

TÍTULO. Desarrollo de nutraceuticos a partir de semillas para el tratamiento de la obesidad y alteraciones relacionadas a nivel hepático. Efecto combinado de un protocolo de entrenamiento interválico de alta intensidad.

TITLE. Development of nutraceuticals from seeds for the treatment of obesity and related liver disorders. Combined effect of a high-intensity interval training protocol.

Alejandro García Beltrán

Departamento de Fisiología

Facultad de Farmacia

Universidad de Granada

**Programa de Doctorado en Nutrición y Ciencias de los
Alimentos**



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

Directoras:

María López-Jurado Romero de la Cruz

Rosario Martínez Martínez

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Alejandro García Beltrán
ISBN: 978-84-1195-596-6
URI: <https://hdl.handle.net/10481/97607>

El trabajo de investigación que constituye esta Tesis Doctoral, titulada: **“Desarrollo de nutracéuticos a partir de semillas para el tratamiento de la obesidad y alteraciones relacionadas a nivel hepático. Efecto combinado de un protocolo de entrenamiento interválico de alta intensidad”**, se ha financiado gracias a la ayuda recibida por el proyecto del Plan Nacional de I+D+i “Retos de Investigación” del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades RTI2018-100934-B-I00 *“Desarrollo de nutracéuticos a partir de semillas para el tratamiento de la obesidad y alteraciones relacionadas. Efecto combinado de un protocolo de entrenamiento interválico de alta intensidad (NUTRISEEDDEX)”*. Los investigadores principales de este proyecto son la Dra. Pilar Aranda Ramírez y el Dr. Jesús María Porres Foulquie. Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Fisiología, Facultad de Farmacia, en el Instituto de Nutrición y Tecnología de los alimentos “José Mataix” y el Instituto Mixto Universitario Deporte y Salud de la Universidad de Granada.

“Nada en la vida es para ser temido, es sólo para ser comprendido. Ahora es el momento de entender más, de modo que podamos temer menos”

Marie Curie

Agradecimientos

Quién me conozca sabe que soy un tipo raro, al que las cosas raras le hacen feliz, por lo que este apartado no iba a ser diferente. No hay normas establecidas en la redacción del mismo, por lo que utilizaré mi propio estilo intentando no desviarme mucho del camino de la formalidad. Y en relación a esto, me gustaría comenzar citando a Antonio Machado: “Caminante, son tus huellas el camino y nada más; caminante, no hay camino, se hace camino al andar”. Me parece que es una descripción muy apropiada de toda esta etapa, ya que ha sido un largo camino hasta poder llegar a este punto, en la que he aprendido y vivido muchas cosas. Hace prácticamente cuatro años que empecé el sendero, sin saber muy bien que me iba a encontrar en él, con una gran parte de emoción, porque me iba a dedicar a la ciencia, pero con otra parte de miedo porque iba a comenzar un DOCTORADO, eso que nos habían dicho que daba tanto miedo. Sin embargo, no puedo estar más agradecido de haberme decidido a dar el primer paso, y eso es debido a todas las personas que me han acompañado en él y de las que estoy eternamente agradecido. Espero no olvidarme de ninguna.

En primer lugar, me gustaría agradecerles a mis padres, *Isabel* y *Manuel*, todo el esfuerzo que han realizado durante años para que yo pueda estar hoy aquí. Sobre todo, me gustaría agradecerles toda la libertad que me han dado, a lo largo de mi vida, para poder elegir mi propio camino y que me ha hecho ser la persona que soy hoy día. También me gustaría darle las gracias a *Mari*, que me crió como a un hijo y a *Juanan*, por continuar una amistad que comenzó cuando teníamos 2 años.

Durante esta etapa he formado otra “familia” muy especial sin la que esto nunca habría sido posible y a la que les estoy eternamente agradecidos por darme esta oportunidad. En primer lugar, tengo que darles las gracias a mis dos directoras de tesis *María* y *Chari* por todo lo que me han enseñado. *María* muchas gracias por todo, por estar siempre para todo lo que he necesitado. No te haces una idea de la profunda admiración que siento por ti, tanto personal como profesionalmente, en cada reunión que teníamos era invaluable la cantidad de aprendizaje que obtenía; eran auténticas clases magistrales. Me gustaría agradecerte el trato que has tenido conmigo siempre, actuando en ocasiones más como una madre que como mi directora, sobre todo cuando me dabas comida para que no pasara hambre. *Chari*, que aparte de ser una de mis

directoras de tesis la considero una amiga. Aunque sé que a ella no le gusta que se lo diga, también ha ejercido un poco de madre durante toda esta etapa. Siempre ha estado y me ha apoyado en todo lo que he necesitado, y me ha cuidado como si fuera uno más de su familia, aunque eso haya derivado en anécdotas graciosas y visitas al hospital. Me gustaría darte las gracias especialmente por ser tal y como eres, dejarme ser yo mismo en el laboratorio y, sobre todo, por siempre tener una sonrisa y hacer que vaya feliz al laboratorio. Además, tengo que darte las gracias por aguantarme que sé que no es fácil y por no desistir ante mis múltiples “preguntitas”. Aunque en esta tesis doctoral oficialmente figuren 2 directores de tesis, esto no habría sido posible sin *Jesús*, de verdad, no sé qué haríamos sin ti... Muchas gracias por estar siempre pendiente de todo y a todas horas. Siempre estabas disponible para resolverme alguna de mis dudas. *Jesús*, nunca dejará de sorprenderme la facilidad con la que haces las cosas, tu inteligencia y buena memoria, pero sobre todo la persona tan cercana y humilde que eres. Gracias por todo y más, por todas las palabras de admiración que siempre me brindas y que significan mucho para mí y me hacen sentir que valgo mucho. Te admiro enormemente. Como no, tengo que darle las gracias (ευχαριστώ πολύ) a mi griega favorita, *Gary*. Lo que más me gustaría destacar de ti es tu felicidad y la felicidad que transmites a los demás. Eres una persona que escucha activamente a las personas y te preocupas por ellas, y las intentas animar. Muchas gracias por ser así conmigo desde el primer día. Y aunque ahora estés en Barcelona, siento que vas a estar para lo que haga falta. Te echamos mucho de menos. Y los pocos momentos que tenemos juntos ahora, son los de la “Maldita Revisión”, aunque espero que acabemos ya con ella jejeje. No podría olvidarme de *Pilar*, lo que más me sorprende de ti es tu capacidad de trabajo, energía y fortaleza, a la par que tu cercanía personal. Es algo que realmente me fascina. Aunque tuvieras muchas obligaciones que atender por tu situación de Rectora, siempre te has preocupado porque todo estuviera bien y saliera adelante. Eres un claro ejemplo de liderazgo, y del que he aprendido mucho. Muchas gracias a *Aida* por haberme ayudado en todo lo que he necesitado en el laboratorio. A todos vosotros, solo me queda decir que sois unas personas espectaculares y agradecer todo este tiempo juntos, por hacerme sentir querido, valorado y respetado, y por haber formado esta familia.

Ya veo a *Ana* preocupada y enfadada conmigo porque no la he mencionado en el párrafo anterior, pero no te preocupes que tú vas a tener un párrafo para ti sola. Era eso

o llevarme alguna reprimenda por tu parte. Aunque tú y yo no empezamos con muy bien pie, porque tú pensabas que yo era un sabelotodo y yo que tú eras una borde, al final hemos acabado queriéndonos. Tú eres participe de la familia que he mencionado anteriormente y has hecho que mis días sean más bonitos. Ya te lo dije una vez, pero eres la hermana que nunca he tenido. Bueno, más bien la hermana mayor que nunca he tenido, pero dejaré el chiste de la edad para otro momento. Has sido un apoyo muy importante durante esta etapa tan complicada, ayudándome en todo lo que he necesitado y sobre todo actuando en ocasiones como mi psicóloga.

A quién tengo que dedicarles otro párrafo es a *Luismi* y a *Pedro*. De *Luismi* me gustaría destacar su calidad humana y que siempre te has ofrecido a ayudar en todo lo que hemos necesitado. Has sido uno de los impulsores de los “jueves al sol” y te lo agradezco enormemente, ya que nos servía de liberación y desconexión. Además, eres de los pocos a los que le hace gracia mi humor, o al menos te ríes por compromiso. Muchas gracias por todo, ya sabes que para mí eres “pura fantasía”. Si tenemos que hablar de mal humor, en eso destaca *Pedro*. Ojalá pudiéramos pasar más tiempo juntos, porque me divierto mucho contigo y compartimos el mismo humor. Me gustaría agradecerte el aguantarme, que sé que es complicado porque soy muy exigente y voy a tres mil revoluciones. Tú me has enseñado a que a veces es necesario levantar el pie del acelerador. Espero de corazón que nuestro proyecto juntos salga adelante, porque confío mucho en nosotros y sé que somos capaces de lograrlo, y de contribuir a la sociedad con él.

Tengo que darles las gracias a todas las personas que han estado involucradas en este trabajo de una forma u otra. Muchas gracias a *Francisco Arrebola* (*Paco*) y a *Juanmi* por abrirme las puertas de su despacho y laboratorio. A *Paco* le estoy infinitamente agradecido por todo el tiempo que me ha dedicado para enseñarme a analizar la histología del hígado y por las charlas personales que hemos podido tener. A *Juanmi* me gustaría agradecerle el trato que ha tenido conmigo y todas las cosas que me has enseñado. Me fascina lo abierto que eres. A *Susana* son pocas las palabras de gratitud que puedo decirte. Lo primero, muchas gracias por haberme acogido en tu laboratorio durante mi periodo en el máster, y lo segundo, muchas gracias por ser como eres, es muy fácil trabajar contigo. Gracias por ayudarnos con todo y por recibirnos con una sonrisa siempre. A toda la gente de la unidad de experimentación animal, pero

especialmente a *Leticia* y *Ana Nieto* por ayudarnos en todo momento con los experimentos con los animales y por estar pendientes del bienestar tanto de ellos como de nosotros. A *Ana Fernández* y *Mila* por estar siempre ahí cuando necesitábamos vuestra ayuda. A *Eduardo Andrés-León* y *Laura Terron-Camero* por su inestimable ayuda con los análisis bioinformáticos. A *Cristina Mesas* y *Kevin* por brindarnos siempre vuestra ayuda. A *Francisco Bértmudez*, no solo por facilitarme el material vegetal para la realización de esta tesis doctoral, sino también por tratarme como uno más y brindarme su conocimiento y hacerme reflexionar sobre muchos temas de la vida.

Durante mi estancia en Lisboa, tengo que darles las gracias, en primer lugar, a *Rui Castro*, por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio. Tengo que agradecerle tu cercanía conmigo y la confianza que depositaste en mí desde el primer día. Te estoy muy agradecido por tu ayuda en todo, tanto durante mi estancia allí, como hoy día. Fue una etapa muy bonita y ya sabes que te considero un buen amigo. Durante esta etapa también tengo que darle las gracias a *André Simão*, *André Santos*, *Marta Afonso*, *Joana Amaral* y *Vanda Marques* por brindarme vuestra ayuda en el laboratorio. A *Miguel Pinheiro* por ser mi "tercer tutor" en el laboratorio y por las clases de portugués. A "mi querido" *André Cardador*, ya sabes que mi "vida vida" es totalmente diferente sin ti. A *Mariana* por hacerme más divertida mi estancia allí, "en plan tía", muchas gracias. A *Daria* por las sesiones de terapia en el laboratorio. A *Inês* por ayudarme siempre en todo, especialmente, en la sala de cultivos. A *Kainat* por enseñarme a vivir la vida con humor y por crear los "funchs". Muchas gracias a *Laura*, aunque me mandaran al búnker los días que no estabas en Donosti, que eso no era muy a menudo. A mi hermano italiano de última hora *Roberto*, gracias por ser tan cercano. Y, por último, gracias a *Fabiola*, creo que sobran las palabras contigo. Gracias por ser como eres, y por regalarnos tu sonrisa cada día en el laboratorio. Fuera del laboratorio tengo que darle las gracias a *Álvaro Robayna*, por hacer mi tiempo en Lisboa tan especial, después de tanto tiempo sin vernos, pero nuestra amistad siguió intacta. A *Franchi* por querer siempre darme lo mejor de él y amenizarme mi tiempo allí con sus peleas con *Álvaro*. A todos los integrantes del "Cool Flat", gracias a *Nico*, *Ella*, *Chrissy*, *Nikos*, *Kostis* y *Fernanda* que hicistéis que mi tiempo en Lisboa fuera tan especial.

Por otro lado, me gustaría darle las gracias a personas que no han tenido una implicación científica en este trabajo, pero que sin ellas este no habría sido posible.

Muchas gracias a *Carmen, Alicia, Jesús, Nani, Miguel, Raúl, Pilar y Juani* por facilitarnos nuestro trabajo en el IMUDS. A todos los técnicos de Imangener y, especialmente, a *Antonio* por su labor en las reparaciones de las incidencias eléctricas, que no son pocas. Me gustaría destacar a otra persona que me ha acompañado durante esta etapa, que no es otra, que mi psicóloga *Ana Piñar*. Muchas gracias por hacerme ver la vida de otra manera y por hacerme ver lo valioso que soy.

Los siguientes, pero no menos importantes, son todos mis amigos que me han acompañado a lo largo de este camino. Son tantos a los que tengo que agradecer que no sé ni por dónde empezar. Al final la broma de que tengo muchos cumpleaños va a ser verdad. Primero, gracias a todos mis compañeros “del Capellanía”, *Carlos, Farfán, López, Molina, Jose, Miguel, Pablo Manuel, Juanma y Fénix* gracias por estar siempre ahí. A mi grupo de la “Asociación”, *Luis, Andrés, Guille, Alvarito, Molina 2.0, Agüera y Laura* por hacérmelo pasar tan bien cada vez que vuelvo a casa y apoyarme en todo. Aun así, ya os vale que todavía no hayáis venido a verme a Granada. A mi “compitruena” *Ana*, por ser mi mejor amiga y aguantarme. A *Álvaro y Trujillo* por ayudarme en todo lo que he necesitado y siempre darme otra visión de las cosas. A *Adri*, has sido uno de los mayores apoyos durante esta etapa y mi vida, muchas gracias por siempre escucharme y ser tan empático conmigo. Posiblemente seas la persona que más me haya tenido que aguantar. A mi grupo de amigos del grado en Biotecnología, ya sabéis *David, Corral, Abel, José Luis, Martín y Miguel* que sois mis hermanos, pero de diferentes madres. Quién nos iba a decir que al final alguno de nosotros acabaría defendiendo su Tesis Doctoral. Gracias por haberme hecho pasar unos de los mejores años de mi vida y mil aventuras, especialmente con *David*, cosas de ser compañeros de piso. En particular, me gustaría agradecer a *Corral* todo lo que has hecho por mí y ser un apoyo constante en mi vida. También me gustaría darles las gracias a *Andrea, Bárbara y Ángela* porque nuestra amistad sigue intacta desde el grado.

Bárbara y Ángela, quién nos iba a decir a nosotros durante la carrera que acabaríamos viviendo los tres en Granada, y encima, junto a *Fran Lara*. Os quiero dar las gracias a todos porque ese año fue espectacular y dejamos muchas cosas para el

recuerdo. Os echo mucho de menos. A *Bárbara*, nuevamente, y a *Fran Hernández* muchas gracias por estar siempre pendiente de mí.

Jose y Molina, nuevamente, os tengo que dar las gracias. Quién se iba a imaginar durante el instituto que acabaríamos viviendo juntos los tres. Ese piso y ese año fue una locura, y aunque no pudimos grabar esa película que tanto quería la gente, espero que cada uno estemos grabando una buena película de nuestra vida. Durante ese año juntos, me llevo a mucha gente, como a *Rocío, Alba, Antonio, Carmen* y *Jose Bueno* a las que tengo que dar las gracias, por ser tan buenas personas conmigo y vivir tantas cosas juntos. Como no, a “mi gordita” *Inma* por volverte un pilar importantísimo en vida y volverte como una hermana, siempre que necesito ayuda recurro a ti. Os echo mucho de menos.

A la peña de fútbol “*Granada Galaxy*”, que pese a haber sido un fichaje de última incorporación, me habéis tratado como uno más de vuestra familia y me habéis ayudado enormemente a desconectar durante este último año cada domingo.

No podría olvidarme de *Mari*, admiro mucho de ti tu capacidad de resiliencia y trabajo, así como, lo mucho que te preocupas tanto por mí como por los demás. Has sido un apoyo muy importante.

Finalmente, me queda darle las gracias a “*Científicos y Anexos*”, que actualmente son las personas con las que más tiempo paso. En primer lugar, tengo que darle las gracias a *Fran*, por aguantarme día a día en el piso y por todo lo que hace por mí. Del “laboratorio de arriba” gracias a *Merche, Ana Cepero, Bea, Alba, Cristina Luque, Patri, Bea* y *Laura Caselles* por estar ahí y apoyarme en todo lo que he necesitado. De los “*Anexos*” tendría que darle las gracias a *Carlos, Víctor, Luis* y *Andrés* por ser unas personas muy cercanas, que se han preocupado por mí en todo momento. Por último, me gustaría destacar a *Lidia* y *Olga* al ser uno de mis mayores apoyos actualmente, gracias por escucharme, entenderme y no juzgarme.

Este trabajo no me pertenece sólo a mí por todo lo comentado anteriormente. Hay tantas personas que han estado involucradas directa o indirectamente y tanto profesional como personalmente, que estas palabras de agradecimiento, escasas

incluso, eran lo mínimo que podría hacer por ellos. Espero no haberme olvidado de ninguna de ellas. Me considero una persona muy afortunada por toda la gente que me apoya y por toda la gente con la que he podido colaborar y coincidir durante este camino. Me gustaría acabar parafraseando a Nino Bravo, ya que todos vosotros, habéis hecho que el equipaje haya sido ligero para tan largo viaje.

ÍNDICE

Resumen.....	1
Summary	4
1 Introducción.....	10
1.1 Obesidad	10
1.1.1 Definición.....	10
1.1.2 Subtipos de obesidad	11
1.1.3 Prevalencia	12
1.1.4 Mortalidad	13
1.1.5 Desequilibrio energético	14
1.1.6 Factores de riesgo.....	16
1.1.7 Adipogénesis.....	25
1.2 Metabolismo lipídico	28
1.2.1 Síntesis de ácidos grasos: Lipogénesis <i>de novo</i>	28
1.2.2 Degradación de ácidos grasos: Lipólisis y β -oxidación.....	30
1.3 Resistencia a la insulina	33
1.4 Inflamación	35
1.5 Lipotoxicidad.....	38
1.6 Disfunción mitocondrial y especies reactivas de oxígeno	39
1.7 Principales patologías asociadas.....	43
1.7.1 Diabetes mellitus.....	43
1.7.2 Enfermedades cardiovasculares	45
1.7.3 Enfermedad del hígado graso no alcohólico.....	47
1.7.4 Síndrome metabólico	50
1.7.5 Cáncer	52
1.8 Otras patologías asociadas.....	53
1.9 Tratamientos contra la obesidad	57

1.9.1	Tratamientos no farmacológicos.....	57
1.9.2	Tratamientos farmacológicos.....	67
1.9.3	Tratamiento quirúrgico	71
2	Hipótesis y Objetivos	72
3	Material y Métodos	73
3.1	Material vegetal	73
3.2	Extractos funcionales.....	75
3.2.1	Hidrolizados proteicos.....	75
3.2.2	Extractos etanólicos	76
3.3	Pruebas de capacidad antioxidante	77
3.3.1	Determinación de los compuestos fenólicos totales	77
3.3.2	Determinación de la capacidad de captación del radical ABTS ⁺	77
3.3.3	Determinación de capacidad reductora de hierro.....	78
3.3.4	Determinación de la capacidad quelante de Fe	78
3.3.5	Capacidad de inhibición de la peroxidación lipídica	79
3.4	Formulación del nutracéutico	80
3.5	Digestibilidad <i>in vitro</i> en continuo.....	81
3.6	Identificación de compuestos bioactivos.....	84
3.6.1	Compuestos fenólicos.....	84
3.6.2	Péptidos bioactivos	85
3.7	Experimentos en cultivos celulares	86
3.7.1	Líneas celulares.....	86
3.7.2	Tratamiento del nutracéutico para ensayos <i>in vitro</i>	88
3.7.3	Capacidad antioxidante <i>in vitro</i> del nutracéutico	88
3.7.4	Ensayo <i>in vitro</i> del nutracéutico sobre la lipotoxicidad.....	90
3.7.5	Determinación de acumulación de triglicéridos.....	92
3.7.6	Determinación de la viabilidad celular: MTT y MTS	93

3.7.7	Determinación de la muerte celular: LDH	94
3.7.8	Determinación de toxicidad: TOXILIGHT	94
3.7.9	Extracción de ARN	94
3.7.10	Retrotranscripción y qPCR: mi-ARN	95
3.7.11	Retrotranscripción y qPCR: ARNm	97
3.8	Ensayos <i>in vivo</i>	98
3.8.1	Fase 1: Desarrollo de un modelo de obesidad inducida por la dieta	98
3.8.2	Fase 2: Tratamiento de la obesidad mediante combinación del nutracéutico y HIIT.....	116
3.9	Análisis estadístico.....	129
4	Resultados.....	130
4.1	Pruebas de capacidad antioxidante	130
4.1.1	Hidrolizados proteicos y extractos etanólicos	130
4.1.2	Formulación nutracéutica	135
4.1.3	Digestibilidad <i>in vitro</i> en continuo.....	135
4.2	Identificación de compuestos bioactivos.....	137
4.2.1	Compuestos fenólicos	137
4.2.2	Péptidos bioactivos	137
4.3	Experimentos en cultivos celulares	149
4.3.1	Viabilidad celular con formulación nutracéutica.....	149
4.3.2	Capacidad antioxidante <i>in vitro</i> de la formulación nutracéutica	151
4.3.3	Ensayo <i>in vitro</i> del nutracéutico sobre la lipotoxicidad	153
4.3.4	Determinación de acumulación de triglicéridos	154
4.3.5	Retrotranscripción y qPCR: mi-ARN	155
4.3.6	Retrotranscripción y qPCR: ARNm	156
4.4	Ensayos <i>in vivo</i>	157
4.4.1	Fase 1: Desarrollo de un modelo de obesidad inducida por la dieta	157

4.4.2 Fase 2: Tratamiento de la obesidad mediante combinación del nutracéutico y HIIT.....	188
5 Discusión.....	236
6 Conclusiones	265
6 Conclusions	267
7 Limitaciones	268
8 Referencias bibliográficas	270

ACRÓNIMOS

ACC1	Acetil-coa carboxilasa 1
ACLY	ATP-citrato liasa
ADIPOQ	Adiponectina
AG	Ácidos grasos
AGCC	Ácidos grasos de cadena corta
AGL	Ácidos grasos libres
AGRP	Proteína relacionada con la agutina
AHA	Asociación Americana del Corazón
AIN	<i>American Institute of Nutrition</i>
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ATGL	Lipasa adipocítica de triglicéridos
BAT	Tejido adiposo pardo
C/EBP-α	Proteína de unión a potenciador CCAAT alfa
CAT	Catalasa
ChREBP	Proteína de unión a elementos de respuesta a carbohidratos
CPT	Carnitina palmitoiltransferasa
DAG	Diacilglicerol
DBC	Dietas bajas en calorías
DIO	Obesidad inducida por la dieta
DMBC	Dietas muy bajas en calorías
DMT2	Diabetes mellitus de tipo 2
DNL	Lipogénesis <i>de novo</i>
ECV	Enfermedades cardiovasculares
EMA	Agencia Europea de Medicamentos
ENT	Enfermedades no transmisibles
ES	Estatus socioeconómico
EtOH	Etanol
FABP	Proteína de unión a ácidos grasos
FASN	Ácido graso sintasa
FATP1	Proteína transportadora de ácidos grasos 1
FBS	Suero bovino fetal

FDA	<i>Food Drug Administration</i>
GLP1	Péptido similar al glucagón tipo 1
GLP1-R	Receptor del péptido similar al glucagón tipo 1
GLP1-RA	Agonista del receptor del péptido similar al glucagón tipo 1
GLUT	Transportador de glucosa
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GST	Glutación S-transferasa
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HIIT	Entrenamiento interválico de alta intensidad
HMGCR	3-hidroxi-3-metilglutaril-co-enzima A reductasa
HSL	Lipasa sensible a hormonas
IGF-1	Factor de crecimiento similar a la insulina 1
IKK	Proteínas inhibidor de la cinasa kappa B
IL	Interleucina
IMC	Índice de Masa Corporal
IR	Receptor de insulina
IRS	Sustrato del receptor de insulina
JNK	Cinasas c-Jun N-terminal (JNK)
LDH	Lactato deshidrogenasa
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LEP	Leptina
LPS	Lipopolisacárido
LXRs	Receptores X hepáticos
MAFLD	Enfermedad del hígado graso asociada a disfunción metabólica
MAG	Monoacilglicerol
MAO	<i>Metabolically abnormal obese</i>
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
MC4R	Receptor de melanocortina-4
MetS	Síndrome metabólico
MGL	Lipasa de monoglicéridos
MHO	<i>Metabolically healthy obese</i>
MONW	<i>Metabolically obese normal weight</i>

NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NAFLD	Enfermedad del hígado graso no alcohólico
NASH	Esteatohepatitis no alcohólica
NCD-RisC	<i>Ncd risk factor collaboration</i>
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NQO1	NAD(P):Ubiquinona oxidorreductasa
OMS	Organización Mundial de la Salud
OS	Estrés oxidativo
PGC	Proliferador de peroxisomas
PI3K	Fosfatidilinositol-3 cinasa
PKC	Proteína cinasa C
POMC	Pro-opiomelanocortina
PPAR	Receptor activado por el proliferador de peroxisomas
PQ	Paraquat
Prx	Peroxiredoxinas
RE	Retículo endoplasmático
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SCD1	Estearil-coa 1-desaturasa
SO	<i>Sarcopenic obesity</i>
SOD	Superóxido dismutasa
SREBP	Proteína de unión a elementos reguladores de esteroides
TCA	Ácido tricarbóxico
TG	Triglicéridos
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF-α	Factor de necrosis tumoral
TR	Tiorredoxina reductasa (TR)
UCP1	Proteína desacoplante 1
UE	Unión Europea
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
WAT	Tejido adiposo blanco

Resumen

La obesidad y el sobrepeso se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud. Esta patología, además, es uno de los principales factores de riesgo para la resistencia a la insulina o la diabetes tipo II, la enfermedad de hígado graso no alcohólico, las enfermedades cardiovasculares, la hipertensión, los accidentes cerebrovasculares y varios tipos de cáncer. *The World Obesity Federation* indicó que para el año 2035, se estima que el 54 % de la población adulta mundial presente alguna de estas patologías.

La obesidad es debida fundamentalmente a un desequilibrio entre la ingesta de calorías y el gasto energético. El exceso de energía, que normalmente proviene del aumento del consumo de grasas saturadas y azúcares refinados, se almacenará en forma de triglicéridos en el interior de los adipocitos, favoreciendo la síntesis de nuevos ácidos grasos (lipogénesis *de novo*) y disminuyendo la capacidad de la β -oxidación de los ácidos grasos. Además, esta patología favorece el desarrollo de resistencia a la insulina, que afecta negativamente a la captación, el metabolismo o el almacenamiento de glucosa por parte de los tejidos diana como el músculo esquelético, el hígado y el tejido adiposo. Todas estas alteraciones generan diferentes complicaciones en el organismo como son la inflamación, lipotoxicidad, disfunción mitocondrial y estrés oxidativo, entre otras. Otro aspecto importante sobre el efecto deletéreo del desarrollo de la obesidad, y que ha cobrado gran importancia en la actualidad, es que los ambientes obesogénicos promueven una alteración de la microbiota intestinal, produciendo lo que se conoce como disbiosis. En general en individuos obesos, se ha comprobado que existe un aumento de la proporción Firmicutes/Bacteroidota que provoca un mayor aprovechamiento de la energía calórica a partir de la fermentación de glúcidos dietéticos, los cuales pueden ser utilizados para la lipogénesis hepática.

Actualmente, los principales tratamientos para la obesidad están centrados en intervenciones que contribuyan a disminuir el aporte o a aumentar el gasto energético. Entre estas estrategias, las más recomendadas son la restricción de la ingesta dietética o la realización de ejercicio físico. Además, se deben modificar tanto la calidad como la naturaleza de los alimentos. En este sentido, es recomendable combinar la ingesta de compuestos bioactivos que puedan potenciar los efectos metabólicos asociados a la pérdida de peso. Estos componentes bioactivos pueden obtenerse a partir de la

elaboración de extractos funcionales procedentes de vegetales, que puedan administrarse como nutracéuticos. Resulta de especial interés, la obtención de estos compuestos bioactivos a partir de residuos de la industria agroalimentaria como podrían ser las semillas que han perdido su capacidad de germinación, y que terminan siendo tratadas como un residuo. Esto proporcionaría valor añadido a estos nutracéuticos, ya que contribuirían a la sostenibilidad medioambiental a través del concepto de economía circular. En algunas ocasiones es necesaria la utilización de tratamientos farmacológicos. Entre ellos, en la última década, los agonistas del receptor del péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1), como la semaglutida, han centrado la atención de la industria farmacéutica por su acción antidiabética y frente a la obesidad.

Por todo lo comentado anteriormente, el objetivo general de esta tesis doctoral fue contribuir a la prevención y manejo de patologías crónicas relacionadas con la obesidad derivadas de hábitos alimentarios y de estilo de vida poco saludables a través de diferentes intervenciones individuales o combinadas (nutracéutico derivado de semillas y ejercicio físico vs tratamiento farmacológico) y promover estrategias de sostenibilidad ambiental.

Para ello, el trabajo de esta tesis doctoral se dividió en dos fases: 1) con el objetivo de desarrollar en ratas Sprague-Dawley el modelo experimental de obesidad inducido por la dieta idóneo para el estudio de las alteraciones asociadas como la enfermedad hepática no alcohólica, la resistencia a la insulina y disbiosis intestinal; y 2) con el objetivo de ensayar el efecto de diferentes intervenciones (sobre una aplicación de restricción calórica): nutracéutico desarrollado a partir de semillas, protocolo de entrenamiento interválico de alta intensidad y fármaco agonista del receptor de GLP-1, en las alteraciones inducidas por la obesidad. Además, se estudió el efecto combinado del protocolo de entrenamiento con la administración del nutracéutico o la administración del fármaco agonista del receptor de GLP-1.

En esta primera fase, para el desarrollo idóneo del modelo experimental animal de obesidad inducido por dieta, se suministró una dieta alta en grasa y fructosa en el agua de bebida a medio (13 semanas) y largo plazo (21 semanas). Como cabría esperar, el consumo de esta dieta obesogénica produjo un incremento del peso corporal, así como, las esperadas alteraciones asociadas de esteatosis hepática, estrés oxidativo, resistencia a la insulina y disbiosis intestinal. La diferente duración del periodo experimental nos

mostró que los mecanismos de acúmulo de grasa hepática fueron distintos: mediante la lipogénesis de *novo* a medio plazo, o la alteración del catabolismo de ácidos grasos por β -oxidación, a largo plazo.

Para conseguir los objetivos de la segunda fase de trabajo, se realizó un *screening* sobre 25 semillas vegetales, un residuo de la industria agroalimentaria como la pulpa del *Argania spinosa* y las hojas de *Salicornia* spp. mediante la preparación de extractos funcionales (extractos etanólicos y/o hidrolizados proteicos) con el objetivo de seleccionar aquellos que mostrasen una mayor capacidad antioxidante y rendimiento de extracción para la formulación y el desarrollo de un nutracéutico. Este nutracéutico, fue sometido a un proceso de digestibilidad *in vitro*, y se evaluó su capacidad antioxidante tanto mediante pruebas químicas, como en las líneas celulares HT-29 y HepG2. Además, se evaluó su capacidad para disminuir la acumulación de triglicéridos y la lipotoxicidad en la línea celular AML12. Finalmente, se identificaron de forma tentativa, los compuestos y péptidos bioactivos presentes en el nutracéutico mediante UPLC y HPLC, respectivamente.

En segundo lugar y en base a los resultados obtenidos en la fase anterior, para el ensayo *in vivo*, se seleccionó un periodo experimental de 16 semanas de duración: 8 semanas de inducción de la obesidad y 8 semanas de tratamiento con la administración del nutracéutico, la realización del protocolo de entrenamiento y la inyección del fármaco semaglutida.

Los principales resultados de esta fase mostraron una alta capacidad antioxidante de los extractos funcionales preparados, y un alto rendimiento de extracción que condicionó la selección de extractos para la formulación y desarrollo del nutracéutico. Este nutracéutico mostró un amplio perfil de compuestos bioactivos que le confirieron un potente efecto antioxidante y antiesteatótico. Además, el nutracéutico no mostró toxicidad celular y el proceso de digestión *in vitro* realizado confirmó su alta bioaccesibilidad.

La administración del nutracéutico en el modelo experimental animal de obesidad desarrollado mostró una disminución en la actividad de las enzimas antioxidantes hepáticas, lo que corroboró su potente efecto antioxidante encontrado en los ensayos *in vitro*. Además, su consumo produjo una reducción en la resistencia a la

insulina, disminuyendo el área bajo la curva tras la realización de una prueba de sobrecarga oral a la glucosa, (con mayor eficacia incluso que la administración del fármaco semaglutida). Los efectos beneficiosos del nutraceutico también se vieron reflejados por su efecto antiinflamatorio, la aminoración del desequilibrio en el metabolismo lipídico y por su marcado efecto prebiótico al disminuir la proporción Firmicutes/Bacteroidota. En cuanto a la administración del fármaco semaglutida, éste promovió la reducción de la esteatosis hepática, pero mostró efectos secundarios ya que tuvo una acción hipercolesterolemizante, así como, prooxidante en hígado, y proinflamatorio en tejido adiposo y, especialmente, en el colon, donde contribuyó a la disbiosis intestinal. Por último, el protocolo de ejercicio físico contribuyó de manera eficaz no sólo en la pérdida de peso corporal, sino también en la grasa hepática a través de la activación de las rutas lipolíticas. La combinación de la práctica de ejercicio físico con la administración del nutraceutico y la semaglutida, mejoraron la funcionalidad cardiopulmonar ya que mejoraron la capacidad aeróbica de los animales; además el protocolo de entrenamiento contrarrestó los efectos negativos que la administración del fármaco promovió sobre el estrés oxidativo a nivel del tejido hepático.

Finalmente, y a modo de conclusión, podemos decir que todas las intervenciones ensayadas fueron beneficiosas para el tratamiento de la obesidad inducida por la dieta a través de la pérdida de peso corporal o mayoritariamente a través de los efectos encontrados a nivel metabólico. A la dosis ensayada, el nutraceutico podría ser una importante herramienta terapéutica produciendo efectos beneficiosos a distintos niveles en el organismo y contribuyendo a recuperar la salud. Este efecto se vería potenciado por la práctica de ejercicio físico.

Summary

Obesity and overweight are defined as an abnormal or excessive accumulation of fat that can be detrimental to health. It is also a major risk factor for insulin resistance or type II diabetes, non-alcoholic fatty liver disease, cardiovascular diseases, hypertension, stroke and several types of cancer. The World Obesity Federation estimated that 54 % of the world's adult population by 2035 will have one or more of these conditions.

Obesity is mainly due to an imbalance between calorie intake and energy expenditure. Excess energy, which normally comes from increased consumption of

saturated fats and refined sugars, will be stored in the form of triglycerides inside adipocytes, favouring the synthesis of new fatty acids (*de novo* lipogenesis) and decreasing the capacity for β -oxidation of fatty acids. In addition, this pathology favours the development of insulin resistance, which negatively affects the uptake, metabolism or storage of glucose by target tissues such as skeletal muscle, liver and adipose tissue. All these alterations lead to various complications in the body such as inflammation, lipotoxicity, mitochondrial dysfunction and oxidative stress, among others. Another important aspect of the deleterious effect of the development of obesity, which has gained great importance nowadays, is that obesogenic environments promote an alteration of the intestinal microbiota, producing what is known as dysbiosis. In general, in obese individuals, it has been shown that there is an increase in the Firmicutes/Bacteroidota ratio that leads to a greater use of caloric energy from the fermentation of dietary carbohydrates, which can be used for hepatic lipogenesis.

Currently, the main treatments for obesity are focused on interventions that contribute to decreasing energy intake or increasing energy expenditure. Among these strategies, the most recommended are restriction of dietary intake or physical exercise. In addition, both the quality and the nature of food should be modified. In this regard, it is recommendable to combine the intake of bioactive compounds that can enhance the metabolic effects associated with weight loss. These bioactive compounds can be obtained from the production of functional plant extracts that can be administered as nutraceuticals. It is of particular interest to obtain these bioactive compounds from waste from the agri-food industry, such as seeds that have lost their germination capacity and end up being treated as waste. This would provide added value to these nutraceuticals, as they would contribute to environmental sustainability through the concept of circular economy. The use of pharmacological treatments is sometimes necessary. Among them, in the last decade, glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor agonists, such as semaglutide, have focused the attention of the pharmaceutical industry for their anti-diabetic and anti-obesity action.

In view of the above, the **main objective** of this doctoral thesis was to contribute to the prevention and management of obesity-related chronic pathologies derived from unhealthy eating habits and lifestyle through different individual or combined

interventions (seed-derived nutraceutical and physical exercise vs. pharmacological treatment) and to promote environmental sustainability strategies.

To this end, the work of this doctoral thesis was divided into two phases: 1) with the aim of developing in Sprague-Dawley rats the experimental model of diet-induced obesity suitable for the study of associated alterations such as non-alcoholic liver disease, insulin resistance and intestinal dysbiosis; and 2) with the aim of testing the effect of different interventions (on an application of calorie restriction): nutraceutical developed from seeds, high-intensity interval training protocol and GLP-1 receptor agonist drug, on obesity-induced alterations. In addition, the combined effect of the training protocol with the administration of the nutraceutical or the administration of the GLP-1 receptor agonist drug was studied.

In this first phase, for the ideal development of the experimental animal model of diet-induced obesity, a high-fat high-fructose diet was fed in the drinking water for the mid- (13 weeks) and long term (21 weeks). As expected, the consumption of this obesogenic diet produced an increase in body weight, as well as the expected associated alterations of hepatic steatosis, oxidative stress, insulin resistance and intestinal dysbiosis. The different duration of the experimental period showed us that the mechanisms of hepatic fat accumulation were different: through *de novo* lipogenesis in the medium term, or the alteration of fatty acid catabolism by β -oxidation in the long term.

To achieve the objectives of the second phase of work, 25 plant seeds, a waste product from the agri-food industry such as the pulp of *Argania spinosa* and the leaves of *Salicornia* spp. were screened by preparing functional extracts (ethanolic extracts and/or protein hydrolysates) with the aim of selecting those with the highest antioxidant capacity and extraction yield for the formulation and development of a nutraceutical. This nutraceutical was subjected to an *in vitro* digestibility process, and its antioxidant capacity was evaluated both by chemical tests and in the HT-29 and HepG2 cell lines. In addition, its ability to reduce triglyceride accumulation and lipotoxicity was evaluated in the AML12 cell line. Finally, the bioactive compounds and peptides present in the nutraceutical were tentatively identified by UPLC and HPLC, respectively.

Secondly, based on the results obtained in the previous phase, a 16-week experimental period was selected for the *in vivo* trial: 8 weeks of obesity induction and 8 weeks of treatment with the administration of the nutraceutical, the completion of the training protocol and the injection of the drug semaglutide.

The main results of this phase showed a high antioxidant capacity of the prepared functional extracts, and a high extraction yield that conditioned the selection of extracts for the formulation and development of the nutraceutical. This nutraceutical showed a broad profile of bioactive compounds that conferred a potent antioxidant and anti-steatotic effect. In addition, the nutraceutical showed no cellular toxicity, and the *in vitro* digestion process confirmed its high bioaccessibility.

Administration of the nutraceutical in the developed experimental animal model of obesity showed a decrease in the activity of hepatic antioxidant enzymes, which corroborated its potent antioxidant effect found in the *in vitro* assays. In addition, its consumption produced a reduction in insulin resistance, decreasing the area under the curve following an oral glucose overload test (with greater efficacy than even the administration of the drug semaglutide). The beneficial effects of the nutraceutical were also reflected in its anti-inflammatory effect, the reduction of lipid metabolism imbalance and its marked prebiotic effect by reducing the Firmicutes/Bacteroidota ratio. As for the administration of the drug semaglutide, it promoted the reduction of hepatic steatosis, but showed side effects as it had a hypercholesterolemic action, as well as a pro-oxidant action in the liver, and a pro-inflammatory action in adipose tissue and, especially, in the colon, where it contributed to intestinal dysbiosis. Finally, the physical exercise protocol contributed effectively not only to body weight loss, but also to liver fat through activation of lipolytic pathways. The combination of physical exercise with the administration of the nutraceutical and semaglutide improved cardiopulmonary function by improving the aerobic capacity of the animals; in addition, the training protocol counteracted the negative effects of the drug administration on oxidative stress in the liver tissue.

Finally, and by way of conclusion, we can say that all the interventions tested were beneficial for the treatment of diet-induced obesity through the loss of body weight or mostly through the effects found at the metabolic level. At the dose tested, the nutraceutical could be an important therapeutic tool, producing beneficial effects at

different levels in the body and contributing to the recovery of health. This effect would be enhanced by physical exercise.

1 Introducción

1.1 Obesidad

1.1.1 Definición

La Organización Mundial para la Salud (OMS) (1) define la obesidad y el sobrepeso como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud. Esta es uno de los principales factores de riesgo de muchas enfermedades crónicas, como podrían ser la diabetes, las enfermedades cardiovasculares, la hipertensión y los accidentes cerebrovasculares, así como varios tipos de cáncer. Además, los niños que presentan sobrepeso tienen mayor riesgo de vivir con sobrepeso u obesidad en la edad adulta. La obesidad y el sobrepeso aumentan de forma alarmante cada año, triplicándose su prevalencia desde 1975 hasta alcanzar proporciones pandémicas (1). El diagnóstico del sobrepeso y la obesidad se efectúa mediante el índice de masa corporal (IMC). Este es calculado como el peso corporal (en kilogramos) dividido entre la altura (en metros cuadrados): kg/m^2 . Este índice sirve como marcador indirecto de la grasa, y aunque existen otro tipo de mediciones, como el perímetro de la cintura y la masa grasa central y periférica, se sigue utilizando el IMC para la clasificación de la obesidad (1,2). Uno de los principales problemas del IMC es que no da una idea precisa de la composición corporal y como esta puede afectar a los riesgos para la salud, es incapaz de proporcionar la proporción de peso corporal que consiste en grasa o la distribución de esta (2). Sin embargo, las medidas más precisas de la adiposidad corporal, como el pesaje subacuático, la absorciometría con rayos X de doble energía (DEXA), la tomografía computarizada y la resonancia magnética, no son prácticas para su uso en los encuentros clínicos cotidianos (3). Por lo tanto, el IMC es actualmente el método estándar aceptado internacionalmente (2). Una persona con un IMC igual o superior a $25 \text{ kg}/\text{m}^2$ es considerada con sobrepeso, mientras que igual o superior a $30 \text{ kg}/\text{m}^2$ se considera obesidad. En el caso de los niños, debe tenerse en cuenta la edad al definir esta relación. En 2019, se estima que 5 millones de muertes por enfermedades no transmisibles (ENT) fueron causadas por un IMC superior al óptimo (1), por lo que este índice puede servir como un predictor de fácil accesibilidad para el desarrollo de ciertas patologías. En función del valor de IMC la obesidad se clasifica en (4):

- Sobrepeso (no obesidad), si el IMC es de 25.0 a 29.9 kg/m^2 .
- Obesidad clase 1 o moderada, si el IMC es de 30 a 34.9 kg/m^2 .

- Obesidad clase 2 o severa, si el IMC es de 35 a 39.9 kg/m².
- Obesidad clase 3 o mórbida, si el IMC es igual o mayor a 40 kg/m².

1.1.2 Subtipos de obesidad

Entre los individuos con sobrepeso y obesidad se produce una importante heterogeneidad de fenotipos o subtipos de obesidad, que están directamente relacionados con la participación de moléculas, genes y células, además de factores ambientales, sociales y económicos (5). La distribución de la masa grasa en distintos sitios del cuerpo exhibe una considerable variación individual, y esta se modifica con el envejecimiento. Aunque el principal lugar de deposición de la grasa es la zona subcutánea, incluso en este compartimento corporal la distribución es diferente entre individuos. Existen claras diferencias entre géneros, las mujeres tienden a acumular grasa en las regiones glúteo-femorales, de ahí el nombre de tipo *ginoide*, y los hombres tienden a acumular grasa en el tronco, y principalmente en la zona abdominal, de ahí el nombre de tipo *androide* (6). La obesidad central (también conocida como obesidad visceral) manifiesta un cuerpo en forma de manzana o *androide*, y confiere un mayor riesgo de desarrollar complicaciones metabólicas; mientras que la obesidad periférica da un cuerpo en forma de pera y tiene un fenotipo *ginoide* asociado a un menor riesgo metabólico (5). La acumulación ectópica de grasa, es decir, la deposición en órganos donde no se almacena una cantidad excesiva de grasa, puede ocurrir en el hígado (enfermedad del hígado graso), así como en otros órganos como las células de los músculos esqueléticos y el páncreas, incluyendo los islotes. Estas diferencias de género son sólo tendencias; las mujeres pueden desarrollar el tipo *androide*, especialmente después de la menopausia, y los hombres pueden desarrollar el tipo *ginoide*. En muchas personas con obesidad, sólo hay un exceso general de acumulación de grasa con poco o ningún patrón específico de género (6).

Por otro lado, en función del riesgo metabólico asociado la obesidad puede ser clasificada en 4 grupos o fenotipos (5,7):

1. Obesos metabólicamente sanos (*Metabolically healthy obese*, MHO): aunque todavía no se ha estandarizado una definición de MHO, este grupo incluiría a personas con un IMC elevado y un perfil metabólico saludable: sensibilidad a la insulina conservada, perfil lipídico favorable y niveles plasmáticos bajos de citoquinas proinflamatorias.

2. Obesos metabólicamente anormales (*Metabolically abnormal obese, MAO*): individuos con un IMC superior a 25 kg/m², con sobrepeso u obesidad central y con un perfil metabólico alterado, englobando las antiguas características del Síndrome Metabólico (MetS), como hipertensión arterial y aumento del perímetro cintura-cadera, colesterol de lipoproteínas de alta densidad, triglicéridos, adiponectina y citoquinas proinflamatorias, así como, pueden llegar a presentar resistencia a la insulina. Todo esto se traduce en un mayor riesgo cardiometabólico.
3. Obesos metabólicamente anormales con peso normal (*Metabolically obese normal weight, MONW*): se tratan de individuos con un peso e IMC normal sin signos visuales de obesidad, pero con alteraciones metabólicas similares a pacientes tradicionalmente obesos, incluyendo inflamación crónica de bajo grado. Los fenotipos MUO y MONW difieren genéticamente: en MUO se observan variaciones principalmente en genes que regulan la ingesta de alimentos, mientras que en MONW genes que regulan la diferenciación de los adipocitos, la lipogénesis y la lipólisis.
4. Obesidad sarcopénica (*Sarcopenic obesity, SO*): se caracteriza por una baja fuerza y masa muscular y un incremento en la masa grasa debido a cambios metabólicos derivados de un estilo de vida sedentario, alteraciones del tejido adiposo o comorbilidades crónicas. La pérdida de masa y función muscular esquelética se produce generalmente con el envejecimiento y suele ir acompañada de un aumento relativo o absoluto de la grasa corporal, lo que favorece el posible desarrollo de la osteoartritis. Como consecuencia, estos individuos presentan una mayor tasa de consecuencias adversas para la salud, como caídas y fracturas, movilidad reducida, mala calidad de vida y hospitalización, en comparación con los pacientes con obesidad o sarcopenia aisladas.

1.1.3 Prevalencia

Según una estimación mundial de 2017 realizada por *NCD Risk Factor Collaboration* (NCD-RisC), unos 650 millones de adultos (de un total de 5500 millones de personas) padecían obesidad y 1300 millones sobrepeso, definidos como un IMC igual o superior a 30 y a 25 kg/m², respectivamente (8). Además, se estimó que el 39 % de los

adultos mayores de 18 años mostraban sobrepeso y el 13 % obesidad (9). Generalmente, la prevalencia de la obesidad es mayor en mujeres que en hombres, y más frecuente en los grupos de mayor edad que en los jóvenes. En mujeres, la prevalencia de obesidad oscila entre el 2.7 % y el 65.3 % y en hombres entre el 1.7 % y el 59.9 % (6). Los datos son cada vez más preocupantes, pues *The World Obesity Federation* indicó que el 42 % de la población adulta mundial padecía de sobrepeso u obesidad en el 2020; esto equivaldría a que 1900 millones de adultos padecieron de sobrepeso y 810 millones obesidad. Se estima que para 2035 el 54 % de la población adulta mundial presente alguna de estas patologías, incrementándose el número de adultos obesos por encima de 1500 millones (10). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la prevalencia del sobrepeso varía según la región, desde el 31 % en la Región de Asia Sudoriental y la Región de África hasta el 67 % en la Región de las Américas (1). En cuanto a la población europea, según datos aportados por la Comisión Europea (*European Commission*) se estimó que el 53 % de los adultos europeos mostraban sobrepeso en el año 2019. La proporción de adultos con sobrepeso en la Unión Europea (UE) varió en 2019 entre el 37 % de Italia y el 58 % de Croacia en el caso de las mujeres, y entre el 53 % de Francia y el 73 % de Croacia en el caso de los hombres. En España, la prevalencia en mujeres y hombres fue de 46 % y 62 %, respectivamente. Por otro lado, la proporción de adultos obesos en la UE en 2019 varió entre el 11 % de Italia y el 27 % de Malta en mujeres, y entre el 11 % de Rumania y el 37 % de Malta en el caso de los hombres. En España la prevalencia fue de 15 % en mujeres y 17 % en hombres (9).

1.1.4 Mortalidad

La obesidad se asocia a un aumento significativo de la mortalidad, con una disminución de la esperanza de vida de entre 5 y 10 años (11). Según la OMS, la obesidad ha alcanzado proporciones pandémicas en todo el mundo, y al menos 2.8 millones de personas mueren cada año por sobrepeso u obesidad (12). La obesidad se asocia a un mayor riesgo de enfermedad y muerte, sobre todo por enfermedades cardiovasculares (ECV) y cáncer. La asociación entre el IMC y la mortalidad varía sustancialmente entre poblaciones y causas de muerte, y puede cambiar con el tiempo (11). Flegal et al. (13) asociaron la obesidad de clase 2 y 3 con una mortalidad por todas las causas significativamente mayor. La obesidad de clase 1 no se asoció a una mayor mortalidad, lo

que sugiere que el exceso de mortalidad en la obesidad puede deberse predominantemente a los niveles más altos de IMC.

1.1.5 Desequilibrio energético

El estudio científico de la obesidad ha estado dominado durante todo el siglo XX por el concepto de equilibrio energético. Este enfoque conceptual, basado en principios termodinámicos fundamentales, afirma que la energía no puede destruirse, y que un organismo sólo puede ganarla, perderla o almacenarla. Su aplicación en la investigación de la obesidad ha hecho hincapié en el apetito excesivo, o la actividad física insuficiente, como principales determinantes de la modificación del balance energético que conduce a un aumento excesivo de peso (14). Si imagináramos el cuerpo como un espacio cerrado la entrada de energía correspondería a la ingesta de alimento mientras que la producción de energía consistiría en el gasto de energía que termina en la disipación del calor producido por el metabolismo (ya sea básico o por los movimientos corporales) o en excreciones de energía en la orina y las heces. Si las “fuerzas externas” introducen en el organismo más alimentos que la producción total de energía, el contenido de energía en el organismo aumentará proporcionalmente (6), y este contenido en energía será almacenado en forma de triglicéridos en el interior de los adipocitos, que es el principal componente del tejido adiposo (15,16). Por tanto, el tejido adiposo es la principal reserva de combustible del organismo y proporciona una importante fuente de energía transportable, fundamental para la supervivencia cuando escasean los alimentos (15). Cuando los adipocitos no pueden captar el exceso de triglicéridos, el organismo sintetiza nuevos adipocitos; este proceso se denomina adipogénesis. Los tejidos adiposos (principalmente los tejidos adiposos blancos) se distribuyen en varios depósitos, que pueden dividirse en dos tipos, los depósitos subcutáneos y los depósitos viscerales; algunos de los depósitos subcutáneos son el glúteo, el femoral y el abdominal; y algunos de los depósitos viscerales son el omental, el mesentérico y el perirrenal. Durante el consumo excesivo de nutrientes, la grasa tiende a acumularse en estos depósitos, haciendo que estos aumenten de tamaño por hipertrofia e hiperplasia, y se vuelvan poco saludables (16). La elección de los triglicéridos como combustible se debe a su alta densidad energética y la naturaleza hidrofóbica de los triglicéridos, lo que los convierte en un combustible cinco veces mejor por unidad de masa que el glucógeno. Los triglicéridos producen aproximadamente 9.3 Kcal por gramo cuando se oxidan,

mientras que el glucógeno se almacena intracelularmente en forma de gel, que contiene aproximadamente 2 g de agua por cada gramo de glucógeno, y produce sólo 4.1 Kcal por gramo cuando se oxida (15).

Aunque el teorema de equilibrio energético es una descripción correcta de los cambios de energía, estamos asumiendo que el cuerpo es un espacio muerto sin considerar las consecuencias de que el cuerpo es una entidad viva (6). Esto provoca que este modelo no pueda explicar por qué el peso se acumula de forma persistente en los individuos, en lugar de alcanzar una meseta cuando el aumento de peso restablece el equilibrio entre la ingesta y el gasto de energía. Así mismo, el enfoque del equilibrio energético subestima el efecto de determinados componentes de la dieta (por ejemplo, los hidratos de carbono, los aminoácidos y los ácidos grasos) sobre el metabolismo energético y la oxidación de estos como “combustible” (14). Además, este teorema no informa sobre qué mecanismos provocan los cambios, es decir, si el factor principal es el exceso de ingesta en relación con la producción, o si es un aumento interno de la energía almacenada que provoca un exceso de ingesta en relación con la producción de energía (6). Por lo tanto, aún se desconoce en qué direcciones causales operan los mecanismos, y se debate mucho cuáles podrían ser estos mecanismos. En 2007 (17), un amplio grupo de investigadores del Reino Unido intentó trazar un mapa del sistema de factores que supuestamente determinan el desarrollo de la obesidad. El mapa comprende varios ámbitos diferentes con múltiples relaciones internas entre muchos componentes, todos presuntamente implicados en conducir directa o indirectamente el balance energético individual hacia el lado positivo (6) (**Figura 1**).

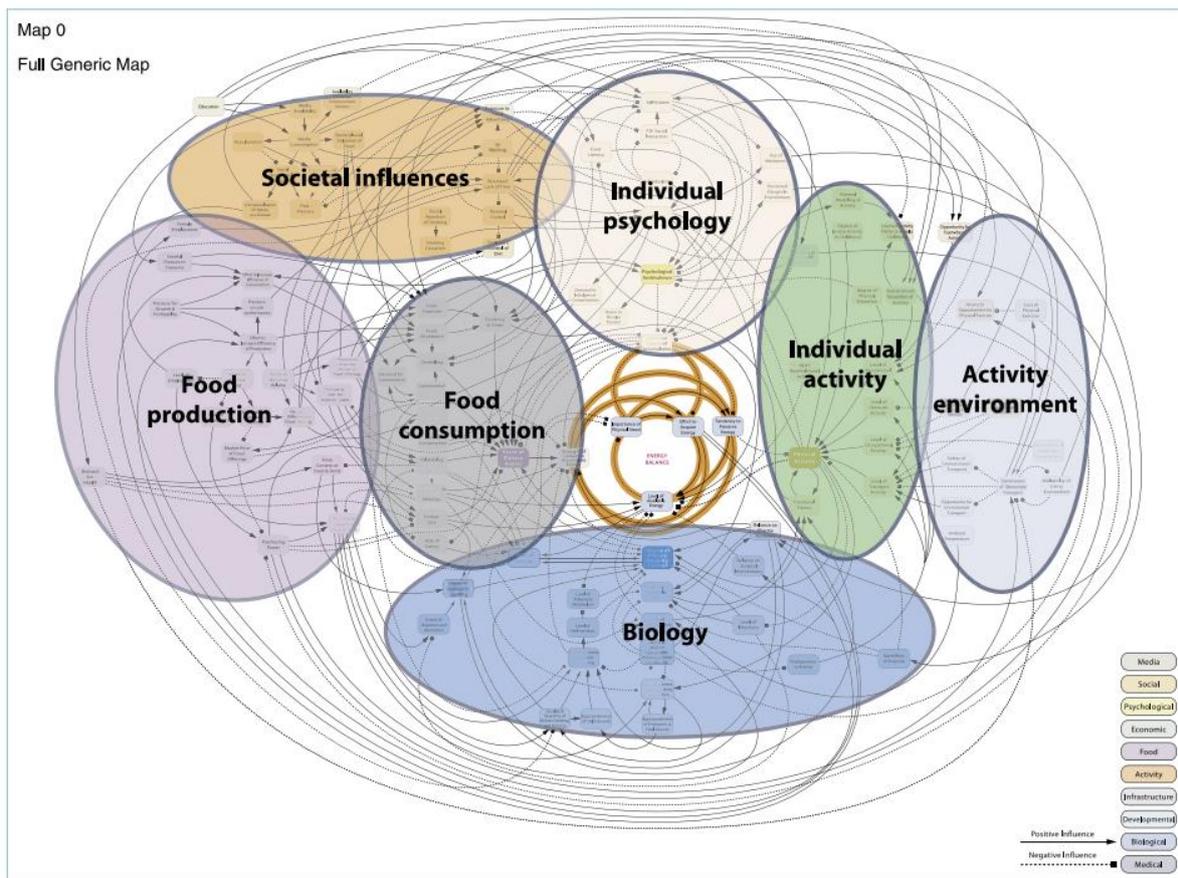


Figura 1. Mapa del sistema de la obesidad en el que se esbozan los factores pertenecientes a varios ámbitos diferentes (etiquetados en la esquina inferior derecha), que influyen directa o indirectamente en última instancia en el equilibrio energético del centro. Figura obtenida a partir del Programa Foresight del Gobierno del Reino Unido (2007) (Butland et al. (17).

1.1.6 Factores de riesgo

Según lo visto anteriormente, son numerosos los factores de riesgos implicados en el desarrollo de la obesidad y están interconectados. Para simplificar, podemos clasificar los factores de riesgo en dos tipos: modificables y no modificables.

1.1.6.1 Factores de riesgo no modificables

1.1.6.1.1 Genética

Se ha descubierto que las mutaciones genéticas (cambios anormales en la secuencia de ADN), los polimorfismos (variación normal en una secuencia de ADN, que es común en la población) y los cambios en la expresión de los genes (el proceso por el cual la información codificada en un gen se convierte en una función), tienen un papel en la predisposición de los individuos a la obesidad. Existen tres tipos de obesidad genética: monogénica, poligénica y sindrómica. La obesidad monogénica resulta de la mutación o deficiencia de un único gen y es una causa rara, pero grave de obesidad. Se

produce cuando hay una mutación en uno de los genes implicados en la vía leptina-melanocortina (véase sección 1.1.6.1.2). Las características típicas de la obesidad monogénica son la hiperfagia (hambre insaciable) y la aparición precoz de la obesidad (edad de 3-5 años). La obesidad poligénica es el resultado de la presencia simultánea de múltiples variantes genéticas, que tienen un efecto acumulativo. El último tipo de obesidad genética es la sindrómica, la cual se asocia con otros signos de un trastorno del desarrollo, y puede o no ir acompañada de un síndrome de malformación congénita; junto a rasgos dismórficos y/o trastornos del neurodesarrollo (retraso del desarrollo psicomotor, discapacidad intelectual, trastornos del espectro autista). Ejemplos de síndromes asociados a la obesidad son Prader-Willi, Cohen y Bardet-Biedl entre otros (18,19).

1.1.6.1.2 *La vía leptina-melanocortina*

Numerosas investigaciones sobre la obesidad genética han revelado que la vía leptina-melanocortina del hipotálamo desempeña un papel clave en la regulación del apetito y que los genes que se expresan exclusivamente en esta vía tienen un papel fundamental en la obesidad. La leptina es una hormona reguladora del apetito segregada en el tejido adiposo blanco, que circula a niveles proporcionales a la masa grasa corporal. En la obesidad, se segrega un exceso de leptina, lo que acaba provocando una resistencia a la leptina (similar a la resistencia a la insulina). Cuando las células del hipotálamo se vuelven resistentes a la leptina, no se recibe la señal de saciedad y la persona sigue teniendo hambre. Los niveles de leptina disminuyen durante el ayuno, y aumentan después de comer (18,20).

En el núcleo arqueado del hipotálamo, la LEPRb (una isoforma del receptor de la leptina) se encuentra en dos tipos de neuronas, que desempeñan un papel fundamental en la vía de la melanocortina; un tipo de neurona expresa la pro-opiomelanocortina (POMC) y el otro expresa la proteína relacionada con la agutina (AGRP). Las neuronas que expresan POMC del núcleo arqueado conectan con las neuronas del receptor de melanocortina-4 (MC4R) del núcleo paraventricular a través de la melanocortina, que envía señales para disminuir la ingesta de alimentos. Por el contrario, las neuronas AGRP actúan sobre las neuronas MC4R para aumentar la ingesta de alimentos. Por lo tanto, existe un equilibrio entre la acción de estos dos tipos de neuronas controlando el comportamiento alimentario. Una mutación en alguno de los genes implicados en esta

vía o una lesión cerebral puede conducir a un desbalance en esta vía y en consecuencia a obesidad (18,20).

1.1.6.1.3 *Obesidad hipotalámica*

El hipotálamo interviene de forma decisiva en la regulación de funciones homeostáticas como la homeostasis energética. Además, como se ha descrito anteriormente, está vinculado mediante conexiones sinápticas directas a regiones cerebrales que regulan el apetito. La alteración anatómica del hipotálamo y/o de los circuitos de alimentación por daños en los núcleos hipotalámicos mediales debidos a tumores, cirugía o irradiación puede aumentar el hambre por la activación de orexígenos del hipotálamo lateral o por respuestas deficientes a señales de adiposidad como la leptina y la pro-opiomelanocortina en el núcleo arqueado del hipotálamo medial. En el caso de los tumores craneales los más frecuentes son el craneofaringioma y el glioma. El tratamiento de estos tumores con cirugía y radioterapia, y las patologías que afectan al hipotálamo, como la neurosarcooidosis, la tuberculosis y la histiocitosis de células de Langerhans, también pueden provocar obesidad hipotalámica (18,21).

1.1.6.2 Factores de riesgo modificables

1.1.6.2.1 *Epigenética*

Los cambios epigenéticos son aquellos que se producen previas o posteriores a la traducción, que afectan a la expresión génica, pero sin cambiar la secuencia del ADN; se adquieren a través de la interacción con el entorno y, son heredables (18,22). Numerosos estudios demuestran que la metilación del ADN contribuye a la obesidad y al síndrome metabólico, principalmente a través de las vías implicadas en el comportamiento alimentario, el ritmo circadiano y el metabolismo lipídico. Por ejemplo, la metilación del ADN de los genes para la leptina (*LEP*) y la adiponectina (*ADIPOQ*) se asoció con el IMC y los niveles de colesterol (23). Los genes candidatos implicados en la obesidad monogénica, como el *POMC*, también sufren cambios epigenéticos que contribuyen a la obesidad común. Otro importante mecanismo asociado a la obesidad es el ritmo circadiano, donde los genes reloj contribuyen al ritmo de 24 horas de los procesos fisiológicos. Se han observado diferencias en la metilación CpG en sangre de importantes genes reloj como *BMAL1*, *PER2* y *PER3* y *CLOCK* entre adultos y niños delgados y obesos (22). Principalmente, varios lípidos se han relacionado con cambios en la metilación del ADN, como los ácidos grasos poliinsaturados n-6 para *TNFA*, los

componentes del aceite de avellana para ADRB3, otros ácidos grasos para CLOCK y los triglicéridos para ABCG1, ABCA1, PHGDH, TOMM20 (24–30). La mayoría de estos genes juegan un papel en el metabolismo de los lípidos, lo que sugiere que a) los lípidos inducen cambios en la metilación del ADN y b) las alteraciones en la metilación del ADN pueden afectar a los genes implicados en la vía de los lípidos, siendo de gran importancia para el desarrollo de la obesidad y las comorbilidades (22).

1.1.6.2.2 *Inactividad física y comportamiento sedentario*

La elevada prevalencia de la obesidad está asociada a la inactividad física y al comportamiento sedentario (31). La inactividad física se define como una cantidad insuficiente de actividad física moderada a vigorosa, mientras que el comportamiento sedentario se refiere a cualquier comportamiento caracterizado por un gasto energético bajo o un gasto energético de 1,5 equivalentes metabólicos (MET) mientras se está sentado o tumbado (31). Los avances tecnológicos han sido un arma de doble filo en este aspecto, la aparición de las pantallas y los ordenadores han fomentado el comportamiento sedentario, la población pasa una gran cantidad de su tiempo viendo la televisión o jugando a videojuegos, optándose por una vida social más virtual. En este aspecto, existe una tendencia de cambio en las tasas de empleo aumentando los empleos de tipo remoto o aquellos en los que se precisa de largas horas sentados. De acuerdo a la OMS, más del 28% de la población adulta mundial y el 81% de los adolescentes eran físicamente inactivos en 2016 (18). Según la Asociación Americana del Corazón (AHA), el comportamiento sedentario se ha identificado como una de las principales causas evitables de muerte, y existe una relación lineal inversa entre el volumen de actividad física y la mortalidad por todas las causas. Se calcula que aproximadamente 1,9 millones de muertes al año en todo el mundo se atribuyen a la inactividad física. La obesidad y la inactividad física son dos factores de riesgo distintos que aumentan la morbilidad y la mortalidad a escala mundial. La morbilidad asociada tanto al sedentarismo como a la obesidad supone una gran carga económica, ya que supone un aumento del gasto sanitario, así como los días de trabajo perdidos por enfermedad (32).

1.1.6.2.3 *Ingesta excesiva de calorías*

Según lo comentado en la sección 1.1.5, históricamente, el dogma central de la ciencia de la obesidad ha sido que se trata simplemente de un trastorno del equilibrio

energético: calorías que se introducen, calorías que se liberan. Sin embargo, este modelo de obesidad basado en la energía es más complejo, puesto que, si fuera cierto, entonces hacer más ejercicio y comer menos debería funcionar para todo el mundo, pero no es así (18). En esta línea, se han sugerido varios modelos que puedan explicar la complejidad de la obesidad, por ejemplo, el modelo carbohidrato-insulina de la obesidad, sugerido por primera vez por Gary Taubes en su libro *“Good Calories, Bad Calories”* en 2007 y respaldado posteriormente en 2018 por Ludwig y Ebbeling (33), propone que una dieta alta en carbohidratos (con predominio de grandes cantidades de azúcar y almidón) induce hiperinsulinemia postprandial. Los altos niveles de insulina desplazan las calorías a los adipocitos en lugar de a los tejidos magros, lo que provoca una sensación general de inanición en el organismo, por lo que la persona tiene una tasa metabólica reducida y se siente más hambrienta. Sin embargo, este modelo fue cuestionado por Hall et al. (34) en 2022, defendieron que el modelo carbohidrato-insulina no era adecuado y que el modelo convencional basado en la energía era más robusto. Argumentaron que el cerebro es el responsable de la regulación del peso corporal a través de una compleja interacción entre señales metabólicas, endocrinas y del sistema nervioso, que responden a las necesidades energéticas intrínsecas del organismo en combinación con influencias ambientales externas. Según Hall et al., el tejido adiposo actuaría como un órgano endocrino y la secreción de leptina y otras adipoquinas sería directamente responsable del aumento de la ingesta de alimentos (18). No obstante, no habría que olvidarse del ambiente obesogénico en el que nos vemos en vuelto actualmente. Hay diferentes factores ambientales que favorecen el consumo de calorías, como la flagrante aparición de cadenas de comida rápida, las ofertas de comidas y las bebidas hipercalóricas y la fácil disponibilidad de alimentos ultraprocesados baratos, forman parte del problema (18). Los alimentos y bebidas que consumimos a diario desempeñan un papel esencial en nuestra salud general. Comer azúcar y grasas saturadas en exceso y con frecuencia repercute negativamente en la obesidad. El consumo excesivo de azúcar añadido es uno de los factores más importantes que inciden directamente en el desarrollo de la obesidad a largo plazo (16), tanto es así que, un análisis de los datos históricos de EE.UU. muestra tendencias paralelas entre el aumento del consumo de azúcar añadido (en gran parte procedente de las bebidas carbonatadas) y las epidemias de obesidad y diabetes mellitus tipo 2. Los refrescos carbonatados son la mayor fuente de azúcares añadidos en la dieta; una ración típica de 355 ml de refresco contiene 35,0-37,5 g de azúcar y 140-150

calorías. Según datos de encuestas nacionales realizadas en EE. UU., la ingesta de bebidas azucaradas ha disminuido ligeramente desde principios de la década de 2000, pero los niveles de consumo siguen siendo elevados. Entre 2011 y 2014, se estimó que los adultos estadounidenses consumían 145 Kcal procedentes de bebidas azucaradas, lo que corresponde al 6,5% de las calorías diarias. Este nivel de ingesta por sí solo casi cumple la recomendación diaria de no más del 10% de las calorías totales procedentes de azúcares añadidos o azúcares libres (35). Diferentes estudios han demostrado que la fructosa 5,5 mM disminuye la expresión de GLUT4 (transportador de glucosa en las células) en un 30-50 en los adipocitos diferenciados, y la ingesta excesiva de fructosa aumenta significativamente el contenido de triglicéridos hepáticos, lo que perjudica la sensibilidad a la insulina (36,37). La glucosa elevada perjudica directamente la sensibilidad a la insulina en los hepatocitos y genera glucotoxicidad; si la glucotoxicidad persiste, puede dar lugar a numerosas afecciones clínicas (16). Históricamente, el consumo de grasas saturadas se ha relacionado con un mayor riesgo de obesidad. Ingerir una comida con un alto contenido en grasas saturadas afecta a la sensibilidad a la insulina y aumenta la glucemia posprandial y la inflamación, lo que contribuye a la obesidad. La grasa presente en los alimentos es mucho más densa energéticamente que las proteínas y los hidratos de carbono, pero tiene menos potencial para inhibir la ingesta de alimentos y suscitar la secreción de insulina; por lo tanto, se supone que el exceso de grasas dietéticas se asocia positivamente con un aumento de la obesidad (16). La OMS y las Guías Alimentarias para Residentes Chinos (*Dietary Guidelines for Chinese Residents*) de 2016 recomiendan que no más del 30% de la ingesta total de energía proceda de las grasas, ya que algunos estudios han demostrado que una dieta rica en grasas es un factor de riesgo importante para el aumento excesivo de peso. Sin embargo, las Guías Alimentarias para los estadounidenses (*Dietary Guidelines for Americans*) 2015-2020 eliminaron las limitaciones en la ingesta de grasas en la dieta, porque numerosos estudios han demostrado que tanto las dietas altas en grasas como las dietas bajas en grasas pueden estar relacionadas con la pérdida de peso en los países occidentales. Otros países de ingresos altos y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación han mantenido sus recomendaciones sobre la ingesta total de grasas alimentarias en no más del 35% de la ingesta energética diaria total. En sus directrices se han centrado en componentes de la dieta como las grasas saturadas y los hidratos de carbono complejos (38).

1.1.6.2.4 *Envejecimiento*

El envejecimiento se asocia con cambios en la composición corporal. El proceso de envejecimiento reordena la masa grasa total, aumentando la probabilidad de depósitos de grasa ectópica en el hígado y el músculo esquelético, así como, la deposición de grasa visceral en el abdomen (16,39). Además, se ha descrito que el tejido adiposo de los individuos delgados se ve afectada por la edad con una disminución de la replicación preadipocitaria y la adipogénesis y un aumento de las citoquinas proinflamatorias (39). Por otro lado, se ha informado que la disminución del gasto energético desempeña un papel fundamental en el aumento de la deposición de grasa en el proceso de envejecimiento. A partir de los 20 años, la tasa de gasto energético en reposo disminuye un 2-3 % por década, y la masa muscular esquelética se reduce un 40 % entre los 20 y los 70 años de edad. Además, la actividad física disminuye y las personas se vuelven sedentarias, lo que reduce a la mitad el gasto energético total en la vejez (16).

1.1.6.2.5 *Sueño insuficiente*

El sueño es un pilar fundamental para la salud. Por desgracia, la prevalencia del sueño insuficiente es alta en la sociedad moderna, tanto es así, que un tercio o más de los adultos de América, Europa y Asia duermen menos de las 7h por noche recomendadas por las autoridades de salud pública para el mantenimiento de la salud. Además, la sociedad actual se encuentra activa 24 h al día, 7 días a la semana, lo que favorece el desajuste circadiano. Tanto el sueño insuficiente como el desajuste circadiano son factores perjudiciales para la salud y se asocian con resultados adversos, incluido un mayor riesgo de desarrollar obesidad (40). Por ejemplo, la corta duración del sueño (definida como menos de 5 o 6 horas al día) se asoció con un aumento absoluto del 38% en la incidencia de la obesidad en comparación con la duración normal del sueño en un metaanálisis de estudios prospectivos de cohortes entre adultos (41). Por otro lado, el sueño regula el metabolismo de la glucosa y la función neuroendocrina. La falta de sueño reduce la intolerancia a la glucosa, la sensibilidad a la insulina y los niveles de leptina y aumenta los niveles de cortisol y grelina (y, por tanto, el apetito) (18). De forma similar a la privación total de sueño, el sueño nocturno insuficiente aumenta el gasto energético diario total, entorno en un 4-5% (~100 Kcal al día) del gasto energético diario total en población joven sana. Cuando se controla la ingesta de energía durante el sueño insuficiente y no se aumenta para compensar el mayor gasto energético, se produce un balance energético negativo. Este balance energético negativo y los cambios

en los niveles de las hormonas del apetito (en concreto, el aumento de la grelina y la reducción de la leptina) se asocian con un aumento de los índices de hambre durante los días de sueño insuficiente en poblaciones sanas. Cuando no se controla la ingesta de energía en adultos delgados durante periodos de sueño insuficiente, se produce un aumento de la ingesta de energía mayor que el aumento del gasto energético, lo que da lugar a un balance energético positivo de 24 horas y a un aumento de peso. Entre las posibles explicaciones del aumento de la ingesta energética durante la restricción del sueño, más allá de las hormonas del apetito, se incluyen el aumento del gasto energético que no parece adaptarse al sueño insuficiente continuado y la activación de regiones cerebrales asociadas a cambios en el hambre y la elección de alimentos (40).

1.1.6.2.6 *Situación socioeconómica*

El estatus socioeconómico (ES) es un factor importante asociado a la obesidad. Este puede determinarse utilizando variables como la educación, los ingresos y la ocupación, considerándose que la educación es la variable más estable a lo largo del tiempo. Un estudio de los datos recogidos en la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (*National Health and Nutrition Examination Survey*, NHANES) estadounidense de 1971 a 1974, de 1976 a 1980, de 1988 a 1994 y de 1999 a 2000 de adultos de entre 20 y 60 años identificó tendencias en las tasas de obesidad entre los niveles de situación socioeconómica. En las últimas 3 décadas, la prevalencia de la obesidad aumentó entre los grupos de ES bajo, y aumentó de forma muy marcada entre los grupos de ES alto, lo que condujo a una reducción de las disparidades en las tasas de obesidad entre los diferentes grupos de ES. Esta tendencia se mantuvo en todas las etnias/razas y de género. Aunque el nivel socioeconómico bajo es un factor de riesgo establecido para la obesidad, su impacto puede estar mediado en parte por el estrés psicosocial (42). Según Pampel et al. (43) la obesidad aumenta con el incremento del desarrollo económico de un país. Además, se observaron una tendencia interesante: en los países con ingresos más bajos, las personas con un ES más alto tenían más probabilidades de ser obesas, mientras que, en los países con ingresos más altos, las personas con un ES más alto tenían menos probabilidades de ser obesas. Los autores atribuyeron este fenómeno al hecho de que, en los primeros, la mejora del ES llevaba a consumir alimentos ricos en calorías y a evitar la actividad física, mientras que, los individuos de países con mayores ingresos respondían con un aumento de la actividad física y una alimentación sana.

1.1.6.2.7 Microbiota

Dado que la microbiota intestinal está íntimamente implicada en la regulación del metabolismo energético, la respuesta inmunitaria y la inflamación del huésped, los cambios en su composición pueden influir en el desarrollo de la obesidad. Un hallazgo consistente en los estudios de la microbiota de la obesidad/síndrome metabólico es una disminución notable en la diversidad microbiana (44-47), y se ha informado que las proteobacterias eran el filo más frecuentemente asociado con la obesidad (48). Un desequilibrio con un aumento relativo de Firmicutes en comparación con Bacteroidetes suele estar implicado en la patogénesis de la obesidad (44,49,50). El predominio de Firmicutes puede conducir a una mayor producción de metabolitos a partir de polisacáridos no digeribles que predisponen al huésped a una mayor absorción de energía, lo que aumenta el aumento de peso (44,51,52). Sin embargo, este desequilibrio entre Firmicutes y Bacteroidetes no se ha reproducido en todos los estudios en humanos que evalúan la obesidad (44,49). Por otro lado, la alteración de la microbiota intestinal puede modular la permeabilidad intestinal y provocar la translocación del lipopolisacárido (LPS), que puede iniciar una inflamación de bajo grado en el huésped (44,53,54). El LPS es un componente de las paredes celulares de las bacterias gramnegativas, que incluyen principalmente el filo Proteobacteria y los géneros *Bacteroides* y *Prevotella*. La ingesta dietética rica en grasas se ha asociado a un aumento del LPS plasmático (44). La inflamación, el estrés oxidativo y el metabolismo del huésped se ven influidos por los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), que se producen cuando la microbiota intestinal fermenta hidratos de carbono complejos. Los mecanismos subyacentes a los efectos de los AGCC abarcan una compleja interacción entre la dieta, la microbiota intestinal y el metabolismo energético del huésped. Los AGCC más importantes son el acetato, el propionato y el butirato. El butirato sirve como sustrato energético para los colonocitos, el propionato contribuye a la gluconeogénesis hepática y el acetato es utilizado por los tejidos periféricos. Entre los AGCC, el butirato desempeña un papel primordial, como la mejora de la sensibilidad a la insulina, la regulación del metabolismo energético, la mejora de la inmunidad y la modulación de la inflamación y el estrés oxidativo (44,55,56).

1.1.7 Adipogénesis

El tejido adiposo, en particular el tejido adiposo blanco, es el principal órgano de almacenamiento de energía (57), y, además, el tejido adiposo es un órgano endocrino activo que segrega numerosos péptidos bioactivos y proteínas que intervienen en el control y mantenimiento de la actividad de otras células y órganos. Estos factores secretados por los adipocitos se denominan adipoquinas e incluyen citoquinas, hormonas, factores de crecimiento y proteínas de fase aguda (58). El exceso de energía se almacena en forma de lípidos, principalmente triglicéridos (TG), en los adipocitos a través del proceso de hiperplasia adipocitaria (formación de nuevos adipocitos mediante la diferenciación de precursores conocidos como preadipocitos) o hipertrofia (agrandamiento de los adipocitos existentes) (58,59); el conjunto de estos dos procesos se denomina adipogénesis. Además, estos dos mecanismos dan lugar a un aumento de la masa grasa y de la secreción de ácidos grasos, péptidos, citoquinas inflamatorias y adipoquinas (57,58).

Existen tres tipos de tejidos adiposos: tejido adiposo blanco (WAT), tejido adiposo pardo (BAT) y el tejido adiposo beige. El WAT es el tipo más abundante de tejido adiposo compuesto por adipocitos caracterizados por una gran gota lipídica unilocular cuya función principal es el almacenamiento de energía. El WAT también segrega adipoquinas como la leptina y la adiponectina para la homeostasis energética. Desde el punto de vista anatómico, los depósitos de tejido adiposo blanco pueden clasificarse en subcutáneos o viscerales (58). A diferencia del WAT, que almacena energía, los adipocitos que constituyen los tejidos adiposos pardos y beige se caracterizan por un mayor número de mitocondrias y muchas gotas lipídicas pequeñas, y expresan altos niveles de proteína desacoplante 1 (UCP1), que se considera el motor clave del programa de termogénesis, en respuesta al estrés por frío o al estímulo β -adrenérgico (58,59). Además, el BAT activado aumenta la eliminación periférica de ácidos grasos y glucosa para proporcionar combustible para la termogénesis prolongada (58,60) y mejora la sensibilidad a la insulina (60). Debido a sus propiedades de disipación de energía y a sus efectos sobre el metabolismo, el BAT humano se le ha correlacionado negativamente con la obesidad y ha sido uno de los principales focos de investigación metabólica y antiobesidad en los últimos años (60).

Además del BAT clásico, también se han encontrado adipocitos de tipo pardo/oxidativo (beige) en los depósitos de WAT. Los adipocitos pardos y beige comparten muchas características, incluida la capacidad de disipación de energía (60). La función de los adipocitos beige es la termogénesis para mantener la temperatura corporal; estas células expresan niveles de ARNm de UCP1 similares a los de los adipocitos pardos (58). Sin embargo, proceden de linajes celulares distintos. Mientras que los adipocitos pardos se originan a partir de células precursoras con ancestros comunes a los miocitos, los adipocitos beige parecen desarrollarse a partir de células precursoras similares a las de los adipocitos blancos (60). A su vez, los BAT existen en depósitos anatómicos distintos (en particular, el depósito interescapular), mientras que los adipocitos beige se encuentran en WAT (en particular, en depósitos subcutáneos) (59).

La acumulación de grasa viene determinada por el equilibrio entre la síntesis y la degradación de los TG. En cuanto a la alimentación, los ácidos grasos del tejido adiposo pueden provenir de dos orígenes distintos: los TG circulantes y la lipogénesis *de novo* (DNL) (57).

1.1.7.1 Diferenciación adipocitaria

El receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR γ) se caracteriza por ser el regulador maestro de la adipogénesis, ya que es indispensable para la diferenciación de los adipocitos en cultivo e *in vivo* (57–60). El proceso de diferenciación de adipocitos *in vitro* a partir de preadipocitos ha sido ampliamente estudiado, el cual es un proceso complejo en el que intervienen muchos factores de transcripción y coactivadores diferentes que finalmente conducen a la activación de PPAR γ (60). Uno de los efectos secundarios más importantes de PPAR γ es la activación del factor de transcripción C/EBP- α (proteína de unión a potenciador CCAAT alfa) (59), el cual también es considerado un regulador maestro en la adipogénesis (58). Por lo tanto, C/EBP- α junto con PPAR γ , funciona como un activador transcripcional pleiotrópico que promueve una mayor diferenciación adipocitaria. Cuando se activan, el C/EBP- α y el PPAR- γ inducen y mantienen la expresión de genes adipogénicos clave, como la proteína transportadora de glucosa tipo (GLUT) 4, la proteína de unión a ácidos grasos (FABP)-4 y la adiponectina, que son fundamentales para el correcto

funcionamiento de los adipocitos, incluida su capacidad de respuesta a la insulina (60) (**Figura 2**).

El modelo más utilizado para estudiar la diferenciación preadipocitaria es la línea celular de ratón 3T3-L1. Estas células son inducidas por un cóctel de diferenciación que activa simultáneamente las vías del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1), los glucocorticoides y el adenosín monofosfato cíclico (AMPC), dando lugar finalmente a células acumuladoras de lípidos y sensibles a la insulina. Los primeros pasos implican varias rondas de mitosis, a lo que se denomina expansión clonal, en la que la inducción del factor de transcripción C/EBP- β por la proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico y la fosforilación por la proteína cinasa activada por mitógenos son pasos cruciales. Posteriormente, la C/EBP- β también es fosforilada por la glucógeno sintasa cinasa-3 β , lo que impulsa el proceso adipogénico (60). Finalmente, se ha comprobado que la acción de C/EBP- β en el proceso adipogénico depende de la acción conjunta de la isoforma C/EBP- δ (61).

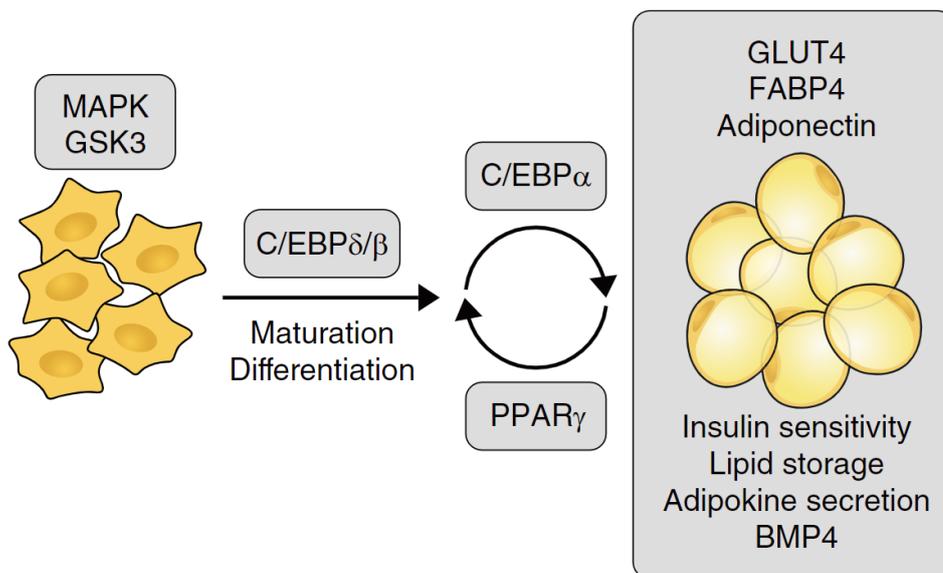


Figura 2. La diferenciación de los adipocitos es un proceso complejo y estrechamente regulado. La diferenciación de adipocitos *in vitro* es un proceso complejo en el que intervienen muchas vías de señalización diferentes que conducen finalmente a la activación de la proteína de unión a potenciadores CCAAT (C/EBP) y el receptor activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR)- γ . Estos factores de transcripción inducen y mantienen la expresión de genes adipogénicos clave, como el transportador de glucosa-4 (GLUT-4), la proteína de unión a ácidos grasos (FABP-4) y la adiponectina, que son fundamentales para la función adecuada de los adipocitos. BMP-4, proteína morfogenética ósea 4; GSK-3, glucógeno sintasa cinasa 3. Imagen extraída de Hammarstedt et al. (60).

1.2 Metabolismo lipídico

1.2.1 Síntesis de ácidos grasos: Lipogénesis *de novo*

La lipogénesis *de novo* (DNL) o síntesis *de novo* de ácidos grasos es la vía metabólica que sintetiza ácidos grasos a partir de un exceso de hidratos de carbono. Cuando la energía es excesiva en el organismo, la mayoría de los ácidos grasos recién sintetizados se esterifican para convertirse en TG y almacenarse (57,62). En condiciones normales, la DNL se produce principalmente en el hígado y en el tejido adiposo y se considera que contribuye en menor medida al mantenimiento de la homeostasis de los TG en suero. La mayor parte del contenido sérico de TG se obtiene de fuentes dietéticas. Sin embargo, algunos estudios sugieren que la DNL hepática podría contribuir significativamente al contenido sérico de lípidos en individuos con una dieta rica en carbohidratos (62).

Como se muestra en la **Figura 3** en el flujo de carbonos de la glucosa a los ácidos grasos intervienen una serie de reacciones enzimáticas coordinadas. En primer lugar, la glucosa proveniente de la dieta se somete a la glucólisis y al ciclo del ácido tricarboxílico (ciclo de Krebs o ciclo TCA) para producir citrato en la mitocondria, que se transporta al citosol y se convierte en Acetil-CoA por la acción de la ATP-citrato liasa (ACLY). En segundo lugar, la acetil-CoA resultante es carboxilada en malonil-CoA por la acetil-CoA carboxilasa 1 (ACC1). En tercer lugar, la enzima ácido graso sintasa (FASN), es la enzima clave que limita la velocidad en la DNL, ya que convierte el malonil-CoA en palmitato, que es el primer producto de ácido graso en la DNL. Por último, el palmitato se somete a las reacciones de elongación y desaturación, en la que participa la estearil-CoA 1-desaturasa (SCD1), para generar los ácidos grasos complejos, como el ácido esteárico, el ácido palmitoleico y el ácido oleico (57,62).

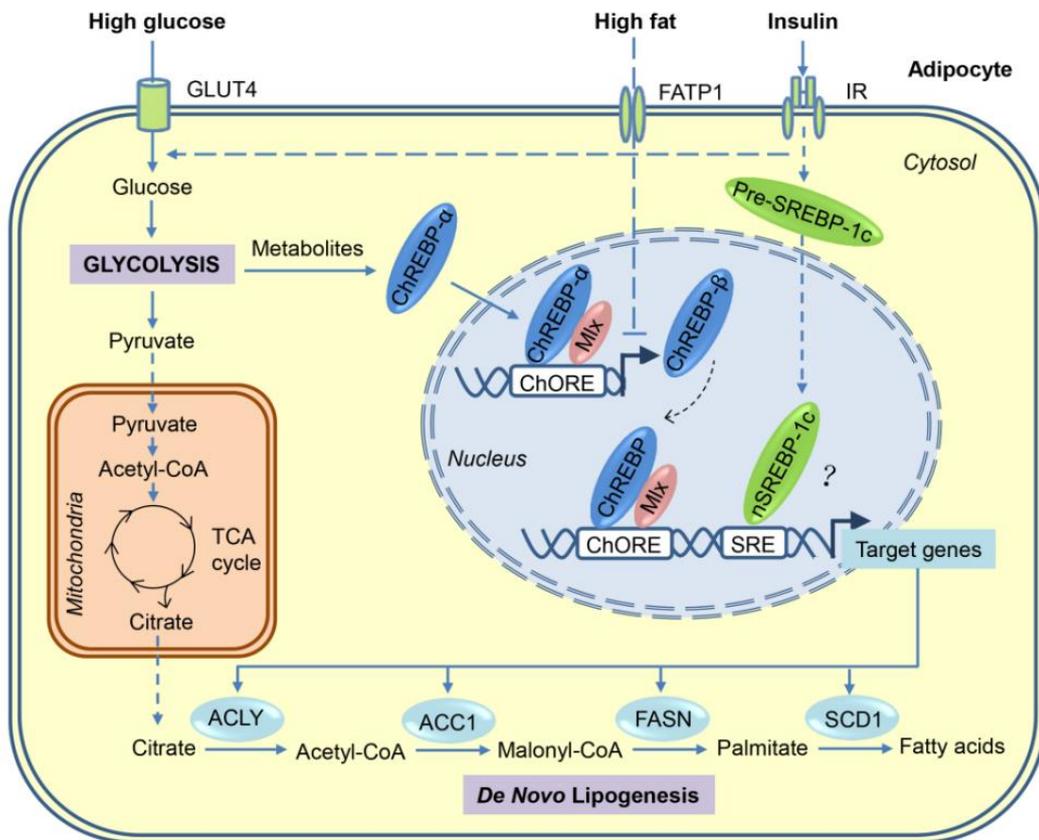


Figura 3. Activación transcripcional de la lipogénesis *de novo* en adipocitos en respuesta a dietas ricas en azúcar o grasas. Tras el consumo de hidratos de carbono, una parte de la glucosa circulante es captada por los adipocitos a través del GLUT4 estimulado por la insulina y, a continuación, mediante la glucólisis en el citosol, la glucosa se convierte en piruvato, que es transportado a las mitocondrias para su posterior oxidación en el ciclo del ácido tricarbóxico (TCA). El citrato, un intermediario del ciclo TCA, se exporta al citosol y se utiliza como sustrato para la lipogénesis *de novo*. La lipogénesis se regula principalmente a nivel transcripcional y la proteína de unión a elementos de respuesta a carbohidratos (ChREBP) desempeña un papel fundamental en la lipogénesis de los adipocitos. Los metabolitos de la glucosa generados durante la glucólisis activan la ChREBP- α , que, junto con la proteína X similar a Max (*Max-like protein*, MLX), se une a los elementos de respuesta a carbohidratos (ChORE) en los promotores de genes diana, incluidos los que codifican la ATP-citrato liasa (ACLY), la acetil-CoA carboxilasa 1 (ACC1), la sintasa de ácidos grasos (FASN), la esteroil-CoA 1-desaturasa (SCD1) y la ChREBP- β . A su vez, la ChREBP- β inducida activa aún más la expresión de su gen diana, que en última instancia promueve la síntesis de ácidos grasos. Otro factor de transcripción lipogénico, la proteína-1 de unión a elementos reguladores del esteroil (SREBP-1), inducida por la insulina a múltiples niveles, puede desempeñar un papel menor en la lipogénesis de los adipocitos. En comparación con los hidratos de carbono, el consumo de grasas inhibe la lipogénesis *de novo* en el adipocito principalmente a través del bloqueo de la activación de ChREBP- β . FATP1: proteína transportadora de ácidos grasos 1; IR: receptor de insulina. Imagen extraída de Song et al. (57).

En el cuerpo humano, la vía lipogénica está activa al menos en los principales tejidos metabólicos: el hígado y el tejido adiposo. Sin embargo, se ha demostrado que la lipogénesis hepática es cuantitativamente más eficiente que la lipogénesis en el tejido adiposo. De hecho, la FASN, que se considera un marcador de la lipogénesis, se ha clasificado como una proteína constitutiva en el hígado (62).

Se ha demostrado que la DNL es muy sensible a los cambios en el régimen dietético. Por ejemplo, se ha comprobado que una dieta rica en carbohidratos induce un aumento de la DNL hepática que, a su vez, contribuye a la hipertrigliceridemia. Además, no sólo la cantidad sino también el tipo de carbohidrato dietético afecta a la tasa de síntesis de ácidos grasos *de novo*. La fructosa, en particular, se ha identificado como un monosacárido con un efecto especialmente potente sobre la DNL. Se ha demostrado que los azúcares simples son más eficaces que los hidratos de carbono complejos para estimular la DNL hepática. La lipogénesis en el tejido adiposo responde menos que el DNL hepático a la sobrealimentación aguda o prolongada de hidratos de carbono (62).

Existen muchas enzimas implicadas en la DNL, que se activan tras una comida rica en carbohidratos. La proteína de unión a elementos reguladores de esteroides (SREBP)-1, la proteína de unión a elementos de respuesta a carbohidratos (ChREBP) y los receptores X hepáticos (LXRs) se identifican como los principales factores de transcripción lipogénicos en el hígado en respuesta a la insulina, la glucosa y los ácidos grasos poliinsaturados, respectivamente. Sin embargo, sólo el ChREBP parece ser el principal impulsor de la DNL de los adipocitos, mientras que SREBP-1 parece ser un actor menor en los adipocitos, pero el principal regulador de la DNL hepática (57).

Por otro lado, la insulina posee un efecto sobre la expresión de genes lipogénicos mediante la regulación, principalmente, de SREBP-1 en células hepáticas y adipocitos. La insulina activa la SREBP-1 hepática tanto transcripcional como postraduccionalmente y media en su exportación del retículo endoplásmico al núcleo, donde se une a los elementos reguladores de esteroides presentes en los promotores de los genes diana (62).

1.2.2 Degradación de ácidos grasos: Lipolisis y β -oxidación

1.2.2.1 Lipolisis

Aunque los TG representan una forma eficiente e inerte para el transporte y almacenamiento de ácidos grasos, son incapaces de atravesar las membranas celulares (63). En déficits de energía, el WAT experimenta un aumento de la lipolisis, que puede definirse como la hidrólisis de triglicéridos para generar ácidos grasos y glicerol, que se liberan al torrente sanguíneo para su uso por otros órganos como sustratos energéticos. La lipolisis se produce de forma ordenada y regulada, con diferentes enzimas (lipasas) que actúan en cada paso. El TG se hidroliza por acción de la lipasa adipocítica de

triglicéridos (ATGL) para formar diacilglicerol (DAG), luego la lipasa sensible a hormonas (HSL) lo convierte en monoacilglicerol (MAG) y se produce la liberación de un ácido graso en cada paso. Finalmente, el MAG se hidroliza mediante la lipasa de monoglicéridos (MGL) para liberar el ácido graso final y el glicerol (63,64). La liberación de ácidos grasos a partir de TG por la lipólisis adipocitaria también es importante para suministrar sustrato para la síntesis hepática de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (64).

Las alteraciones de la lipólisis se asocian con frecuencia a la obesidad, incluyendo un aumento de las tasas basales de lipólisis que puede contribuir al desarrollo de resistencia a la insulina, así como una menor capacidad de respuesta a la lipólisis estimulada (63,64). Así mismo, la disfunción o deficiencia de las lipasas suele causar patologías graves y se han asociado con la dislipidemia, la obesidad, la diabetes de tipo 2, la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), el cáncer, las cardiopatías, la caquexia y las enfermedades infecciosas, entre otras (63).

1.2.2.2 β -oxidación de los ácidos grasos

La β -oxidación de ácidos grasos mitocondrial es una de las principales vías de producción de energía a partir de lípidos con una importante función para la homeostasis celular (65). Los sustratos para la β -oxidación de ácidos grasos mitocondrial proceden de tres fuentes principales: (1) AG procedentes de la dieta o movilizados de otros tejidos que entran en la célula a través del torrente sanguíneo, (2) la síntesis *de novo* de AG y (3) los AG liberados dentro de la célula a través de la hidrólisis de fosfolípidos (PL) y TGs (65).

El primer paso de la β -oxidación de ácidos grasos es el transporte de los AG a la matriz mitocondrial (**Figura 4**). Los AG procedentes de la dieta y del tejido adiposo se transportan por el torrente sanguíneo unidos a la albúmina y a las lipoproteínas. Al llegar a las células diana, los AG de cadena corta y media atraviesan la membrana plasmática por difusión pasiva, mientras que, los AG de cadena larga son transportados activamente a través de la membrana celular por transportadores proteicos específicos presentes en la membrana plasmática, a saber, las proteínas transportadoras de AG (FATP), la translocasa de AG (FAT) y las proteínas de unión a AG (FABP) (65,66). Una vez en el citosol, los AG de cadena larga se convierten en ésteres de acil-CoA, mientras que los AG de cadena corta y media se transforman en ésteres de acil-CoA dentro de la matriz

mitocondrial. Dado que la membrana mitocondrial no es permeable a los ésteres de acil-CoA largos, es necesaria la acción de diferentes enzimas. Este paso está controlado por el sistema carnitina palmitoiltransferasa (CPT), que consta de tres proteínas: CPT1, carnitina-acilcarnitina translocasa (CACT) y CPT2 (65,66). La malonil-CoA, una molécula derivada del metabolismo de la glucosa y primer intermediario de la lipogénesis, regula la β -oxidación de ácidos grasos inhibiendo la CPT1, lo que convierte a esta enzima en el paso que limita la velocidad de oxidación mitocondrial de los AG (66).

Dentro de la matriz mitocondrial, la forma activada del ácido graso (acil-CoA graso) se degrada por β -oxidación en unidades de acetil-CoA mediante un proceso cíclico. Cada ciclo de β -oxidación implica cuatro pasos enzimáticos, que dan lugar a la liberación de unidades de dos carbonos (como acetil-CoA) del ácido graso, con formación de un ácido graso más corto. Estos pasos son catalizados por varias enzimas con especificidades de longitud de cadena (65).

Finalmente, se ha postulado que la oxidación defectuosa de los ácidos grasos contribuye a los trastornos asociados con la obesidad. Aunque existe cierta controversia sobre este tema, se ha asociado que una disminución de la capacidad de la β -oxidación de ácidos grasos en humanos y roedores obesos contribuye a la acumulación de lípidos y a la lipotoxicidad (67).

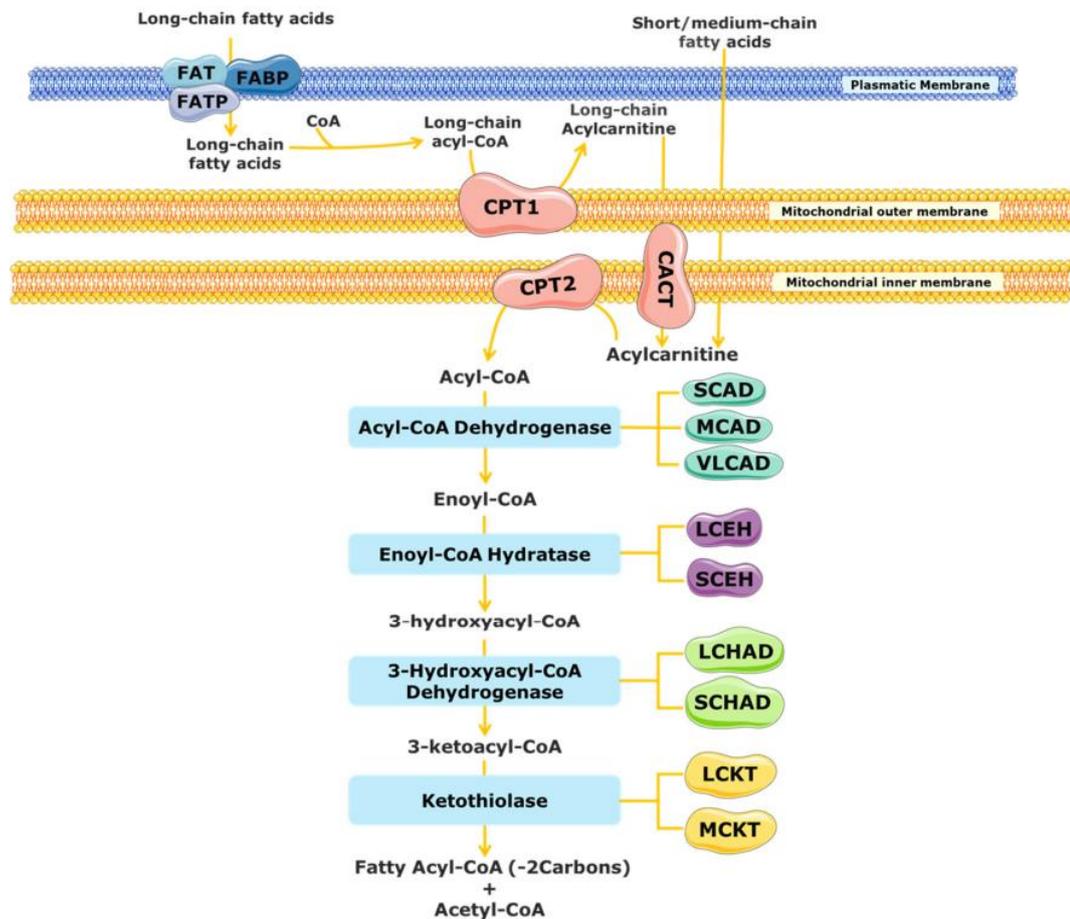


Figura 4. Representación esquemática de la β -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos. CACT, carnitina acilcarnitina translocasa; CPT, carnitina palmitoiltransferasa; FABP, proteína de unión a ácidos grasos; FAT, translocasa de ácidos grasos; FATP, proteína transportadora de ácidos grasos; LCHAD, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa de cadena larga; MCAD, acil-CoA deshidrogenasa de cadena media; SCAD, acil-CoA deshidrogenasa de cadena corta; SCHAD, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa de cadena corta; VLCAD, acil-CoA deshidrogenasas de cadena muy larga; LCEH, enoil-CoA hidratasa de cadena larga; SCEH, enoil-CoA hidratasa de cadena corta; LCKT, 3-cetoacil-CoA tiolasa de cadena larga; MCKT, cetoacil-CoA tiolasa de cadena media. Imagen extraída de Guerra et al. (65).

1.3 Resistencia a la insulina

Los efectos de la obesidad sobre el metabolismo de los macronutrientes están mediados principalmente por la resistencia a la insulina (68). La insulina es una hormona liberada por las células β pancreáticas a la vena porta para su transporte al hígado, que es el principal lugar de eliminación de esta (15). La principal función de la insulina es la captación y utilización de glucosa, aunque presenta otras importantes funciones fisiológicas, como la promoción de la lipogénesis, la inhibición de la gluconeogénesis y glucogenólisis, y la prevención de la degradación proteica y la lipólisis (69,70). Cuando tomamos una comida, el nivel de glucosa circulante en sangre aumenta; las células β pancreáticas detectan y liberan insulina en función del nivel de glucosa. La insulina se une a los receptores celulares situados principalmente en el músculo esquelético, el

tejido adiposo y el hígado (16). En el músculo y tejido adiposo, la unión de la insulina a su receptor conduce a la fosforilación en tirosina del sustrato-1 del receptor de insulina (IRS-1), mientras que en el hígado es el IRS-2, mediando así el efecto de la insulina sobre el metabolismo de la glucosa. El IRS-1 activa la fosfatidilinositol (PI)-3 cinasa, que cataliza la fosforilación 3' de PI, PI-4 fosfato y PI-4,5 difosfato, y aumenta el transporte de glucosa y la glucógeno sintasa. Esto activa segundos mensajeros que inician una cascada de fosforilación y desfosforilación que estimula el transporte de glucosa (GLUT-4), la fosforilación de glucosa (hexocinasa II), la glucógeno sintasa (que controla la síntesis de glucógeno) y, tanto, la fosfofructocinasa como la piruvato deshidrogenasa (que regulan la glucólisis y la oxidación de glucosa). La señalización de la insulina también desempeña un papel fundamental en la activación de la óxido nítrico sintasa, que regula la producción de óxido nítrico, el cual es un potente vasodilatador y agente antiaterogénico (71). Por lo tanto, la insulina permite que la glucosa entre en las células para el metabolismo energético, la síntesis de ácidos grasos y la síntesis de proteínas. Cuando las células no responden adecuadamente a la insulina y no pueden utilizar la glucosa para el metabolismo energético, el nivel de glucosa en sangre aumenta y las células β pancreáticas producen más insulina para compensar el elevado nivel de glucosa en sangre circulante, lo que constituye la circunstancia inicial de resistencia a la insulina. A medida que se desarrollan entornos resistentes a la insulina, las células β contraatacan produciendo más insulina en respuesta al deterioro del suministro de glucosa. Si el estado de resistencia a la insulina se mantiene durante meses y años, las células β se esfuerzan continuamente por producir un exceso de insulina para compensar la sobrecarga de glucosa. Debido a la sobrecarga continua, las células β se desgastan, provocando un aumento de la glucosa en circulación (16). Por lo tanto, el término "resistencia a la insulina" se define como la resistencia a los efectos de la insulina sobre la captación, el metabolismo o el almacenamiento de glucosa por parte de los tejidos diana de la insulina, como el músculo esquelético, el hígado y el tejido adiposo (68-70). En la obesidad, la resistencia a la insulina se manifiesta por una disminución del transporte y metabolismo de la glucosa estimulados por la insulina en los adipocitos y el músculo esquelético, y por una supresión deficiente de la producción de glucosa en el hígado. Se ha demostrado que varias adipoquinas como la leptina, la adiponectina y la visfatina estimulan la sensibilidad a la insulina. Se ha propuesto que la adiponectina es esencial en la sensibilidad a la insulina. Por otra parte, la resistina y la proteína de unión

al retinol inducen resistencia a la insulina. En la obesidad, los niveles de expresión de los receptores de adiponectina disminuyen, lo que reduce la sensibilidad a la adiponectina y aumenta la resistencia a la insulina (68).

La insulina es un regulador crítico de prácticamente todos los aspectos de la biología adipocitaria, y los adipocitos son uno de los tipos celulares más sensibles a la insulina (68). Los estudios realizados en una variedad de modelos de ratón de obesidad demuestran una serie de procesos biológicos complejos pero interactivos en el tejido adiposo que contribuyen a la resistencia a la insulina en todo el cuerpo (15), incluyendo (1) la hipoxia adipocitaria, debido a la entrega inadecuada de oxígeno y el aumento de la demanda de oxígeno de los adipocitos (72,73); (2) aumento del número y de la proporción relativa de células inmunitarias proinflamatorias del tejido adiposo (macrófagos y células T) y de la expresión de genes que codifican proteínas proinflamatorias (74); (3) disminución de la producción y secreción en el tejido adiposo de adiponectina, una hormona insulinosensibilizante (75); (4) aumento de la actividad lipolítica del tejido adiposo y de la liberación de ácidos grasos libres a la circulación (76); y (5) alteraciones metabólicamente deletéreas en el contenido de la carga de los exosomas derivados de los macrófagos del tejido adiposo (77–79). Aunque se ha demostrado que cada uno de estos factores causa resistencia a la insulina en modelos de ratón y que revertir sus efectos mejora la acción de la insulina, su importancia en la patogénesis de la resistencia a la insulina en humanas es menos clara o aún no está validada (15).

La obesidad a largo plazo genera una inflamación sistémica de bajo grado y resistencia a la insulina, esto genera diferentes complicaciones en el organismo.

1.4 Inflamación

El tamaño de los adipocitos aumenta con el aumento de peso, provocando la muerte de los adipocitos debido a un suministro inadecuado de oxígeno ante la expansión del tejido adiposo. Los adipocitos y tejidos adiposos agrandados liberan entonces ácidos grasos libres (AGL), especies reactivas del oxígeno (ROS) y citoquinas proinflamatorias. Se cree que los ácidos grasos activan la señalización del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B) y la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), concretamente la p38 MAPK, a través de las vías mediadas por MyD88 y TRIF, tras la activación de la expresión de TLR4 (*Toll-like receptor 4*) en los adipocitos y macrófagos residentes, se produce un incremento del

estrés en el retículo endoplasmático y se producen ROS, promoviéndose así la secreción de citoquinas proinflamatorias (16). TLR4 es una proteína perteneciente a las TLR, las cuales son una familia de proteínas transmembrana responsables de desempeñar un papel esencial en el sistema inmunitario innato. La función principal de la proteína TLR radica en el control de las respuestas inflamatorias e inmunológicas (80).

Los tejidos adiposos obesos segregan varios tipos de adipocinas proinflamatorias, como la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1), el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), la interleucina 1 beta (IL-1 β) y la interleucina 6 (IL-6). La MCP-1 secretada recluta monocitos en el proceso de quimiotaxis atrayendo el receptor 2 de quimiocinas con motivo C-C (CCR2) a los tejidos adiposos obesos. Una vez que los monocitos se unen a los tejidos adiposos en el lugar de la inflamación, los monocitos se diferencian en macrófagos (16,80,81).

El aumento del TNF- α sistémico en la obesidad promueve la actividad de las proteínas inhibidor de la cinasa kappa B (IKK), p38 MAPK, cinasas c-Jun N-terminal (JNK) y proteína cinasa C (PKC), que se dirigen directamente a los residuos de serina de la proteína sustrato del receptor de insulina (IRS) y alteran la fosforilación de la tirosina, lo que conduce a la resistencia a la insulina en los tejidos adiposo, muscular y hepático (16,80). El TNF- α también promueve la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B), que deteriora la señalización de la insulina mediante la desfosforilación de los residuos de fosfo-tirosina en el receptor de insulina y la proteína IRS (16). El aumento de IL6 puede inducir las vías de señalización JAK-STAT (cinasa jano-transductores de señales y activadores de la transcripción) y aumentar la expresión de las proteínas SOCS1 (supresor de la señalización de citoquinas 1) y SOCS3, que pueden desregular la función del receptor de insulina bloqueando estéricamente su interacción con las proteínas IRS o modificando la actividad de la cinasa, y bloqueando la posterior asociación entre IRS-1 y fosfatidilinositol-3 cinasa (PI3K) (16,80) . La IL-6 también puede inducir la expresión del gen TLR-4 a través de la activación de STAT3; y junto con la IL-1 β potencian STAT3 y NF- κ B en los hepatocitos, causando inflamación. La IL-1 β activa la p38 MAPK a través del receptor de IL-1 β e impide la señalización de la insulina mediante la fosforilación de serina en IRS1/2 (16).

Los lípidos de la dieta pueden provocar cambios en los patrones de expresión de las TLR. Ghanim et al. (82) comprobaron como la ingesta de una comida rica en calorías

(910 Kcal), lípidos (51 g) y carbohidratos (88 g) por persona en sujetos delgados sanos provocó cambios significativos en los TLR en el periodo posprandial, con un aumento de TLR2 y TLR4 en las células mononucleares sanguíneas. Esto refuerza la importancia potencial de la inflamación posprandial para la obesidad, la DMT2 y la fisiopatología de las enfermedades cardiovasculares (80).

Los ácidos grasos saturados, en particular el ácido láurico y el ácido palmítico, son capaces de estimular una respuesta inflamatoria a través de la vía de señalización TLR4. Además, los ácidos grasos saturados también pueden inducir una respuesta inflamatoria a través de la activación de TLR2, que forma heterodímeros en la membrana plasmática, junto con TLR1 o TLR6. Esto puede ser debido a que los ácidos grasos saturados representan un componente esencial de las endotoxinas bacterianas, las cuales son reconocidas por las TLRs. El ácido palmítico también deteriora las vías de señalización de la insulina al inducir la fosforilación del IRS-1 en la posición 307 del residuo de serina. Este proceso reduce sus interacciones con el receptor de insulina y, en consecuencia, disminuye la transducción de señales inducida por la insulina. Además, los ácidos grasos saturados inducen resistencia a la acción de la insulina debido a la acción antagonista del coactivador del receptor- γ activado por el proliferador de peroxisomas (PGC)-1 alfa. Este proceso induce la expresión de genes mitocondriales implicados en la fosforilación oxidativa y en la captación de glucosa, que está mediada por la insulina (80).

Por otro lado, los ácidos grasos poliinsaturados constan de dos familias (ω -3 y ω -6) que se caracterizan por las ubicaciones del doble enlace, definidas por el primer doble enlace en relación con el grupo metilo terminal en la molécula de ácido graso. Estos dos ácidos grasos no se sintetizan en el ser humano, por lo tanto, deben consumirse a través de la dieta. Los ácidos grasos poliinsaturados ω -3 y ω -6 generan modulaciones relevantes en la respuesta inflamatoria porque son precursores de series diferentes de eicosanoides, que tienen efectos distintos sobre la intensidad de la respuesta inflamatoria. Así, el ácido ω -6 araquidónico genera eicosanoides de serie par, como la prostaglandina E2 y el leucotrieno B4. Estos eicosanoides inducen efectos proinflamatorios, como aumento de la permeabilidad vascular, vasodilatación, fiebre y quimiotaxis. Es importante señalar que la prostaglandina E2 también tiene efectos antiinflamatorios, como la reducción de la producción de IL-1 y TNF- ω . En cuanto a los

efectos moleculares del ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 ω -3) y el ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6 ω -3) en la modulación de la respuesta inflamatoria, los estudios han demostrado que estos ácidos grasos inhiben la expresión de genes inflamatorios, como la COX-2, la iNOS y la IL-1 en los macrófagos. A diferencia del efecto estimulante de los ácidos grasos saturados sobre la activación de TLR2 y TLR4, el EPA y el DHA son capaces de mitigar la activación de la vía del factor de transcripción NF- κ B inducida por diversos agonistas (80).

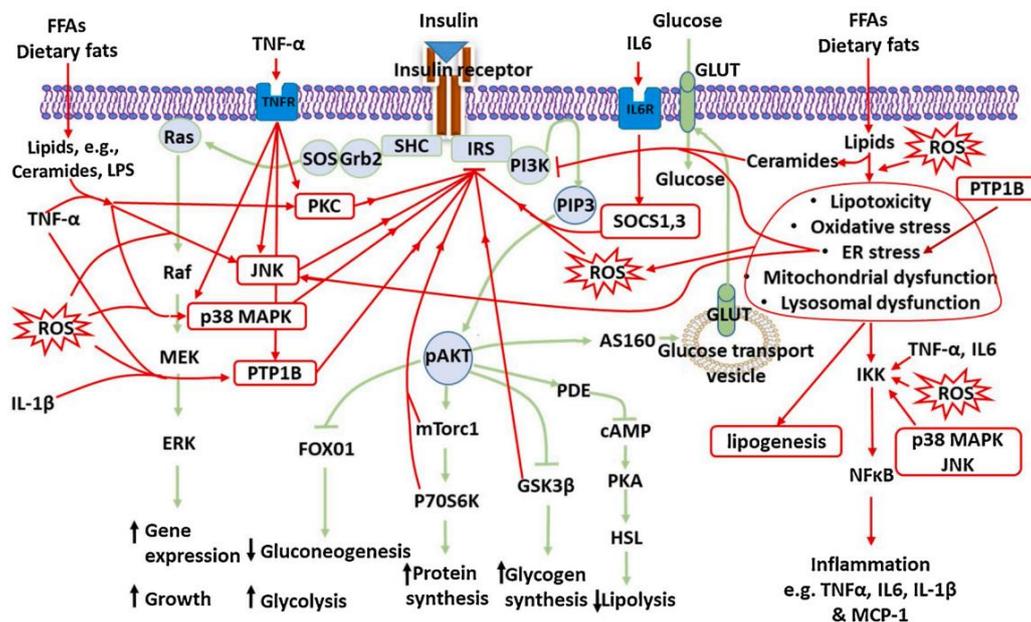


Figura 5. Posibles mecanismos celulares de la resistencia a la insulina inducida por la obesidad y el proceso inflamatorio asociado. La insulina tiene posibles efectos sobre la homeostasis de la glucosa, el metabolismo energético, el almacenamiento de energía y el crecimiento. La sobrealimentación crónica y la obesidad interceptan la acción de la insulina en el metabolismo celular, lo que aumenta los niveles sistémicos de insulina, AGL, inflamación y glucosa. Esta figura ilustra cómo los lípidos, la inflamación y las ROS interrumpen la vía de señalización de la insulina dirigida a los IRS. En la obesidad, estas quinasas regulan negativamente las proteínas IRS tras una estimulación prolongada de la insulina o activan vías no relacionadas para inhibir la acción de la insulina mediante la fosforilación de residuos de serina. El color rojo indica el mecanismo molecular de la resistencia a la insulina asociada a la obesidad. El color verde claro indica la vía de señalización de la insulina modificada. Imagen extraída de Ahmed et al. (16).

1.5 Lipotoxicidad

La obesidad no sólo se asocia a la acumulación de lípidos en el tejido adiposo, sino también en los tejidos no adiposos. Los efectos nocivos de la acumulación de lípidos en tejidos no adiposos se conocen como lipotoxicidad. Además de reducir la eliminación de ácidos grasos de la circulación, el aumento de la masa de tejido adiposo libera más AGL a la circulación, lo que, a su vez, incrementa los niveles plasmáticos de AGL en la

obesidad. Así mismo, una vez elevados los niveles plasmáticos de AGL, se inhibe la acción antilipolítica de la insulina. De este modo, la tasa de liberación de AGL a la circulación aumentará aún más (83). Por tanto, la sobreproducción crónica de AGL y la deposición de lípidos procedentes de la dieta en la obesidad, así como la sobrealimentación provocan lipotoxicidad en las células de los músculos, el corazón, el hígado, el páncreas y otros órganos (16).

Maris et al. (84) afirmaron que la resistencia a la insulina no sólo está inducida por la propia acumulación de grasa en los tejidos adiposos, sino también por la proinflamación causada por la deposición de grasa ectópica (84). La grasa ectópica produce lípidos tóxicos, como ceramidas y diacilglicéridos (DAG), altera la vía PI3K, activa los complejos PKC, JNK e IKK, genera ROS, favorece el desarrollo de estrés en el retículo endoplásmico y el endurecimiento de la membrana, induce la inflamación y activa la apoptosis. Las grasas alimentarias también activan las vías de señalización intracelular de MAPK y NF- κ B, y regulan al alza la expresión de NALP3 y la proinflamación sistémica (16).

1.6 Disfunción mitocondrial y especies reactivas de oxígeno

La mitocondria es un orgánulo esencial que genera energía en forma de Adenosín Trifosfato (ATP) en una vía catalítica para mantener la función fisiológica normal. Cuenta con procesos dinámicos para adaptarse sistémicamente en entornos metabólicos como la mitofagia, la apoptosis, la fusión y la fisión. La disfunción de la dinámica mitocondrial provoca la pérdida de integridad y funciones, perjudica la producción de energía y causa diversas alteraciones y daños metabólicos. Estos procesos disfuncionales dañan el ADN mitocondrial, lo que puede detener la producción de energía, generar ROS e inducir estrés oxidativo y apoptosis (16). Además, es bien sabido que las mitocondrias son las principales fuentes generadoras de ROS. Los ácidos grasos que se acumulan en las proximidades de las mitocondrias son vulnerables a la peroxidación lipídica inducida por las ROS. Posteriormente, estos peróxidos lipídicos podrían tener efectos lipotóxicos provocando disfunción mitocondrial y los efectos antes comentados (83). La obesidad y el consumo excesivo de nutrientes se asocian con disfunciones mitocondriales. Esta disfunción mitocondrial puede ocurrir en varios órganos, en el caso de la obesidad se supone que la mayoría tiene lugar en los tejidos adiposos, los músculos y el hígado, ya que estos órganos están implicados en procesos de alta energía con una sobrecarga

excesiva de nutrición y lípidos (16). La sobrecarga de ácidos grasos afecta a las mitocondrias en tres fases. Al principio, con la acumulación de ácidos grasos se induce la producción de ROS. En la segunda fase, se observa un aumento de la conductancia protónica mitocondrial o el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa. En la última fase, los ácidos grasos pueden provocar la permeabilización de la membrana mitocondrial externa. Una vez inducida la permeabilización de la membrana mitocondrial, se facilita la liberación de hidrolasas y activadores catabólicos de las mitocondrias. Estas enzimas catabólicas, así como el cese de las funciones bioenergéticas y redox de las mitocondrias, conducen finalmente a la muerte celular. Realmente, los ácidos grasos provocan estrés oxidativo y alteraciones en la estructura y función mitocondrial; y el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa es uno de los efectos deletéreos más reconocidos de los ácidos grasos (83). Finalmente, se ha comprobado que las características de las mitocondrias en los individuos obesos son diferentes en comparación con las de los individuos delgados. Debido a la sobrecarga de lípidos y glucosa, las mitocondrias producen más ROS de las necesarias. En las mitocondrias sanas, menos del 5% del oxígeno recogido produce ROS; mientras que, en el caso de la obesidad, las mitocondrias producen una cantidad incontrolable de ROS, que generan los daños comentados anteriormente (16).

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) son moléculas señalizadoras esenciales que se generan como producto del metabolismo celular (85–87) y desempeñan un papel importante en el desarrollo de la obesidad y sus complicaciones metabólicas asociadas (87); si no se controlan bien, pueden dañar las proteínas, los lípidos y el ADN (85,87). Las ROS están conformadas por: anión superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), óxido nítrico (NO), hipoclorito (ClO^-) y peroxinitrito (ONOO^-) (16,85,87). El lugar más importante, donde se producen las ROS, es la mitocondria, debido al desacoplamiento de electrones a través de la cadena respiratoria (85–87), aunque también pueden producirse en orgánulos de la membrana plasmática, y sistemas, como el retículo endoplasmático, lisosomas, peroxisomas y por enzimas citosólicas (87). Se cree que el daño producido por las ROS se debe a un desequilibrio entre la generación de estas y la capacidad de eliminación de ROS por parte de los sistemas antioxidantes de las células. Para mantener a las ROS en niveles adecuados, los tejidos tienen componentes antioxidantes que actúan sinérgicamente para reducir la citotoxicidad de los radicales libres. Las moléculas antioxidantes que se encuentran de

forma natural son el glutatión, la ubiquinona, la tiorredoxina y el urato. También existen proteínas, como la ferritina, la transferrina, la lactoferrina y la ceruloplasmina, con propiedades antioxidantes, ya que estas se unen y secuestran metales de transición que pueden iniciar reacciones oxidativas. Además, los tejidos presentan enzimas con actividad antioxidante, como la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (GPx), la glutatión reductasa (GR), la glutatión S-transferasa (GST), la catalasa (CAT), la tiorredoxina reductasa (TR), las peroxiredoxinas (Prx) y la NAD(P)H: Ubiquinona oxidoreductasa (NQO1) (86,87).

Se creó que entre el 0.2 % y el 2 % del oxígeno consumido en la célula se emite en forma de ROS. En la mayoría de los tipos celulares, el principal lugar de generación de ROS es la cadena de transporte electrónico, que se encuentra en las crestas de la membrana interna mitocondrial (85–87). Una pequeña proporción de electrones no atraviesan completamente la cadena de transporte electrónico y reaccionan directamente con el oxígeno, dando lugar a la formación de $\bullet\text{O}_2^-$, el cual es altamente reactivo y tiene una vida media corta del orden de 1 ms. Tradicionalmente, se ha considerado a los complejos I y III como los sitios clave de la generación de ROS; sin embargo, estudios recientes han indicado que al menos otras 10 enzimas mitocondriales, como el complejo II, también están implicadas (88). La producción de $\bullet\text{O}_2^-$ está regulada por varios factores, como el estado funcional de los complejos individuales, el estado redox de la CoQ, el potencial de membrana, las proteínas de desacoplamiento (UCP) y el ensamblaje del supercomplejo (**Figura 6**) (85). La enzima SOD convierte rápidamente el $\bullet\text{O}_2^-$ en peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El H_2O_2 es más estable que el $\bullet\text{O}_2^-$, pero puede difundirse a través de las membranas, lo que significa que puede afectar a las biomoléculas presentes en toda la célula. Para eliminar este H_2O_2 actúan las enzimas CAT, GPx y TR transformándolo en H_2O (85–87).

Por otro lado, se ha comprobado como la obesidad aumenta la producción de ROS e induce la peroxidación lipídica en adipocitos, hígado y músculos esqueléticos de humanos (16). Se ha propuesto que este exceso de ROS genera señales falsas y engañosas sobre el estado energético. Este exceso de señales engañosas estimula la secreción de insulina y el almacenamiento de lípidos, de forma inapropiada (86). Esto reduciría transitoriamente la glucosa en sangre, induciendo así el hambre, seguido del consumo de alimentos, la secreción de insulina y el aumento del almacenamiento de grasa. En

última instancia, la hiperinsulinemia prolongada provoca resistencia a la insulina y aumenta las reservas de lípidos por encima de la capacidad normal de los adipocitos, lo que induce la inflamación del tejido adiposo, altera el perfil lipídico circulante y favorece el depósito ectópico de grasa (86).

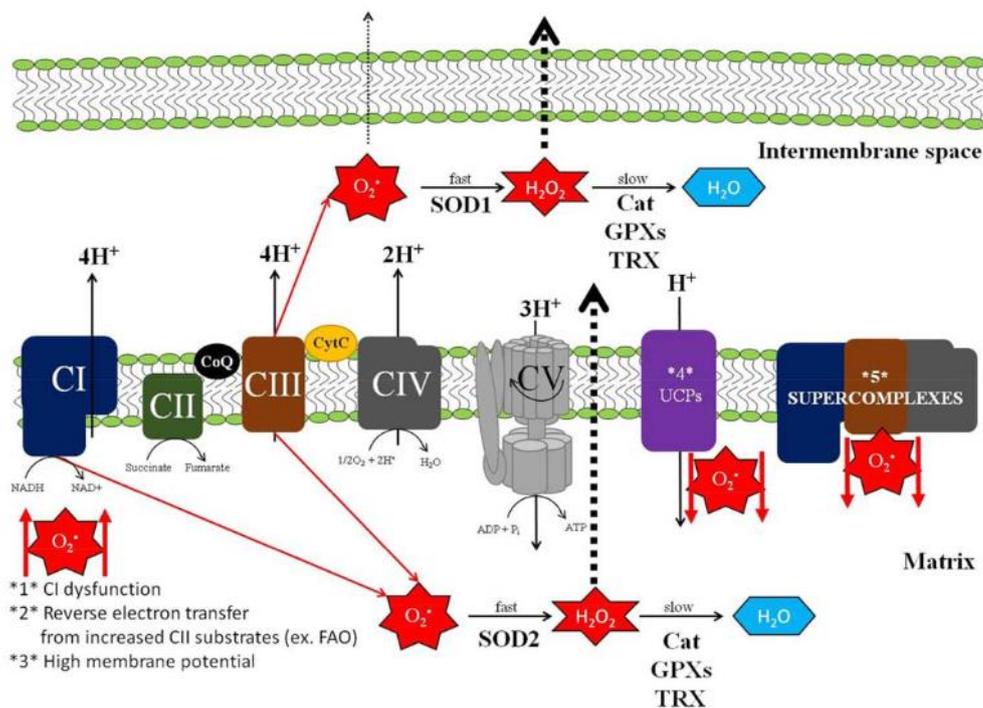


Figura 6. Regulación de la generación de especies reactivas de oxígeno por la cadena de transporte de electrones (ETC). La representación esquemática destaca los principales lugares de generación de anión superóxido y los medios para su detoxificación. Las tres vías principales que regulan el aumento de la generación de anión superóxido son: 1) la disfunción de la ETC, sobre todo en el complejo I; 2) la transferencia inversa de electrones (RET), por la que una reserva de CoQ muy reducida transfiere electrones de vuelta a Complejo I, que luego se separan para formar superóxido; y 3) un potencial de membrana excesivamente alto aumenta la probabilidad de que los electrones actúen fuera de la ETC para formar superóxido. Dos vías principales conocidas para disminuir la generación de superóxido incluyen: 4) el desacoplamiento de la membrana interna por las proteínas de desacoplamiento (UCP) u otros desacopladores que disipan parte del potencial de membrana; y 5) el aumento de la eficacia de la transferencia de electrones por los supercomplejos ETC que conduce a la disminución de la generación de superóxido en el Complejo I. Imagen extraída de McMurray et al. (85).

Además, el retículo endoplasmático (RE) es otro orgánulo crucial en una célula eucariota, aunque su función principal es la síntesis, el plegamiento y el transporte de proteínas, el RE también controla muchos procesos celulares, como la inflamación y el metabolismo lipídico, a través de la vía de señalización de la respuesta a proteínas no plegadas. Además, participa en el almacenamiento de glucosa, proteínas e iones de calcio (16,87). El estrés generado en el RE ha sido designado como el actor clave en el desarrollo de la disfunción metabólica asociada a la obesidad. Se ha comprobado en

ratones como durante la obesidad y la sobrealimentación, la alta carga de lípidos y proteínas desplegadas/mal plegadas se acumulaban en el RE, lo que provocaba estrés del RE e inflamación crónica del tejido adiposo y el hígado (16). Por otro lado, los depósitos internos del RE liberan niveles elevados de Ca^{2+} , lo que provoca una disfunción mitocondrial y la generación de ROS mitocondriales (87).

1.7 Principales patologías asociadas

La obesidad es un factor de riesgo de varias enfermedades, en particular la diabetes mellitus de tipo 2 (DMT2), la enfermedad del hígado graso no alcohólico (*non-alcoholic fatty liver disease*, NAFLD), la esteatohepatitis no alcohólica (*non-alcoholic steatohepatitis*, NASH), las enfermedades cardiovasculares (ECV) y algunos tipos de cáncer (69).

1.7.1 Diabetes mellitus

La diabetes es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por la hiperglucemia resultante de defectos en la secreción de insulina, en la acción de la insulina o en ambas. La hiperglucemia crónica de la diabetes se asocia con daños a largo plazo, disfunción e insuficiencia de diferentes órganos, especialmente los ojos, los riñones, los nervios, el corazón y los vasos sanguíneos (89). Existen 4 tipos de diabetes:

1. Prediabetes: los niveles de azúcar en sangre son más altos que lo habitual, pero sin alcanzar niveles lo suficientemente altos para que se diagnostique diabetes tipo 2. La prediabetes lo pone en mayor riesgo de presentar diabetes tipo 2, enfermedad del corazón y derrame cerebral (90).
2. Diabetes mellitus tipo 1: se debe a una reacción autoinmune que destruye las células beta del páncreas, provocando que el organismo sea incapaz de producir insulina y las personas deben recibir insulina todos los días para sobrevivir. Aproximadamente entre 5-10% de las personas que tienen diabetes presentan diabetes tipo 1 y esta suele aparecer en la infancia y adolescencia, aunque puede presentarse a cualquier edad. La destrucción autoinmune de las células beta tiene múltiples predisposiciones genéticas y también está relacionada con factores ambientales. Aunque la obesidad no es un factor de riesgo para el desarrollo de esta patología, la presencia de obesidad no es incompatible con el diagnóstico (89,90).

3. Diabetes mellitus tipo 2: en este caso no se produce destrucción autoinmune de las células beta, si no que las personas presentan resistencia a la insulina y suelen tener una deficiencia relativa de insulina. En un primer principio, estas personas no necesitan tratamiento con insulina para sobrevivir. Aunque las personas con este tipo de diabetes puedan tener niveles de insulina que parecen normales o elevados, se esperaría que los niveles más altos de glucosa en sangre de estos pacientes diabéticos dieran lugar a valores de insulina aún más elevados si la función de sus células beta hubiera sido normal. Así pues, la secreción de insulina es defectuosa en estos pacientes e insuficiente para compensar la resistencia a la insulina (89). Es un proceso que evoluciona a lo largo de muchos años y generalmente se diagnostica en los adultos (89,90). La mayoría de los pacientes con esta forma de diabetes son obesos, así mismo, la propia obesidad provoca cierto grado de resistencia a la insulina. Los pacientes que no son obesos según los criterios tradicionales de peso pueden tener un mayor porcentaje de grasa corporal distribuida predominantemente en la región abdominal (89).
4. Diabetes gestacional: la diabetes gestacional aparece en mujeres embarazadas que nunca han tenido diabetes (90) y durante muchos años se ha definido como cualquier grado de intolerancia a la glucosa durante el embarazo. Aunque la mayoría de los casos se resuelven con el parto, la definición se aplica tanto si el trastorno persiste después del embarazo como si no, y no excluye la posibilidad de que la intolerancia a la glucosa no reconocida haya precedido al embarazo o haya comenzado concomitantemente con éste (89). Además, este tipo de diabetes aumenta el riesgo de padecer diabetes tipo 2, tanto en las madres como en los hijos, en un futuro (90).

La obesidad es conocida por ser el mayor factor de riesgo en el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 (DMT2). Los adultos con un IMC >35 kg/m² tienen 20 veces más probabilidades de desarrollar DMT2 que los que tienen un IMC entre 18.5 y 24.9 kg/m². Además, el 80% de los pacientes con DMT2 tienen sobrepeso o son obesos. Se cree que la causa principal de la DMT2 es la resistencia a la insulina provocada por la obesidad en

los tejidos no adiposos, combinada con una secreción insuficiente de insulina por parte de las células beta pancreáticas (69).

1.7.2 Enfermedades cardiovasculares

El sistema cardiovascular está formado por el corazón y sus vasos sanguíneos. La enfermedad cardiovascular, también conocida como cardiopatía, se refiere a las 4 entidades siguientes: enfermedad arterial coronaria o cardiopatía coronaria, enfermedad cerebrovascular, arteriopatía periférica y aterosclerosis. Las enfermedades cardiovasculares (ECV) se mantienen entre las 2 principales causas de muerte en Estados Unidos desde 1975 con 1 de cada 4 muertes, y las enfermedades del corazón ocuparon la primera causa de muerte en 2015 seguidas de 595.930 muertes relacionadas con el cáncer (91). Según la OMS (92), las ECV son la principal causa de muerte en el mundo, estimándose unos 17,9 millones de muertes al año en 2019. Más de cuatro de cada cinco muertes por ECV se deben a infartos de miocardio y accidentes cerebrovasculares, y un tercio de estas muertes se producen prematuramente en personas menores de 70 años. Los factores de riesgo modificables más importantes de las ECV son una dieta poco saludable, la inactividad física, el consumo de tabaco y el consumo nocivo de alcohol. Los efectos de los factores de riesgo modificables pueden manifestarse en forma de aumento de la tensión arterial, de la glucosa en sangre, de los lípidos en sangre y de sobrepeso y obesidad (91,92).

Aunque las ECV pueden surgir directamente de diferentes etiologías, abordar los factores de riesgo asociados al desarrollo de la aterosclerosis es lo más importante porque es un denominador común en la fisiopatología de la ECV. La aterosclerosis es el proceso patogénico de las arterias y la aorta que puede causar enfermedades como consecuencia de la disminución o ausencia de flujo sanguíneo por estenosis de los vasos sanguíneos (91). En la aterosclerosis se produce el depósito e infiltración de sustancias lipídicas en las paredes de las arterias de mediano y grueso calibre, las cuales activan las células endoteliales de los vasos y promueven el reclutamiento de células inmunes; inicialmente, plaquetas, macrófagos y células dendríticas; que favorecen el posterior desarrollo de respuestas celulares y humorales mediadas por linfocitos T y B. Se desarrolla así una respuesta inflamatoria que media la formación de placas de ateroma y estrechamiento de las arterias (93,94). Por lo tanto, en este proceso intervienen

múltiples factores: dislipidemia, fenómenos inmunológicos, inflamación y disfunción endotelial (91).

Los ensayos clínicos y los estudios epidemiológicos han demostrado que la obesidad puede aumentar el riesgo de ECV, como la enfermedad arterial coronaria, la insuficiencia cardíaca y la aterosclerosis. Además, la obesidad guarda una estrecha relación con otros factores de riesgo de ECV, como la hipertensión, la resistencia a la insulina y la dislipidemia. La obesidad provoca hipertrofia, principalmente del ventrículo izquierdo, disfunción e inflamación del tejido adiposo, lo que en última instancia modifica la estructura y la función del sistema cardiovascular (7,69).

Por otro lado, el depósito ectópico de TG en otros órganos conduce a una acumulación anormal de grasa alrededor del corazón, lo que a su vez se ha relacionado con el riesgo de ECV. En los pacientes con obesidad y resistencia a la insulina, el exceso de AGL se acumula en los cardiomiocitos, lo que da lugar a un aumento de ROS a través de la oxidación de ácidos grasos y, finalmente, conduce a la disfunción mitocondrial. Además, el aumento del depósito de lípidos en el miocardio induciría una miocardiopatía debido a la lipotoxicidad cardíaca (69).

Las adipoquinas se consideran un vínculo entre la obesidad y la ECV. La leptina, adiponectina, resistina, visfatina y citoquinas inflamatorias, pueden modular el tono vascular, la migración y proliferación de células musculares lisas, la inflamación y el estrés oxidativo, aumentando así el riesgo de factores de ECV (69).

Como ya se ha visto, la aterosclerosis es la principal causa de las ECV, y la obesidad es un importante factor de riesgo de aterosclerosis. El exceso de TG acumulado en los adipocitos es transportado por las VLDL en la circulación. Estas partículas penetran fácilmente en la pared arterial, y sufren oxidación y otras modificaciones para producir proinflamación. Los macrófagos se combinan con las lipoproteínas para convertirse en células espumosas, un rasgo distintivo de las lesiones ateroscleróticas tempranas. La acumulación excesiva de tejido adiposo puede aumentar las citoquinas inflamatorias, TNF- α , IL-6 e IL-1 β , que a su vez promueven la migración de macrófagos al tejido adiposo y aumentan el número de células espumosas (69).

1.7.3 Enfermedad del hígado graso no alcohólico

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (*non-alcoholic fatty liver disease*, NALFD) es una afección metabólica causada por una serie de trastornos metabólicos como la acumulación excesiva de lípidos, el estrés oxidativo, la inflamación y la apoptosis (95,96) (**Figura 7**). Debido al gran número de factores de riesgo de esta patología, especialmente factores de desregulación metabólica, en 2020 un panel internacional de expertos lideró un proceso de consenso para desarrollar un término más apropiado para el estudio de esta enfermedad. El término propuesto fue enfermedad del hígado graso asociada a disfunción metabólica (*metabolic dysfunction-associated fatty liver disease*, MAFLD) (97), sin embargo, durante la presente tesis doctoral se utilizará la terminología anterior de NAFLD, ya que la bibliografía consultada no incluía el nuevo término adoptado. La NALFD se define como un síndrome clínico-patológico, cuya característica principal es la acumulación de grasa en el tejido hepático, principalmente en forma de triglicéridos, superior al 5% del peso del hígado y que no pueden explicarse por un consumo excesivo de alcohol (es decir, >30 g al día). Esta patología es una de las principales causas de enfermedad hepática crónica en todo el mundo, y la primera en los países occidentales. Su incidencia entre las enfermedades hepáticas crónicas ha aumentado del 47 al 75% en los últimos años, como consecuencia de esta elevada prevalencia, se espera que la NAFLD se convierta en la principal causa de hepatopatía terminal, trasplante de hígado y carcinoma hepatocelular en la próxima década (98,99).

Una de las razones de la elevada prevalencia de la NAFLD es que está fuertemente vinculada con las características del síndrome metabólico, como la obesidad central, la resistencia a la insulina, la diabetes mellitus de tipo 2, la hipertensión arterial y la dislipidemia (98,99). Los pacientes con NAFLD suelen tener un patrón dietético poco saludable caracterizado por un alto consumo de grasas esterificadas con ácidos grasos libres saturados, colesterol y fructosa y, por otro lado, una baja ingesta de antioxidantes y grasas esterificadas con ácidos grasos libres poliinsaturados (98).

La acumulación de grasa hepática genera múltiples señales que alteran el metabolismo lipídico y glucídico, dando lugar a la presencia de vacuolas intracelulares de grasa, falta de capacidad para realizar el proceso de β -oxidación mitocondrial, generación de estrés oxidativo, desarrollo de mecanismos proinflamatorios y,

finalmente, apoptosis hepatocelular (99) (**Figura 7**). La acumulación de grasa en las células del hígado se denomina esteatosis hepatocelular y se clasifica en dos tipos: macrovesicular y microvesicular. En la esteatosis macrovesicular, una sola gota de grasa grande o gotitas de grasa más pequeñas y bien definidas ocupan el citoplasma de los hepatocitos, empujando el núcleo hacia la periferia. En la esteatosis microvesicular, el citoplasma de los hepatocitos está lleno de pequeñas gotas de lípidos y el núcleo está situado en el centro de la célula. La esteatosis en NAFLD suele ser macrovesicular (100).

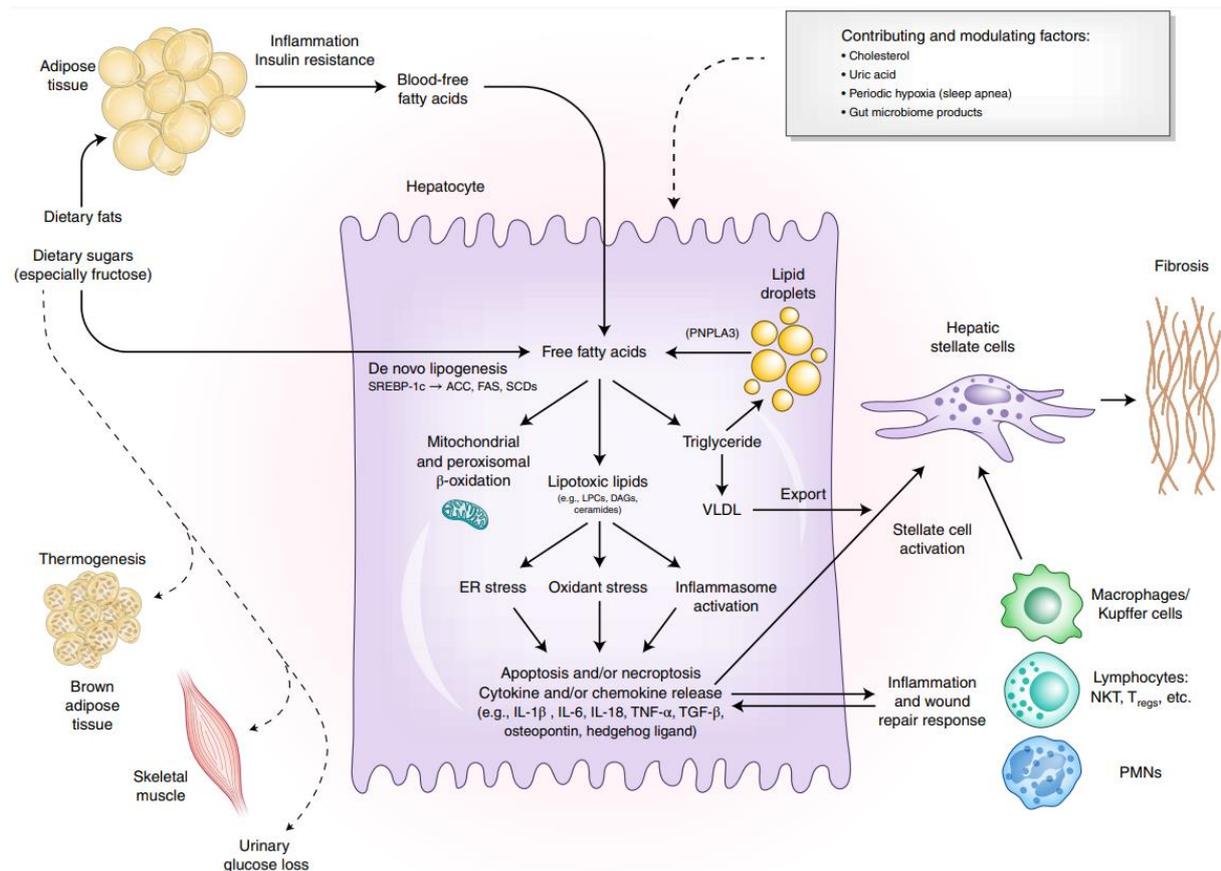


Figura 7. Los ácidos grasos libres son fundamentales en la patogénesis de la NAFLD. Los ácidos grasos libres procedentes de la lipólisis de triglicéridos en el tejido adiposo llegan al hígado a través de la sangre. Otro factor importante que contribuye al flujo de ácidos grasos libres a través del hígado es la DNL. Los dos destinos principales de los ácidos grasos en los hepatocitos son la β -oxidación mitocondrial y la reesterificación para formar triglicéridos. Los triglicéridos pueden exportarse a la sangre en forma de VLDL o almacenarse en gotas lipídicas. Cuando la eliminación de ácidos grasos a través de la β -oxidación o la formación de triglicéridos se ve desbordada, los ácidos grasos pueden comenzar a formar especies lipotóxicas que conducen al estrés del RE, el estrés oxidativo y la activación del inflamasoma. Estos procesos son responsables del fenotipo de NAFLD con lesión hepatocelular, inflamación, activación de células estrelladas y acumulación progresiva de matriz extracelular en exceso. Las modificaciones del estilo de vida, que incluyen hábitos alimentarios saludables y ejercicio regular, reducen la sobrecarga de sustratos mediante la disminución de la ingesta y el desvío de sustratos metabólicos a los tejidos metabólicamente activos y, por tanto, pueden prevenir o revertir la NAFLD. Imagen extraída de Friedman et al. (101).

El desarrollo de esta enfermedad fue explicado por Day y James (102) hace casi dos décadas mediante la hipótesis de “two-hits” o dos etapas. La primera etapa se

caracteriza por una acumulación de grasa, especialmente triglicéridos, en los hepatocitos y donde se produce la RI. Esta condición aumentaría la vulnerabilidad del hígado a otros factores dañinos, denominados colectivamente como segundo “hit”, como podría ser un aumento en los niveles de estrés oxidativo, inflamación y un principio de fibrosis. Esta segunda etapa impulsaría la progresión de la esteatosis macrovesicular a la NASH, seguida por una fibrosis, y posteriormente, se alcanzarían etapas finales irreversibles como remodelación cirrótica con insuficiencia hepática y, por último, hepatocarcinogénesis (98) (**Figura 8**).

Sin embargo, con el paso del tiempo esta teoría ha evolucionado, y esta progresión se ha explicado mediante una teoría “multi-hit” o de impactos múltiples (98,101). Son muchas las vías moleculares que contribuyen al desarrollo de NASH, y ni siquiera se sabe con certeza si la NASH siempre va precedida de un hígado graso no-alcohólico. Además, es probable que los factores patogénicos no sean idénticos en todos los pacientes. Así pues, tanto los mecanismos que conducen a la enfermedad como sus manifestaciones clínicas son muy heterogéneos (101). Según este punto de vista, la RI, sería el primer “hit” o etapa que desencadena la enfermedad, dando lugar a elevaciones hepatocelulares de AGLs; estas moléculas serían los principales factores patogénicos que hacen que el hígado sea extremadamente vulnerable a los “hits” o impactos posteriores, mencionados anteriormente (98).

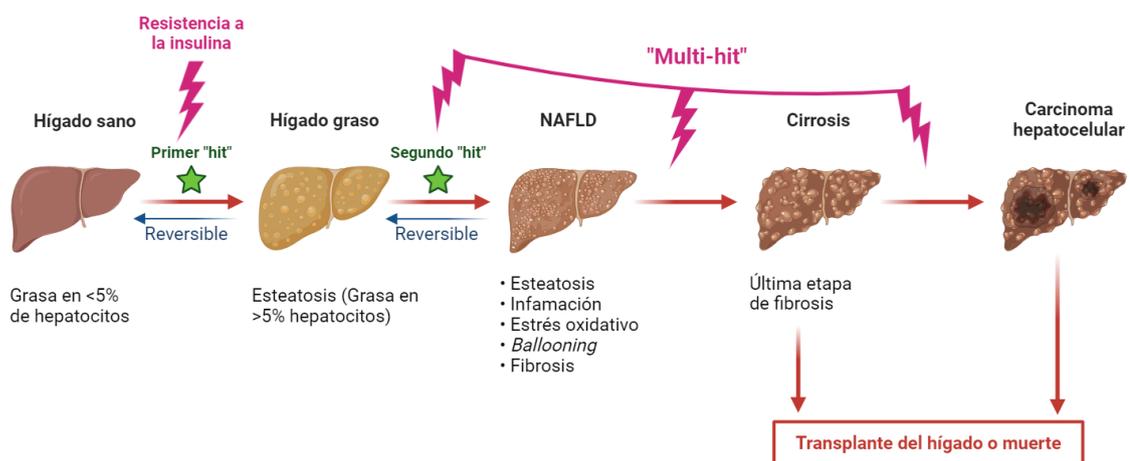


Figura 8. Representación de hipótesis de “two-hits” y teoría del “multi-hit” o impactos múltiples en la progresión clínica del NAFLD/MAFLD. La NAFLD comprende un amplio espectro de lesiones hepáticas, que van desde la esteatosis macrovesicular simple (hígado graso) a la esteatohepatitis, con inflamación, fibrosis y lesión hepática combinadas, que progresa a cirrosis y, finalmente, a carcinoma hepatocelular. El “hit” o impacto inicial es la resistencia a la insulina, que conduce a un aumento de la captación y síntesis de ácidos grasos libres almacenados en forma de triglicéridos, lo que da lugar a una esteatosis simple. En la progresión hacia estadios más avanzados de la enfermedad pueden intervenir otros efectos múltiples que actúan como agresiones superpuestas, como el estrés oxidativo, los mediadores inflamatorios de origen

hepático (por ejemplo, las citocinas inflamatorias derivadas de las células de Kupffer) y de fuentes extrahepáticas (por ejemplo, las adipoquinas y los lipopolisacáridos de la microbiota intestinal), las agresiones apoptóticas y la regeneración compensatoria resultante, la adquisición de un fenotipo profibrótico y los factores genéticos proesteatóticos, entre otros. La NASH puede producirse incluso sin esteatosis, lo que respalda la opinión de que la esteatosis no es un factor causal en el desarrollo y la progresión de la NASH. Adaptación de Bessone et al. (98) generada a partir de BioRender.

1.7.4 Síndrome metabólico

El síndrome metabólico (MetS) no es una única enfermedad, sino que es definida por la combinación de varias enfermedades metabólicas conectadas de origen metabólico, ambiental y/o genético (103). En ellas se incluyen obesidad abdominal, resistencia a la insulina, disglucemia (reducción de la tolerancia a la glucosa y/o reducción de la glucosa en ayunas), dislipidemia aterogénica e hipertensión (103,104). Estas alteraciones se evalúan mediante seis índices para realizar del MetS: perímetro de cintura, niveles de glucosa en ayunas, niveles de triglicéridos, niveles de colesterol y niveles de HDL-colesterol y presión arterial (104). Existen muchas definiciones para esta patología, aunque todas ellas son similares, en el caso de la Federación Internacional de Diabetes (104,105) considera que un individuo presenta MetS si posee una circunferencia de cintura superior a 94 cm en hombres o 80 cm en mujeres junto con la presencia de dos o más de los siguientes factores:

1. Glucosa plasmática superior a 100 mg/dL o diabetes diagnosticada
2. HDL-colesterol inferior a 40 mg/dL en hombres, 50 mg/dL en mujeres o tratamiento específico para esta afección
3. Triglicéridos plasmáticos superiores a 150 mg/dL o tratamiento específico para esta afección
4. Presión arterial superior a 130 mm Hg (sistólica) o 85 mm Hg (diastólica) o tratamiento específico para hipertensión

Saklayen (105) estimó que casi el 25 % de la población mundial padece MetS, y aunque esta varía entre países y, a veces, es complicada de estimar según la definición empleada. Según el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC), en Estados Unidos se ha producido un aumento del 35 % en la prevalencia del MetS desde la aparición del término en la década de 1980 hasta 2012 (104). La incidencia del MetS coincide con la de la obesidad y la DMT2 (104,105). Alrededor del 85 % de los pacientes con DMT2 también padecen MetS y, por tanto, tienen un mayor riesgo de ECV (104). En el caso de la población europea, la prevalencia del MetS difiere según la definición, la

localización geográfica y la población examinada, pero se calcula que oscila entre el 13 % y el 36 % (106).

La fisiopatología del MetS (**Figura 9**) engloba diferentes mecanismos que se han tratado en los diferentes apartados anteriores. Como ya se ha visto, la obesidad se ha convertido en una epidemia mundial debido a los estilos de vida sedentarios, el alto consumo de comida rápida y otros entornos socioeconómicos obesogénicos. Los individuos pueden adquirir el MetS debido a una susceptibilidad genética a la obesidad y a respuestas proinflamatorias. Se cree que intervienen diferentes mecanismos como: inflamación del tejido adiposo, estrés celular, acumulación lipídica en el músculo esquelético, esteatosis hepática, disfunción del sistema nervioso autónomo, resistencia a la leptina y relaciones cruzadas entre sistemas de señalización. En este último aspecto, la obesidad y la hipertensión pueden estar relacionadas por las interacciones entre los sistemas de señalización de la insulina y la renina-angiotensina. Por otro lado, la resistencia a la insulina y la disfunción endotelial, así como la resistencia a la insulina y la inflamación, tienen relaciones recíprocas. Se ha comprobado como el MetS provoca un aumento inusual del sistema renina-angiotensina-aldosterona en el sistema cardiovascular (103). Entre los mecanismos propuestos, la resistencia a la insulina, la inflamación crónica y la activación neurohormonal parecen ser los principales factores en la progresión del MetS y su posterior transición a ECV y DMT2 (104).

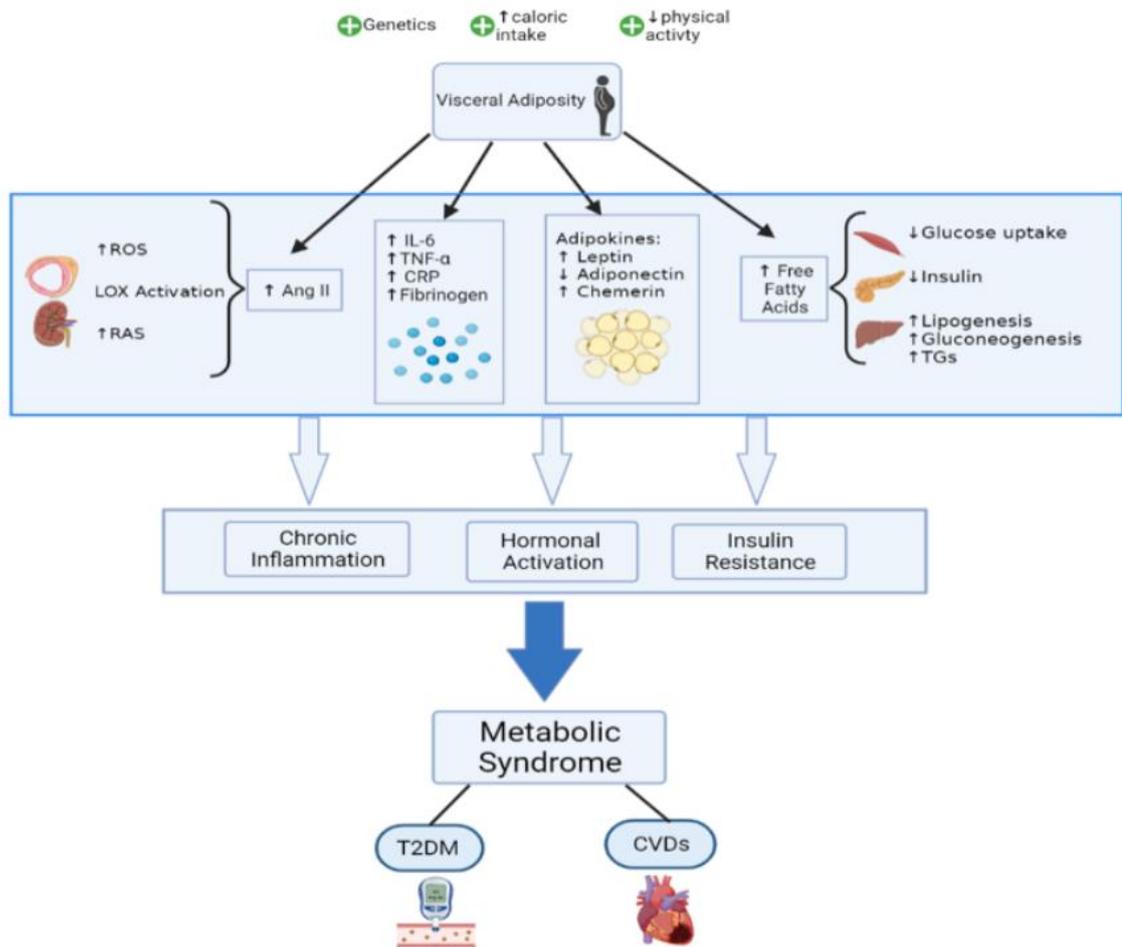


Figura 9. Mecanismos que ponen de relieve la fisiopatología de la MetS. La predisposición genética, la alta ingesta calórica y la inactividad física contribuyen a alterar el sistema renina-angiotensina y a aumentar el tejido adiposo visceral, lo que a su vez promueve un aumento de las citoquinas proinflamatorias y de las principales adipoquinas. Al aumentar el número de ácidos grasos libres se produce alteraciones en el metabolismo glucídico y lipídico, disminuyendo la captación de glucosa por parte del músculo esquelético, un aumento de la resistencia a la insulina y la gluconeogénesis hepática, y acumulación de triglicéridos y ácidos grasos a través de la lipogénesis *de novo*. Todas estas alteraciones favorecen el desarrollo de DMT2 y ECV. Imagen extraída de Fahed et al. (104).

1.7.5 Cáncer

De acuerdo con la Agencia para Investigación sobre el Cáncer (*Agency for Research on Cancer*) (IARC) se sabe que la obesidad está asociada a 13 tipos de cáncer, entre ellos los de mama, útero, ovario, esófago, estómago, colon y recto, hígado, vesícula biliar, páncreas, riñón, tiroides y meninges, así como al mieloma múltiple. La relación de la obesidad con el cáncer es biológicamente compleja. Se cree que los efectos relacionados con la obesidad actúan generando un daño sobre el ADN y/o las vías de reparación de este a través de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), produciéndose así una inestabilidad genética inducida por la obesidad. El estrés oxidativo (OS) podría ser inducido por la formación de ROS, y el OS promueve la

modificación de la estructura de carbohidratos, proteínas, fosfolípidos y ácidos nucleicos mediante el proceso de oxidación. Además, la remodelación lipídica celular inducida por la obesidad afecta a múltiples facetas de la fisiología relevantes para la carcinogénesis. Los lípidos de las reservas de los adipocitos próximos pueden transferirse a las células cancerosas para ser utilizados como fuente de energía y promover el crecimiento tumoral. Además, la obesidad puede conducir al desarrollo de cáncer a través de la conversión de los ácidos grasos en lípidos de señalización protumorigénica (69).

1.8 Otras patologías asociadas

Hipertensión

La obesidad afecta a la hipertensión, ya que se ha encontrado una asociación entre un aumento de la presión sanguínea con la ganancia de peso corporal. Los mecanismos de la obesidad y de la hipertensión relacionada con la obesidad son complejos y a veces interdependientes. Los principales factores, aparte de los factores genéticos y ambientales, se deben al sistema nervioso simpático, a la función renal y suprarrenal, al endotelio, a las adipoquinas y a la resistencia a la insulina. La obesidad, incluso cuando no se acompaña de un aumento de la presión arterial, presenta signos de activación adrenérgica, como un aumento de los valores plasmáticos de norepinefrina y de la frecuencia cardíaca en reposo. La presencia concomitante de obesidad e hipertensión se asocia a una activación simpática de mayor grado que la observada en cada condición fisiopatológica (107).

Enfermedades neurodegenerativas

La obesidad afecta a las funciones fisiológicas de varios órganos, contribuyendo al deterioro general de la salud. En el cerebro, la obesidad podría provocar un amplio espectro de alteraciones homeostáticas, como una mayor incidencia de estrés oxidativo, inflamación, agregación de proteínas, disfunción mitocondrial, alteración de los niveles hormonales, resistencia a la insulina y compromiso de la barrera hematoencefálica. Todos estos cambios podrían perjudicar la plasticidad sináptica y la neurogénesis, junto con la muerte neuronal, lo que en última instancia conduciría a un fallo de la función cognitiva. Las alteraciones mencionadas, junto con la caracterización de la obesidad por un estado inflamatorio de bajo grado, han establecido un vínculo entre la obesidad y las

enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis múltiple, la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson (108).

Enfermad crónica renal

El sobrepeso, la obesidad y el síndrome metabólico se han identificado como factores de riesgo independientes de la enfermedad renal crónica (ERC) y la enfermedad renal terminal. La relación entre obesidad y ERC es compleja (109). Numerosos factores están implicados en el desarrollo de la enfermedad renal en la obesidad, como la resistencia a la insulina, la lipotoxicidad, la fibrogénesis, disbiosis de la microbiota intestinal, la desregulación de las adipoquinas, la hipertensión y el aumento de la presión arterial glomerular. Clínicamente, la ERC relacionada con la obesidad se caracteriza por proteinuria, albuminuria, glomerulomegalia, glomeruloesclerosis progresiva y reducción de la función renal (109,110). La ERC es un problema de salud pública de primer orden en todo el mundo, que afecta aproximadamente al 13.4 % de la población mundial. Los síntomas más comunes en pacientes con ERC incluyen alteraciones del sueño, debilidad, fatiga, dolor y picor en la piel (110).

Síndrome de apnea obstructiva del sueño

El síndrome de apnea obstructiva del sueño (SAOS) es un trastorno respiratorio común durante el sueño en el que las vías respiratorias se estrechan o colapsan durante el sueño, provocando apnea obstructiva del sueño. Este trastorno respiratorio relacionado se caracteriza por hipopnea y apnea ventilatoria; estas alteraciones respiratorias provocan hipoxia, lo que conduce a hipoxemia, hipercapnia, sueño fragmentado, despertares nocturnos recurrentes, mayor esfuerzo respiratorio y aumento de la actividad nerviosa simpática. La incidencia del SAOS en la población general de 30 a 60 años es del 24 % en los hombres y del 9 % en las mujeres, y existen casi 1.000 millones de personas afectadas en todo el mundo, lo que ha suscitado una preocupación extremadamente importante (111). Existe una correlación lineal entre la obesidad y la apnea obstructiva del sueño. En las personas obesas, los depósitos de grasa en el tracto respiratorio superior estrechan las vías respiratorias; se produce una disminución de la actividad muscular en esta región, lo que provoca episodios de hipoxia y apnea que, en última instancia, dan lugar a la apnea del sueño. Estos episodios de hipoxia/apnea provocan una disminución del oxígeno disponible en los tejidos

corporales y los vasos sanguíneos. La disminución de la oxigenación provoca hipoxia tisular, que es el principal factor que contribuye a la aterosclerosis, el principal factor de riesgo de las ECV (112).

Asma

La obesidad es un factor de riesgo importante la enfermedad del asma tanto en niños como en adultos. Además, la obesidad materna y el aumento de peso durante el embarazo se asocian de forma independiente con un riesgo aproximadamente entre un 15 % y un 30 % mayor de asma en la descendencia. Este riesgo no está mediado únicamente por la propia obesidad del niño. Los mecanismos implicados pueden incluir cambios inflamatorios o de otro tipo durante el embarazo o la vida postnatal temprana, y estos mecanismos podrían explicar por qué el aumento excesivo de peso en la infancia también se ha relacionado con sibilancias recurrentes y asma. En niños o adultos obesos los mecanismos se deben a un aumento en la producción de citoquinas proinflamatorias, asociado a la resistencia a la insulina y/o alteraciones en el metabolismo lipídico. Tanto niños como adultos obesos tienden a padecer asma más grave que los niños/adultos delgados y tener una respuesta menor a los medicamentos para esta afección. Los adultos obesos presentan un riesgo entre 4 y 6 veces mayor de ser hospitalizados en comparación con los adultos delgados con asma. Casi el 60% de los adultos con asma grave en Estados Unidos son obesos (113).

Osteoartritis

La obesidad sigue siendo el factor de riesgo más importante para la incidencia y la progresión de la osteoartritis (OA). Se creía que la principal causa de la OA era la sobrecarga de las articulaciones debida al exceso de peso, que a su vez provoca la destrucción del cartílago articular. Sin embargo, se han descubierto otros factores que podrían tener una implicación mayor como la deposición adiposa, la resistencia a la insulina y, sobre todo, la coordinación inadecuada de las respuestas inmunitarias innata y adaptativa pueden conducir al inicio y la progresión de la OA asociada a la obesidad. Cada vez es más evidente que en la articulación sinovial se reclutan múltiples células inflamatorias que desempeñan un papel importante en los cambios patológicos de la articulación sinovial. La interacción entre una variedad de células inmunitarias y otras

células que residen en las articulaciones articulares puede constituir un círculo vicioso que provoque cambios patológicos de la articulación articular en individuos obesos (114).

Cálculos biliares

La presencia de cálculos biliares es una afección con una alta prevalencia global de aproximadamente el 10-20 %; se presenta principalmente en pacientes con exceso de peso corporal, ya que el principal factor de riesgo asociado al desarrollo de esta afección es la presencia de obesidad central. El desarrollo de cálculos biliares está causado por el desequilibrio entre el sistema hígado-vesícula biliar-intestino, en el que se llevan a cabo los procesos de síntesis del colesterol. Las alteraciones en estos procesos se deben al desequilibrio en el transporte de lípidos biliares, en las enzimas de esterificación del colesterol y en las vías de señalización reguladoras, así como en la motilidad de la vesícula biliar. Se ha establecido que uno de los mecanismos fisiopatológicos por los que la obesidad aumenta el riesgo de desarrollar cálculos biliares se debe al incremento de los niveles plasmáticos de insulina, ya que niveles más elevados de insulina plasmática estimulan la actividad de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa provocando una hipersecreción de colesterol. Otro factor implicado en la patogénesis de los cálculos biliares es la leptina. Algunos estudios en modelos animales han observado una disminución de los cristales de colesterol cuando hay resistencia a la acción de la leptina (115).

Pancreatitis

La obesidad aumenta la pancreatitis aguda a través de cálculos biliares, hipertrigliceridemia, fármacos e intervenciones para perder peso. Las personas obesas y con sobrepeso tienen mayor incidencia de enfermedad biliar y, en consecuencia, pancreatitis. La enfermedad biliar causa pancreatitis aguda por cálculos biliares, que causan reflujo biliar o aumentan la presión del conducto pancreático. Además, las personas obesas presentan niveles más elevados de triglicéridos en sangre (hipertrigliceridemia) y esto se relaciona con la pancreatitis, debido a la insolubilidad de los triglicéridos en el medio acuoso de la sangre, lo que provoca microtrombos en la vasculatura pancreática provocando isquemia e infarto pancreático. Además, se ha comprobado que los tratamientos quirúrgicos de la obesidad aumentan la incidencia de pancreatitis debido a obstrucciones de los conductos biliares o un aumento de la

presión en estos y el páncreas. Por último, la acumulación de depósitos de grasa en el páncreas agrava esta patología, debido a la hidrólisis de ácidos grasos insaturados en los adipocitos, los cuales son liberados al exterior celular, provocando la necrosis de las células acinares pancreáticas. Así mismo, la necrosis de la grasa peripancreática aumenta la severidad de la pancreatitis (116).

1.9 Tratamientos contra la obesidad

El sobrepeso y la obesidad, así como las enfermedades no transmisibles relacionadas, son en gran medida prevenibles y controlables. Según la OMS (1) se recomienda limitar el consumo de bebidas azucaradas y alimentos hipercalóricos, limitar la ingesta de energía procedente de grasas totales y azúcares, y se debería fomentar el desarrollo de una vida sana, impulsando comportamientos alimentarios saludables, aumentando el consumo de frutas y verduras, así como de legumbres, cereales integrales y frutos secos; y la práctica de una actividad física de forma regular. Por otro lado, habría que evitar el tabaco y el alcohol y mejorar la duración y calidad del sueño, así como, la salud emocional y mental. Controlar o perder peso para prevenir el empeoramiento de los individuos obesos parece ser un método eficaz, pero puede ser muy difícil de cumplir a largo plazo. Los métodos de pérdida de peso incluyen una mayor actividad física, modificaciones en la dieta, cirugía bariátrica e intervenciones farmacológicas (69).

1.9.1 Tratamientos no farmacológicos

1.9.1.1 Intervenciones dietéticas

La pérdida de peso mediante tratamientos dietéticos está basada en lograr un déficit neto de kilocalorías, es decir, que el flujo de energía entrante (ingesta de energía alimentaria) debe ser inferior al flujo de energía saliente (el gasto energético total). Por tanto, la mayoría de las intervenciones dietéticas para perder peso se basan en algún tipo de restricción energética, que puede llevarse a cabo de diferentes maneras (117,118).

1.9.1.1.1 Restricción calórica

La restricción calórica es una intervención dietética, que representa una estrategia eficaz para la reducción de peso, en la que se reduce la ingesta calórica. Esto influye en la plasticidad de los tejidos adiposos y modifica la función endocrinológica del tejido adiposo y del músculo esquelético (69).

Las dietas bajas en calorías y muy bajas en calorías (DBC y DMBC) limitan la ingesta energética a 800-1600 Kcal/día y <800 Kcal/día, respectivamente. Las DMBC producen una pérdida de peso superior a corto plazo en comparación con las DBC (-16,1 kg frente a -9,7 kg, respectivamente). La pérdida de peso con las DMBC se consigue principalmente a través de una pérdida de grasa corporal total. Sin embargo, los beneficios a largo plazo de las DMBC son menos pronunciados, y las cifras de pérdida de peso son más comparables a las de los DBC (-6,3% frente a -5%, respectivamente) debido a un mayor aumento de peso debido a un efecto “rebote” (61% frente a 41%, respectivamente) (117). Las DMBC incluye a las dietas cetogénicas, muy bajas en carbohidratos y altas en grasas. Aunque ambas dietas se han recomendado para el tratamiento de la obesidad, sus efectos sobre el metabolismo lipídico y los mecanismos a través de los cuales puede promover la pérdida de peso siguen siendo controvertidos (119). Según Ellenbroek et al. (120) tras un tratamiento a largo plazo, la dieta cetogénica provoca un aumento de los marcadores plasmáticos asociados a la dislipidemia y la inflamación, como el colesterol, los triglicéridos, la leptina, la proteína quimiotáctica de monocitos-1, la IL-1 β y la IL-6, sin pérdida de peso. Sin embargo, en otros trabajos se refieren efectos opuestos (119). Por lo tanto, las DMBC solo deben utilizarse como parte de una intervención integral sobre el estilo de vida y con la supervisión médica adecuada debido a las rápidas pérdidas de peso y a los posibles efectos secundarios (118). De hecho, la Guía AHA/ACC/TOS 2013 para el tratamiento del sobrepeso y la obesidad en adultos sugirió que las DMC se prescriban solamente en casos limitados, como en la preparación para la cirugía bariátrica (121).

1.9.1.1.2 *Composición de macronutrientes*

Los 3 principales macronutrientes son los lípidos, glúcidos (hidratos de carbono) y proteínas, los cuales aportan 9, 3.75 y 4 Kcal por gramo, respectivamente. La grasa (lípidos) es el macronutriente menos saciante, más fácil de absorber y más densamente calórico, lo que la convierte en el principal objetivo para las intervenciones de adelgazamiento (117,118). Las dietas bajas en grasas son una estrategia estándar de pérdida de peso y, por lo general, menos del 30% de las calorías proceden de las grasas. Este tipo de dietas son muy similares a las dietas DBC y DMBC, de hecho, la mayoría de las dietas bajas en grasas utilizadas para el tratamiento de la obesidad incluyen la restricción calórica. Varios mecanismos podrían contribuir a la pérdida de peso con las dietas bajas en grasas. Algunos de ellos tienen que ver con la propia limitación de grasas,

mientras que otros son consecuencia del aumento de la proporción de hidratos de carbono y proteínas que se produce con la restricción de grasas (118).

Las dietas bajas en carbohidratos hacen hincapié en la restricción de carbohidratos y su sustitución por grasas y/o proteínas. Las dietas bajas en carbohidratos incluyen 60-130 g de carbohidratos al día (\leq 20%-45% de la ingesta energética diaria). Mientras que las dietas muy bajas en carbohidratos recomiendan menos de 60 g de carbohidratos al día (118). En general, las dietas bajas en carbohidratos producen mayores pérdidas de peso a corto plazo (<6 meses) que las dietas bajas en grasas, pero a largo plazo (>12 meses) son más o menos equivalentes (118). Sin embargo, gran parte de esta pérdida a corto plazo se ha sido atribuida a la pérdida de reservas de glucógeno y agua, que asciende a 1-2 kg en los primeros 14 días, tras los cuales el ritmo de pérdida de peso se ralentiza (117).

Las dietas cetogénicas muy bajas en carbohidratos son una de las formas más populares de dietas bajas en carbohidratos y están diseñadas para inducir la cetosis. En este tipo de dietas se restringen los carbohidratos a menos de 20 g/día durante la fase 1, que suele durar hasta 12 semanas, y luego se aumentan gradualmente hasta 80-100 g/día. La cantidad de restricción de carbohidratos necesaria para alcanzar la cetosis varía según la persona, pero suele ser inferior a 50 g/día. Estas dietas suelen aportar entre un 70% y un 80% de grasas, ya que ingerir demasiadas proteínas puede impedir la cetosis (porque los aminoácidos pueden convertirse en glucosa a través de la gluconeogénesis). Aunque este tipo de dietas genere una rápida pérdida de peso, la adherencia a largo plazo para este tipo de dietas es baja (118) y puede inducir un aumento de marcadores proinflamatorios, como ya se comentó en la sección 1.9.1.1.1. Muchos de los argumentos a favor de reducir la ingesta de los hidratos de carbono hacen referencia a los efectos de los alimentos de alto índice glucémico, como los almidones refinados y el azúcar. Según el modelo hidratos de carbono-insulina, las dietas ricas en hidratos de carbono aumentan la secreción postprandial de glucosa e insulina y desvían los combustibles metabólicos de la oxidación hacia el almacenamiento en el tejido adiposo, lo que reduce el gasto energético y aumenta el apetito (118).

Las proteínas son altamente saciantes, por lo tanto las dietas hiperproteicas se utilizan con el objetivo de reducir el consumo excesivo pasivo de otros macronutrientes menos saciantes y más densos en energía (117). Las dietas hiperproteicas prescriben \geq

25% de calorías procedentes de proteínas o $\geq 1,6$ g de proteínas por kg de peso corporal. El mayor contenido en proteínas es una característica de muchas dietas bajas en grasas y carbohidratos. Sin embargo, existe bastante controversia en sí realmente este tipo dietas producen efectos reseñables en la pérdida de peso, en comparación con otros tipos de dietas o con una dieta baja en proteínas (117,118). Diferentes meta-análisis han mostrado que no existen diferencias significativas o son mínimas en comparación con una dieta baja en proteínas y baja en grasas (122,123) o una dieta alta en carbohidratos (124). Una mayor ingesta de proteínas evita la pérdida de masa libre de grasa durante la pérdida de peso, especialmente en los adultos mayores. Una dieta rica en proteínas en comparación con una dieta moderada en proteínas también puede crear un balance energético negativo, que contrarreste la termogénesis adaptativa durante el mantenimiento de la pérdida de peso (118).

1.9.1.1.3 *Patrones alimentarios*

Muchos científicos y consumidores han desplazado su atención hacia los patrones dietéticos en lugar de centrarse en alimentos o tipos de alimentos específicos. Este enfoque tiende a hacer más hincapié en la calidad y la naturaleza de los macronutrientes que en la cantidad y centrándose más en la salud que en la pérdida de peso *per se*. Un buen ejemplo de patrón dietético es el de la Dieta Mediterránea, basada en un consumo elevado de frutas, verduras, legumbres y granos; un consumo moderado de grasas (mayoritariamente grasas monoinsaturadas), lácteos (principalmente queso) y vino, y un consumo reducido de carne (pescado y aves de corral en lugar de carne roja) (117,118).

1.9.1.1.4 *Nutracéuticos y compuestos bioactivos*

En 1989, De Felice introdujo el término “nutracéutico” como combinación de los términos “nutrición” y “farmacéutico” (125). Los nutraceuticos son alimentos/productos derivados de alimentos que tienen efectos beneficiosos para la salud y pueden utilizarse para prevenir enfermedades crónicas en lugar de curarlas. Debido a sus efectos terapéuticos seguros, estos productos han ganado mucha atención, ya que previenen la aparición de varias enfermedades potencialmente mortales, como la DMT2, el cáncer y los trastornos neurodegenerativos. Los nutraceuticos abarcan desde suplementos dietéticos (proteínas, vitaminas y minerales), compuestos puros hasta componentes

derivados de fuentes naturales. Dado que los nutracéuticos presentan una amplia gama de sustancias, sus mecanismos también son muy diversos (126).

La obesidad y sus patologías asociadas (sección 1.7), se caracterizan por un metabolismo alterado (glucídico y lipídico, mayoritariamente) junto a un estado proinflamatorio y prooxidante, por lo tanto, los tratamientos de estas enfermedades no deben centrarse únicamente en la reducción del peso corporal, de hecho, en la sección 1.1.2 se describe a individuos con peso e IMC normal, sin signos visuales de obesidad, pero con alteraciones metabólicas similares a pacientes tradicionalmente obesos. Por ello, también deben existir tratamientos enfocados en mejorar el estado fisiológico y metabólico del individuo, hasta alcanzar una homeostasis, así como intervenciones basadas en la prevención en lugar del tratamiento. En este sentido, los nutracéuticos o compuestos bioactivos presentes en las especies vegetales, cómo ahora describiremos, juegan un papel fundamental.

Es ampliamente conocido, que el consumo de una dieta sana, como es el caso de una dieta mediterránea, favorece la disminución de la obesidad y sus complicaciones. Estas dietas se caracterizan por la presencia de verduras, cereales o legumbres que contienen compuestos simples o mixtos con efectos sinérgicos. A estos compuestos se denominan compuestos bioactivos o fitoquímicos, y se encuentran en todas las plantas como metabolitos secundarios. La concentración de compuestos bioactivos (como fibra dietética, minerales, vitaminas, ácidos grasos, proteínas, algunos hidratos de carbono y compuestos fenólicos) varía en función de las partes de la fase de crecimiento de la planta y de la estación del año (127).

Entre los distintos tipos de compuestos funcionales, aquellos relacionados con el síndrome metabólico, enfermedades cardiovasculares, resistencia a la insulina y hepatopatía no alcohólica han atraído gran atención. Especialmente relevantes son los derivados de semillas de plantas aromáticas y leguminosas, debido a su contenido en compuestos fenólicos, fibra y otros compuestos antioxidantes (128–131). Por un lado, las leguminosas tienen una importancia nutricional notable, aunque también contienen diversos compuestos no nutricionales que tradicionalmente se consideraban antinutrientes con efectos negativos (132). Sin embargo, se ha demostrado que estos componentes poseen actividad biológica positiva, contribuyendo a la preservación del

genoma y siendo útiles en el tratamiento nutricional de patologías asociadas al síndrome metabólico (133,134).

Los compuestos bioactivos naturales presentes en los alimentos se han relacionado con diferentes efectos en la obesidad, como la disminución de la respuesta inflamatoria y el estrés oxidativo, la inhibición de la adipogénesis y la lipogénesis, la inducción de la apoptosis, la regulación de los genes implicados en la adipogénesis, la lipólisis y la oxidación de los ácidos grasos (127). Así mismo, se ha comprobado como diferentes compuestos bioactivos pueden ser utilizados en la prevención y el tratamiento del MAFLD (135).

En la naturaleza se han identificado cerca de 8000 compuestos polifenólicos y estos se clasifican en flavonoides, ácidos fenólicos, lignanos, estilbenos, alquilfenoles, curcuminoides, furanocumarinas, terpenos fenólicos y otros (87,127). Los compuestos polifenólicos son los fitoquímicos más abundantes en las dietas basadas en frutas y verduras, y están biodisponibles en el sistema circulatorio tras su absorción por el intestino, después de la ingestión de alimentos (127), aunque, la absorción de estas moléculas puede ser pobre y poseer un metabolismo rápido (87).

Los flavonoides son fitoquímicos fenólicos que constituyen importantes componentes de la dieta humana. Se dividen en subgrupos en función del grado de oxidación de los anillos que confirman su estructura. Existen seis subgrupos principales: (1) flavonoles, como el kaempferol y la quercetina, (2) flavanoles, como la epicatequina, (3) flavonas, como la apigenina; (4) isoflavonas, como la genisteína; (5) flavanonas, como la hesperetina, la naringenina; y (6) antocianinas, como la cianidina o la delphinidina, la malvidina. Según diferentes estudios, los flavonoides se han relacionado con la reducción de peso debido a la reducción del tejido adiposo, la estimulación de la β -oxidación y la inhibición de la adipogénesis y la lipogénesis al disminuir la expresión de la lipoproteinlipasa (LPL), SREBP1c y PPAR γ . Además, durante la respuesta inflamatoria, los flavonoides podrían inhibir la expresión y secreción de citoquinas proinflamatorias (87,127). Bloquean el TLR y regulan varias vías relacionadas con la inflamación, como NF- κ B, MAPK, PI3K/Akt, IKK/JNK y JAK/STAT, regulando así la respuesta inmunitaria. También interfieren en la regulación de las células inmunitarias (87).

Los compuestos fenólicos también controlan la diferenciación de los adipocitos y el metabolismo de los lípidos, ya que disminuyen la actividad de la lipasa pancreática y la permeabilidad del intestino, a través de su interacción con la microbiota intestinal. Además, algunos compuestos fenólicos pueden activar la Sirtuina 1 (Sirt1) y son inductores potenciales de la biogénesis mitocondrial a través de la activación de PGC-1 α mediada por la desacetilación y, también, disminuyen la disfunción mitocondrial. Por otro lado, los compuestos fenólicos secuestran los radicales libres, aumentan la actividad y la expresión de las enzimas antioxidantes e inhiben la expresión de las enzimas productoras de ROS. Finalmente, también presentan propiedades como quelantes de metales (87). Los compuestos fenólicos neutralizan las ROS mediante la donación de un electrón o un átomo de hidrógeno (87,127), ejercen una actividad coantioxidante con las vitaminas esenciales, inhiben las vías de la oxidasa y del ácido araquidónico y regulan al alza las enzimas SOD, CAT y GPX. También promueven la expresión de enzimas antioxidantes implicadas en la síntesis de glutatión y el metabolismo de fármacos de fase II, a través de la regulación de la vía Nrf2/Keap1 (87).

Finalmente, aunque no son moléculas como tal, también habría que considerar a los péptidos bioactivos procedentes de fuentes alimentarias vegetales como una alternativa en el tratamiento de la obesidad y sus patologías asociadas, ya que estos poseen importantes efectos sobre la salud humana por su capacidad para reforzar el sistema inmunitario y mejorar la salud. En concreto, los péptidos bioactivos pueden actuar regulando la saciedad, reduciendo la hipertensión y los niveles de colesterol y poseer efectos antimicrobianos, antitrombóticos, antioxidantes, antiinflamatorios y antidiabéticos. Este último debido a que intervienen descendiendo o inhibiendo la actividad de las enzimas α -glucosidasa y dipeptidil peptidasa-4, las cuales presentan un papel importante en desarrollo de DMT2 (136).

Por otra parte, la actividad agrícola proporciona además de semillas y frutos, otras partes de la planta que son habitualmente tratadas como residuos agrícolas. En el caso de las semillas, estas terminan siendo tratadas como un residuo o como un componente no absorbible que pasa inalterado por el tracto gastrointestinal. Sin embargo, son una potente fuente de nutrientes y compuestos bioactivos. Este aspecto ha sido menos estudiado y, sin embargo, puede tener una gran proyección puesto que este material se puede utilizar para la extracción de proteína, aceites o compuestos

bioactivos con aplicaciones novedosas en el ámbito del tratamiento nutricional de diferentes patologías que puede ayudar a reducir las dosis necesarias de fármacos en determinados casos. Este nuevo enfoque ofrece una nueva oportunidad puesto que permite el reciclado de material vegetal proporcionándole un valor añadido y reforzando el concepto de economía circular dentro de la industria alimentaria.

1.9.1.2 Ejercicio físico

Los beneficios esperados de la actividad física, o ejercicio físico, incluyen efectos positivos en la pérdida de peso, pero también pérdida de grasa junto con la preservación de la masa magra, así como el posterior mantenimiento de la pérdida de peso (137). El ejercicio regular puede reducir el riesgo de desarrollar obesidad y las complicaciones y enfermedades metabólicas asociadas a la obesidad, como la MAFLD y DMT2. Además, tiene implicaciones en la regulación epigenética, el envejecimiento, la sensibilidad y resistencia a la insulina, la prevención de enfermedades cardiovasculares, y otras como la esclerosis múltiple, las enfermedades pulmonares, la enfermedad de Parkinson, etc (138,139). El ejercicio físico tiene estos potentes efectos sobre el metabolismo, no sólo por sus conocidos efectos sobre el metabolismo del músculo esquelético, sino también como resultado de las adaptaciones metabólicas que confiere en otros múltiples tejidos, como el hígado, el tejido adiposo, el páncreas y el sistema cardiovascular mediante la activación de una variedad de moléculas señalizadoras, hormonas, citoquinas y otros mecanismos (139) (**Figura 10**).

Durante el ejercicio físico, existen cuatro fuentes endógenas principales de energía: la glucosa plasmática derivada de la glucogenólisis hepática, los ácidos grasos libres liberados de la lipólisis del tejido adiposo y de la hidrólisis de triglicéridos en las VLDL, el glucógeno muscular y los triglicéridos intramiocelulares disponibles dentro de las fibras musculares esqueléticas. Las grasas y los hidratos de carbono se oxidan simultáneamente, pero su contribución relativa depende de diversos factores, como la duración y la intensidad del ejercicio (138).

El músculo esquelético es el mayor tejido metabólico del cuerpo y es crucial para la eliminación de glucosa en reposo y durante el ejercicio. El músculo esquelético usa glucógeno muscular y glucosa plasmática como combustible, mejorando la acción de la insulina y la oxidación y almacenamiento de glucosa. El entrenamiento de resistencia aumenta la oxidación de ácidos grasos y reduce los lípidos intermedios en los músculos.

Durante el ejercicio de alta intensidad y corto, los músculos usan sus propias reservas de glucosa y grasa, pero en ejercicios prolongados necesitan sustratos externos, a partir del hígado y tejido adiposo. El ejercicio incrementa la movilización del glucógeno hepático y la gluconeogénesis. También mejora la supresión de producción de glucosa hepática por la insulina, mejora las enzimas hepáticas séricas, aumenta la oxidación hepática de ácidos grasos, a la par que disminuye la actividad de enzimas lipogénicas, afectando a la secreción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y reduciendo la hipertrigliceridemia (139,140). Las mioquinas, como la IL-6, regulan estos cambios metabólicos. La oxidación de grasas aumenta con ejercicio prolongado, y las demandas energéticas se satisfacen movilizando ácidos grasos libres controlados por insulina, catecolaminas y el péptido natriurético auricular (139).

Actualmente es bien sabido que la inflamación crónica de bajo grado y el estrés oxidativo desempeñan un papel central en la etiología de varias enfermedades crónicas. Curiosamente, el ejercicio físico regular ha sido implicado en la modulación tanto del metabolismo oxidativo como del estado inflamatorio en la mayoría, si no en todas, de las enfermedades mencionadas (140) a lo largo de este texto. El ejercicio físico intenso y prolongado restringe el flujo sanguíneo visceral, privando de oxígeno a los tejidos y aumentando la producción de ROS. El hígado, que produce el 90% del glutatión (GSH) circulante, juega un papel crucial en el estado redox. Los niveles hepáticos de GSH aumentan tras un ejercicio agotador, indicando estrés oxidativo. Este estrés refleja un desequilibrio en la síntesis y plegamiento de proteínas en el retículo endoplásmico del hepatocito, con mayor producción de ROS y una disminución de la actividad de importantes enzimas antioxidantes, como la SOD, CAT y GPx. A pesar de estas alteraciones, se ha demostrado que el ejercicio físico regular mejora la capacidad antioxidante y el funcionamiento mitocondrial del hígado, aumentando su resistencia a daños (140). Sun et al. (141) encontraron niveles elevados de GSH en mitocondrias de hígado de rata tras 4 semanas de entrenamiento, lo que se atribuyó a una mayor actividad antioxidante. Así mismo, Yuan et al. (142) comprobaron como un entrenamiento interválico de alta intensidad (HIIT) reducía los niveles de ROS en hígados de ratas obesas al aumentar la actividad enzimática de CAT, SOD y GPx, y de forma más pronunciada que un entrenamiento continuo de intensidad moderada. El entrenamiento interválico de alta intensidad (HIIT) es un tipo de protocolo que alterna periodos de entrenamiento de alta intensidad con intervalos de baja intensidad. Con los

intervalos activos o pasivos, el HIIT puede permitir a los individuos completar ejercicios de alta intensidad con un mayor volumen de entrenamiento. En la última década, el HIIT se ha convertido en un tema de amplio interés de la promoción de la salud en comparación con el entrenamiento aeróbico clásico, ha demostrado efectos similares o mejores sobre la pérdida de grasa visceral y hepática, la mejora de la resistencia a la insulina y la función cardiovascular, a la vez que es más eficiente en términos de tiempo (143).

De forma similar a lo observado en los niveles de ROS, un episodio agudo de ejercicio físico produce un aumento de la respuesta inflamatoria al aumentar la producción y movilización de citoquinas proinflamatorias. Sin embargo, el ejercicio físico de forma regular es considerado una potente herramienta antiinflamatoria cuando se realiza a intensidades controladas. Por ejemplo, el ejercicio físico regular se asocia con una reducción de las citoquinas inflamatorias, las adipocinas y otros marcadores relacionados con lesiones en el hígado. Parece que el entrenamiento de intensidad moderada-alta induce vías antiinflamatorias a través de varios mecanismos, como la supresión de las citoquinas proinflamatorias, la mejora del estado antiinflamatorio del endotelio y la regulación a la baja de la expresión de los TLR (140).

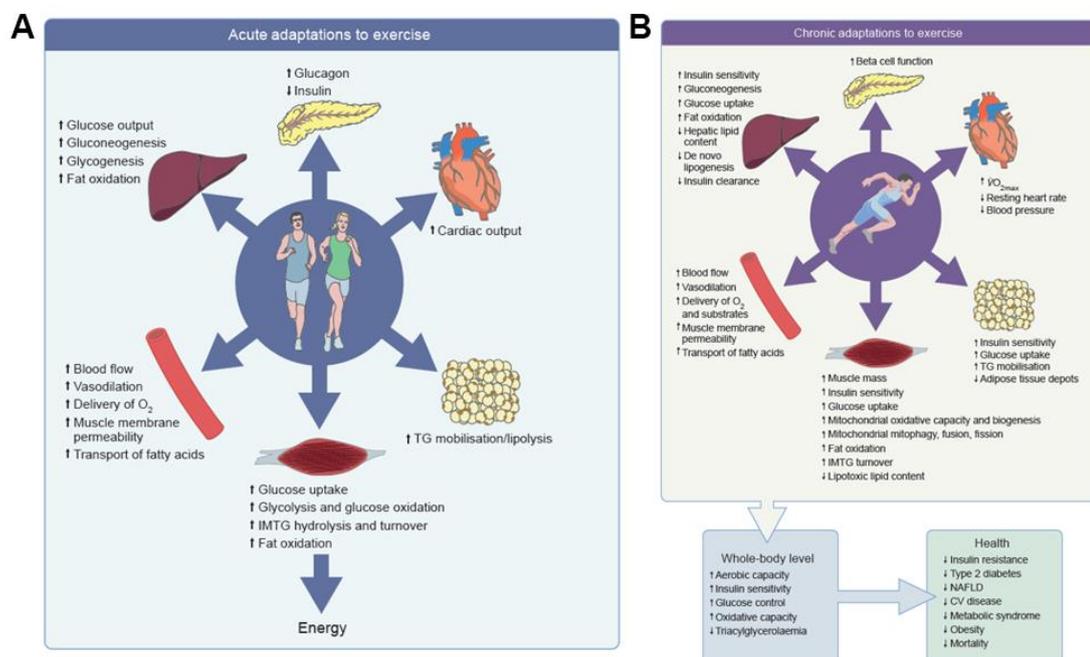


Figura 10. Representación de las adaptaciones y los efectos metabólicos del ejercicio sobre los órganos periféricos claves implicados en la regulación de la homeostasis energética en respuesta al (A) ejercicio físico agudo y (B) al ejercicio físico de forma prolongada. (A) En respuesta al ejercicio agudo, el músculo moviliza inmediatamente la glucosa almacenada y luego los ácidos grasos y absorbe glucosa y

ácidos grasos del plasma para satisfacer la demanda energética. Durante el ejercicio sostenido, el tejido adiposo y el hígado movilizan ácidos grasos libres y sintetizan glucosa, respectivamente, para seguir proporcionando combustible al músculo. Mientras tanto, aumenta el gasto cardíaco y se incrementa la perfusión microvascular de los tejidos periféricos, el reclutamiento capilar, la permeabilidad de la membrana muscular y el transporte de sustratos. Estos cambios se asocian a cambios en los flujos de sustratos y en la secreción de glucagón e insulina por el páncreas. (B) La realización de ejercicio físico de forma prolongada provoca adaptaciones crónicas. El ejercicio físico mejora el VO_2 max., disminuye la frecuencia cardíaca y la presión arterial en reposo y aumenta la masa muscular total. Mejora la función de las células beta y la captación de glucosa en sangre por los músculos, el tejido adiposo y el hígado, y mejora la sensibilidad a la insulina de los tejidos periféricos. Mejora la capacidad de movilización de ácidos grasos libres del tejido adiposo, junto con una mayor capacidad del hígado para producir glucosa y una disminución de la lipogénesis *de novo*. También aumenta la capacidad de oxidación de las grasas en el hígado y los músculos, junto con una mayor capacidad oxidativa y biogénesis mitocondrial. El resultado es una reducción de los depósitos de tejido adiposo visceral y del almacenamiento de grasa ectópica. En conjunto, estas adaptaciones estructurales, funcionales y metabólicas mejoran la capacidad aeróbica, la sensibilidad a la insulina de todo el cuerpo, el control de la glucosa, la capacidad oxidativa y reducen la hipertrigliceridemia y la inflamación crónica. Estos cambios reducen el riesgo de desarrollar resistencia a la insulina, DMT2, MAFLD, ECV, MetS, obesidad y, en última instancia, la mortalidad prematura. IMTG, triacilgliceroles intramusculares; TG, triglicéridos. Imagen extraída de Thyfault y Bergouignan (139).

1.9.2 Tratamientos farmacológicos

Se recomienda aplicar el tratamiento farmacológico para el mantenimiento de la pérdida de peso, en combinación con una dieta hipocalórica y un ejercicio físico óptimo. Los medicamentos contra la obesidad están indicados en individuos con un IMC ≥ 30 kg/m² o si ≥ 27 kg/m² en presencia de una o más comorbilidades (117,144). La Agencia Europea de Medicamentos (EMA) y la *Food Drug Administration* (FDA) revisaron sus criterios de aprobación reglamentaria de estos tipos de fármacos, destacando en particular la importancia de la seguridad cardiovascular y del sistema nervioso central (144). En base a eso, se recomienda interrumpir el tratamiento a los 3 meses si se ha conseguido una pérdida de peso inferior al 5 % mientras se tomaba el fármaco (117).

Tabla 1. Medicamentos aprobados por la EMA y FDA para el tratamiento de la obesidad (69,117,144).

Fármaco	Mecanismo de acción	Sitio de acción periférico	Efectos secundarios
Orlistat	Inhibidor lipasa pancreática	Estómago	Síntomas gastrointestinales, lesión hepática
Liraglutida	Agonista GLP-1R	Intestino delgado y páncreas	Náuseas/vómitos, diarrea, cálculos biliares
Semaglutida	Agonista GLP-1R	Intestino delgado y páncreas	Náuseas/vómitos, diarrea, cálculos biliares
Naltrexona/ Bupropión	Antagonista de los receptores opiáceos/Inhibidor de la recaptación de dopamina y noradrenalina	Ninguno	Convulsiones, palpitaciones, elevaciones transitorias de la presión arterial
Fentermina/ Topiramato	Simpaticomimético/antiepiléptico	Ninguno	Depresión, ideación suicida

Los fármacos contra la obesidad actualmente aprobados (**Tabla 1**) se dirigen a las vías periféricas y centrales para disminuir la ingesta de energía mediante la reducción del apetito y el aumento de la saciedad (144). El Orlistat tiene principalmente un efecto periférico; inhibe las lipasas gástricas y pancreáticas, disminuyendo así la absorción de las grasas de la dieta (117,144) en hasta un 32% de las grasas ingeridas, las cuales se excretan por las heces (117).

Los agonistas del receptor del péptido similar al glucagón (GLP1-R), Liraglutida y Semaglutida se utilizan cada vez más para el tratamiento de la DMT2 (69). Estos fármacos actúan a nivel central, disminuyendo el apetito, y a nivel periférico, en el páncreas, aumentando la secreción de insulina, y en el tracto gastrointestinal, provocando una disminución de la motilidad intestinal y un retraso del vaciado gástrico (117,144).

La Naltrexona es un antagonista de los receptores opioides que inhibe la vía de la POMC, mientras que el Bupropión es un antidepresivo e inhibidor de la recaptación de noradrenalina y dopamina que estimula directamente las células POMC. Al combinar ambos fármacos se produce una actuación de forma sinérgica para aumentar la producción de péptidos POMC y, por tanto, disminuir la ingesta de alimentos (117,144). Además, se cree que ambos fármacos tienen un efecto sinérgico en la supresión de los

centros del hambre localizados en el hipotálamo (117), ya que actúan sobre las vías de recompensa, como demuestran los estudios de resonancia magnética funcional (144).

La Fentermina combinada con Topiramato está aprobada para el tratamiento a largo plazo de la obesidad (117,144). La Fentermina es un simpaticomimético menos potente que otras anfetaminas en la liberación de dopamina y, por lo tanto, se asocia a un menor riesgo de abuso de sustancias (144). Mientras que, el Topiramato, es un fármaco antiepiléptico (117), el cual es un agonista del ácido gamma-aminobutírico, antagonista del glutamato e inhibidor de la anhidrasa carbónica que ha demostrado suprimir el apetito, a través de mecanismos que aún no están claros. Los estudios en animales han demostrado un aumento del gasto energético y una mejora de la sensibilidad a la insulina, pero esto aún no se ha confirmado en humanos (117,144).

En los ensayos clínicos aprobados por la FDA, se ha podido comprobar una pérdida de peso corporal total temprana de al menos el 5% con todos los fármacos descritos, no obstante, el objetivo es una pérdida de peso mayor, ya que una pérdida de peso corporal total del 5-10% se asocia a una reducción del riesgo de diversas complicaciones metabólicas, esqueléticas y anatómicas de la obesidad, y puede ser necesaria una pérdida de peso corporal total >15% para mejorar las ECV. La eficacia de estos fármacos actualmente para la pérdida de peso sigue siendo modesta, con la excepción de los agonistas de GLP-1R, y en particular la Semaglutida, que puede lograr una pérdida de peso superior al 15%. Aunque algunos resultados obtenidos de diferentes ensayos clínicos mostraron una mejoría de la esteatosis hepática con los agonistas de GLP1-R, no existen pruebas de reducción de la fibrosis hepática con ninguno de los otros medicamentos, por lo que es un parámetro que requiere estudios a más largo plazo para mostrar beneficios. Hasta la fecha, siguen faltando datos sobre el efecto de los fármacos en relación con las ECV (144). Ninguno de los fármacos antiobesidad aprobados actualmente ha demostrado ser eficaz para la prevención primaria de las ECV o para reducir los principales eventos cardiovasculares adversos o la mortalidad entre los pacientes con obesidad. La mayoría de las muertes relacionadas con la obesidad se deben a ECV, por lo que la mejora de la salud cardiovascular se convierte en un objetivo primordial de los fármacos para perder peso (69).

En el caso de la MAFLD, las opciones de tratamiento farmacológico recomendadas por las directrices para los pacientes con esta patología son escasas y, en

la actualidad, la Asociación Europea y Americana para el Estudio del Hígado sólo recomiendan la vitamina E y el ligando del PPAR- γ , la Pioglitazona, para determinados pacientes. Aparte de estas dos intervenciones, existen otros fármacos mecánicamente diferentes que han mostrado beneficios en el tratamiento del MAFLD. Los agonistas de GLP-1R han mostrado efectos positivos, sin embargo, se cree que estos actúan mejorando la esteatosis, pero no la fibrosis hepática, por lo que se ha indicado su uso para el tratamiento de la obesidad y DMT2. Por otro lado, existen estudios sobre los inhibidores de cotransportador de sodio y glucosa tipo 2 que han mostrado sistemáticamente una reducción de las transaminasas hepáticas y una mejora de los biomarcadores basados en imágenes, por lo que podrían ser una opción de tratamiento para los pacientes diabéticos y no diabéticos con MALFD (145).

1.9.2.1 Mecanismo de acción de los agonistas del GLP1-R

El péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP1) es una hormona incretina de 30 aminoácidos producida y secretada principalmente por las células L de íleon y del colon tras la ingestión de alimentos (146,147). La secreción de GLP1 es muy rápida y tiene dos fases: la fase temprana se produce entre 5 y 15 minutos después de la ingestión de nutrientes, mientras que la fase tardía surge entre 30 y 60 minutos después, con dos picos diferentes. El GLP1 se secreta principalmente en dos formas, GLP1 (7-36) y GLP1 (7-37), que son las formas bioactivas con un efecto insulínico equipotente (146). En la posición 2 de su secuencia de aminoácidos, las isoformas GLP1 (7-36) y (7-37) son escindidas e inactivadas por la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4), en <2 min desde su liberación. Para contrarrestar la actividad de la DPP-4 y aumentar la biodisponibilidad del GLP1 circulante, se han desarrollado inhibidores de la DPP-4, también conocidos como gliptinas. Además, se han sintetizado agonistas de GLP-1R (GLP-1RA) resistentes a la escisión de DPP-4 (146,148).

El GLP-1 estimula la secreción postprandial de insulina y somatostatina a partir de las células beta y células delta del páncreas, respectivamente. La secreción de insulina se produce de forma dependiente de la glucosa para controlar el aumento de la carga de carbohidratos y lípidos. Por otro lado, la somatostatina inhibe la secreción de glucagón de las células alfa de los islotes a través del receptor de somatostatina-2 (146-148). En su conjunto, esto produce un descenso de la glucosa plasmática, además, los GLP-1R se expresan de forma diferencial en el cerebro y la estimulación de los

receptores centrales de GLP-1 por el GLP-1 endógeno y análogos de GLP-1 suprime la ingesta de alimentos, aumenta la saciedad y retrasa el vaciado gástrico (147). Por otro lado, el GLP1 disminuye la absorción de lípidos al reducir la producción intestinal de quilomicrones y la hipertrigliceridemia postprandial, que son factores predictivos del riesgo cardiovascular (146).

Se ha demostrado que los GLP-1RAs aumentan la secreción de insulina y disminuyen la de glucagón de forma dependiente de la glucosa, de forma similar a GLP1, lo que se traduce en una reducción de los niveles de glucosa en sangre, con un riesgo bajo de producirse hipoglicemia (146–148). Además, los GLP-1RAs mejoran la regulación del apetito, el vaciamiento gástrico, y también mejoran múltiples efectos fisiopatológicos más allá del control glucémico, en el hígado se reduce la producción de glucosa y la lipogénesis *de novo*, y se aumenta la sensibilidad a la insulina; en el tejido adiposo se reduce la resistencia a la insulina y la lipólisis; y han mostrado efectos cardioprotectores (148).

1.9.3 Tratamiento quirúrgico

La cirugía bariátrica es segura y muy eficaz para reducir el peso, las comorbilidades asociadas a la obesidad y la mortalidad. La cirugía bariátrica es apropiada para pacientes con un IMC >40 kg/m² o >35 kg/m² con comorbilidades, o que hayan fracasado en sus intentos de dieta y ejercicio, o que no padezcan enfermedades psicológicas significativas (69,117). Independientemente del tipo de cirugía bariátrica realizada, sus efectos sobre la pérdida de peso y las comorbilidades asociadas son superiores en comparación con las intervenciones no quirúrgicas (117). La cirugía bariátrica (**Figura 11**) incluye la banda gástrica ajustable, el *bypass* gástrico en Y de Roux, la gastrectomía en manga, y la derivación biliopancreática con cruce duodenal. Mientras que la banda gástrica y la gastrectomía en manga son puramente restrictivas por naturaleza, los dos últimos procedimientos también provocan una malabsorción significativa (69).

Aunque los beneficios de la pérdida de peso entre los individuos con obesidad grave son incuestionables, estos beneficios deben considerarse en el contexto de las complicaciones quirúrgicas. Las complicaciones a medio y largo plazo han sido bien descritas, entre ellas figuran la obstrucción intestinal, la úlcera marginal, la hernia ventral y los cálculos biliares. Las complicaciones metabólicas descritas incluyen la

nefrolitiasis y la hipoglucemia. Las deficiencias minerales y vitamínicas, así como la recuperación de peso, se han notificado en un número variable de pacientes (149).

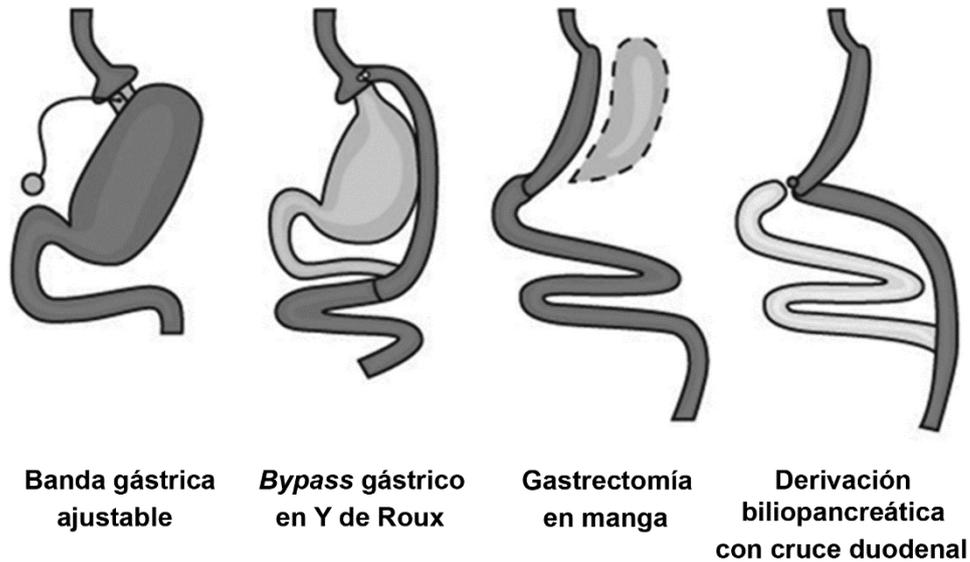


Figura 11. Diagrama de las opciones de cirugía bariátrica. Adaptación de Wolfe et al. (149).

2 Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

La hipótesis de investigación de este proyecto de tesis plantea que es posible mejorar la salud de la población a través de intervenciones que combinan la administración de un nutracéutico, a partir de diferentes extractos derivados de excedentes de semillas silvestres o cultivadas, con un protocolo de entrenamiento interválico de alta intensidad (HIIT) diseñado para el tratamiento de cambios metabólicos asociados a la obesidad y la resistencia a la insulina.

Objetivos

Objetivo general

Contribuir a la prevención y manejo de patologías crónicas relacionadas con la obesidad derivadas de hábitos alimentarios y de estilo de vida poco saludables a través de diferentes intervenciones individuales o combinadas (nutracéutico derivado de

semillas y ejercicio físico vs tratamiento farmacológico) y promover estrategias de sostenibilidad ambiental.

Objetivos específicos

1. Preparar extractos de las semillas seleccionadas. Caracterización química de su actividad antioxidante.
2. Desarrollar un nutracéutico con los extractos que muestren mayor potencial bioactivo. Validación a nivel químico y celular e identificación de compuestos bioactivos. Ensayo de su bioaccesibilidad *in vitro*, ausencia de toxicidad y estimación de la dosis a utilizar.
3. Desarrollar en ratas Sprague-Dawley un modelo experimental de obesidad, enfermedad hepática no alcohólica y resistencia a la insulina mediante la administración de una dieta alta en grasa y fructosa. Detección de alteraciones en parámetros metabólicos, funcionalidad hepática y en la microbiota intestinal.
4. Ensayar los efectos individuales de las intervenciones (nutracéutico, protocolo de entrenamiento de alta intensidad y fármaco agonista del receptor de GLP-1 sobre un tratamiento base de restricción calórica) en las principales alteraciones inducidas por la obesidad asociadas a parámetros metabólicos, funcionalidad hepática y microbiota intestinal.
5. Ensayar los efectos combinados del protocolo de entrenamiento de alta intensidad con la administración del nutracéutico o la administración del fármaco agonista del receptor de GLP-1 en las principales alteraciones inducidas por la obesidad asociadas a parámetros metabólicos, funcionalidad hepática y microbiota intestinal.

3 Material y Métodos

3.1 Material vegetal

Las diferentes especies vegetales utilizadas se encuentran en la **Tabla 2**. Las semillas fueron adquiridas por el grupo de investigación (AGR-145) en un supermercado local o suministradas por la empresa biotecnológica CELLBITEC S.L. (Almería), lavadas y molidas hasta obtener un polvo fino (tamaño de partícula de 0.18 mm) con un molinillo (Jata). Además, se incluyó el fruto maduro de Argán (*Argania spinosa*) y las hojas de Salicornia (*Salicornia* spp.) suministradas también por la empresa CELLBITEC S.L.

Tabla 2. Especies vegetales empleadas

Familia	Nombre científico	Nombre común
Amaranthaceae	<i>Salicornia</i> spp.	Salicornia
Apiaceae	<i>Coriandrum sativum</i>	Cilantro
Asteraceae	<i>Cynara scolymus</i>	Alcachofa
Cucurbitaceae	<i>Citrullus lanatus</i>	Sandía
	<i>Lens culinaris</i> var. Castellana	Lenteja pardina var. castellana
	<i>Lens culinaris</i> var. Caviar	Lenteja pardina var. caviar
	<i>Lens culinaris</i> var. Pardina	Lenteja pardina var. pardina
	<i>Lens culinaris</i> var. Verdina	Lenteja pardina var. verdina
	<i>Lens culinaris</i> var. verdina Pui	Lenteja pardina var. verdina pui
	<i>Medicago sativa</i>	Alfalfa
	<i>Onobrychis vicifolia</i>	Zulla
	<i>Phaseolus Lunatus</i> L.	Garrofón
	<i>Phaseolus Vulgaris</i> var. Black	Alubia negra
Fabaceae	<i>Phaseolus Vulgaris</i> var. Black Tolosana	Alubia tolosana
	<i>Phaseolus Vulgaris</i> var. Brown	Alubia marrón
	<i>Phaseolus Vulgaris</i> var. Pinto	Alubia pinta
	<i>Phaseolus Vulgaris</i> var. Red	Alubia roja
	<i>Phaseolus Vulgaris</i> var. White	Alubia blanca
	<i>Trigonella foenum-graecum</i>	Fenogreco
	<i>Vigna angularis</i>	Azuki
	<i>Vigna radiata</i>	Judía mungo
	<i>Vigna unguiculata</i>	Judía carilla
	<i>Melissa officinalis</i>	Melisa
Lamiaceae	<i>Ocimum basilicum</i>	Albahaca
	<i>Origanum vulgare</i>	Orégano

Sapotaceae	<i>Argania spinosa</i>	Argán
Solanaceae	<i>Capsicum annuum</i>	Pimiento

3.2 Extractos funcionales

3.2.1 Hidrolizados proteicos

Los hidrolizados proteicos de las diferentes semillas fueron obtenidos mediante una extracción en medio acuso alcalino de acuerdo con Martínez-Villaluenga et al. (150) y una hidrólisis proteica según la metodología de Megías et al. (151). Para ello, 3-5 g de harina de semillas fueron resuspendidos en 15-20 mL de agua tipo I que contenía sulfito de sodio (Na_2SO_3) (Panreac Química, Barcelona, España) (0.25 % p/v) y, a continuación, se ajustó el pH a 8.8. La suspensión se mantuvo en agitación durante 30 min a 33 °C y con pH constante (Agitador magnético IKA® C-MAG HS 7). Posteriormente, la suspensión se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min a temperatura (T^a) ambiente (Centrifuge 5810 R, Eppendorf). Con el objetivo de aumentar el rendimiento, se repitió una segunda extracción y centrifugado sobre el precipitado anterior. Las proteínas presentes en la suspensión final fueron secuencialmente hidrolizadas por la adición de la proteasa proveniente de *Bacillus licheniforme* (P4860, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) y la proteasa de *Aspergillus oryzae* (C2605, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.). La hidrólisis se realizó del siguiente modo: se añadieron cloruro cálcico (CaCl_2) (Panreac Química, Barcelona, España) y sulfato de magnesio (MgSO_4) (VWR International, Lovaina, Bélgica) en una cantidad suficiente como para alcanzar una concentración de 1 mM en la suspensión proteica y esta se mantuvo en agitación a 47 °C durante 20 min, ajustándose el pH a 8.8. A continuación, se añadió la proteasa proveniente de *Bacillus licheniforme* y pasada media hora, la proteasa de *Aspergillus oryzae*; manteniéndose en todo momento las condiciones previas. Para la primera hidrólisis, la proporción enzima/sustrato fue de 0.3 Unidades de Anson (UA)/g prot; mientras que para la segunda 100 Unidades de leucina aminopeptidasa (LAPU)/g prot. El pH fue ajustado durante todo el proceso de extracción mediante la adición de hidróxido de potasio (KOH) (VWR International, Lovaina, Bélgica) 3M. El producto obtenido se liofilizó (Liofilizador Cryodos-50, TELSTAR, Madrid, España) para determinar el rendimiento de extracción.

3.2.2 Extractos etanólicos

La harina de semillas de las diferentes especies vegetales, de las hojas de *Salicornia* spp. y de la pulpa de *Argania spinosa* fue extraído por duplicado según la metodología de Martínez et al. (152). Para ello 3-5 g de harina fueron resuspendidos en 15-20 mL de una solución hidroalcohólica compuesta por 50 % etanol (EtOH) (VWR International, Lovaina, Bélgica), 50 % agua tipo I y 0.25 % ácido clorhídrico (HCl) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) 12N. Se mantuvo en agitación durante 30 min a 4 °C y pH 2 (Agitador magnético IKA® C-MAG HS 7). Previo a la extracción, se burbujeó una corriente de nitrógeno (N₂) a través de las muestras para generar una atmósfera reductora, previniendo cualquier potencial oxidación. Después de la extracción, la suspensión se centrifugó a 3500 rpm durante 10 min a 4 °C (Centrifuge 5810 R, Eppendorf). El pH fue ajustado durante todo el proceso de extracción mediante la adición de HCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) 6N. Con el objetivo de aumentar el contenido en compuestos fenólicos se almacenó el sobrenadante y se repitió una segunda extracción y centrifugado sobre el precipitado anterior. Finalmente, ambos sobrenadantes se mezclaron y almacenaron a -20 °C hasta su análisis. Para evaluar el rendimiento del extracto etanólico, se evaporaron 3 alícuotas de 1 mL a T^a ambiente durante 1 h y 30 min utilizando un evaporador de vacío Savant DNA120 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Los extractos evaporados se liofilizaron durante 24 h (Liofilizador Cryodos-50, TELSTAR, Madrid, España). A continuación, se calculó el peso seco del extracto y se referenció a un volumen de 1 mL de extracto inicial, así como por mg de extracto.

Alternativamente, se desarrollaron extractos etanólicos mediante Soxhlet en medio ácido. Para ello 2.5 g de harina de las muestras se resuspendieron en 20 mL de solución extractora compuesta por EtOH:H₂O tipo 1:HCl 12N (50:50:0.4) y sonicados durante 1 min (Vibracell™ 75185). La mezcla anterior se traspasó a dedales de extracción de celulosa grado 501 33x80 mm (VWR International, Lovaina, Bélgica). A continuación, estos se llevaron a un extractor de solventes semiautomático SER 148 (VELP Scientifica) y se añadieron 70 mL de la solución extractora anterior a los vasos de extracción. El cartucho con la muestra quedó inmerso en la solución extractora durante 20 min a 180 °C. Inmediatamente después, el cartucho se elevó para no estar inmerso en la solución extractora, y se continuó el proceso de extracción durante 60 min a 180 °C.

Finalmente, se recogió el extracto y se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Al igual que en el caso anterior, para evaluar el rendimiento del extracto etanólico, se evaporaron alícuotas de 1 mL a T^{a} ambiente durante 1 h y 30 min utilizando un evaporador de vacío Savant DNA120 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Los extractos evaporados se liofilizaron durante 24 h (Liofilizador Cryodos-50, TELSTAR, Madrid, España). A continuación, se calculó el peso seco del extracto y se referenció a un volumen de 1 mL de extracto inicial, así como por mg de extracto.

3.3 Pruebas de capacidad antioxidante

3.3.1 Determinación de los compuestos fenólicos totales

El contenido total de compuestos fenólicos se evaluó mediante un ensayo colorimétrico de Folin-Ciocalteu modificado, descrito por Dewanto et al. (153). Una alícuota de 125 μL de hidrolizado proteico o extracto etanólico o una solución estándar de ácido gálico (Panreac Química, Barcelona, España) (0-600 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se mezclaron con 500 μL de agua tipo I y 125 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu (MP Biomedicals, OH, EE.UU.). Las muestras se mantuvieron en oscuridad durante 6 min y después se mezclaron con 1.25 mL de una solución al 10% (p/v) de carbonato de sodio (Na_2CO_3) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) e hidróxido de sodio (NaOH) (PanReac AppliChem, Barcelona, España) 1 M. Tras ajustar el volumen a 3 mL utilizando 1 mL de agua tipo I, las muestras se mantuvieron en oscuridad a T^{a} ambiente durante 90 min. A continuación, se centrifugó la mezcla a 3000 rpm durante 10 min (Centrifuge 5810 R, Eppendorf) y se midió la densidad óptica del sobrenadante a $\lambda=750\text{ nm}$ (Multiskan FC Microplate Photometer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Los resultados se midieron por cuadruplicado y se expresaron como μg de ácido gálico equivalente (GAE) por mg de extracto.

3.3.2 Determinación de la capacidad de captación del radical ABTS^{•+}

Se determinó la capacidad antioxidante de los hidrolizados proteicos o extractos etanólicos mediante un ensayo de captación de radicales libres basado en el método de Miller et al. (154), en el que se hizo uso del ácido 2,20-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) como generador de radicales libres, para medir la capacidad antioxidante total de un fluido. Para generar el radical libre ABTS^{•+}, se requirió de la reacción química entre el ABTS (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) (7 mM)

y el persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) (4.9 mM) durante al menos 4 h en ausencia de oscuridad, formándose una solución estable de color azul-verde oscuro. Para poder utilizar dicha solución fue necesario diluirla hasta conseguir una absorbancia de 0.6 a $\lambda=620$ nm (Multiskan FC, fotómetro de microplacas, Thermo Fisher Scientific, Shanghai, China). Posteriormente, 6 μ L de hidrolizado proteico o extracto etanólico evaporado o una solución estándar de ácido gálico (Panreac Química, Barcelona, España) (0-60 μ g/mL), se mezclaron con 294 μ L de la solución de ABTS anterior diluida y se incubaron durante 1 minuto en ausencia de luz. A continuación, se midió la densidad óptica de las muestras a $\lambda=620$ nm (Multiskan FC, fotómetro de microplacas, Thermo Fisher Scientific, Shanghai, China). El blanco de la prueba se realizó con 6 μ l de agua y 294 μ l de la solución de ABTS. Los resultados se midieron por cuadruplicado y se expresaron como μ g de equivalente de ácido gálico (GAE) por mg de extracto.

3.3.3 Determinación de capacidad reductora de hierro

El poder reductor férrico se determinó mediante el método de Oyaizu et al. (155) con ligeras modificaciones. A 500 μ L de hidrolizado proteico o extracto etanólico o una solución estándar de ácido gálico (Panreac Química, Barcelona, España) (0-80 μ g/mL) se le adicionó 1.25 mL de tampón fosfato 0.2 M pH 6.6 y 1.25 mL de ferricianuro de potasio ($K_3[Fe(CN)_6]$) (Panreac Química, España, Barcelona) al 1 %. La mezcla se incubó a 50 °C durante 30 min. A continuación, se añadió 1.25 mL de ácido tricloroacético ($C_2HCl_3O_2$) (VWR International, Lovaina, Bélgica) 10%. Después de una centrifugación a 3000 rpm durante 10 min (Centrifuge 5430 R, Eppendorf), 2 mL de sobrenadante se mezclaron con 2 mL de agua tipo I y 0.4 mL de cloruro férrico ($FeCl_3$) (Panreac Química, España, Barcelona) 0.1%. A continuación, se midió la densidad óptica de las muestras a $\lambda=700$ nm (Multiskan FC, fotómetro de microplacas, Thermo Fisher Scientific, Shanghai, China). Los resultados se midieron por cuadruplicado y se expresaron como μ g de equivalente de ácido gálico (GAE) por mg de extracto.

3.3.4 Determinación de la capacidad quelante de Fe

El método descrito por Decker y Welch (156) se utilizó para determinar la capacidad quelante del ion ferroso de los hidrolizados proteicos y los extractos etanólicos. A 335 μ L de las muestras anteriores se les adicionó 35 μ L de cloruro ferroso ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$) (Merck, Darmstadt, Alemania) 2 mM y 1630 μ L de piperazina-N,N'-bis(ácido

2-etanesulfónico) (PIPES) (Thermo Fisher Scientific, Shanghai, China) 0.15 N. La mezcla se mantuvo en oscuridad durante 45 min. Tras la centrifugación a 3000 rpm durante 8 min (Centrifuge 5430 R, Eppendorf), 253 µL del sobrenadante se mezclaron con 13 µL de agua tipo I y 17 µL de sal sódica del ácido 3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazina-4',4''-disulfónicoferrozina (FerroZine, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) (5 mg/mL) y se incubaron 10 min en oscuridad. A continuación, se midió la densidad óptica de las muestras a $\lambda=570$ nm (Multiskan FC, fotómetro de microplacas, Thermo Fisher Scientific, Shanghai, China). El blanco de la prueba se realizó añadiendo agua tipo I en lugar de muestra. Una absorbancia más baja indicaba una mayor capacidad de quelación de iones ferrosos, que se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Capacidad de quelación de ion ferroso (\%)} = [1 - (\text{Abs}_{570 \text{ nm, muestra}} / \text{Abs}_{570 \text{ nm, control}})] \times 100$$

Los resultados fueron medidos por cuadruplicado y expresados como Unidades de Actividad Quelante (UAQ) por mg de extracto. Representando una unidad la capacidad de quelar el 50% del ion ferroso presente en la disolución.

3.3.5 Capacidad de inhibición de la peroxidación lipídica

Los homogeneizados de encéfalo, utilizados como aceptores de radicales libres, fueron preparados a partir de ratas (250–300 g de peso) que fueron alojadas y mantenidas en fotoperiodo de luz/oscuridad 12/12 h y a una temperatura de 22 ± 1 °C, con acceso libre a la comida y el agua. Los animales fueron anestesiados con ketamina (Fatro Ibérica, Barcelona, España) (75 mg/kg peso corporal) y xilazina (Fatro Ibérica, Barcelona, España) (10 mg/kg peso corporal) y el encéfalo fue extraído y homogeneizado usando el método de Oboh et al. (157) con pequeñas modificaciones. El encéfalo completo fue homogeneizado en frío con tampón 1.15 % de cloruro de potasio (KCl) (Panreac Química, Barcelona, España) suplementado con 0.1 % Triton X-100 (Merck, Darmstadt, Alemania) (en una relación 1:10, 1 g de tejido/10 g de tampón) y centrifugado a 7000 rpm durante 25 min a 4 °C (Centrifuge 5810 R, Eppendorf). El sobrenadante fue recogido y almacenado a -80 °C hasta su utilización. Las ratas provenían de la Unidad de Experimentación de la Universidad de Granada y el alojamiento y uso de los animales fueron llevados a cabo siguiendo las guías de la Directiva del Consejo de la Comunidad Europea (European Union Council, 2010) y del Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Granada.

Las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) fueron medidas en el homogeneizado de encéfalo como marcador de la peroxidación lipídica tras el tratamiento oxidativo tal y como fue descrito por Ohkawa et al. (158) con modificaciones que a continuación se detallan: en tubos Pyrex®(Corning, Corning, Nueva York, EE. UU.) con tapón de rosca se añadieron 100 µl de homogeneizado de encéfalo, 100 µL de cloruro férrico (FeCl₃) (Panreac Química, España, Barcelona) 5 mM, 100 µL de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (PanReac AppliChem, Barcelona, España) 1 mM, 1300 µL de KCl 0.15% (p/v) y finalmente se suplementaron con 150 µL de los diferentes extractos etanólicos realizados. Se realizaron cuatro réplicas por muestra. Como control se utilizaron mezclas de oxidación formadas por 100 µL FeCl₃ 5 mM, 100 µL H₂O₂ 1 mM y 1450 µL de KCl 0.15%. Todos los tubos fueron incubados a 37 °C durante 1 h (Memmert®). La reacción se detuvo por adición de 1500 µL de HCl 0.25 N (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.); 15% ácido tricloroacético (VWR International, Lovaina, Bélgica), 1.34 mM ácido dietilentriaminopenta acético (DETAPAC) (Panreac Química, España, Barcelona), 0.5 % butilhidroxitolueno (BHT) (Panreac Química, España, Barcelona), 300 µL de dodecilsulfato sódico (SDS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) al 8.1% y 300 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) al 3%; las muestras fueron después incubadas a 75 °C durante 1 h, enfriadas a T^a ambiente y centrifugadas a 4000 rpm durante 15 min (Centrifuge 5810 R, Eppendorf). Finalmente, los sobrenadantes fueron recogidos y su absorbancia fue determinada a λ=532 nm para detectar la formación de TBARS. El porcentaje de inhibición de la peroxidación lipídica fue calculado usando la ecuación:

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

A₀ = absorbancia del control.

A₁ = absorbancia de las diferentes muestras.

Una unidad de capacidad antioxidante (UCA) fue definida como la cantidad de muestra que inhibe la formación de TBARS un 50 %. Los resultados fueron expresados como UCA/mL.

3.4 Formulación del nutracéutico

Los extractos obtenidos de semillas que mostraron el mayor potencial bioactivo en base a su capacidad antioxidante, conjuntamente con su mayor rendimiento de

extracción fueron seleccionados para diseñar la combinación nutracéutica. Además, se seleccionó el extracto etanólico obtenido del fruto de *Argania spinosa*. La combinación final fue la siguiente:

- **Hidrolizados proteicos (80 %)**
 - *Lens culinaris* var. Castellana (20 %)
 - *Vigna angularis* (20 %)
 - *Onobrychis viciifolia* (20 %)
 - *Trigonella foenum-graecum* (20 %)

- **Extractos etanólicos (20 %)**
 - *Argania spinosa* (4 %)
 - *Origanum vulgare* (4 %)
 - *Coriandrum sativum* (4 %)
 - *Citrullus lanatus* (4 %)
 - *Cynara scolymus* (4 %)

La formulación nutracéutica fue sometida a las pruebas de capacidad antioxidante previamente comentadas en el **apartado 3.3**: determinación de los compuestos fenólicos totales y determinación de capacidad antioxidante: captación del radical ABTS^{•+}, capacidad reductora de hierro y capacidad quelante de hierro.

3.5 Digestibilidad *in vitro* en continuo

Para evaluar la digestibilidad y la bioaccesibilidad de la capacidad antioxidante de la formulación nutracéutica diseñada, se llevó a cabo un método *in vitro* de flujo continuo mediante el protocolo de Minihane et al. (159) y Shen et al. (160), siguiendo las recomendaciones de INFOGEST para las soluciones de digestión salival, gástrica e intestinal, así como las proporciones alimento:secreción digestiva, con algunas modificaciones (161). Este modelo pretende simular las condiciones fisiológicas del tracto gastrointestinal superior, es decir, las fases oral, gástrica e intestinal delgada (**Figura 12**). Para simular la fase oral, a la formulación nutracéutica liofilizada (2.5 g) se le adicionó 32 mL de solución salival y se incubó a 37 °C en agitación continua durante 2 min dentro del equipo de digestión. El equipo de digestión consistió en un recipiente hermético con agitación (UFSC20001, EMD Millipore, EE. UU.) con un disco de filtración 10 kDa (PLGC06210, EMD Millipore, EE. UU.) en su fondo (mantenido en agua tipo I 1 h

previo a su utilización), dentro de una estufa (Incudigit-TFT, JP Selecta, Barcelona, España), en el que se puede realizar un proceso de filtración mediante presión, a través de la inyección de nitrógeno (N_2), y obtener un filtrado mediante la presión generada, el cual es recogido en tubos falcons. A continuación, se simuló la fase gástrica añadiendo 31 mL de solución gástrica y se llevó a pH 2 añadiendo ácido clorhídrico (HCl) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) 6 N. A la mezcla anterior se añadió 1 mL de solución de pepsina (P6887, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) al 5.2 % (p/v) diluida en HCl 0.01 N y se llevó a incubación durante 2 h a 37 °C. Tras la digestión con pepsina se simuló la fase intestinal, para lo que a la mezcla anterior se añadieron 54 mL de solución intestinal. Además, para compensar el pH de la mezcla de digestión se incluyó una membrana de diálisis con anión bicarbonato (HCO_3^-) y agua tipo I hasta un volumen final de 5 mL con una cantidad de bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$) (PanReac AppliChem, Barcelona, España) equivalente a la acidez valorable de la solución gástrica para ajustar el pH de la digestión intestinal a 7.5. Previamente, la membrana de diálisis con un tamaño de poro de 14 kDa (DTV12000.02.30, Medicell Membranes Ltd, Londres) fue cortada en un fragmento de 7 cm de longitud y se mantuvo en agua tipo I durante 12 h a 4 °C antes de su utilización. Todo ello se digirió durante 30 min a 37 °C en agitación dentro del equipo de digestión en continuo. Inmediatamente después se vació el contenido de la membrana de diálisis y se añadieron 15 mL de una solución pancreatina (P7545, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) y sales biliares (B8631, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.). De nuevo el contenido se mantuvo 2 h en agitación a 37 °C, recolectándose fracciones cada 30 min. Cuando acabó el proceso, tanto el contenido del interior de equipo de digestión en continuo (retenido), como el contenido de los tubos fuera del equipo de digestión en continuo (dializado) fueron conservados a -20 °C hasta su posterior análisis. Se determinó la capacidad antioxidante en dializados y retenidos de la formulación nutraceútica mediante las diferentes pruebas que se incluyen en el **apartado 3.3.**

Solución salival (pH 7):

- KCl 15.1 mM
- KH₂PO₄ 3.7 mM
- NaHCO₃ 6.8 mM
- MgCl₂·6 H₂O 0.15 mM
- (NH₄)₂CO₃ 0.06 mM
- HCl 1.1 mM
- CaCl₂ 1.5 mM
- H₂O tipo I hasta 32 mL

Solución gástrica (pH 3):

- KCl 6.9 mM
- KH₂PO₄ 0.9 mM
- NaHCO₃ 25 mM
- NaCl 47.2 mM
- MgCl₂·6 H₂O 0.12 mM
- (NH₄)₂CO₃ 0.5 mM
- HCl 15.6 mM
- CaCl₂ 0.15 mM
- H₂O tipo I hasta 31 mL

Solución intestinal (pH 7):

- KCl 6.8 mM
- KH₂PO₄ 0.8 mM
- NaHCO₃ 85 mM
- NaCl 38.4 mM
- MgCl₂·6 H₂O 0.33 mM
- HCl 8.4 mM
- CaCl₂ 0.6 mM
- H₂O tipo I hasta 54 mL

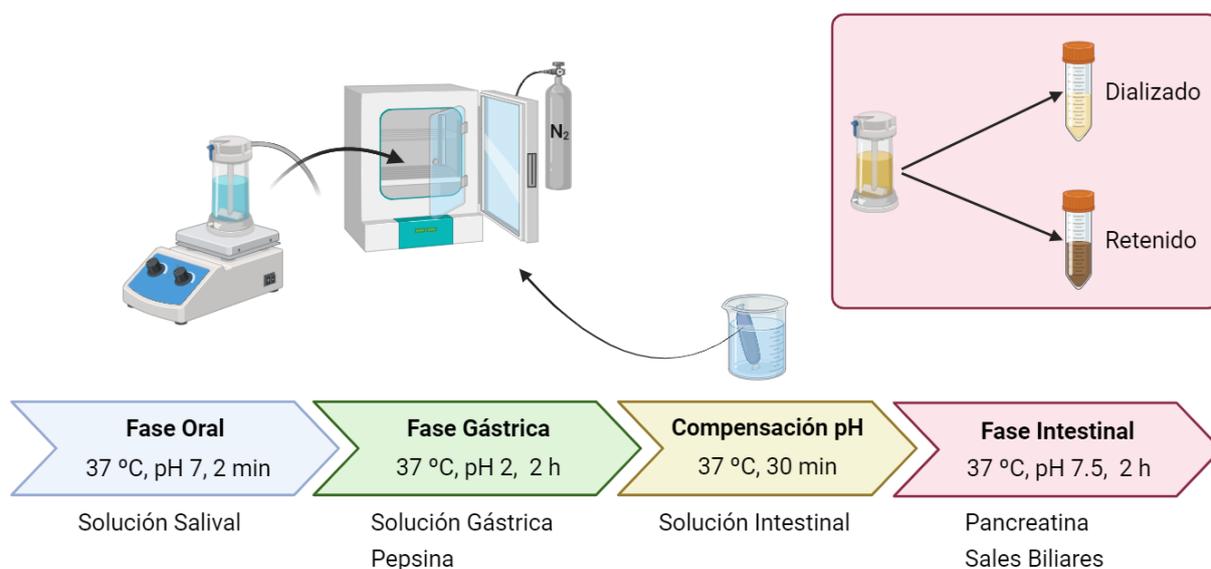


Figura 12. Esquema del proceso de digestión *in vitro* en continuo. Imagen generada a partir de BioRender.

3.6 Identificación de compuestos bioactivos

3.6.1 Compuestos fenólicos

El perfil de compuestos fenólicos de la formulación nutraceútica se identificó mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución (UPLC) (Acquity H Class, Waters, Milford, MA, EE. UU) acoplada por espectrometría de masas de QTOF (Synap G2, Waters) en la unidad de Espectrometría de Masas del Centro de Instrumentación Científica (Facultad de Farmacia, Universidad de Granada). Antes del análisis por espectrometría de masas, las muestras se filtraron a través de filtros de disco de nailon de 0.22 μm (Millipore). Se inyectaron en el cromatógrafo 10 μL de la solución final. La separación analítica de los compuestos fenólicos se realizó en una columna analítica ACQUITY HSS T33 (100 mm \times 2,1 mm de diámetro interno, 1.8 m). Se utilizó una fase móvil consistente en un programa de gradiente que combinaba agua desionizada con 0.5 % de ácido acético (CH_3COOH) como disolvente A y acetonitrilo (CH_3CN) con 0.5 % de ácido acético como disolvente B. Las condiciones iniciales fueron 95 % de A y 5 % de ácido acético. Se estableció un gradiente lineal para alcanzar el 95 % (v/v) de B a los 18 min. El tiempo total de ejecución fue de 18 min y el tiempo de posretardo de 5 min. El caudal de la fase móvil fue de 0,4 mL/min. Tras la separación cromatográfica, se realizó un análisis de espectrometría de masas de alta resolución en ionización por electrospray negativo (ESI⁻). Se utilizó nitrógeno de gran pureza como gas para la desolvatación (600 L/h) y el cono (30 L/h). Los espectros se registraron en el intervalo masa/carga (m/z) 50-1200.

Todos los compuestos se identificaron basándose en sus tiempos de retención (RT) y masa de sus fragmentos (MS). El análisis de los cromatogramas se realizó con el software MassLynx V4.1 (Waters Corporation, Milford, MA, EE.UU.). Se utilizó la base de datos Chemspider y LOTUS para validar los compuestos identificados haciendo coincidir al menos tres de sus fragmentos.

3.6.2 Péptidos bioactivos

La identificación de péptidos bioactivos de la formulación nutracéutica fue realizada por el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (CSIC, Madrid, España) se empleó una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) AcclaimPepMap 100 C18 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.), los péptidos se separaron en un nano Easy-nLC 1000 (Proxeon) acoplado a una fuente iónica con nanoelectrospray (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Los espectros de masas se adquirieron en un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Las muestras se resuspendieron en ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1 % de manera que se alcanzara una concentración de 2 mg/mL. Se sometieron a vórtex 10 s, sonicación 3 min y disgregación de restos sólidos con *tips* de punta ultrafina. Se repitió todo el proceso y finalmente se centrifugaron las muestras a 13000 g a T^a ambiente 2-3 min. En ningún caso se alcanzó la resuspensión completa. Ante la persistencia de los pellets, se procesaron alícuotas de 10 µL de los sobrenadantes diluyéndolos a la mitad, con otros 5 µL de TFA 0.1 %. Se conservó el resto de cada muestra resuspendida. Las alícuotas se purificaron con columnas de fase reversa C18 ZipTip (millipore) y se resuspendieron en ácido fórmico al 0.1 % / acetonitrilo (ACN) 2 %. En todos los casos se inyectaron 1/5 de los volúmenes de las alícuotas en el LTQ Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Tras retener los péptidos en una precolumna AcclaimPepMap 100 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.), se eluyeron en una columna AcclaimPepMap 100 C18, 25 cm de longitud, 75 µm de diámetro interno y 3 µm de tamaño de partícula (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Los péptidos se separaron en un gradiente de 120 min (90 min de 0-35 % de Buffer B; 10 min 35 %-45 % Buffer B; 5 min 45 %-95 % Buffer B; 10 min al 95 % Buffer B; 1 min 95 %-100 %, y 4 al 100 % Buffer B (Buffer A: 0.1 % ácido fórmico, 2 % ACN; Buffer B: 0.1 % ácido fórmico en acetonitrilo) con un flujo de 250 nL/min en un nano Easy-nLC 1000 (Proxeon) acoplado a una fuente iónica con

nanoelectrospray (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Los espectros de masas se adquirieron en un espectrómetro de masas LTQ–Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) trabajando en modo positivo. Los espectros de masas correspondientes al barrido completo (m/z 400-2.000) se obtuvieron en el Orbitrap con una resolución de 60.000 y se seleccionaron los 15 iones más intensos de cada barrido para su fragmentación mediante disociación inducida por colisión (CID) en la trampa iónica, con la energía de colisión normalizada al 35 %. Los iones con carga única o sin asignación de carga se desecharon. Se llevó a cabo una exclusión dinámica con una duración de 45 s. Para la búsqueda e identificación de secuencias peptídicas los archivos de espectros (*.raw) se enfrentaron a la base de datos SwissProt con taxonomía Viridiplantae (2347000 secuencias), usando el motor de búsqueda MASCOT (versión 2.3, Matrix Science). Las búsquedas se realizaron mediante ProteomeDiscoverer (versión 1.4.1.14, Thermo Fisher Scientific). En los parámetros de búsqueda se estableció como modificación fija la carbamidometilación de cisteínas, y como modificación dinámica, la oxidación de metioninas. La tolerancia de la selección de los precursores y los iones producto se fijó en 10 ppm y 0.5 Da, respectivamente. La identificación de los péptidos se validó mediante el algoritmo Percolator usando un valor $q \leq 0.01$ (162). Por otro lado, mediante la herramienta *peptide ranker* (163) se calculó la probabilidad de que los péptidos fuesen bioactivos. Esta herramienta establece que cuando el valor de predicción es superior a 0.5 el péptido tiene muchas probabilidades de ser bioactivo. Posteriormente se buscó su perfil bioactivo utilizando la base de datos BIOPEP.UWN (164). Esta base de datos define el potencial bioactivo de un péptido enlazando su secuencia de aminoácidos con la de otros péptidos con actividades biológicas demostradas experimentalmente.

3.7 Experimentos en cultivos celulares

3.7.1 Líneas celulares

Los experimentos de cultivo celular tuvieron como objetivo estudiar la influencia de la formulación nutraceútica sobre la viabilidad y el estado metabólico de las líneas celulares HT-29 (Centro Instrumentación científica, Universidad de Granada) y HepG2 (Centro Instrumentación científica, Universidad de Granada) solas o sometidas a estrés oxidativo. La línea celular HT-29 es una línea de adenocarcinoma colorrectal humano con morfología epitelial y que crece adherida a la superficie del matraz de cultivo

formando una monocapa, mientras que HepG2 es una línea celular tumoral humana de carcinoma hepatocelular que presenta una morfología similar a la epitelial. Además, durante el periodo de estancia predoctoral, bajo la supervisión del Dr. Rui Eduardo Castro, en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Lisboa se evaluó el efecto de la formulación nutraceútica sobre la lipotoxicidad en la línea celular de hepatocitos murinos AML12 (*Alpha mouse liver 12*) (ATCC, CRL-2254). Las células se mantuvieron en una incubadora estéril a 37 °C y 5 % de CO₂ utilizando como medios de cultivos suplementados con suero bovino fetal (FBS) (Gibco, Life Technologies) (10 %): 1) McCoy's 5a modificado (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) y penicilina-estreptomicina (Pen Strep) (10000 unidades/mL-10000 µg/mL) (1 %) para HT29, 2) RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) suplementado con L-Glutamina (1 %) y Pen Strep (1 %) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) para HepG2 y 3) DMEM/F-12 + GLUTAMAX™ (Gibco, Life Technologies) suplementado con Insulina-transferrina-selenio (ITS-G) (1 %) (Gibco, Life Technologies), dexametasona (DEXM) (0.0001 %) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) y antibiótico-antimicótico (A/A) (1 %) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) para AML12. Antes de iniciar los experimentos, las células se lavaron con una solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.), se trataron con solución de tripsina al 0.25 %-EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) durante 5 min y se contaron con *Trypan Blue* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) (0.4 %, preparado en PBS), utilizando una cámara de Neubauer (Zuzi®). Las líneas celulares HT-29 y HepG2 fueron sembradas en placa de 96 pocillos a una concentración de 5·10⁴ células/mL en 150 µL de McCoy's 5a modificado, 10 % FBS, 1 % Pen Strep (HT-29) o RPMI 1640, 10 % FBS, 1 % Pen Strep (HepG2). La línea celular AML12 fue sembrada en placa de 48 pocillos a una concentración de 1·10⁴ células/mL en 250 µL de DMEM/F-12 + GLUTAMAX™, 10 % FBS, 1 % ITG-S, 0.0001 % DEXM, 1 % A/A; en placas para cultivo celular 60 x 15 mm (Falcon, Fisher Scientific) a una concentración de 2·10⁵ células/mL en 2 mL de DMEM/F-12 + GLUTAMAX™, 10 % FBS, 1 % ITG-S, 0.0001 % DEXM, 1 % A/A, y en placas para cultivo celular 35 x 15 mm (Falcon, Fisher Scientific) a una concentración de 1·10⁵ células/mL en 1 mL de medio DMEM/F-12 + GLUTAMAX™, 10 % FBS, 1 % ITG-S, 0.0001 % DEXM, 1 % A/A.

3.7.2 Tratamiento del nutracéutico para ensayos *in vitro*

El extracto de la formulación nutracéutica liofilizada fue preparado en condiciones de esterilidad, para ello, 9 mg se resuspendieron en 1.8 mL de agua tipo I esterilizada mediante autoclave y bajo campana de flujo laminar. A continuación, fueron homogenizadas mediante agitación en vortex y sonicación en baño durante 30 min (Fisherbrand™ 11205 *Advanced Ultrasonic Cleaner*). Inmediatamente después, las preparaciones fueron filtradas sucesivamente con filtros estériles de acetato de celulosa sin surfactantes con un tamaño de poro de 0.45 µm y 0.20 µm (Sartorius, Göttingen, Alemania), para eliminar partículas no disueltas y los posibles microorganismos presentes en la formulación. Además, las preparaciones fueron calentadas a 95 °C durante 10 min en un bloque térmico (AccuBlock™ Digital Dry Bath, Labnet) para inactivar la potencial acción de las proteasas presentes en los hidrolizados proteicos incluidos en la formulación. Previo a las diferentes condiciones de estrés oxidativo, se ensayaron diferentes concentraciones del nutracéutico en las diferentes líneas celulares empleadas, para determinar la concentración máxima del nutracéutico que mantuvo la viabilidad e integridad de cada línea celular y emplearlas en los siguientes ensayos celulares. Para ello, la formulación nutracéutica fue diluida en el medio indicado sin FBS para cada línea celular McCoy's 5a modificado, 1 % Pen Strep (HT-29), RPMI-1640, 1 % L-Glutamina, 1 % Pen Strep (HepG2) y DMEM/F-12 + GLUTAMAX™, 1 % ITG-S, 0.0001 % DEXM, 1 % A/A (AML12) e incubada durante 24 h. Para estudiar los cambios en el estado metabólico de las células se hizo uso del ensayo MTT de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazolio (AppliChem) (165) en las líneas celulares HT-29 y HepG2. Con este mismo objetivo se realizó el ensayo MTS de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (Promega) en la línea celular AML12. Además, en esta misma línea se evaluó la muerte celular y la toxicidad generada por la formulación nutracéutica mediante el ensayo LDH (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) y ensayo ToxiLight (Lonza), respectivamente.

3.7.3 Capacidad antioxidante *in vitro* del nutracéutico

Se generaron condiciones de estrés oxidativo en las líneas celulares HT-29 y HepG2 mediante la adición de H₂O₂ (PanReac AppliChem, Barcelona, España) y dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo (Paraquat, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.). En primer lugar, se cultivaron las células en placa de 96 pocillos y se ensayaron concentraciones

crecientes de H₂O₂ y Paraquat (0.5-4 mM) durante 6 h y 16 h, respectivamente, para encontrar la concentración que disminuyera en un 50 % la viabilidad celular. A continuación, para evaluar la capacidad antioxidante diferentes concentraciones de la formulación nutracéutica fueron ensayadas en las líneas celulares HT-29 y HepG2 en placa de 96 pocillos, en ausencia o presencia de las concentraciones previamente seleccionadas de H₂O₂ y Paraquat a partir del ensayo anterior (**Figura 13**). Para determinar la viabilidad celular se hizo uso del ensayo MTT. A continuación, se detalla el protocolo experimental:

Protocolo experimental en placa de 96 pocillos

- **Día 1:** se sembró en cada pocillo 5×10⁴ células en 150 µL de McCoy's 5a modificado, 10 % FBS, 1 % Pen Strep (HT-29) o RPMI 1640, 10 % FBS, 1 % L-Glutamina, 1 % Pen Strep (HepG2) hasta el día siguiente, cuando se alcanzó un 96% de confluencia.
- **Día 2:** se desechó el medio de cada pocillo y se sustituyó por 150 µL de McCoy's 5a modificado, 1 % Pen Strep (HT-29) o RPMI 1640, 1 % L-Glutamina, 1 % Pen Strep (HepG2) sin FBS. Se incubó durante 24 h.
- **Día 3:** inicio del pre-tratamiento. Se retiró el medio de cada pocillo y, a continuación, se añadieron las concentraciones correspondientes de la formulación nutracéutica a cada pocillo. La formulación nutracéutica (NT) fue diluida en el medio de cultivo indicado sin FBS para cada línea celular McCoy's 5a modificado, 1 % Pen Strep (HT-29) o RPMI-1640, 1 % L-Glutamina, 1 % Pen Strep (HepG2). El volumen de cada pocillo es de 200 µL. Se dejaron incubar durante 24 h.
- **Día 4:**
 - **Ensayo H₂O₂:** para la mitad de la placa, se reemplazó el medio de cultivo indicado sin FBS (200 µL) para cada línea celular McCoy's 5a modificado, 1 % Pen Strep (HT-29) o RPMI-1640, 1 % L-Glutamina, 1 % Pen Strep (HepG2) y se incubó durante 18 h. Para la otra mitad de las placas, se retiró el medio de cada pocillo y se trataron las células con las concentraciones seleccionadas de H₂O₂ (200 µL) durante 6 h. Inmediatamente después, se retiró el medio de las células tratadas con H₂O₂ y se añadió 200 µL del medio de cultivo indicado sin FBS para

cada línea celular McCoy's 5a modificado, 1 % Pen Strep (HT-29) o RPMI-1640, 1 % L-Glutamina, 1 % Pen Strep (HepG2) y se incubó durante 12 h.

- **Ensayo Paraquat:** para una mitad de la placa, se reemplazó el medio de cultivo indicado sin FBS (200 μ L) para cada línea celular McCoy's 5a modificado, 1 % Pen Strep (HT-29) o RPMI-1640, 1 % L-Glutamina, 1 % Pen Strep (HepG2) y se incubó durante 16 h. Para la otra mitad de las placas, se retiró el medio de cada pocillo y se trataron las células con las concentraciones seleccionadas de Paraquat (200 μ L) durante 16 h.
- **Día 5:** se retiró el medio de cultivo de cada pocillo y se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo MTT.

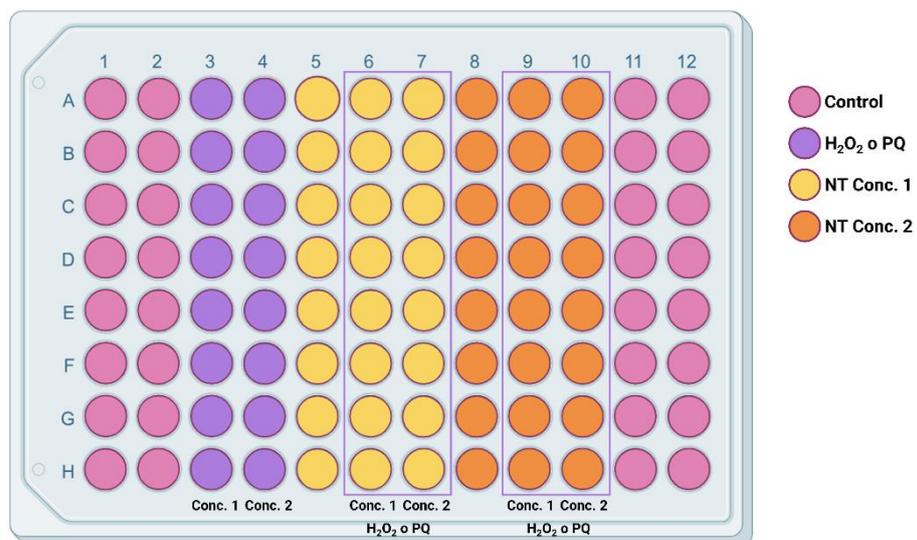


Figura 13. Diseño experimental placa de 96 pocillos. Imagen generada a partir de BioRender.

3.7.4 Ensayo *in vitro* del nutraceutico sobre la lipotoxicidad

Se generaron condiciones de lipotoxicidad en la línea celular AML12 mediante la adición de ácido palmítico (PA) (125 μ M) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.). En primer lugar, se cultivaron las células en : 1) placa de 48 pocillos a una densidad de $1 \cdot 10^4$ células/mL en 250 μ L de DMEM/F-12 + GLUTAMAX™, 10 % FBS, 1 % ITG-S, 0.0001 %

DEXM, 1 % A/A; 2) en placas para cultivo celular 60 x 15 mm (Falcon, Fisher Scientific) a una densidad de $2 \cdot 10^5$ células/mL en 2 mL de DMEM/F-12 + GLUTAMAX™, 10 % FBS, 1 % ITG-S, 0.0001 % DEXM, 1 % A/A, y 3) en placas para cultivo celular 35 x 15 mm (Falcon, Fisher Scientific) a una concentración de $1 \cdot 10^5$ células/mL en 1 mL de medio DMEM/F-12 + GLUTAMAX™, 10 % FBS, 1 % ITG-S, 0.0001 % DEXM, 1 % A/A. Tras 48 h de incubación, se añadieron las concentraciones correspondientes de la formulación nutraceútica diluidas en el medio anterior sin FBS y como un control positivo se añadió también el fármaco semaglutida y se incubaron durante 1 h. La semaglutida fue diluida en dimetilsulfóxido (DMSO) (PanReac AppliChem, Barcelona, España) según las indicaciones del fabricante (Bachem), así como las concentraciones utilizadas. En placa de 48 pocillos se sembraron 6 réplicas por cada una de las concentraciones de formulación nutraceútica y semaglutida utilizadas, mientras que en sendas placas para cultivo celular (60 x 15 mm y 35 x 15 mm) se sembraron 4 réplicas por concentración. Tras la hora de incubación, a 3 de las réplicas de cada una de las concentraciones de formulación nutraceútica y semaglutida utilizadas en placa de 48 pocillos y a 2 réplicas de las sendas placas para cultivo celular (60 x 15 mm y 35 x 15 mm) con las concentraciones de formulación nutraceútica y semaglutida utilizadas, se les añadió PA a una concentración final de 125 μ M y se incubaron durante 24 h (**Figura 14**). Tras lo cual en la placa de 48 pocillos se realizaron ensayos de viabilidad celular mediante el ensayo MTS (Promega), de muerte celular mediante ensayo de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) y de toxicidad mediante ensayo ToxiLight (Lonza). Por otro lado, las placas para cultivo celular de 60 x 15 mm y 35 x 15 mm fueron utilizadas para la extracción de ARN (ver **apartado 3.7.9**).

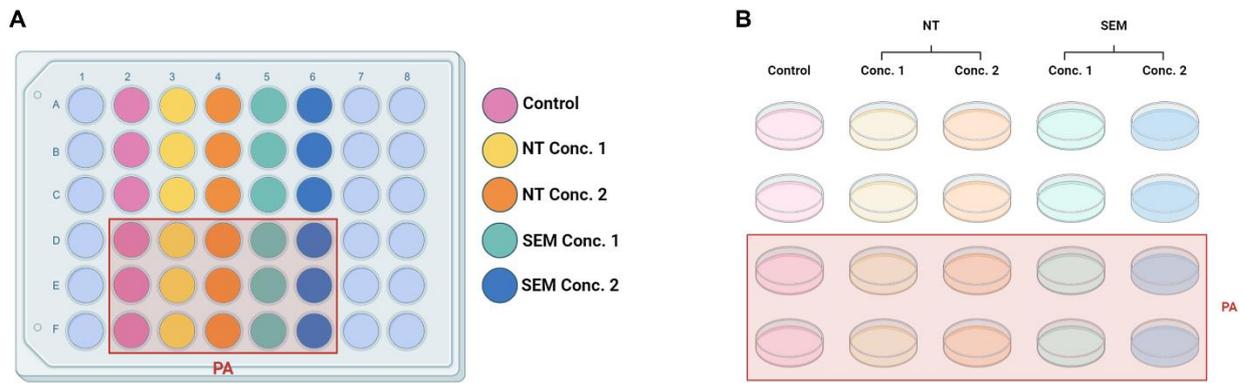


Figura 14. (A) Diseño de la placa de 48 pocillos y (B) de placas para cultivo celular para la determinación del efecto *in vitro* sobre la lipotoxicidad de la formulación nutraceútica (NT) y de la semaglutida (SEM) a dos concentraciones diferentes. Imagen generada a partir de BioRender.

3.7.5 Determinación de acumulación de triglicéridos

Para determinar la capacidad de la formulación nutraceútica y la semaglutida de disminuir la acumulación de triglicéridos las células fueron tratadas con PA (125 μM) y teñidas con 9-(dietilamino)-5H-benzo[a]fenoxazin-5-ona (*Nile Red*). El *Nile Red* es un colorante liposoluble, el cual es una excelente sonda para la detección de lípidos neutros y mediante su combinación con fluorescencia permite detectar lípidos intracelulares en diferentes organismos (166). Para ello, se cultivaron en placa de 48 pocillos a una densidad de $1 \cdot 10^4$ células/mL en 250 μL de DMEM/F-12 + GLUTAMAX™, 10 % FBS, 1 % ITG-S, 0.0001 % DEXM, 1 % A/A durante 48 h. A continuación, se añadieron las concentraciones correspondientes de la formulación nutraceútica diluidas en el medio anterior sin FBS (6 réplicas por concentración) y del semaglutida diluidas en DMSO (PanReac AppliChem, Barcelona, España) (6 réplicas por concentración) y se incubaron durante 1 h. Inmediatamente después, a 3 de las réplicas de cada una de las concentraciones de la formulación nutraceútica y semaglutida utilizadas se les añadió PA a una concentración final de 125 μM . Se incubaron durante 24 h, tras lo cual se retiró el medio de cultivo celular y se añadió *Nile Red* (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) diluido en medio de cultivo (200 μL por pocillo) y se incubó durante 1 h. A continuación, se descartó el medio de cultivo y se lavaron las células con 200 μL de PBS para remover el exceso de colorante. Se descartó el contenido y se volvieron a añadir 200 μL de PBS. Se midió la intensidad de fluorescencia ($\lambda_{\text{excitación}}=552$ y $\lambda_{\text{emisión}}=636$ nm) utilizando un lector de microplacas multimodo Varioskan LUX (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Se normalizaron los resultados mediante la actividad LDH de las

células viables tras la disrupción celular al final del ensayo utilizando *Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS}* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). Para ello se descartó el PBS de la placa anterior y las células se incubaron con la solución de lisis (100 μL /pocillo) durante 30 min, para liberar al exterior el contenido en LDH intracelular. Después del tiempo de incubación, se traspasaron 50 μL de cada pocillo a una placa de 96 pocillos nueva y se les añadió 50 μL de mezcla de reacción (1.12 μL de catalizador + 48.88 μL de solución de tinción) y se incubó en oscuridad durante 10-30 min. Finalmente, se midió la absorbancia a $\lambda=490$ nm, con $\lambda_{\text{referencia}}=620$ nm, en un fotómetro de microplacas Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, Shanghai, China). Los resultados fueron expresados como la relación entre fluorescencia/absorbancia.

3.7.6 Determinación de la viabilidad celular: MTT y MTS

Para determinar la viabilidad celular tras someter a las líneas celulares de HT-29 y HepG2 a condiciones de estrés oxidativo (H_2O_2 y Paraquat) en placa de 96 pocillos y a la línea celular AML12 a condiciones proinflamatorias (PA) en placa de 48 pocillos.

MTT

Se preparó la solución de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT, AppliChem) a una concentración final de 0.5 mg/mL. Para realizar el ensayo, en primer lugar, se descartó el medio de cultivo y a cada pocillo se añadieron 200 μL de la solución anterior de MTT. Se incubó en oscuridad durante 2-3 h en el incubador para cultivo celular, tras lo que se retiró el medio y se añadió a cada pocillo 200 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) (PanReac AppliChem, Barcelona, España) y 25 μL de tampón de glicina de Sørensen (5.8 g de NaOH + 7.5 g de Glicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) pH 10.5 en 100mL de agua tipo I), se agitó hasta completa disolución y se midió la absorbancia a $\lambda=492$ nm en un fotómetro de microplacas Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, Shanghai, China).

MTS

Se realizó según las indicaciones del fabricante *CellTiter 96[®] Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay* (Promega), para ello, se descartó el medio de cultivo y a cada pocillo se le añadieron: 1) 100 μL de medio de cultivo; 2) 1 μL de solución de metosulfato de fenazina (PMS) y 3) 20 μL de solución de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS). Se incubó en oscuridad

durante 1 h en el incubador para cultivo celular, tras lo que se traspasó el medio a una placa de 96 pocillos nueva y se midió la absorbancia a $\lambda=492$ nm en un fotómetro de microplacas Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, Shanghai, China).

3.7.7 Determinación de la muerte celular: LDH

Se determinó la citotoxicidad o muerte celular tras someter a las células a condiciones proinflamatorias en placa de 48 pocillos mediante un ensayo de actividad de lactato deshidrogenasa (LDH), ya que el incremento en la actividad LDH en el sobrenadante del cultivo es proporcional al número de células lisadas. El ensayo se realizó según el *Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS}* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) con ligeras modificaciones. En esta ocasión la mezcla de reacción por pocillo consistió en 2.22 μ L de catalizador y 100 μ L de solución de tinción. En una placa de 96 pocillos se traspasaron 50 μ L del sobrenadante de cada pocillo y se añadieron 50 μ L de la mezcla de reacción. Se dejó incubar 10 min y se midió la absorbancia a $\lambda=490$ nm, con $\lambda_{\text{referencia}}=620$ nm, en un fotómetro de microplacas Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, Shanghai, China).

3.7.8 Determinación de toxicidad: TOXILIGHT

Se determinó la toxicidad tras someter a las células a condiciones proinflamatorias en placa de 48 pocillos mediante un ensayo de detección de la liberación de adenilato kinasa (AK) por parte de células dañadas. El ensayo se realizó según *ToxiLightTM bioassay kit* (Lonza) con ligeras modificaciones. En una placa de 96 pocillos compatible para luminiscencia se traspasaron 50 μ L del sobrenadante de cada pocillo y se añadieron 50 μ L del reactivo de detección de AK. Se dejó incubar durante 5 min y se midió la luminiscencia en un multilector GloMax (GloMax-Multi+ Detection System; Promega Corp., Madison, WI, EE. UU.).

3.7.9 Extracción de ARN

Tras el ensayo bajo condiciones proinflamatorias en la línea celular AML12 en placas para cultivo celular 60 x 15 y 35 x 15 mm, se retiró el medio de cultivo y se añadieron 1.5 y 1 mL de PBS (GibcoTM), respectivamente. Con ayuda de un raspador celular se recogieron las células y el volumen final 500 y 300 μ L, respectivamente, fue destinado para la extracción de ARN. A continuación, la suspensión anterior se centrifugó a 600 g durante 5 min a T^a ambiente (Centrifuge 5430 R, Eppendorf) y se

descartó el sobrenadante. Sobre el pellet se añadieron 500 µL de TRIZOL® (Invitrogen) y se almacenaron las muestras a -20 °C durante 24 h para facilitar la lisis celular. Posteriormente y tras la descongelación de las muestras, se añadieron 100 µL de cloroformo (PanReac AppliChem, Barcelona, España) y se agitaron vigorosamente en vortex durante 15 s. Las muestras se incubaron de 2-3 min a T^a ambiente y se centrifugaron a 12000 g durante 15 min y a 4 °C. Se obtuvieron 3 fases bien diferenciadas, una fase superior acuosa que contiene ARN, una interfase y una fase orgánica inferior roja que contiene proteínas y ADN. Se recogió la fase superior, traspasándose a tubo libre de ARNasas (Corning, Nueva York, EE. UU.), sobre este se añadieron 250 µL de isopropanol (PanReac AppliChem, Barcelona, España), el contenido de los tubos mezcló por inversión y se incubó 10 min a T^a ambiente. Inmediatamente después, las muestras se centrifugaron a 12000 g durante 10 min y a 4 °C. El sobrenadante se descartó y se añadieron 400 µL de EtOH 70 % (VWR International, Lovaina, Bélgica) preparado con agua tipo I autoclavada para lavar el ARN. Se agitó brevemente en vortex y se centrifugaron las muestras a 7500 g durante 5 min y a 4 °C. A continuación, se descartó el sobrenadante y el precipitado se secó a T^a ambiente durante 10 min. Éste fue resuspendido, en un volumen de agua tipo I libre de ARNasas entre 30-100 µL en función de su tamaño. Finalmente, las muestras se incubaron durante 10 min a 55 °C en un bloque térmico (Thermo shaker, Lan Technics Model MS-100) para facilitar la disolución del precipitado. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su posterior utilización. El ARN aislado fue cuantificado en un espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop) y su calidad analizada mediante el índice de A=260/A=280 que se estableció entre 1.90 a 2.00.

3.7.10 Retrotranscripción y qPCR: mi-ARN

La retrotranscripción de ARN total de las muestras para la síntesis de ADN complementario (ADNc) de micro-ARNs (mi-ARNs) se llevó a cabo utilizando *TaqMan*TM *MicroRNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) con ligeras modificaciones. En tiras de 8 tubos para reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó una mezcla de 10 ng de ARN con 9.25 µL de *Master Mix* que contenían los componentes necesarios para llevar a cabo la retrotranscripción del material genético (**Tabla 3**) y con 0.75 µL del cebador específico para cada mi-ARN (RT Primer 20X, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) (**Tabla 4**).

Tabla 3. Componentes de la mezcla de reacción (*Master Mix*) de la retrotranscripción.

Componente	Volumen para 1 reacción (µL)
100 mM nucleósidos trifosfato (dNTPS) (con timidina trifosfato (dTTP))	0.15
MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 50 U/µL	1.00
10× Tampón de transcripción reversa	1.50
Inhibidor de ribonucleasas	0.19
Agua libre de nucleasas	6.41
Volumen total de Master Mix	9.25

Tabla 4. Genes incluidos en el análisis de mi-ARN.

Gen	Assay ID
U6*	001973
miR-21	000397
miR-34a	000426
miR-122	002245
miR-192	000491

* U6 es un pequeño ARN nuclear (ARNsn) en lugar de un mi-ARN, que se usa como gen endógeno en el análisis de estos últimos.

Finalmente, las muestras (con 15 µL de volumen final) se someten a un programa en el termociclador para producir la retrotranscripción de la muestra de ARN a ADNc: 30 min a 16 °C, 30 min a 42 °C y 5 min 85 °C.

La PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) fue realizada en un equipo QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) y haciendo uso de una placa de 384 pocillos, a los que a cada uno se añadió 0.5 µL de TaqMan™ Small RNA Assay (20X) (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.), 5 µL de TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.), 3.84 µL de agua libre de nucleasas (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) y 1 µL de ADNc. Las condiciones de reacción vienen recogidas en la **Tabla 5**. Los niveles de expresión relativos de los mi-ARNs de interés en relación con el gen endógeno U6 se calcularon como $2^{-\Delta\Delta CT}$. Estos ensayos se llevaron a cabo bajo la supervisión del Dr. Rui Eduardo Castro, en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Lisboa.

Tabla 5. Condiciones de reacción qPCR.

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Activación de la enzima	95 °C	20 s	1
Desnaturalización	95 °C	1 s	1
Anillamiento y extensión	60 °C	20 s	40

3.7.11 Retrotranscripción y qPCR: ARNm

La retrotranscripción de ARN total de las muestras para la síntesis del ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) de ARN mensajero (ARNm) de genes de interés se llevó a cabo utilizando NZY Reverse Transcriptase (Nzytech, Lisboa, Portugal) con ligeras modificaciones. En tiras de 8 tubos para reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó una mezcla de 1-2 µg de ARN total con 2 µL de *Random hexamers* y 1 µL de dNTPs. Para algunos ARN ricos en guanina-citosina o ácidos nucleicos con alto grado de estructura secundaria, puede ser necesario un paso de desnaturalización, por lo que se incubó la mezcla a 65 °C durante 5 min (Termociclador XT[®], VWR International, Lovaina, Bélgica). A continuación, se añadieron 2 µL de 10x *Reaction Buffer* y 1 µL de NZY *Reverse Transcriptase*, y se centrifugó brevemente (Mini Star Blueline 521-21319, VWR International, Lovaina, Bélgica). Las muestras (con 20 µL de volumen final) se sometieron a un programa en el termociclador para producir la retrotranscripción de la muestra de ARN a ADNc: 10 min a 25 °C, 50 min a 50 °C y 5 min 85 °C.

La PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) fue realizada en un equipo QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) y haciendo uso de una placa de 384 pocillos, a los que a cada uno se añadió 2.5 µL de SYBR Green Master Mix (SensiFast™ SYBR® Hi-ROX Kit (Bioline USA Inc, Taunton, MA, EE.UU.)) (el cuál se une a la molécula de ADN y permite su cuantificación mediante fluorescencia), 0.2 µL de cada cebador (*forward* y *reverse primer*, Eurofins Genomics, Ebersberg, Alemania) (**Tabla 6**) y 0.1 µL de agua tipo I libre de nucleasas (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.). A esta mezcla se le añadieron 2 µL del ADNc anterior y previamente diluido 1/4. Por último, la expresión relativa de los genes se calculó por el método del ciclo umbral ($2^{-\Delta\Delta CT}$) y los resultados se normalizaron con respecto al nivel endógeno de la hipoxantina fosforribosiltransferasa (HPRT). Estos

ensayos se llevaron a cabo bajo la supervisión del Dr. Rui Eduardo Castro, en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Lisboa.

Tabla 6. Secuencia de los cebadores para el análisis de expresión génica de ARNm.

Gen	Cebador Forward	Cebador Reverse
Hprt	GGTGAAAAGGACCTCTCGAAGTG	ATAGTCAAGGGCATATCCAACAACA
Srebf1	GCAGGACACTGAGAGACCCC	GTACCCACTGGCCTTCTCAC
Cpt1a	TGGACCCAAATTGCAGTGGT	GCATCTCCATGGCGTAGTAGT

3.8 Ensayos *in vivo*

3.8.1 Fase 1: Desarrollo de un modelo de obesidad inducida por la dieta

3.8.1.1 Animales y diseño experimental

En primer lugar, se realizó un ensayo para el desarrollo del modelo experimental animal de obesidad inducido por la dieta que fue utilizado en la siguiente fase, en la cual se implementó la formulación nutraceútica como tratamiento. Para esta primera fase, un total de 32 ratas macho de la raza Sprague-Dawley (Charles River, Barcelona) fueron alojadas en jaulas colectivas con fondo sólido y nido de viruta (4 ratas en cada jaula), y ubicadas en una habitación bien ventilada y controlada termostáticamente (21 ± 2 °C) bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12 h para garantizar el bienestar animal (Unidad de Experimentación Animal, CIC, Universidad de Granada). Tras una semana de aclimatación, los animales de 10 semanas de edad con un peso corporal medio inicial de 357 ± 2 g, se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos experimentales de ocho animales por grupo.

Dos grupos de animales consumieron una dieta estándar (20 % Kcal de proteínas, 10 % Kcal de grasa) (TD.08806, ENVIGO, Madison, WI) durante 13 o 21 semanas (SD1 y SD2, respectivamente), los otros dos grupos experimentales consumieron una dieta de alto contenido en grasa (19 % Kcal de proteínas, 45 % Kcal de grasa) (TD.06415, ENVIGO, Madison, WI) y se les suministró fructosa al 20 % en el agua de bebida durante 13 o 21 semanas (HFHF1 y HFHF2, respectivamente) (**Figura 15**). Se utilizó la combinación de alto contenido en grasa y alto contenido en fructosa ya que genera un mayor aumento de peso, hiperinsulinemia, esteatosis hepática y estrés oxidativo que una dieta alta grasa y baja en carbohidratos (167,168) y favorece la lipogénesis *de novo* y el agravamiento de los

trastornos del metabolismo de la glucosa y la grasa (168). Durante el periodo experimental, los animales tuvieron libre acceso a líquidos (agua o solución de fructosa al 20 % (PanReac AppliChem, Barcelona, España)), y los animales consumieron la dieta experimental alta en grasa *ad libitum*, mientras que los animales de los grupos SD siguieron un diseño de consumo de alimentos *pair-fed* basado en experimentos anteriores para mantener una ingesta calórica adecuada en un grupo normocalórico (169). La ingesta de alimentos se registró diariamente, mientras que el peso corporal se midió semanalmente. Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con las Guías Directrices relacionadas con el Alojamiento y Cuidado de los Animales (170), y todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Granada, España (Referencia de Proyecto 16/07/2019/132). Para seleccionar el número de ratas asignadas a cada grupo experimental (n=8), aplicamos el principio de las 3R (171).

Los días previos al sacrificio animal y tras un periodo mínimo de ayunas de 8 h se realizó un test de tolerancia a una sobrecarga oral de glucosa según la metodología descrita por Prieto et al. (172) (**Figura 16**). El día anterior al final del periodo experimental de 13 o 21 semanas se alojaron a los animales en jaulas metabólicas individuales para permitir la recogida de orina. Posteriormente, fueron anestesiados con ketamina (Fatro Ibérica, Barcelona, España) (75 mg/kg peso corporal) y xilazina (Fatro Ibérica, Barcelona, España) (10 mg/kg peso corporal) y se extrajo la sangre mediante la punción de la aorta abdominal utilizando heparina (Deltalab, Barcelona, España) como anticoagulante y se cuantificaron los parámetros sanguíneos mediante un sistema Analizador Hematológico Automatizado (KX-21 Automated Hematology Analyzer, Sysmex Corporation, Kobe, Japón). Posteriormente, el volumen de sangre restante se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min a 4 °C (Centrifuge 5810 R, Eppendorf) para separar el plasma que se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C hasta su posterior análisis. Se extrajeron y pesaron el bazo, los riñones, el colon, el ciego, el contenido cecal, tejido adiposo abdominal y epididimal y el hígado y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido para almacenarse posteriormente a -80 °C hasta su análisis. Además, el hígado se dividió en varias porciones y se procesó para su análisis histológico y 100 mg de tejido se sumergió en una solución conservante de ARN (RNAlater, Ambion).

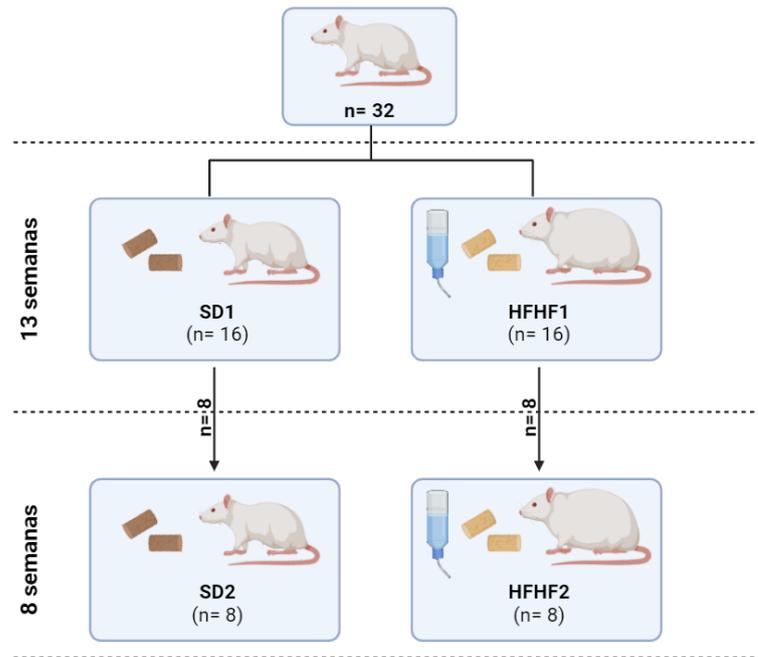


Figura 15. Diseño experimental del ensayo *in vivo* de la fase 1: (Desarrollo modelo de obesidad inducido por la dieta). SD1: grupo que consume dieta estándar 13 semanas; HFHF1: grupo que consume dieta hipercalórica durante 13 semanas; SD2: grupo que consume dieta estándar 21 semanas; HFHF2: grupo que consume dieta hipercalórica durante 21 semanas. Imagen generada a partir de BioRender.



Figura 16. Diseño experimental de la última semana del periodo experimental del ensayo *in vivo* de la fase 1 tanto para el periodo de 13 y 21 semanas. SD1: grupo que consume dieta estándar 13 semanas; HFHF1: grupo que consume dieta hipercalórica durante 13 semanas; SD2: grupo que consume dieta estándar 21 semanas; HFHF2: grupo que consume dieta hipercalórica durante 21 semanas.

3.8.1.2 Dietas experimentales

Las dietas experimentales fueron suministradas por la empresa ENVIGO y cumplían las necesidades de nutrientes para ratas (173) y los requerimientos de la AIN-93G con pequeñas modificaciones (174). La composición de las dietas hipercalórica (TD.06415, ENVIGO, Madison, WI) y estándar (TD.08806, ENVIGO, Madison, WI) viene recogida en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Composición de las dietas estándar e hipercalórica.

g/Kg	Dieta estándar	Dieta hipercalórica
Caseína	210	245
Cistina	3	3.5
Almidón de maíz	465	85
Maltodextrina	100	115
Sacarosa	90	200
Grasa	20	195
Aceite de soja	20	30
Celulosa	37.15	58
Mezcla mineral, AIN-93G-MX (94046)	35	43
Fosfato cálcico, dibásico	2	3.4
Mezcla vitamínica, AIN-93-VX (94047)	15	19
Bitartrato de colina	2.75	3

3.8.1.3 Prueba de tolerancia a una sobrecarga oral de glucosa

Tras mantener a los animales privados de alimento durante 8 h, se realizó una prueba de tolerancia a una sobrecarga oral de glucosa (PTOG) siguiendo el método previamente descrito por Prieto et al. (172) con pequeñas modificaciones. Las ratas se sometieron a una sobrecarga oral de glucosa, mediante sonda gástrica metálica, en relación a una dosis de 6.9 μmol glucosa/g de peso corporal disolviendo la glucosa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) en solución salina (cloruro de sodio (NaCl) (PanReac AppliChem, Barcelona, España) al 0.9 %. Se determinó la concentración de glucosa sanguínea antes de la sobrecarga oral (glucosa basal) y a los 15, 30, 60, 90 y 120 min. Para la extracción de sangre, se realizó una pequeña incisión en la parte más distal de la cola y se utilizó un glucómetro Bayer Breeze 2® (Bayer Healthcare, España) para medir la concentración de glucosa. Los resultados fueron expresados como las medias de cada grupo \pm el error estándar de la media. Se determinó el área bajo la curva para

cada animal usando el modelo de los trapezoides con el programa Excel® utilizando la siguiente fórmula (Pruessner et al., (175)):

$$AUC_I = \left(\sum_{i=1}^{n-1} \frac{(m_{(i+1)} + m_i) \cdot t_i}{2} \right) - \left(m_1 \cdot \sum_{i=1}^{n-1} t_i \right)$$

Donde:

- **m_i**: medida
- **t_i**: distancia en tiempo entre medidas
- **n**: número total de medidas

3.8.1.4 Parámetros hemáticos

Una alícuota de la sangre recolectada de 250 µL aproximadamente fue utilizada para la determinación de parámetros hemáticos como leucocitos (WBC, x10³/µL), hematíes (RBC, x10⁶/µL), hemoglobina (HGB, g/dL), hematocrito (HCT, %), volumen corpuscular medio (MCV, fL), contenido medio de hemoglobina por hematíe (MCH, pg), concentración media de hemoglobina por hematíe (MCHC, g/dL), plaquetas (PLT, x10³/µL) y la amplitud de distribución eritrocitaria (RDW, %) mediante un sistema Analizador Hematológico Automatizado (KX-21 Automated Hematology Analyzer, Sysmex Corporation, Kobe, Japón) perteneciente a la unidad de Bioanálisis en el Centro de Instrumentación Científica (Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada).

3.8.1.5 Bioquímica plasmática

La sangre fue centrifugada a 3500 rpm durante 15 min a 4 °C (Centrifuge 5810 R, Eppendorf). El plasma fue separado, introducido en nitrógeno líquido y conservado a -80 °C hasta su utilización. Las determinaciones que posteriormente se llevaron a cabo fueron: colesterol total (mg/dL), colesterol LDL (mg/dL), colesterol HDL (mg/dL), triglicéridos (mg/dL), ácido úrico (mg/dL), albúmina (g/dL), creatinina (mg/dL), fósforo (mg/dL) fosfatasa alcalina (ALP, U/L), alanina aminotransferasa (ALT/GPT, U/L), aspartato aminotransferasa (AST/GOT, U/L) y gama-glutamilttransferasa (GGT). Estos parámetros fueron determinados mediante un Analizador Químico (Shenzhen Midray BS-200 Chemistry Analyzer, Bio-Medical Electronic) perteneciente a la unidad de bioanálisis en el Centro de Instrumentación Científica (Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada). Además, se calcularon índices plasmáticos a partir

de los parámetros analizados como índice aterogénico (colesterol total/colesterol HDL), índice triglicéridos-glucosa ($\ln(\text{triglicéridos} \cdot (\text{glucosa}/2))$), no-HDL (colesterol total-colesterol HDL) y TG/HDL (triglicéridos/colesterol HDL).

3.8.1.6 Contenido grasa hepática total

La determinación del contenido en grasa hepática se llevó a cabo gravimétricamente por el método de Folch (176) siguiendo las modificaciones realizadas por Kapravelou et al. (128). Se pesaron 0.25-0.3 g de hígado previamente liofilizado y se añadió 1 mL de cloruro de sodio (NaCl) (PanReac AppliChem, Barcelona, España) al 0.9 % y 3 ml de etanol (EtOH) (VWR International, Lovaina, Bélgica) al 0.01 % de butilhidroxitolueno (BHT) (Panreac Química, España, Barcelona). Tras la adición de estos compuestos, la mezcla fue homogeneizada 3 veces durante 10 s, usando un homogeneizador Micra D-1 (ART-Moderne Labortechnik) a 18000 rpm; seguido por un tratamiento con un homogeneizador de ultrasonidos (Sonopuls HD 2070, Bandelin) al 50 % de fuerza y durante tres repeticiones de 10 s. Una vez listo el homogeneizado del hígado se añadieron 0.5 mL de la solución obtenida mediante la mezcla de 10 mL de EtOH (0.01 % BHT) + 1 mL hidróxido de potasio (KOH) (VWR International, Lovaina, Bélgica) 11 N. Posteriormente, la muestra fue saponificada durante 40 min en un baño de agua a 60 °C (Fisherbrand™ 11205 *Advanced Ultrasonic Cleaner*). Una vez saponificada, se realizó la extracción del tejido adiposo mediante la adición de 2 mL de hexano (PanReac AppliChem, Barcelona, España) al 95 % y mezcla con vórtex durante 1 min y 30 s (dos veces), a continuación, se añadieron 500 µL de agua tipo I y se mezcló durante otros 10 s. Las muestras fueron centrifugadas durante 5 min a 3000 rpm (Centrifuge 5810 R, Eppendorf). Finalmente, se procedió a la recogida de la fase orgánica (superior) evaporándose bajo una corriente de nitrógeno, obteniendo la cantidad de tejido adiposo mediante gravimetría.

3.8.1.7 Determinación del perfil de ácidos grasos del hígado

Se determinó el perfil de ácidos grasos en el hígado mediante el método descrito por Lepage y Roy (177), este método presenta la ventaja de realizar la extracción lipídica y la transesterificación de los ácidos grasos en una sola etapa. En un tubo de rosca Pyrex® (Corning, Nueva York, EE. UU.) a 125-150 mg de hígado liofilizado se añadieron 2 mL de una mezcla metanol (PanReac AppliChem, Barcelona, España):benceno (PanReac AppliChem, Barcelona, España) (MeOH:C₆H₆, 4:1 (v/v)). La mezcla se agitó durante 30 s y

se añadieron 200 μL de cloruro de acetilo (CH_3COCl) (Merck, Darmstadt, Alemania) lentamente y en agitación constante y bajo campana de extracción de gases. A continuación, se incubó en un baño de agua a $100\text{ }^\circ\text{C}$ durante 1 h (Raypa®), comprobando que no se evaporara ninguna muestra. Seguidamente los tubos se enfriaron en un baño de hielo picado y se añadieron 5 mL de carbonato de potasio (K_2CO_3) (PanReac AppliChem, Barcelona, España) al 6 % para detener la reacción de metilación y neutralizar la mezcla. Los tubos se agitaron durante 1 min y se centrifugaron a 2920 rpm y $4\text{ }^\circ\text{C}$ durante 10 min (Centrifuge 5810 R, Eppendorf). Posteriormente, se recogió la fase bencénica, correspondiente a la fase superior, donde se encontraban disueltos los ésteres metílicos de los ácidos grasos. Finalmente, la determinación de lípidos se realizó en el Centro de Instrumentación Científica usando un cromatógrafo de gases de alta resolución modelo 7890A de Agilent (EE.UU.) acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo modelo Quattro micro GC de Waters (EE.UU.). Los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) individuales se separaron con una columna capilar ZB Fame de $30 \times 0.25\text{ mm}$ ($0.2\text{ }\mu\text{m}$ de grosor) (Phenomenex, Torrance, CA, EE. UU.). Las condiciones de cromatografía de gases fueron las siguientes: T^a del inyector $250\text{ }^\circ\text{C}$, volumen de inyección $2\text{ }\mu\text{L}$ Split (proporción 10:1), gradiente de T^a de $100\text{ }^\circ\text{C}$ a $210\text{ }^\circ\text{C}$ con una velocidad de $4\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$, tiempo de retención 5 min. El caudal del gas portador (Helio) fue de $1\text{ mL}/\text{min}$. El tiempo de análisis fue de 40 min y el intervalo de medición de 45-450 uma (modo de barrido). Los datos cromatográficos se registraron e integraron utilizando el software Masslynx, versión 4.1. Los FAME se identificaron utilizando estándares analíticos y la biblioteca de espectros de masas. Se midieron las áreas de los picos y se utilizaron para calcular el porcentaje de cada ácido graso en relación con la suma total de todas las áreas de ácidos grasos de la muestra. Además, se utilizaron algunas relaciones entre productos y ácidos grasos precursores como índices de las actividades enzimáticas desaturasa o desaturasa-elongasa en el hígado, tal y como describieron González-Torres et al. (178) utilizando las siguientes fórmulas:

Actividad delta-6-elongasa-desaturasa:

- i. ácido docosahexaenoico/ácido linolénico
- ii. ácido araquidónico/ácido linoleico

Actividad estearil-CoA (SCD):

- i. ácido palmitoleico/ácido palmítico
- ii. ácido oleico/ácido esteárico

Actividad delta-5 desaturasa:

- i. ácido araquidónico/ ácido eicosatrienoico

3.8.1.8 Análisis histológico del hígado

Una porción del hígado se fijó en formol tamponado al 4 % (PanReac AppliChem, Barcelona, España) durante 24 h, y posteriormente se conservó en etanol al 70 % hasta su procesamiento en el Servicio de Microscopía, CIC, Universidad de Granada. Como resultado de este procesamiento se obtuvieron cuatro preparaciones histológicas teñidas con Hematoxilina-Eosina (HE) para cada animal. Para el análisis histológico del hígado se evaluaron las preparaciones de los ocho animales por grupo experimental (n = 32 muestras por grupo). La estructura microscópica del hígado se conceptualizó utilizando el término de lobulillo hepático clásico, en el que la estructura central es la vénula hepática terminal (“vena centrolobulillar”) y la periferia está definida por los espacios porta, los cuales son canales que se originan en el hilio y atraviesan el hígado con un patrón de ramificación, transportando la sangre hasta la vena central. En base a esto, se definen 3 zonas: zona 1 (periportal), zona 2 (zona media) y zona 3 (pericentral o centrolobulillar) (179). En el análisis histológico, se evaluaron las alteraciones histológicas en las zonas 1, 2 y 3 del lobulillo. Para la evaluación semicuantitativa del daño hepático, se realizó una puntuación inicial utilizando la evaluación de Brunt basada en los siguientes parámetros: esteatosis macrovesicular, esteatosis microvesicular, abombamiento, inflamación periportal, inflamación centrolobulillar y fibrosis. Para la evaluación semicuantitativa se utilizó la siguiente escala cruzada: (-) inexistente, (+) leve, (++) leve-moderado, (+++) moderado, (++++) severo, (-/+) entre inexistente y leve, (+/++) entre leve y leve-moderado (180). En caso de que se encontraran diferencias entre los tratamientos en la evaluación de Brunt, el sistema de puntuación semicuantitativa de esteatohepatitis no alcohólica (NASH) de Kleiner et al. (181) adaptado por Chen et al. (182)

se utilizó para evaluar el grado de desarrollo de EHNA siguiendo las recomendaciones de Martínez et al. (169). El sistema de puntuación comprendía 14 características histológicas, 4 de las cuales se evaluaron semicuantitativamente: esteatosis (0-3), inflamación lobulillar (0-2), balonización hepatocelular (0-2) y fibrosis (0-4). Otras nueve características se registraron como presentes o ausentes. La puntuación NAS se calculó mediante la suma del grado de esteatosis, la inflamación lobulillar y el abombamiento. NAS de >5 se correlacionó con un diagnóstico de “NASH”, y puntuaciones de <3 se diagnosticaron como “no NASH” (181).

3.8.1.9 Extracción ARN

Se aisló el ARN total del hígado, 100 mg de hígado fueron introducidos en un tubo libre de ribonucleasas (ARNasas) (Biologix, Jinan, China), donde se añadió 1 mL de Tri-Reagent® (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.), que contenía guanidina isotiocianato, fenol y un agente solubilizante para disolver el ADN, ARN y las proteínas de las muestras lisadas. A continuación, la porción de hígado fue homogeneizada en un homogeneizador Micra D-1 (ART Moderne Labortechnik). El homogeneizado fue transferido a un tubo libre de ARNasas (Corning, Nueva York, EE. UU.) y se dejó incubar a T^a ambiente durante 5 min para asegurar la completa disociación de los complejos nucleoproteicos. Posteriormente, se añadió a cada muestra 200 µL de cloroformo (PanReac AppliChem, Barcelona, España) y se agitaron vigorosamente durante 15 s. Se volvieron a incubar a T^a ambiente de 2-15 min y las muestras se centrifugaron a 12000 g durante 15 min a 4 °C (Centrifuge 5430 R, Eppendorf). La mezcla se separó en tres fases: una fase acuosa superior que contenía el ARN, otra interfase que contenía el ADN y por último una fase orgánica que contenía las proteínas. La parte acuosa fue transferida a un tubo nuevo y se le añadieron 500 µL de isopropanol (PanReac AppliChem, Barcelona, España), las muestras se mezclaron y se mantuvieron a T^a ambiente de 5-10 min centrifugándose después a 12000 g durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante fue descartado y el pellet formado se lavó con 1 mL de EtOH (VWR International, Lovaina, Bélgica) 70 % preparado con agua tipo I tratada con dietil pirocarbonato (DEPC) (Acros Organics) previamente autoclavada. A continuación, se centrifugó a 15000 g durante 5 min a 4 °C. El sobrenadante fue descartado y el pellet se disolvió en un volumen de 50-200 µL con agua libre de ARNasas (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) dependiendo del tamaño del pellet formado, y por tanto del material genético extraído. Posteriormente, las

muestras fueron tratadas con ADNasas (AM1907, Kit TURBO DNA-*free*[™], Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) para eliminar cualquier ADN presente y el ARN fue transferido a tubos libres de ARNasas para determinar la concentración y calidad del ácido nucleico mediante el índice de A=260/A=280 que se estableció entre 1.90 a 2.00 (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.).

3.8.1.10 Transcriptómica

Para el análisis transcriptómico hepático, se seleccionaron aleatoriamente seis muestras de ARN total por grupo experimental. La preparación de las bibliotecas y la secuenciación Illumina se llevaron a cabo en el Centro de Genómica del IPBLN (CSIC, Granada, España). La calidad del ARN total se verificó mediante electroforesis *Bioanalyzer RNA 6000 Nano chip* (Agilent Technologies). Todas las muestras de ARN mostraron un valor RIN superior a 8.4. Las bibliotecas de secuenciación de ARN (ARN-seq) se prepararon con el kit *Truseq stranded mRNA* (Illumina®) a partir de 200 ng de ARN total. La calidad y la distribución del tamaño de las bibliotecas enriquecidas por PCR se validaron mediante el ensayo *Bioanalyzer High Sensitivity DNA* y la concentración se midió en el fluorímetro Qubit® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Las bibliotecas finales se agruparon de forma equimolecular y, a continuación, se diluyeron y desnaturalizaron según lo recomendado en la guía de preparación de bibliotecas Illumina NextSeq 500. La secuenciación por pares de 75 x 2 nt se realizó en un secuenciador NextSeq 500 con una salida final de 70 Gbp y una puntuación de calidad (Q30) del 97 %. Las lecturas de la secuenciación de extremo pareado de Illumina se sometieron a un control de calidad mediante FastQC v0.11.9 (183) y MultiQC v1.9 (184). Se comprobó que, a lo largo de toda la secuencia de las lecturas, su calidad media presentaba una puntuación de calidad de bases nitrogenadas Phred >30, por lo que no fue necesario filtrar los datos. A continuación, se realizó el mapeo de las lecturas. Para ello se utilizó HISAT2 v2.2.1 (185). El genoma de *Rattus norvegicus* obtenido de Ensembl (archivo *Rattus_norvegicus.Rnor_6.0.dna.toplevel.fa*) fue elegido como genoma de referencia para el alineamiento y las lecturas. Los archivos SAM resultantes de estos mapeos fueron ordenados, transformados en archivos BAM e indexados, todo ello utilizando SAMtools v1.10 (186). En el siguiente paso se realizó el recuento de las lecturas que mapeaban contra cada uno de los genes, para lo cual se utilizaron los ficheros BAM obtenidos en el paso anterior, el fichero de anotación en formato GTF del

genoma de referencia (accesión GCA_000001895.4), y el *feature counts* v2.0.1 (187). Finalmente, se realizó el análisis de expresión diferencial utilizando las tablas de recuento obtenidas en el paso anterior y los programas DESeq (188), DESeq2 (189) y edgeR (190). Los transcritos se definieron como expresados diferencialmente cuando el *fold-change* (FC) entre los grupos (SD1, HFHF1, SD2, HFHF2) era >1.3 (porcentaje de cambio +30 %; sobreexpresado) o <-1.3 (porcentaje de cambio -30 %; infraexpresado) y el valor P de la prueba t de Student era <.05. En varios estudios recientes se utilizaron criterios de filtrado idénticos o similares (191,192).

3.8.1.1 Retrotranscripción y qPCR: ARNm

Para validar el análisis transcriptómico, se llevó a cabo la expresión génica mediante RT-PCR de diversos genes. En primer lugar, para realizar la transcripción reversa de ARN a ADNc a un total de 1–500 ng de ARN se le añadieron: agua libre de ARNasas (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) hasta un volumen final de 10 μ L y 1 μ L de hexámeros aleatorios 50 μ M (Invitrogen). A continuación, las muestras se introdujeron en un termociclador LifePro Gradient Thermal Cycler (Bioer Serves Life, P. R. China), durante 5 min a 65 °C para desnaturalizar el ARN molde. Posteriormente se mantuvieron en hielo durante 2 min. A cada muestra se añadió 1.25 μ L de nucleasa (RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor, Life Technologies); 5 μ L de desoxinucleótidos trifosfato 25 mM (dNTPs, Promega); 5 μ L de First Buffer (250 mM Tris-HCl (Merck, Darmstadt, Alemania) pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂, Invitrogen™) y 2.5 μ L de DTT 100 mM (Invitrogen) y 1.25 μ L de retrotranscriptasa inversa (SuperScript® IV Reverse Transcriptase, Invitrogen). La mezcla de reacción se llevó hasta un volumen final de 25 μ L con agua libre de ARNasas (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.). Finalmente, se estableció el programa en el termociclador para llevar a cabo la reacción: 10 min a 25 °C, 50 min a 42 °C y 15 min a 70 °C.

A partir del ADNc obtenido, la q-PCR cuantitativa se llevó a cabo en QuantStudio 12 K Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.), utilizando cebadores para genes involucrados en estructura celular, metabolismo lipídico & glucídico y capacidad antioxidante & detoxificante (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.)(**Tabla 8**). Estos genes fueron seleccionados según los resultados del análisis transcriptómico. A cada reacción se le añadieron 6.25 μ L de Taqman Master Mix (TaqMan™ Fast Advanced Master Mix for qPCR, no UNG, Thermo Fisher Scientific,

Waltham, MA, EE.UU.), 4.5 μ L de agua libre de ARNasas (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.); 0.5 μ L del ADNc de la muestra correspondiente y 1.25 μ L del cebador. La reacción se llevó a cabo mediante una incubación de 2 min a 50 °C para optimizar la actividad de la uracil-ADN glicosilasa y posterior activación de la polimerasa durante 10 min a 95 °C. A continuación, se realizaron 40 ciclos con los siguientes parámetros para cada uno: 95 °C durante 15 s (desnaturalización) y 60 °C durante 60 s (alineación y extensión). La expresión de cada gen fue comparada con la de la Actb de referencia medida en paralelo en la misma muestra usando el método del Δ Ct. Los resultados finales fueron expresados usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ en referencia al grupo control (SD1).

Tabla 8. Distribución de genes en categorías según su función celular para el estudio de la expresión.

Función	Gen	Proteína	Assay ID	
Estructura celular	Estructura celular anatómica	Mmp15	Matrix metalloproteinase-15	Rn0153692_5_m1
		Psmb9	Proteasome subunit beta type-9	Rn00680664_g1
	Adhesión celular	Col26a1	Collagen type XXVI alpha 1 chain	Rn01499402_m1
	Daño celular	Cdkn1a	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1	Rn00589996_m1
		Gadd45a	Growth arrest and DNA damage-inducible protein alpha	Rn01425130_g1
	Proliferación celular	Gdf15	Growth/differentiation factor 15	Rn00570083_m1
		Myc	Myc proto-oncogene protein	Rn00561507_m1
	Transporte de solutos	Abcg5	ATP-binding cassette sub-family G member 5	Rn01499073_m1
		Slc2a2	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 2	Rn00563565_m1
		Slc34a2	Sodium-dependent phosphate transport protein 2B	Rn00584515_m1
Metabolismo glucosa & lípidos	Acción lipogénica	Agpat3	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase gamma	Rn01428234_m1
		Fabp5	Fatty acid-binding protein 5	Rn01461858_g1
		Fasn	fatty acid synthase	Rn00569117_m1
		Pnpla3	Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3	Rn01502361_m1
		Scd1	stearoyl-CoA desaturase-1	Rn00594894_g1
	Srebf1	Sterol regulatory element binding transcription factor 1	Rn01495769_m1	
	Pparg	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	Rn00440945_m1	
	Acción lipolítica	Cpt1a	Carnitine palmitoyl transferase 1A	Rn00580702_m1

	Crot	Peroxisomal carnitine O-octanoyltransferase	Rn0152694 0_m1
	Ppara	Peroxisome proliferator activated receptor alpha	Rn0056619 3_m1
Metabolismo colesterol	Cyp1a1	Cytochrome P450 1A1	Rn0141802 1_g1
	Cyp1a2	Cholesterol 25-hydroxylase	Rn0056108 2_m1
	Cyp7a1	Cholesterol 7 alpha-hydroxylase	Rn005640 65_m1
	Hmgcr	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase	Rn005655 98_m1
Metabolismo glucosa	Gck	Hexokinase-4	Rn006882 85_m1
Capacidad antioxidante & detofixicante	Akr7a3	Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 3	Rn006806 64_m1
	Gpx1	Glutathione peroxidase 1	Rn0057799 4_g1
	Nfe2l2	Nuclear factor erythroid 2 like 2	Rn0047778 4_m1
	Nqo1	NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1	Rn005665 28_m1
	Sod1	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	Rn005669 38_m1
	Ucp2	Mitochondrial uncoupling protein 2	Rn0175485 6_m1

3.8.1.12 Análisis de la actividad de enzimas antioxidante hepáticas

3.8.1.12.1 Homogenización de hígados

Para poder realizar la determinación de la actividad de las enzimas antioxidante se procedió a la preparación de homogenizados de hígado siguiendo el método descrito por Oboh et al. (157) con pequeñas modificaciones. Una pequeña porción de 1 g de hígado fue homogeneizada en 10 mL de tampón fosfato 50 mM (pH 7.8) que contenía 0.1 % Triton X-100 (Merck, Darmstadt, Alemania) y ácido dietilentiainopenta acético (DETAPAC) (Panreac Química, España, Barcelona) 1.34 mM usando un homogeneizador Micra D-1 (ART Moderne Labortechnik) a 18000 rpm durante 30 s seguido por un tratamiento con un homogeneizador de ultrasonidos (Sonoplus HD 2070, Bandelin) al 50 % de máxima intensidad y durante tres repeticiones de 10 s. Los homogeneizados fueron centrifugados a 16000 rpm, 4 °C durante 40 min (BECKMAN, Allegra 64R) y los sobrenadantes fueron recogidos y conservados a -80 °C hasta su posterior uso en la determinación de actividad enzimática antioxidante y detoxificante de distintas enzimas. Las muestras se mantuvieron en todo momento en condiciones a 4 °C.

3.8.1.12.2 *Determinación de la concentración de proteína*

La concentración de proteína fue determinada en los homogeneizados de hígado mediante el método de Bradford (193) con pequeñas modificaciones para adaptar el protocolo a microplaca de 96 pocillos (Multiskan™ FC Microplate Photometer, Thermo Fisher Scientific. Shanghai, China). Se realizó una recta patrón con cantidades crecientes de proteína (0, 100, 200, 300, 400 y 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para lo que se utilizó una solución de albúmina de suero bovino (BSA) (Merck, Darmstadt, Alemania) con una concentración inicial de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se añadieron a la placa las muestras debidamente diluidas o los patrones (20 μL), posteriormente se añadieron 200 μL del reactivo de Bradford (PanReac AppliChem, Barcelona, España) y las muestras se incubaron durante 10 min a T^a ambiente en oscuridad y se midió la absorbancia a $\lambda=570$ nm. Tanto las muestras como la recta patrón fueron determinadas por cuadruplicado. Los resultados fueron expresados como mg proteína/mL de homogeneizado.

3.8.1.12.3 *Actividad enzimática de la catalasa*

La actividad enzimática de la catalasa (CAT) fue determinada por el método de Cohen et al. (194) en la que se muestrea la desaparición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Para ello se añadieron en un tubo de reacción 1650 μL de tampón fosfato 10 mM pH 7, 100 μL agua tipo 1, 50 μL de homogeneizado de hígado (convenientemente diluido) y 200 μL de H_2O_2 (PanReac AppliChem, Barcelona, España) 60 mM. Transcurrido 1 y 4 min de incubación, para detener la reacción, se traspasó 50 μL de la mezcla anterior a sus respectivos tubos de muestreo que contenían 2 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) (PanReac AppliChem, Barcelona, España) 0.6 N y 500 μL de sulfato de hierro (FeSO_4) (PanReac Química, Barcelona, España) 10 mM. Finalmente, a cada tubo de muestreo se añadieron 200 μL de tiocianato de potasio (KSCN) (PanReac Química, Barcelona, España) 2.5 M y se incubaron durante 3 min en oscuridad. Traspasado ese tiempo se midió la absorbancia por cuadruplicado a $\lambda=460$ nm en lector de microplacas (Multiskan™ FC Microplate Photometer, Thermo Fisher Scientific. Shanghai, China). Los resultados fueron expresados como unidades enzimáticas calculadas mediante la siguiente fórmula: $\ln(A1/A2)/t$, donde ln es el logaritmo natural, A1 y A2 son las absorbancias observadas en los dos tiempos seleccionados, y t es el tiempo de reacción entre los dos puntos.

3.8.1.12.4 Actividad enzimática de la superóxido dismutasa

La actividad enzimática superóxido dismutasa (SOD), fue determinada en los homogeneizados de hígado mediante el método colorimétrico descrito por Ukeda et al. (195) adaptado para un lector de microplacas (Multiskan™ FC Microplate Photometer, Thermo Fisher Scientific, Shanghai, China). La base de la técnica específica es la inhibición inducida por la SOD de la reacción de oxidación entre los aniones superóxido producidos por el sistema xantina/xantina oxidasa y el receptor de superóxido 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida (XTT). Para la determinación de la actividad enzimática SOD total, se preparó una mezcla de reacción que contenía para un volumen final de 1 mL: 740 µL de tampón fosfato 50 mM (pH 7.8); 38 µL de ácido dietilentriaminopenta acético (DETAPAC) (Panreac Química, España, Barcelona) 3 mM, 55 µL de XTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) 1 mM y 167 µL de xantina oxidasa (X4500, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) (70 mU/mL). Las muestras se midieron por cuadruplicado; a cada pocillo de la placa se añadieron 150 µL de la mezcla de reacción, 35 µL de la muestra convenientemente diluida o 35 µL de tampón fosfato 50 mM para los controles, y finalmente 55 µL de xantina 3 mM. Se midió la absorbancia cada minuto durante 15 min a 25 °C y a $\lambda=492$ nm.

El mismo protocolo fue seguido para determinar la actividad de SOD dependiente de manganeso (Mn) (o mitocondrial), pero las muestras fueron tratadas previamente con cianuro de potasio (KCN) (Panreac Química, Barcelona, España) a una concentración final de 4.8 mM durante 30 min en hielo para inhibir la actividad de la SOD dependiente cobre/cinc (Cu/Zn). La actividad de SOD dependiente Cu/Zn fue determinada mediante la diferencia entre la actividad de SOD total y actividad de SOD dependiente de Mn. Una unidad de actividad enzimática se definió como la enzima necesaria para inhibir el 50 % de la reducción de XTT.

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

A_0 = actividad del control

A_i = actividad de la muestra

Finalmente, los resultados fueron expresados como unidades de actividad enzimática (UAE)/mg de proteína.

3.8.1.12.5 Actividad enzimática de la glutatión peroxidasa

La actividad enzimática de la glutatión peroxidasa (GPx) se determinó mediante el método anteriormente descrito por Lawrence et al. (196) con las modificaciones realizadas para un lector de microplaca por Smith et al. (197). Dicha técnica se basa en la oxidación de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) por la enzima glutatión reductasa (GR), a su vez la velocidad de reducción de la enzima GR se relaciona con la actividad enzimática GPx de cada muestra. Para esta determinación, se realizaron en paralelo reacciones catalizadas y no catalizadas (ambas en cuadruplicado). A las reacciones no catalizadas, en cada pocillo se añadieron 240 μL de NADPH (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) 2 mM en tampón fosfato 50 mM, 1 mM ácido etildiaminotetraacético (EDTA) (Merck, Darmstadt, Alemania) y pH 7.4; 5-15 μL de homogeneizado de tejido y 10 μL de una solución de cumeno hidroperóxido (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) 22 mM. Para las reacciones catalizadas a cada pocillo se añadieron 240 μL de una mezcla de reacción también en tampón fosfato 50 mM, 1 mM EDTA y pH 7.4 adicionada de acida sódica 4.3 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.), glutatión reducido (GSH) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) 4.3 mM y NADPH 2 mM, 5-15 μL de homogeneizado de tejido; 4.5 μL de GR (G3664, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) de una solución de 0.04 mU/mL y 10 μL cumeno hidroxiperóxido. La lectura de la placa se llevó a cabo a $\lambda=340$ nm (Multiskan™ FC Microplate Photometer, Thermo Fisher Scientific. Shanghai, China), a 37 °C durante 4 min, realizándose la lectura cada 15 s. Los resultados de actividad enzimática fueron expresados como nmol NADPH/min·mg prot, para lo que se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Activida GPx} = \frac{\Delta\text{Absorbancia reacción catalizada} - \Delta\text{Absorbancia reacción no catalizada}}{0.00622 \frac{\text{mL}}{\text{nmol} \cdot \text{cm}} \times 1 \text{ cm}} \times \frac{V_{\text{total pocillo (mL)}}}{V_{\text{muestra (mL)}}} \text{ mg proteína/mL}$$

3.8.1.12.6 Actividad enzimática de la quinona reductasa

La actividad enzimática de la quinona reductasa (QR) se determinó según la metodología descrita por Ernster (198), esta enzima cataliza la oxidación de nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) o NADPH y se utilizó diclorofenolindofenol (DCIP) y dinucleótido de flavina adenina (FAD) como aceptor de electrones e inhibidor, respectivamente. Se preparó una mezcla de reacción (881 μL tampón Tris-HCl (Merck, Darmstadt, Alemania) 25 mM pH 7.4, 60 μL de albúmina de suero bovino (BSA) (Merck,

Darmstadt, Alemania) 1 mg/mL, 2.5 µL Tween-20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.), 5 µL FAD (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) 1 mM, 10 µL NADH (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) 20 mM y 16 µL DCIP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) 5 mM y se incubó durante 5 min a 37 °C. A continuación, en una cubeta de cuarzo se realizó la reacción en la que se añaden 975 µL de la mezcla de reacción anterior y 25 µL de homogeneizado de hígado o tampón Tris-HCl (control). Se midió la absorbancia a $\lambda=600$ nm en un espectrofotómetro Thermo Scientific™ Evolution 300 UV-Vis cada minuto durante 5 min. Las reacciones se hicieron por triplicado. Se utilizó 1 mL de tampón Tris-HCl como blanco. Los resultados fueron expresados como unidades enzimáticas por minuto (UA/min·mg prot).

Actividad QR

$$= \frac{\frac{\Delta \text{Absorbancia}/\text{min}_{\text{muestra}} - \Delta \text{Absorbancia}/\text{min}_{\text{control}}}{0.0205 \frac{\text{mL}}{\text{nmol} \cdot \text{cm}} \times 1 \text{ cm}} \times \frac{V_{\text{total cubeta (mL)}}}{V_{\text{muestra (mL)}} \times \text{Factor dilución}}{\text{mg proteína/mL}}$$

3.8.1.12.7 Actividad enzimática de la glutatión S-transferasa

La actividad enzimática de la glutatión S-transferasa se determinó mediante el método descrito por Habig et al. (199) utilizando 1-cloro-2,4-dinitrobenzenu (CDNB) como sustrato. La técnica se basa en la neutralización del grupo electrófilo del potencial agente alquilante mediante la reacción con el grupo -SH del glutatión; transformándose en un producto más soluble en agua. Se preparó una mezcla de reacción: 880 µL tampón fosfato 100 mM pH 6.5, 10 µL CDNB (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) 100 mM y 10 µL glutatión reducido (GSH) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) 100 mM y se incubó durante 5 min a 37 °C. A continuación, en una cubeta de cuarzo se realizó la reacción en la que se añaden 900 µL de la mezcla de reacción anterior y 100 µL de homogeneizado de hígado o tampón fosfato (control). Se midió la absorbancia a $\lambda=340$ nm en un espectrofotómetro Thermo Scientific™ Evolution 300 UV-Vis cada minuto durante 5 min. Las reacciones se hicieron por triplicado. Se utilizó 1 mL de tampón fosfato como blanco. Los resultados fueron expresados como unidades enzimáticas por minuto (UA/min·mg prot).

Actividad GST

$$= \frac{\frac{\Delta \text{Absorbancia}/\text{min}_{\text{muestra}} - \Delta \text{Absorbancia}/\text{min}_{\text{control}}}{0.0096 \frac{\text{mL}}{\text{nmol} \cdot \text{cm}} \times 1 \text{ cm}} \times \frac{V_{\text{total cubeta (mL)}}}{V_{\text{muestra (mL)}}} \times \text{Factor dilución}}{\text{mg proteína/mL}}$$

3.8.1.13 Análisis microbiológico del contenido cecal

El contenido cecal fue recolectado al final del periodo experimental y utilizado para el aislamiento de ADN genómico (ADNg). La extracción del material genómico se realizó mediante el kit QIAamp® PowerFecal® Pro DNA siguiendo el protocolo correspondiente de QIAGEN. La cuantificación del ADNg se llevó a cabo mediante fluorometría (Qubit). Las muestras de ADNg se analizaron mediante secuenciación de la región V4 (233 pb) de los genes de ARN ribosómico 16S (ARNr) utilizando el sistema MiSeq (Illumina, San Diego, CA, EE.UU.). La preparación de las bibliotecas, *pooling* y secuenciación miniSeq se realizaron en el Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra (IPBLN) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC, Granada). Los pasos de la reacción fueron los siguientes: desnaturalización 3 min a 95 °C; (desnaturalización 30 s a 95 °C, y 10 s 75 °C, alineamiento 30 s a 55 °C, elongación 30 s a 72 °C) x 25 ciclos, y extensión 5 min a 72 °C indexada con 8 ciclos de PCR para amplificar las regiones V3-V4 del gen 16S rARN con los siguientes cebadores: 16S ProV3V4 *forward* 5'→3' 5' CCTACGGGNBGCASCAG 3' y 16S ProV3V4 *reverse* 5'→3' 5' GACTACNVGGGTATCTAATCC 3'. Los resultados se obtuvieron con el software de análisis Illumina versión 2.6.2.3, obteniéndose unas 157801 lecturas medias por muestra. Posteriormente, el análisis de las lecturas fue llevado a cabo por Bio Knowledge Lab utilizando QIIME2 v2020.8 (200). En primer lugar, las lecturas se desnaturalizaron utilizando DADA2 (201). Se aplicaron los siguientes procesos: (1) recorte y truncamiento de las regiones de baja calidad; (2) desreplicación de las lecturas; (3) filtrado de quimeras. Tras la eliminación de ruido, las lecturas hacia delante y hacia atrás se fusionan en una secuencia, se desreplican y se asignan a un ID. A partir de este momento, las secuencias desprotegidas y su ID asignado se consideran ASV (Variantes de secuencia de amplicón). Las lecturas ASV se organizaron en unidades taxonómicas operativas (OTU) utilizando el método de agrupación *de novo* de “vsearch” (202). La agrupación se realizó con un 97 % de identidad para crear un 97 % de OTU. En el caso del análisis de la diversidad de especies, se utilizó la herramienta *diversity alpha-rarefaction* para seleccionar aleatoriamente diferentes números de secuencias y analizar las OTU detectadas en cada

fracción para formar una curva de rarefacción. También se aplicó el método *core-metrics-phylogenetic*, que permite calcular las métricas de diversidad alfa y beta. Se realizaron diagramas de Venn y árboles filogenéticos para representar la diversidad común de la microbiota en las muestras. Para la clasificación taxonómica, las OTU se clasificaron por taxón utilizando una región ITS1 (espaciador transcrito interno 1) de la base de datos UNITE (203) con “vsearch” (202). Finalmente, se realizó un análisis de abundancia diferencial, para ello se aplicó la herramienta estadística ANCOM (204) (análisis de la composición de las microbiotas) para identificar las características, en los diferentes niveles taxonómicos específicos, que eran diferencialmente abundantes entre los grupos de muestras. La prueba calcula el número de ratios entre pares de ASV que son significativamente diferentes con $p < .005$ corregida por tasa de descubrimiento falso (FDR). La estadística W es el número de hipótesis nulas ANCOM que se han rechazado para cada taxón individual, lo que indica que se detectó que las relaciones entre la abundancia relativa de ese taxón y las abundancias relativas de W de otros taxones eran significativamente diferentes (normalmente $p < .05$ ajustada por FDR).

3.8.2 Fase 2: Tratamiento de la obesidad mediante combinación del nutracéutico y HIIT

3.8.2.1 Animales y diseño experimental

A partir de los resultados obtenidos en la primera fase experimental, se seleccionó la duración de la fase de inducción de obesidad y la duración de la fase para aplicación de los tratamientos. Finalmente, el periodo experimental tuvo una duración total de 16 semanas, 8 semanas de inducción de obesidad y 8 semanas de tratamiento. Para esta segunda fase, un total de 64 ratas macho Sprague-Dawley (Charles River, Barcelona) fueron alojadas en jaulas colectivas con fondo sólido y nido de viruta (4 ratas en cada jaula), y ubicadas en una habitación bien ventilada y controlada termostáticamente (21 ± 2 °C) bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12 h para garantizar el bienestar animal (Unidad de Experimentación Animal, CIC, Universidad de Granada). Tras una semana de aclimatación, los animales de 6 semanas de edad con un peso corporal medio inicial de 283 ± 3 g, se dividieron aleatoriamente en ocho grupos experimentales de ocho animales por grupo (**Figura 17**). Se formaron dos grupos control: 1) un grupo de animales consumieron una dieta estándar (20 % Kcal de proteínas, 10 % Kcal de grasas) (TD.08806, ENVIGO, Madison, WI) durante 16 semanas (Grupo 1, **SD**) y 2)

otro grupo experimental consumió una dieta de alto contenido en grasas (19 % Kcal de proteínas, 45 % Kcal de grasas) (TD.06415, ENVIGO, Madison, WI) y se les suministró fructosa (PanReac AppliChem, Barcelona, España) en el agua de bebida al 20% durante 16 semanas (Grupo 2, **HF**). Los seis grupos experimentales restantes consumieron la misma dieta de alto contenido en grasa y 20 % de fructosa en el agua de bebida durante 8 semanas, a partir de la cual los animales fueron alimentados con una dieta estándar durante 8 semanas (Grupo 3, **HF/SD**). Además, del cambio de dieta se incluyeron como tratamiento: 1) la realización de un protocolo de entrenamiento interválico de alta intensidad (Grupo 4, **HF/EX**); 2) la inclusión de la formulación nutracéutica en la dieta estándar (Grupo 5, **HF/NT**); 3) la combinación de la realización del protocolo de ejercicio junto a la administración del nutracéutico (Grupo 6, **HF/NEX**); 4) la administración del agonista de GLP1-R (Semaglutida, Ozempic) mediante inyección subcutánea (Grupo 7, **HF/S**) y 5) la combinación de la semaglutida con el protocolo de ejercicio (Grupo 8, **HF/SE**). Se optó por incluir la semaglutida para utilizarse como control positivo y comparar los efectos del nutracéutico. Durante el periodo experimental, los animales tuvieron libre acceso a líquidos (agua o solución de fructosa al 20 %), y los animales consumieron la dieta experimental alta en grasa *ad libitum*, mientras que los animales del grupo de dieta estándar siguieron un diseño de consumo de alimentos *pair-fed* basado en experimentos anteriores (169) para mantener una ingesta calórica adecuada en un grupo normocalórico. El nivel de inclusión del nutracéutico (NT) en la dieta fue del 0.75 % lo que aproximadamente equivaldría a 250 mg NT/kg rata. La semaglutida fue administrada semanalmente mediante inyección subcutánea a dos dosis diferentes. Entre las semanas 9-12 se administró a una dosis de 22.5 µg/kg, mientras que de las semanas 13-16 se duplicó la dosis a 45 µg/kg. La ingesta de alimentos se registró diariamente, mientras que el peso corporal se midió semanalmente. Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con las Guías Directrices relacionadas con el Alojamiento y Cuidado de los Animales (170), y todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Granada, España (Referencia de Proyecto 16/07/2019/132). Para seleccionar el número de ratas asignadas a cada grupo experimental (n=8), aplicamos el principio de las 3R (171).

Los días previos al sacrificio animal y tras un periodo mínimo de ayunas de 8 h se realizó un test de tolerancia a una sobrecarga oral de glucosa (PTOG) según la metodología descrita por Prieto et al. (172) (**Figura 18**). El día anterior al final del periodo

experimental de 13 o 21 semanas se alojaron a los animales en jaulas metabólicas individuales para permitir la recogida de orina. Finalmente, y antes del sacrificio se determinó la composición corporal mediante un equipo basado en resonancia magnética (EchoMRI™; EchoMedical Systems, Houston, TX) que analiza el contenido en grasa y magra corporal en animales vivos. Posteriormente, fueron anestesiados con ketamina (75 mg/kg peso corporal) (Fatro Ibérica, Barcelona, España) y xilazina (10 mg/kg peso corporal) (Fatro Ibérica, Barcelona, España) y se extrajo la sangre mediante la punción de la aorta abdominal utilizando heparina (Deltalab, Barcelona, España) como anticoagulante y se cuantificaron los parámetros sanguíneos mediante un sistema Analizador Hematológico Automatizado (KX-21 Automated Hematology Analyzer, Sysmex Corporation, Kobe, Japón). Posteriormente, el volumen de sangre restante se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min a 4 °C (Centrifuge 5810 R, Eppendorf) para separar el plasma que se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C hasta su posterior análisis. Se extrajeron y pesaron el bazo, los riñones, el colon, el ciego, el contenido cecal, tejido adiposo abdominal y epididimal y el hígado y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido para almacenarse posteriormente a -80 °C hasta su análisis. Además, el hígado se dividió en varias porciones y se procesó para su análisis histológico y 100 mg de tejido se sumergió en una solución conservante de ARN (RNAlater, Ambion).

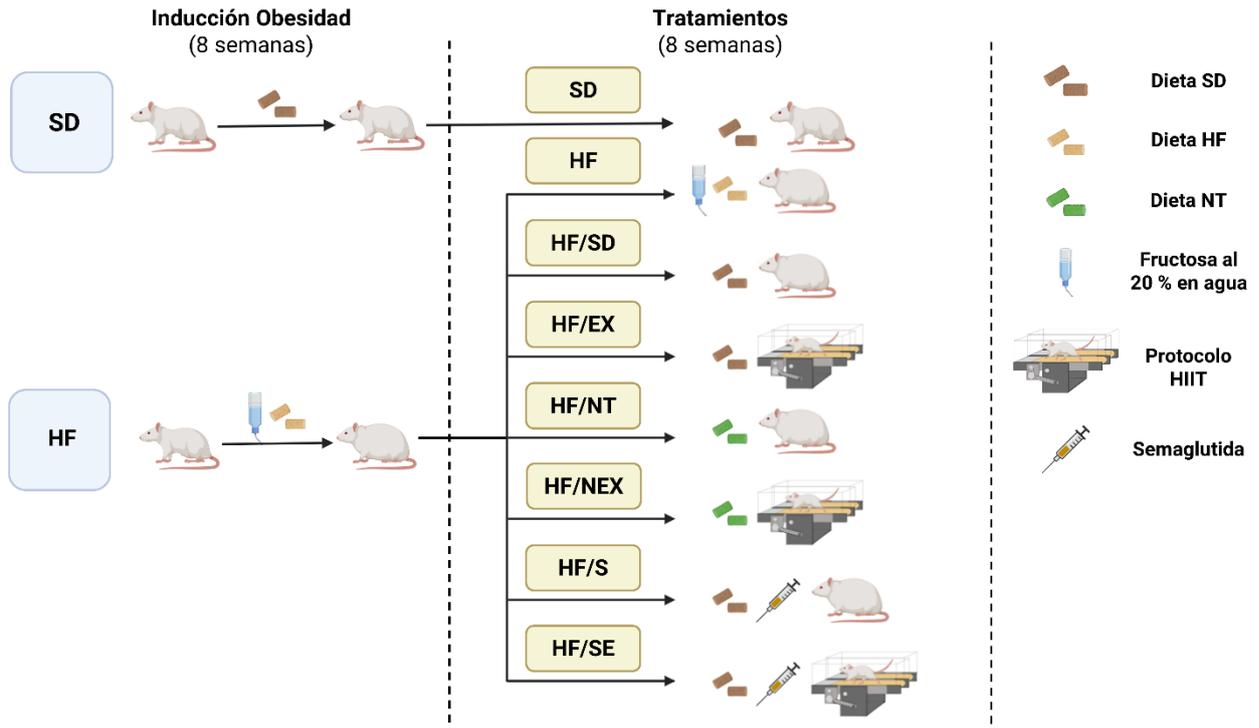


Figura 17. Diseño experimental del ensayo *in vivo* de la fase 2: (Tratamiento de la obesidad a partir de la formulación nutraceutica y su combinación con ejercicio fisico). SD: grupo que consume dieta estándar; HF: grupo que consume dieta hipercalórica; HF/SD: grupo que consume dieta hipercalórica 13 semanas + dieta estándar 8 semanas; HF/EX: grupo que consume dieta hipercalórica 13 semanas + dieta estándar y protocolo de ejercicio fisico 8 semanas; HF/NT: grupo que consume dieta hipercalórica 13 semanas + dieta estándar con nutraceutico 8 semanas; HF/NEX: grupo que consume dieta hipercalórica 13 semanas + dieta estándar con nutraceutico y protocolo de ejercicio fisico 8 semanas; HF/S: grupo que consume dieta hipercalórica 13 semanas + dieta estándar y administración semaglutida 8 semanas y HF/SE: grupo que consume dieta hipercalórica 13 semanas + dieta estándar, administración semaglutida y protocolo ejercicio fisico 8 semanas. Imagen generada a partir de BioRender.

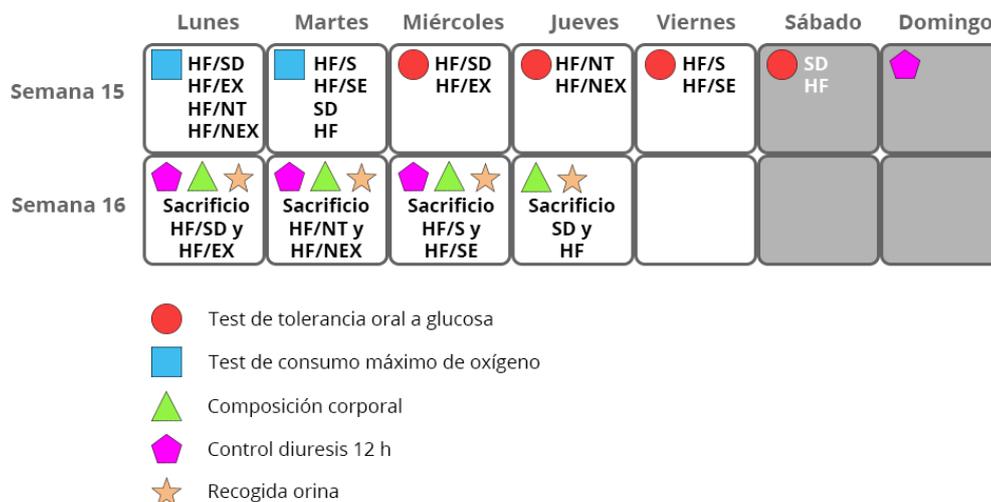


Figura 18. Diseño experimental de las dos últimas semanas del periodo experimental del ensayo *in vivo* de la fase 2.

3.8.2.2 Dietas experimentales

Las dietas experimentales fueron suministradas por la empresa ENVIGO y cumplían las necesidades de nutrientes para ratas (173) y los requerimientos de la AIN-93G con pequeñas modificaciones (174). La composición de las dietas hipercalórica (TD.06415, ENVIGO, Madison, WI) y estándar (TD.08806, ENVIGO, Madison, WI). La composición de las dietas viene recogida en el **apartado 3.8.1.2**. Las dietas de la intervención nutraceútica serán la misma que la dieta estándar con la formulación nutraceútica incluida en un 0.75 %. La formulación nutraceútica fue preparada a mayor escala, para ello se prepararon los hidrolizados proteicos según la metodología descrita en el **apartado 3.2.1**, partiendo de 50-100 g de harina de semillas y manteniendo la proporción de 100 mL de agua tipo 1/25 g de muestra. Así mismo, los extractos etanólicos se prepararon según la metodología mediante Soxhlet descrita en el **apartado 3.2.2** a partir de 20-30 g de harina de semillas o de la pulpa de *Argania spinosa* y manteniendo la proporción de 20 mL de solución extractora/2.5 g de muestra.

Digestibilidad in vitro basado en un equilibrio de diálisis de las dietas experimentales

El método in vitro de Miller et al. (205) modificado por Porres et al. (206) fue utilizado para ensayar la digestibilidad de las dietas experimentales. Las diferentes dietas experimentales (5 g) fueron adicionadas a 50 mL de ácido clorhídrico (HCl) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) 0.01 N y llevados hasta pH 2 añadiendo HCl 0.1 N. En un tubo tipo falcon se añadieron 10 mL de la mezcla anterior, 10 mL de HCl 0.01 N y 1 mL de solución de pepsina (P6887, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) al 16 % (p/v) diluida en HCl 0.1 N. La mezcla se llevó a incubación en un baño de agitación a 37 °C durante 2 h (Memmert®). Las muestras se prepararon en cuadruplicado; como blanco de la prueba se prepararon tubos donde se añadieron todos los componentes de la reacción a excepción de las muestras de dietas experimentales. Se prepararon membranas de diálisis con un tamaño de poro de 14 kDa (DTV12000.02.30, Medicell Membranes Ltd, Londres) cortadas en fragmentos de 12-13 cm de longitud y se mantuvieron en agua tipo I durante 12 h a 4 °C antes de su utilización. Posteriormente, a cada membrana de diálisis se le añadieron anión bicarbonato (HCO_3^-) (PanReac AppliChem, Barcelona, España) y agua tipo I hasta un volumen final de 10 mL, para compensar el pH de la mezcla de digestión. Estos volúmenes fueron calculados para cada proceso de digestión, ya que

difiere en función de la muestra utilizada. Las membranas se colocaron dentro de los tubos, donde se había llevado a cabo el proceso anterior, y se mantuvieron durante 30 min a una T^a de 37 °C para permitir que el pH se compensara hasta llegar a pH 7.4. Inmediatamente después se añadieron 5 mL de una solución de pancreatina (P7545, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) y sales biliares (B8631, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU. (2.5 de sales biliares, 0.4 g de pancreatina en 100 mL de HCO₃⁻). De nuevo, los tubos se mantuvieron durante 2 h en baño de agitación a 37 °C. Cuando acabó el proceso, tanto el contenido del interior de las membranas de diálisis (dializados), como el contenido de los tubos fuera de las membranas (retenidos) fueron conservados a -20 °C hasta su posterior análisis.

3.8.2.3 Consumo máximo de oxígeno en test incremental

La prueba incremental de consumo máximo de oxígeno se llevó a cabo utilizando un analizador de gases (Gas Analyzer LE 405. Panlab Oxylet System, Harvard Apparatus, Cornellá, Barcelona, España) que estaba conectado a una cinta rodante individual (Panlab LE8708) para poder diseñar el protocolo de entrenamiento. El método utilizado por este sistema se basó en la determinación de los valores de O₂ consumido y CO₂ producido mediante un dispositivo calorimétrico indirecto de circuito abierto. La tasa de flujo de gas dentro de la cinta rodante se estableció en 0.7-1.2 L/minuto durante la prueba. Al mismo tiempo, la concentración de gas de las muestras de aire se detectó mediante sensores de O₂ y CO₂ y estos valores se registraron en el ordenador conectado. El protocolo utilizado se basó en el propuesto por Wisløff et al. (207) con ligeras modificaciones (208). 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, Cornellá, Barcelona, España).

Después del registro de los valores de O₂ y CO₂ del aire ambiental durante los primeros 5 min, los sensores comienzan a registrar los valores de los gases dentro de la cinta rodante durante los siguientes 3 min. Una vez que los valores se estabilizan, se introduce al animal dentro de la jaula de la cinta rodante. Durante los siguientes 5 min, los sensores siguen detectando los gases dentro de la cinta de correr y luego comienza la prueba incremental. Durante los primeros 5 min, la velocidad aumenta de 25 a 30 cm/s y después de este periodo, la velocidad continúa aumentando a un ritmo de 3 cm/s cada minuto. La prueba termina cuando el animal está visiblemente exhausto y se

apoya en la barra de descarga durante más de 5 s. Los animales fueron pesados previo a la realización del test incremental.

3.8.2.4 Protocolo de entrenamiento interválico de alta intensidad

El protocolo de entrenamiento se llevó a cabo utilizando un tapiz rodante de 5 carriles, especialmente diseñado para ratas de experimentación (Panlab/Harvard Apparatus, Inc. Cornellá, Barcelona) y haciendo uso del software SEDACOM v2.0 (Panlab, Harvard Apparatus, Cornellá, Barcelona, España). Una semana antes del inicio del periodo experimental, los animales se familiarizaron con el tapiz rodante durante 3-4 días. Este periodo de adaptación consistió en realizar un entrenamiento de baja intensidad a una velocidad de 15 cm/s durante 15 min al día y sin inclinación del tapiz.

Los animales experimentales de los grupos que incluían ejercicio físico (HF/EX, HF/NEX y HF/SE) realizaron el protocolo de entrenamiento 5 días a la semana, 32 min/día durante todo el periodo experimental. Este protocolo específico se caracteriza por ser un protocolo de entrenamiento aeróbico de alta intensidad, dado que la intensidad utilizada fue inferior al 100 % del consumo máximo de oxígeno (VO_2 máx.), determinado como umbral anaeróbico. Al mismo tiempo se consideró interválico, ya que se realizó en 4 bloques y en los que se alternaron periodos de alta intensidad de 2.5 min con periodos de descanso absoluto de 3 min, durante los 32 min del protocolo de ejercicio. Además, se incluía un calentamiento de 10 min en ese tiempo. El entrenamiento específico comenzó a 20 % y 50 % del VO_2 máx. en la primera semana, para la sesión de calentamiento y alta intensidad, respectivamente, y siguió aumentando hasta 45 y 85 % del VO_2 máx. durante la última semana. A continuación, se muestra el protocolo de entrenamiento, que además se realizó durante el periodo de oscuridad ya que es el periodo más activo de los animales.

Tabla 9. Protocolo de entrenamiento interválico de alta intensidad.

Semana		S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
Calentamiento 10 min	Velocidad (cm/s)	11	12	22	22	22	25	25	25
	Consumo máximo oxígeno (VO ₂ máx.)	20%	22%	40%	40%	40%	45%	45%	45%
	Pendiente (%)	0	0	5	5	5	10	10	10
4 periodos 2.5' trabajo + 3' descanso	Velocidad (cm/s)	30	33	33	39	44	44	44	47
	Consumo máximo oxígeno (VO ₂ máx.)	50%	60%	60%	70%	80%	80%	80%	85%

3.8.2.5 Prueba de tolerancia a una sobrecarga oral de glucosa

La prueba de tolerancia a una sobrecarga oral de glucosa se realizó conforme al apartado 3.8.1.3.

3.8.2.6 Análisis de la composición corporal

La composición corporal de los animales fue determinada después de 8 h de ayuno mediante el dispositivo EchoMRITM (EMS 181, Echo Medical Systems, Houston). El equipo emplea un método validado de resonancia magnética nuclear para la medición de la masa grasa, tejido magro, agua libre (agua no unida a los tejidos, normalmente orina y el plasma) y agua total (también denominada agua total corporal, unida y no unida a los tejidos). Es un método no invasivo, preciso y exacto que realiza mediciones muy rápidas (aproximadamente 1 min para cada medida) (209).

Para determinar los índices antropométricos en animales, se obtuvieron medidas de la circunferencia abdominal y de la longitud del animal, tomando como referencias la nariz y el final de la cola. Se calcularon los siguientes índices (210):

$$\text{Índice de masa corporal (IMC)} = \frac{\text{Peso del animal (kg)}}{\text{Longitud (m)}^2}$$

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

3.8.2.7 Parámetros hemáticos

Los parámetros hemáticos se determinaron conforme al **apartado 3.8.1.4**.

3.8.2.8 Bioquímica plasmática

La bioquímica plasmática fue determinada por la unidad de bioanálisis en el Centro de Instrumentación Científica (Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada) según lo indicado en el **apartado 3.8.1.5**.

3.8.2.9 Contenido grasa hepática total

La determinación del contenido en grasa hepática se llevó a cabo según se indica en el **apartado 3.8.1.6**.

3.8.2.10 Análisis histológico

Una porción del hígado se fijó en formalina tamponada con fosfato al 10 %, se deshidrató en etanol, se embebió en parafina y se seccionó para examen histológico mediante tinción con hematoxilina-eosina (HE) para microscopía general de morfología (Servicio de Microscopía, CIC, Universidad de Granada). Se evaluaron todos los grupos experimentales (SD, HF, HF/SD, HF/EX, HF/NT, HF/NEX, HF/S y HF/SE) y ocho animales por grupo experimental y se analizaron dos preparaciones diferentes de cada tinción para cada animal (n=16 muestras por grupo). El análisis histológico fue realizado conforme a lo indicado en el **apartado 3.8.1.8**.

3.8.2.11 Extracción de ARN

Se aisló el ARN total del hígado y colon utilizando 100 mg de cada tejido según lo indicado en el **apartado 3.8.1.9**. Además, se aisló ARN total de tejido adiposo abdominal siguiendo el método descrito por Roy et al. (211). Se trata del mismo protocolo indicado en el **apartado 3.8.1.9** con ligeras modificaciones. A 300 mg de tejido adiposo abdominal se añadieron 1 mL de Tri-Reagent® (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.), y se homogeneizaron en un homogeneizador Micra D-1 (ART moderne labortechnik). El homogeneizado fue transferido a un tubo libre de ribonucleasas (RNasas) (Corning, Nueva York, EE. UU.) y se centrifugó a 12000 g durante 5 min a 4 °C (Centrifuge 5430 R, Eppendorf). Tras el proceso se formarán dos capas, una capa superior amarillenta/blanca translúcida que contiene tejido adiposo y una capa inferior con ADN, ARN y proteínas lisadas en el Tri-Reagent® (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.). La

capa superior se descarta cuidadosamente con una micropipeta y se continúa con el protocolo indicando en el **apartado 3.8.1.9**.

3.8.2.12 Retrotranscripción y qPCR: mi-ARN

La retrotranscripción de ARN total de los tejidos de hígado y tejido adiposo abdominal para la síntesis del ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) de micro-ARNs (mi-ARNs) se llevó a cabo según lo detallado en el **apartado 3.7.10**.

3.8.2.13 Retrotranscripción y OpenArray: ARNm

La transcripción reversa de ARN a ADNc de los tejidos de hígado, colon y tejido adiposo abdominal se realizó utilizando un Kit de transcripción inversa de ADNc de gran capacidad (*High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits Protocol*) (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). En tubos individuales para reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Corning, Nueva York, EE. UU) se realizó una mezcla de 2 µg (10 µL) de ARN con 10 µL de *Master Mix* que contenían los componentes necesarios para llevar a cabo la retrotranscripción del material genético (**Tabla 10**). Se centrifugaron brevemente los tubos (Centrifuge Model 2500, Nahita) para reducir el contenido y eliminar las burbujas de aire. Finalmente, las muestras se someten a un programa en el termociclador para producir la retrotranscripción de la muestra de ARN a ADNc: 10 min a 25 °C, 120 min a 37 °C y 5 min 85 °C.

Tabla 10. Componentes de la mezcla de reacción (*Master Mix*) de la retrotranscripción.

Componentes	Volumen/reacción (µL)
10× RT Buffer	2.0
25× dNTP Mix (100 mM)	0.8
10× RT Random Primers	2.0
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1.0
Agua libre de nucleasas	4.2
Total por Reacción	10.0

Para analizar los cambios de expresión en ARNm en hígado, colon y tejido adiposo abdominal debido a la obesidad inducida por la dieta, así como, los efectos de las intervenciones sobre esta patología; se diseñó un panel de OpenArray que incluía 112 genes implicados en el metabolismo lipídico (lipogénesis y lipólisis) & glucídico, estrés oxidativo, inflamación y otras vías (ANEXO I). Se incluyeron 7 genes endógenos,

específicos de los 3 tejidos, para la normalización. En una placa de 384 pocillos para OpenArray se preparó la mezcla de reacción, para ello en cada pocillo a 1.2 μL del ADNc anterior (~ 100 ng) se añadieron 2.5 μL de *TaqMan™ OpenArray™ Real-Time PCR Master Mix* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) y 1.2 μL de agua libre de nucleasas (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Se centrifugó 1-2 min a 200 rpm (Centrifuge 5810 R, Eppendorf) y se dejó incubar la reacción a 4 °C durante 1 h en oscuridad, pasado el tiempo se volvió a centrifugar 2 min a 2000 rpm. Estos últimos pasos se realizan para para eliminar cualquier posible burbuja que pueda interferir en la carga del OpenArray. A continuación, la mezcla de reacción fue cargada en la placa de OpenArray mediante el OpenArray AccuFill System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Finalmente, la PCR cuantitativa (qPCR) fue realizada en un equipo QuantStudio 12 K Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). Los datos brutos se analizaron mediante el software Design and Analysis de Thermo Fisher Cloud y la expresión relativa de los genes se calculó mediante el método Cq comparativo ($2^{\Delta\text{Cq}}$); como control normalizador se usaron *Gapdh* y *B2m* en hígado, *Hprt1* y *Tbp* en colon y tejido adiposo. Los controles normalizadores se seleccionaron en base a la puntuación ofrecida por el software Design and Analysis de Thermo Fisher Cloud. El ΔCq , fue calculado como: ΔCq (gen endógeno) - ΔCq (gen interés). Cq superiores a 28 fueron excluidos del análisis y considerados como genes sin amplificación de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Se comprobó dentro de cada grupo cuantas muestras expresaban cada gen; si existían 4 o más muestras sin expresión se consideró que ese gen no era expresado en ese grupo. Finalmente, se calculó el *fold-change* o tasa de cambio utilizando los valores de $2^{\Delta\text{Cq}}$ y seleccionándose el grupo HF como control para las comparativas. Los *Heatmaps* fueron calculados usando el paquete *pheatmap* 1.0.12 con una agrupación mediante distancia euclidiana. No se incluyeron los genes sin expresión, ni aquellos en los que no se pudiera calcular el *fold-change* para 4 o más grupos.

3.8.2.14 Análisis actividad antioxidante hepática

3.8.2.14.1 Homogenización de hígados

Los homogenizados de hígados fueron preparados siguiendo el método descrito en el **apartado 3.8.1.12.1**.

3.8.2.14.2 *Determinación de la concentración de proteína*

La concentración de proteína fue determinada en los homogeneizados de hígado mediante el método de Bradford (193) tal y como se indica en el **apartado 3.8.1.12.2**.

3.8.2.14.3 *Actividad enzimática de la catalasa*

La actividad enzimática de la catalasa (CAT) fue determinada por el método descrito en el **apartado 3.8.1.12.3**.

3.8.2.14.4 *Actividad enzimática de la superóxido dismutasa*

La actividad enzimática superóxido dismutasa (SOD) total, dependiente de Mn y de Cu/Zn fue determinada en los homogeneizados de hígado mediante el procedimiento detallado en el **apartado 3.8.1.12.4**.

3.8.2.14.5 *Actividad enzimática de la glutatión peroxidasa*

La actividad enzimática glutatión peroxidasa (GPx) se determinó mediante el método indicado en el **apartado 3.8.1.12.5**.

3.8.2.14.6 *Actividad enzimática de la glutatión S-transferasa*

La actividad enzimática glutatión S-transferasa se ensayó mediante lo descrito en el **apartado 3.8.1.12.7**.

3.8.2.15 Análisis microbiológico del contenido cecal

El contenido cecal fue recolectado al final del periodo experimental y utilizado para el aislamiento de ADN genómico (ADNg). La extracción del material genómico se realizó mediante el kit QIAamp® PowerFecal® Pro DNA siguiendo el protocolo correspondiente de QIAGEN. La cuantificación del ADNg se llevó a cabo mediante fluorometría (Qubit). Las muestras de ADNg se analizaron mediante secuenciación de la región V4 (233 pb) de los genes de ARN ribosómico 16S (ARNr) utilizando el sistema MiSeq (Illumina, San Diego, CA, EE.UU.). La preparación de las bibliotecas, *pooling* y secuenciación miniSeq se realizaron en el Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra (IPBLN) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC, Granada). Los pasos de la reacción fueron los siguientes: desnaturalización 3 min a 95 °C; (desnaturalización 30 s a 95 °C, y 10 s 75 °C, alineamiento 30 s a 55 °C, elongación 30 s a 72 °C) x 25 ciclos, y extensión 5 min a 72 °C indexada con 8 ciclos de PCR para amplificar las regiones V3-V4 del gen 16S rRNA con los siguientes cebadores: 16S ProV3V4 *forward* 5'→3' 5' CCTACGGGNBGCASCAG 3' y 16S ProV3V4 *reverse* 5'→3' 5'

GACTACNVGGGTATCTAATCC 3'. Los resultados se obtuvieron con el software de análisis Illumina versión 2.6.2.3, obteniéndose unas 157801 lecturas medias por muestra.

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. (212). En primer lugar, se realizó un análisis de calidad de 2x275 secuencias de pares de bases usando FastQC (213) y el software MultiQC v1.14 (214). A continuación, se hizo uso del software Qiime2 (215). 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. Para filtrar, agrupar y eliminar el ruido de las secuencias se incluyó DADA2 (216) como plugin externo, el cual produjo un corte tanto en la región 3' como en 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). Seguidamente, se agruparon las muestras para comprobar su reproducibilidad mediante la aplicación Emperor. Una vez identificados los microorganismos, se obtuvo la matriz de abundancia a nivel de familia, género y especie. También se realizó el cálculo de la diversidad alfa y beta. La base de datos utilizada como referencia ha sido SILVA v.138-99 (217). Posteriormente, se calculó la abundancia diferencial en cada grupo con respecto al grupo normocalórico (SD) mediante el uso del paquete metagenomeSeq R (218). Este paquete permite eliminar las especies raras, las cuales no se detectaban en ninguna muestra, por lo que su suma de lecturas era igual a 0. A continuación, para abordar las variaciones en el número de lecturas entre las muestras, se normalizó el número de secuencias utilizando el método de escala de suma acumulativa (CSS). Este algoritmo divide los recuentos brutos por la suma acumulativa de recuentos hasta un percentil específico que captura la distribución de recuentos relativamente constante en el conjunto de datos. Se optó por este método debido a su mayor sensibilidad en comparación con otros métodos de normalización para evaluar la abundancia de taxones (218). Finalmente, los datos normalizados se sometieron a pruebas de abundancia diferencial basadas en el modelo gaussiano cero-inflado, integrado en metagenomeSeq, para identificar los cambios en los taxones.

3.9 Análisis estadístico

Se realizaron diferentes tratamientos estadísticos según el diseño experimental de cada fase de trabajo y en todos los casos utilizando el programa estadístico IBM SPSS, versión 25. Los supuestos del modelo se comprobaron mediante la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk y la prueba de homogeneidad de la varianza de Levene, así como mediante inspección visual del histograma de frecuencias, el gráfico de cuantiles y el gráfico de valores residuales y ajustados.

Para detectar el efecto antioxidante, antilipotóxico y el potencial efecto antiesteatótico de la formulación nutracéutica y/o la semaglutida en las tres líneas celulares empleadas (HT-29, HepG2 y AML12); los resultados de viabilidad celular (MTT y MTS), muerte celular (LDH), toxicidad (Toxilight) y acumulación de triglicéridos fueron analizados mediante un test t-Student comparando frente a los controles de cada condición experimental. El nivel de significación se estableció en $p < .05$.

El efecto del nutracéutico y de la semaglutida sobre la expresión de *Cpt1a* y *Srbef1* y de miR-21 y miR-34a en la línea celular AML12 fue evaluado mediante un test t-Student comparando frente a los controles de cada condición experimental. El nivel de significación se estableció en $p < .05$.

Los efectos de la intervención dietética con HFHF frente a SD, y la duración del periodo experimental como medida de envejecimiento (13 frente a 21 semanas) sobre el peso de los órganos, el área bajo la curva de la prueba de tolerancia oral a una sobrecarga de glucosa (PTOG), los parámetros hemáticos, la bioquímica plasmática, el contenido total de grasa hepática, el perfil y los índices de ácidos grasos hepáticos, y la actividad de enzimas antioxidantes o desintoxicantes hepáticas se analizaron mediante un análisis de la varianza (ANOVA) factorial 2 x 2, con la intervención dietética y la duración del periodo experimental como tratamientos principales. El uso del ANOVA factorial 2 x 2 se fundamenta en la significancia de las posibles interacciones entre las dos intervenciones analizadas (dieta alta en grasa y fructosa y duración del periodo experimental) en nuestro modelo estadístico, además de los efectos individuales. Para reforzar la potencial fuerza integradora del modelo estadístico implementado, se incluyó en las tablas el estadístico R^2 como medida de la bondad de ajuste del modelo, dado que el coeficiente de determinación indica la proporción de variabilidad en un conjunto de datos que puede ser explicada por el modelo estadístico. Los resultados se expresaron

como valores medios \pm error estándar de la media (EEM) agrupados. Se utilizó la prueba de Duncan para detectar diferencias entre las medias de los tratamientos. Las diferencias se consideraron significativas a $p < .05$. Se realizó la prueba de Pearson en los datos obtenidos sobre las enzimas antioxidantes y desintoxicantes para comprobar la correlación entre su expresión génica y la actividad enzimática; cuando la prueba de Pearson mostró $r > 0.4$ y $p < .05$, los resultados se consideraron estadísticamente significativos. Se utilizó la prueba t-Student para detectar diferencias en el cambio de la expresión de transcritos entre los grupos control y los grupos experimentales (SD1, HFHF1, SD2, HFHF2).

Además, los efectos de las intervenciones aplicados en la fase 2 del ensayo *in vivo* sobre las determinaciones de peso de los órganos, capacidad aeróbica, área bajo la curva de la prueba de tolerancia oral a una sobrecarga de glucosa, composición corporal, parámetros hemáticos, bioquímica plasmática, contenido de grasa hepática, expresión génica de ARNm y mi-ARNs, actividad de enzimas antioxidantes o desintoxicantes hepáticas y el porcentaje de dializabilidad de las dietas experimentales fueron analizados mediante un ANOVA de una vía y el test de Duncan fue aplicado para detectar diferencias significativas. El nivel de significación se estableció en $p < .05$ en ambos test.

4 Resultados

4.1 Pruebas de capacidad antioxidante

4.1.1 Hidrolizados proteicos y extractos etanólicos

Un total de 27 especies de plantas pertenecientes a 8 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. Se realizaron extractos etanólicos de todas las especies vegetales, a excepción de *Onobrychis vicifolia*. Además, se hizo uso de todas las especies de la familia Fabaceae, debido a su alto contenido proteico, para la extracción en medio acuoso (hidrolizado proteico). Los rendimientos y la capacidad antioxidante de los diferentes hidrolizados proteicos y extractos etanólicos de las especies vegetales incluidas se muestran en las Tablas 11 y 12, respectivamente. Los hidrolizados proteicos de forma general mostraron un rendimiento de extracción cercano al 40 % y el mayor valor se observó en *Trigonella foenum-graecum* con un 42.4 ± 3.23 %. En cuanto a las pruebas de capacidad

antioxidante, de forma general, el hidrolizado proteico de *Onobrychis vicifolia* mostró los mayores valores, especialmente, en el contenido en compuestos fenólicos, donde arrojó valores dos veces superiores en comparación el resto de las muestras (58.4 ± 0.91 μg EAG/mg extracto). Así mismo, el hidrolizado proteico de *Trigonella foenum-graecum* presentó una muy alta capacidad antioxidante en la prueba de la captación del radical libre ABTS⁺ (25.8 ± 0.5 μg EAG/mg extracto). Por otro lado, los hidrolizados de las diferentes especies de *Lens culinaris* presentaron la mayor capacidad reductora de hierro, mientras que la capacidad quelante de este metal fue muy superior en los hidrolizados de las diferentes especies del género *Vigna*.

Por otro lado, los extractos etanólicos (**Tabla 12**) mostraron un rendimiento de extracción inferior (entre el 5-10 %) a los hidrolizados proteicos, a excepción del extracto obtenido de la pulpa de *Argania spinosa* que obtuvo un valor de extracción de 56.5 ± 0.32 %, seguido de los extractos de *Coriandrum sativum* (20.7 ± 0.94 %), *Cynara scolymus* (28.5 ± 1.07 %) y *Salicornia* spp (32.8 ± 0.36 %). El extracto de *Argania spinosa* mostró valores muy altos de capacidad antioxidante en las diferentes pruebas ensayadas en comparación con el resto de los extractos. La mayor concentración de compuestos fenólicos se observó en *Argania spinosa* (100.29 ± 0.91 μg EAG/mg extracto), *Origanum vulgare* (97.07 ± 2.72 μg EAG/mg extracto) y *Cynara scolymus* (82.13 ± 6.08 μg EAG/mg extracto). Los extractos de estas mismas especies presentaron una alta capacidad de captación del radical libre ABTS⁺: *Argania spinosa* (51.23 ± 1.58 μg EAG/mg extracto), *Origanum vulgare* (13.6 ± 0.80 μg EAG/mg extracto) y *Cynara scolymus* (22.12 ± 1.33 μg EAG/mg extracto), así como, *Melissa officinalis* (19.87 ± 0.33 μg EAG/mg extracto). Por otra parte, en la prueba de capacidad reductora de hierro, a excepción de *Argania spinosa* (86.9 ± 2.47 μg EAG/mg extracto), el extracto etanólico de *Ocimum basilicum* (27.8 ± 0.34 μg EAG/mg extracto) fue el que mayor capacidad mostró. En la prueba de capacidad quelante de hierro el extracto etanólico de *Cynara scolymus* fue el de mayor actividad, con un valor de quelación de 9.28 ± 0.11 . Finalmente, la mayor capacidad de inhibir la peroxidación lipídica o formación de TBARs se encontró en *Argania spinosa* (4.29 ± 0.10 UCA/mg extracto), *Origanum vulgare* (3.41 ± 0.05 UCA/mg extracto) y *Melissa officinalis* (3.52 ± 0.21 UCA/mg extracto). En base a estos resultados se seleccionaron las especies con mayor capacidad antioxidante y mayor rendimiento de extracción para elaborar el nutracéutico.

Tabla 11. Caracterización de la actividad antioxidante de los hidrolizados proteicos mediante diversas pruebas químicas.

Hidrolizado Proteico	Rendimiento (%)	Comp. Fenólicos (μg EAG/mg extracto)	ABTS (μg EAG/mg extracto)	Cap. Reductora Hierro (μg EAG/mg extracto)	Cap. Quelante Hierro (UAQ/mg extracto)
<i>Lens culinaris</i> var. Castellana	38.4 \pm 1.35	26.2 \pm 0.32	16.8 \pm 0.42	18.10 \pm 0.94	3.54 \pm 0.61
<i>Lens culinaris</i> var. Caviar	37.0 \pm 0.25	27.0 \pm 0.26	18.8 \pm 1.03	17.0 \pm 0.39	4.00 \pm 0.31
<i>Lens culinaris</i> var. Pardina	33.5 \pm 1.09	21.2 \pm 2.45	15.4 \pm 1.51	13.4 \pm 0.16	3.38 \pm 0.04
<i>Lens culinaris</i> var. Verdina	35.9 \pm 0.94	30.4 \pm 1.3	13.1 \pm 1.22	15.3 \pm 0.25	2.46 \pm 0.03
<i>Lens culinaris</i> var. Verdina Pui	39.2 \pm 5.19	35.7 \pm 0.58	18.8 \pm 0.61	22.3 \pm 2.43	3.8 \pm 0.28
<i>Onobrychis vicifolia</i>	38.2 \pm 1.86	58.4 \pm 0.91	26.9 \pm 0.45	-	5.24 \pm 0.04
<i>Medicago Sativa</i>	32.2 \pm 1.63	25.0 \pm 2.36	17.5 \pm 1.15	16.0 \pm 0.59	3.56 \pm 0.15
<i>Phaseolus Lunatus</i> L.	41.3 \pm 1.16	10.1 \pm 1.4	9.11 \pm 0.64	2.82 \pm 0.16	4.74 \pm 0.39
<i>Phaseolus Vulgaris</i> var. Black	29.6 \pm 1.05	24.7 \pm 0.33	15.2 \pm 0.52	9.61 \pm 0.37	5.54 \pm 0.71
<i>Phaseolus Vulgaris</i> var. Black Tolosana	35.5 \pm 1.48	21.6 \pm 1.35	14.1 \pm 0.52	10.5 \pm 0.3	5.61 \pm 0.69
<i>Phaseolus Vulgaris</i> var. Brown	35.7 \pm 1.10	23.2 \pm 0.87	13.7 \pm 0.49	6.93 \pm 0.10	5.71 \pm 0.02
<i>Phaseolus Vulgaris</i> var. Pinto	37.2 \pm 1.14	27.7 \pm 0.19	17.5 \pm 0.79	12.0 \pm 0.31	4.32 \pm 0.04
<i>Phaseolus Vulgaris</i> var. Red	37.2 \pm 0.86	25.5 \pm 0.45	15.4 \pm 0.27	10.7 \pm 0.43	4.54 \pm 0.29
<i>Phaseolus Vulgaris</i> var. White	34.5 \pm 1.21	14.5 \pm 0.60	9.88 \pm 0.99	3.16 \pm 0.05	3.33 \pm 0.17
<i>Trigonella foenum-graecum</i>	42.4 \pm 3.23	7.02 \pm 0.27	25.8 \pm 0.5	5.3 \pm 0.08	1.05 \pm 0.01
<i>Vigna angularis</i>	33.9 \pm 1.10	22.0 \pm 1.38	16.0 \pm 0.45	16.6 \pm 1.3	5.32 \pm 0.84
<i>Vigna radiata</i>	40.1 \pm 1.05	16.9 \pm 1.20	14.2 \pm 0.93	7.04 \pm 0.33	5.35 \pm 0.12
<i>Vigna unguiculata</i>	38.9 \pm 0.99	9.5 \pm 0.34	10.59 \pm 0.64	5.33 \pm 0.12	6.10 \pm 0.17

Los resultados son la media \pm el error estándar de la media (EEM). Los datos en el contenido en compuestos fenólicos, ABTS y capacidad reductora de hierro se expresan como μg de equivalentes de ácido gálico/mg extracto (μg EAG/mg extracto) mientras que la capacidad reductora de hierro como unidades de actividad quelante de hierro/mg extracto (UAQ/mg extracto).

Tabla 12. Caracterización de la actividad antioxidante de los extractos etanólicos mediante diversas pruebas químicas.

Extracto Etanólico	Rendimiento (%)	Comp. Fenólicos (μg EAG/mg extracto)	ABTS (μg EAG/mg extracto)	Cap. Reductora Hierro (μg EAG/mg extracto)	Cap. Quelante Hierro (UAQ/mg extracto)	TBARS (UCA/mg extracto)
<i>Argania spinosa</i>	56.5 \pm 0.32	100.29 \pm 0.91	51.23 \pm 1.58	86.9 \pm 2.47	2.42 \pm 0.04	4.29 \pm 0.10
<i>Capsicum annum</i>	3.01 \pm 0.12	24.70 \pm 8.7	0.43 \pm 0.05	5.11 \pm 0.11	1.68 \pm 0.03	0.57 \pm 0.01
<i>Citrullus lanatus</i>	15.6 \pm 2.36	17.18 \pm 0.81	2.86 \pm 0.05	9.39 \pm 0.24	-	2.13 \pm 0.04
<i>Coriandrum sativum</i>	20.7 \pm 0.94	13.99 \pm 0.35	3.15 \pm 0.11	8.13 \pm 0.09	-	1.75 \pm 0.04
<i>Cynara scolymus</i>	28.5 \pm 1.07	82.13 \pm 6.08	22.12 \pm 1.33	6.92 \pm 0.03	9.28 \pm 0.11	2.03 \pm 0.07
<i>Lens culinaris</i> var. Castellana	8.42 \pm 0.18	28.9 \pm 0.50	11.16 \pm 0.62	10.8 \pm 0.05	4.07 \pm 0.14	1.06 \pm 0.08
<i>Lens culinaris</i> var. Caviar	8.56 \pm 0.07	25.3 \pm 0.50	7.62 \pm 0.01	8.17 \pm 0.61	6.10 \pm 0.05	0.58 \pm 0.02
<i>Lens culinaris</i> var. Pardina	7.16 \pm 0.08	22.2 \pm 0.42	7.57 \pm 0.66	7.13 \pm 0.21	1.93 \pm 0.73	0.33 \pm 0.05
<i>Lens culinaris</i> var. Verdina	7.62 \pm 0.07	22.3 \pm 0.50	6.28 \pm 0.09	6.75 \pm 0.52	2.87 \pm 1.09	0.46 \pm 0.05
<i>Lens culinaris</i> var. Verdina Pui	12.7 \pm 0.12	11.8 \pm 0.12	7.47 \pm 0.35	9.69 \pm 0.05	3.24 \pm 0.07	0.60 \pm 0.05
<i>Medicago Sativa</i>	19.4 \pm 0.25	22.5 \pm 0.34	8.26 \pm 0.26	11.4 \pm 0.37	1.95 \pm 0.09	2.14 \pm 0.16
<i>Melissa officinalis</i>	5.38 \pm 0.07	50.14 \pm 0.86	19.87 \pm 0.33	-	6.09 \pm 0.02	3.52 \pm 0.21
<i>Ocimum basilicum</i>	5.36 \pm 0.16	60.6 \pm 3	8.96 \pm 0.05	27.8 \pm 0.34	2.30 \pm 0.03	1.62 \pm 0.05
<i>Origanum vulgare</i>	14.8 \pm 0.50	97.07 \pm 2.72	13.6 \pm 0.80	9.01 \pm 0.11	6.93 \pm 0.03	3.41 \pm 0.05
<i>Phaseolus Lunatus</i> L.	11.8 \pm 0.25	2.85 \pm 0.06	-	0.45 \pm 0.02	6.09 \pm 0.06	0.14 \pm 0.01

<i>Phaseolus Vulgaris</i> var. Black	8.56 ± 0.07	9.37 ± 0.21	2.42 ± 0.08	3.30 ± 0.10	7.70 ± 0.03	0.56 ± 0.04
<i>Phaseolus Vulgaris</i> var. Black Tolosana	10.2 ± 0.04	13.00 ± 0.15	2.50 ± 0.12	4.10 ± 0.24	6.61 ± 0.04	0.52 ± 0.03
<i>Phaseolus Vulgaris</i> var. Brown	9.97 ± 0.08	8.56 ± 0.32	1.84 ± 0.03	3.48 ± 0.12	7.41 ± 0.05	0.58 ± 0.12
<i>Phaseolus Vulgaris</i> var. Pinto	10.1 ± 0.06	12.7 ± 0.30	2.99 ± 0.12	3.83 ± 0.12	3.03 ± 0.03	0.76 ± 0.03
<i>Phaseolus Vulgaris</i> var. Red	9.16 ± 0.12	10.6 ± 0.23	1.57 ± 0.01	2.80 ± 0.11	3.00 ± 0.01	0.58 ± 0.12
<i>Phaseolus Vulgaris</i> var. White	10.6 ± 0.06	3.86 ± 0.08	0.25 ± 0.01	0.99 ± 0.05	6.03 ± 0.05	0.35 ± 0.02
<i>Salicornia</i> spp.	32.8 ± 0.36	65.19 ± 0.56	6.93 ± 0.11	-	3.09 ± 0.19	-
<i>Trigonella foenum-</i> <i>graecum</i>	9.96 ± 0.012	33.4 ± 0.25	2.58 ± 0.11	2.71 ± 0.42	2.85 ± 0.08	0.72 ± 0.03
<i>Vigna angularis</i>	7.78 ± 0.10	20.8 ± 0.36	4.45 ± 0.05	6.63 ± 0.02	7.63 ± 0.04	-
<i>Vigna radiata</i>	10.1 ± 0.13	15.5 ± 0.49	-	2.48 ± 0.06	5.29 ± 0.05	-
<i>Vigna unguiculata</i>	10.2 ± 0.16	5.40 ± 0.1	0.52 ± 0.01	1.21 ± 0.06	5.29 ± 0.04	-

Los resultados son la media ± el error estándar de la media (EEM). Los datos en el contenido en compuestos fenólicos, ABTS y capacidad reductora de hierro se expresan como µg de equivalentes de ácido gálico/mg extracto (µg EAG/mg extracto) mientras que la capacidad reductora de hierro como unidades de actividad quelante de hierro/mg extracto (UAQ/mg extracto).

4.1.2 Formulaci3n nutraceutica

La capacidad antioxidante de la formulaci3n nutraceutica se muestra en la **Tabla 13**. El contenido en compuestos fen3licos y la capacidad reductora de hierro fue muy similar al de los hidrolizados proteicos incluidos. Sin embargo, disminuy3 la capacidad antioxidante mediante la captaci3n del radical libre ABTS⁺ y la capacidad quelante de hierro con respecto a los hidrolizados proteicos y extractos etan3licos presentes.

Tabla 13. Caracterizaci3n de la actividad antioxidante del nutraceutico mediante diversas pruebas quimicas.

	Nutraceutico
Contenido en Comp. Fen3licos (μg EAG/mg extracto)	21.1 \pm 0.42
ABTS (μg EAG/mg extracto)	6.78 \pm 0.12
Capacidad Quelante (UAQ/mg extracto)	2.17 \pm 0.14
Capacidad Reductora (UAR/mg extracto)	16.6 \pm 0.32

Los resultados son la media \pm el error estandar de la media (EEM). Los datos en el contenido en compuestos fen3licos, ABTS y capacidad reductora de hierro se expresan como μg de equivalentes de acido g3lico/mg extracto (μg EAG/mg extracto) mientras que la capacidad reductora de hierro como unidades de actividad quelante de hierro/mg extracto (UAQ/mg extracto).

4.1.3 Digestibilidad *in vitro* en continuo

El nutraceutico fue sometido a una digesti3n *in vitro* en continuo para simular las condiciones fisiol3gicas del tracto gastrointestinal superior y comprobar la bioaccesibilidad de la capacidad antioxidante de este mismo (**Tabla 14**). El contenido en compuestos fen3licos y la capacidad quelante fue muy similar en los diferentes tiempos del dializado al del nutraceutico de partida, mientras que el potencial antioxidante (ABTS) mostr3 tendencia a un aumento desde el inicio del proceso digestivo hasta 150 min. En base a la capacidad antioxidante total del nutraceutico (**Tabla 13**) se calcul3 el porcentaje de esta tanto en dializado como en retenido, para cada prueba quimica y en los distintos tiempos. Se observaron resultados similares en dializado y retenido, sin embargo, la mayor parte de la capacidad antioxidante determinada por el nivel de compuestos fen3licos y ABTS se encontr3 en el retenido (en torno al 60 %) (**Tabla 15**), si bien una parte del potencial antioxidante se perdi3 durante el proceso digestivo. Por otro lado, la capacidad quelante del hierro fue superior en el retenido en comparaci3n con la misma capacidad en el nutraceutico (14 % superior).

Tabla 14. Caracterización de la actividad antioxidante del dializado y retenido de la formulación nutraceútica mediante diversas pruebas químicas.

Muestra	Comp. Fenólicos (μg EAG/mg extracto)	ABTS (μg EAG/mg extracto)	Cap. Reductora Hierro (μg EAG/mg extracto)	Cap. Quelante Hierro (UAQ/mg extracto)
Dializado 30'	15.2 \pm 0.16	1.65 \pm 0.02	7.44 \pm 0.56	2.22 \pm 0.00
Dializado 60'	14.3 \pm 0.11	4.78 \pm 0.03	6.04 \pm 0.04	1.80 \pm 0.01
Dializado 90'	14.2 \pm 0.04	5.15 \pm 0.08	5.55 \pm 0.24	1.67 \pm 0.02
Dializado 120'	17.8 \pm 0.06	6.33 \pm 0.07	6.24 \pm 0.28	1.85 \pm 0.01
Dializado 150'	11.8 \pm 0.27	4.49 \pm 0.07	6.33 \pm 0.73	1.34 \pm 0.00
Retenido	13.4 \pm 0.57	4.56 \pm 0.59	10.40 \pm 0.06	2.53 \pm 0.32

Los resultados son la media \pm EEM. Los datos en el contenido en compuestos fenólicos, ABTS y capacidad reductora de hierro se expresan como μg de equivalentes de ácido gálico/mg extracto (μg EGA/mg extracto) mientras que la capacidad reductora de hierro como unidades de actividad quelante de hierro/mg extracto (UAQ/mg extracto).

Tabla 15. Porcentaje de capacidad antioxidante del dializado y retenido de la formulación nutraceútica.

Muestra	Comp. Fenólicos (%)	ABTS (%)	Cap. Reductora Hierro (%)	Cap. Quelante Hierro (%)
Dializado 30'	7.94 \pm 0.35	2.51 \pm 0.55	3.96 \pm 0.29	11.3 \pm 0.36
Dializado 60'	3.92 \pm 0.18	4.03 \pm 0.13	2.01 \pm 0.21	4.86 \pm 0.23
Dializado 90'	3.31 \pm 0.13	3.69 \pm 0.12	1.70 \pm 0.15	3.82 \pm 0.17
Dializado 120'	3.14 \pm 0.02	3.51 \pm 0.24	1.52 \pm 0.06	3.20 \pm 0.04
Dializado 150'	2.78 \pm 0.10	3.37 \pm 0.40	1.42 \pm 0.02	3.09 \pm 0.15
Dializado	21.1 \pm 1.47	17.1 \pm 3.76	10.7 \pm 1.55	26.2 \pm 1.63
Retenido	63.5 \pm 1.16	64.77 \pm 6.95	59.2 \pm 3.46	114.5 \pm 1.50
Total	84.6 \pm 0.65	79.5 \pm 20.50	70.0 \pm 1.91	140.8 \pm 0.22

Los resultados son la media \pm EEM. Los datos en el contenido en compuestos fenólicos, ABTS y capacidad reductora de hierro se expresan como μg de equivalentes de ácido gálico/mg extracto (μg EGA/mg extracto) mientras que la capacidad reductora de hierro como unidades de actividad quelante de hierro/mg extracto (UAQ/mg extracto).

4.2 Identificación de compuestos bioactivos

4.2.1 Compuestos fenólicos

Se caracterizaron 72 componentes en la formulación nutracéutica (**Tabla 16**) mediante UPLC (**Figura 19**). Los compuestos bioactivos identificados en el producto resultante fueron, entre otros, Puerarina, Luteolina, Kaempferol, Genisteina, Apigenina, Baicaleina, Glabridina, Ácido carnósico, Aloe emodina y Carnosol. Las principales propiedades de estos compuestos fueron antioxidantes y antiinflamatorias; con algunos compuestos que presentaron actividades antitumorales, antiobesogénicas y hepatoprotectoras. La gran mayoría de compuestos pertenecían a la superclase de flavonoides (29.17 %), triterpenoides (16.67 %), diterpenoides (15.28 %) e isoflavonoides (12.50 %) (**Tabla 17**).

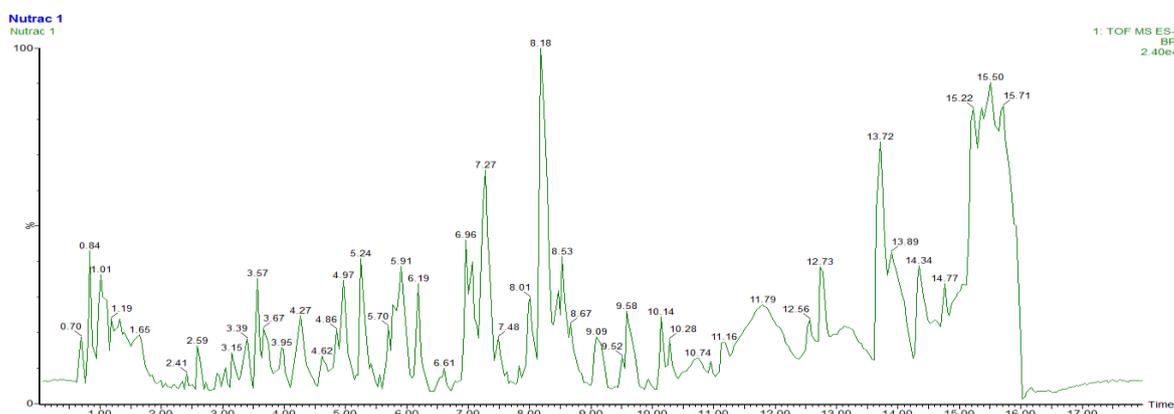


Figura 19. Cromatograma del nutracéutico obtenido mediante UPLC.

4.2.2 Péptidos bioactivos

La identificación de los péptidos bioactivos hallados en el nutracéutico se recoge en la **Tabla 18**. La mayoría de los péptidos provenían de *Vigna angularis* y *Onobrychis vicifolia*, y entre ellos una gran parte pertenecen a proteínas sin caracterizar de *Vigna angularis*. La principal actividad encontrada es como inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, antihiper glucemiante y en menor proporción antioxidante. Además, cabe destacar la función como inhibidor de la 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa de la proteína con dominio lipoxigenasa caracterizada en *Vigna angularis*. En esta misma especie, las proteínas sin caracterizar mostraron un efecto antitrombótico y modulador de la actividad de la membrana mucosa del estómago.

Tabla 16. Caracterización de componentes bioactivos del nutracéutico.

RT	Masa	Formula [H-]	Nombre	PPM	% FIT	Propiedad
0.84	539.1416	C24H27O14	Blumeoside C	2.8	91.95	Antioxidante
2.9	323.1298	C20H19O4	Glabridin	4.6	92.72	Antioxidante y antiinflamatorio
2.9	323.1298	C20H19O4	Isobavachalcone	4.6	92.72	Antioxidante, antiinflamatorio y antitumoral
2.9	323.1298	C20H19O4	Glabranin	4.6	92.72	Antioxidante y antimicrobiano
2.9	323.1298	C20H19O4	Bavachalcone	4.6	92.72	Antioxidante, antiinflamatorio y antifúngico
2.9	323.1298	C20H19O4	Bavachin	4.6	92.72	Antioxidante, antiinflamatorio, antitumoral y antifúngico
2.9	323.1298	C20H19O4	Licarin B	4.6	92.72	Mejora la sensibilidad a la insulina e inhibidor de la producción de óxido nítrico. Antioxidante y antiinflamatorio
2.9	323.1298	C20H19O4	Abyssinone II	4.6	92.72	Antioxidante y antitumoral
3.04	527.2573	C30H39O8	Withanimin	-13.7	90.97	Potencial efecto antioxidante, antiinflamatorio y antitumoral
3.39	501.2558	C28H37O8	4β-Hydroxywithanolide E	14	76.89	Antiinflamatorio y antitumoral
3.57	563.143	C26H27O14	Apiin	5.1	88.55	Antioxidante y antiinflamatorio
3.57	563.143	C26H27O14	Isoschaftoside	5.1	88.55	Antioxidante y antiinflamatorio
3.57	563.143	C26H27O14	Vicenin III	5.1	88.55	Antioxidante y antiinflamatorio
4.27	431.1004	C21H19O10	Vitexin	6	99.31	Antioxidante, antiinflamatorio, antiobesogénico, hipoglucemiante y antitumoral
4.27	431.1004	C21H19O10	Sophoricoside	6	99.31	Antioxidante y antiinflamatorio
4.27	431.1004	C21H19O10	Apigetrin	6	99.31	Antioxidante, antiinflamatorio y antitumoral
4.27	431.1004	C21H19O10	Afzelin	6	99.31	Antioxidante, antiinflamatorio y antitumoral
4.27	431.1004	C21H19O10	Oroxin A	6	99.31	Antidiabético y antitumoral. Posible efecto antioxidante y antiinflamatorio
4.27	431.1004	C21H19O10	Puerarin	6	99.31	Antioxidante, antiinflamatorio, antiobesogénica, antidiabética y efectos positivos cardiovasculares
4.86	515.1277	C25H23O12	Cynarine	7.2	99.06	Antioxidante y antiobesogénico. hepatoprotector y reduce niveles de colesterol

4.86	515.1277	C25H23O12	Isochlorogenic acid B	7.2	99.06	Antioxidante, antiinflamatorio y antiobesogénico. hepatoprotector
6.19	285.0403	C15H9O6	Luteolin	1.4	99.61	Antioxidante, antiinflamatorio y antitumoral
6.19	285.0403	C15H9O6	Kaempferol	1.4	99.61	Antioxidante, antiinflamatorio y antitumoral
6.19	285.0403	C15H9O6	Fisetin	1.4	99.61	Antioxidante, antiinflamatorio y antitumoral
6.19	285.0403	C15H9O6	Scutellarein	1.4	99.61	Antioxidante, antiinflamatorio y antitumoral. Hepatoprotector
6.19	285.0403	C15H9O6	2'-Hydroxygenistein	1.4	99.61	Potencial efecto antioxidante, antiinflamatorio y antitumoral
6.19	285.0403	C15H9O6	Citreorosein	1.4	99.61	Antiinflamatorio y antitumoral
6.19	285.0403	C15H9O6	Isoscutellarein	1.4	99.61	Antioxidante, antiinflamatorio y efecto antitumoral
6.19	285.0403	C15H9O6	Norartocarpetin	1.4	99.61	Antiinflamatorio
6.19	285.0403	C15H9O6	Thunberginol B	1.4	99.61	Antiinflamatorio
6.19	285.0403	C15H9O6	6-hydroxygenistein	1.4	99.61	Antioxidante
6.96	269.0483	C15H9O5	Apigenin	12.3	99.46	Antioxidante, antiinflamatorio, antiobesogénico y antitumoral
6.96	269.0483	C15H9O5	Baicalein	12.3	99.46	Antioxidante, antiinflamatorio, antiobesogénico y antitumoral
6.96	269.0483	C15H9O5	Galangin	12.3	99.46	Antioxidante, antiinflamatorio, antiobesogénico y antitumoral
6.96	269.0483	C15H9O5	Norwogonin	12.3	99.46	Antioxidante y antitumoral
6.96	269.0483	C15H9O5	3'-Hydroxydaidzein	12.3	99.46	Antiobesogénico
6.96	269.0483	C15H9O5	Aloe emodin	12.3	99.46	Antioxidante, antiinflamatorio y antitumoral. Hepatoprotector
6.96	269.0483	C15H9O5	Genistein	12.3	99.46	Antioxidante, antiinflamatorio, antiobesogénico y antitumoral
6.96	269.0483	C15H9O5	Thunberginol A	12.3	99.46	Antiinflamatorio
6.96	269.0483	C15H9O5	2'-hydroxydaidzein	12.3	99.46	Antiinflamatorio
6.96	269.0483	C15H9O5	8-Hydroxydaidzein	12.3	99.46	Antioxidante, antiinflamatorio y antitumoral
7.48	1133.546	C54H85O25	Gypsosaponin C	7.1	63.13	Inhibidor lipasa pancreática
7.48	1133.546	C54H85O25	Vaccaroside A	7.1	63.13	Potencial antioxidante y antiinflamatorio

7.83	725.4133	C38H61O13	Fenugreek saponin I	2.9	86.12	Antiinflamatorio y disminuye niveles de colesterol
8.01	431.1739	C23H27O8	Flavaspidic acid PB	7.7	99.41	Potencial antioxidante y antibacteriano
8.01	431.1739	C23H27O8	Schisandrol A	7.7	99.41	Potencial antioxidante, efecto hepatoprotector, antiadipogénico y disminuye niveles de lípidos
8.01	431.1739	C23H27O8	Deangeloylgomisin B	7.7	99.41	Potencial efecto antioxidante
8.01	417.1558	C22H25O8	(+)-syringaresinol	2.2	98.74	Antioxidante y antiinflamatorio
8.01	417.1558	C22H25O8	Albaspidin AP	2.2	98.74	Inhibe ácido grasa sintetasa
8.53	795.4531	C42H67O14	Dipsacussaponin A	0	98.05	Antiinflamatorio
8.53	795.4531	C42H67O14	Eclalbasaponin I	0	98.05	Potencial efecto antioxidante, antiinflamatorio y hepatoprotector
9.09	779.4637	C42H67O13	Saikosaponin A	7.1	81	Antioxidante, antiinflamatorio, inmunomodulador, hepatoprotector y antitumoral
9.09	779.4637	C42H67O13	Saikosaponin B1	7.1	81	Antioxidante, antiinflamatorio, inmunomodulador, hepatoprotector y antitumoral
9.09	779.4637	C42H67O13	Saikosaponin B2	7.1	81	Antioxidante, antiinflamatorio, inmunomodulador, hepatoprotector y antitumoral
9.09	779.4637	C42H67O13	Saikosaponin D	7.1	81	Antioxidante, antiinflamatorio, inmunomodulador, hepatoprotector y antitumoral
9.09	779.4637	C42H67O13	Saikosaponin G	7.1	81	Antioxidante, antiinflamatorio, inmunomodulador, hepatoprotector y antitumoral
9.09	779.4637	C42H67O13	Bryonioside G	7.1	81	Potencial efecto antiinflamatorio y antitumoral
9.09	779.4637	C42H67O13	Corchorusin D	7.1	81	Potencial efecto similar a saikosaponin
10.95	329.179	C20H25O4	meso-Dihydroguaiaretic acid	11.2	82.31	Antioxidante, antiinflamatorio y antitumoral
10.95	329.179	C20H25O4	Carnosol	11.2	82.31	Antioxidante, antiinflamatorio y antitumoral
10.95	329.179	C20H25O4	Jolkinolide B	11.2	82.31	Antiinflamatorio y antitumoral
10.95	329.179	C20H25O4	Triptoquinone B	11.2	82.31	Antioxidante y antiinflamatorio
10.95	329.179	C20H25O4	Geranyl ferulate	11.2	82.31	Potencial antioxidante y antiinflamatorio
10.95	329.179	C20H25O4	17-Hydroxyjolkinolide A	11.2	82.31	Potencial antioxidante y antiinflamatorio

10.95	329.179	C ₂₀ H ₂₅ O ₄	Hedychilactone D	11.2	82.31	Potencial antiinflamatorio
11.79	331.1926	C ₂₀ H ₂₇ O ₄	Carnosic acid	5.1	98.3	Antioxidante y antiinflamatorio
11.79	331.1926	C ₂₀ H ₂₇ O ₄	Glaucocalyxin A	5.1	98.3	Antioxidante, antiinflamatorio y antitumoral
11.79	331.1926	C ₂₀ H ₂₇ O ₄	Dehydroandrographolide	5.1	98.3	Antiinflamatorio y antitumoral
11.79	331.1926	C ₂₀ H ₂₇ O ₄	20-Deoxyingenol	5.1	98.3	Antiinflamatorio y antitumoral
11.79	331.1926	C ₂₀ H ₂₇ O ₄	Hautriwaic acid	5.1	98.3	Antiinflamatorio y hepatoprotector
11.79	331.1926	C ₂₀ H ₂₇ O ₄	Taxoquinone	5.1	98.3	Antioxidante y antibiótico
11.79	331.1926	C ₂₀ H ₂₇ O ₄	Hulupone	5.1	98.3	Potencial antiinflamatorio

Se incluye el tiempo de retención (RT), masa y fórmula molecular teórica (H⁺) del compuesto, así como sus principales propiedades. PPM: es la diferencia entre la masa observada y la masa calculada, en partes por millón. % FIT: indica la consistencia con el valor teórico.

Tabla 17. Clasificación de los compuestos bioactivos caracterizados en el nutracéutico.

Nombre	Superclase	Clase
Blumeoside C	Terpeno	Iridoide
Glabridin	Isoflavonoide	Pterocarpano
Isobavachalcone	Flavonoide	Chalcona
Glabranin	Cumarina	Piranocoumarina
Bavachalcone	Flavonoide	Chalcona
Bavachin	Flavonoide	Flavanona
Licarin B	Neolignano	
Abyssinone II	Flavonoide	Flavanona
Withanimin	Withanolide	
4 β -Hydroxywithanolide E	Withanolide	
Apiin	Flavonoide	Flavona
Isoschaftoside	Flavonoide	Flavona
Vicenin III	Flavonoide	Flavona
Vitexin	Flavonoide	Flavona
Sophoricoside	Isoflavonoide	Isoflavona
Apigetrin	Flavonoide	Flavona
Afzelin	Flavonoide	Flavonol
Oroxin A	Flavonoide	
Puerarin	Isoflavonoide	Isoflavona
Cynarine	Fenilpropanoides	Ácido cinámicos y derivados
Isochlorogenic acid B	Fenilpropanoides	Ácido cinámicos y derivados
Luteolin	Flavonoide	Flavona
Kaempferol	Flavonoide	Flavonol
Fisetin	Flavonoide	Flavonol
Scutellarein	Flavonoide	Flavona
2'-Hydroxygenistein	Isoflavonoide	Isoflavona
Citreorsein	Policétidos aromáticos policíclicos	Antraquinonas y antranas
Isoscutellarein	Flavonoide	Flavona
Norartocarpetin	Flavonoide	Flavona
Thunberginol B	Cumarina	Isocumarina
6-hydroxygenistein	Isoflavonoide	Isoflavona
Apigenin	Flavonoide	Flavona
Baicalein	Flavonoide	Flavona

Galangin	Flavonoide	Flavonol
Norwogonin	Flavonoide	Flavona
3'-Hydroxydaidzein	Isoflavonoide	Isoflavona
Aloe emodin	Policétidos aromáticos policíclicos	Antraquinonas y antronas
Genistein	Isoflavonoide	Isoflavona
Thunberginol A	Cumarina	Isocumarina
2'-hydroxydaidzein	Isoflavonoide	Isoflavona
8-Hydroxydaidzein	Isoflavonoide	Isoflavona
Gypsosaponin C	Triterpenoide	Saponina
Vaccaroside A	Triterpenoide	Saponina
Fenugreek saponin I	Triterpenoide	Saponina
Flavaspidic acid PB	Floroglucinol	Floroglucinol dimérico
Schisandrol A	Lignano	
Deangeloylgomisin B	Lignano	
(+)-Syringaresinol	Lignano	Lignano furofuranoide
Albaspidin AP	Acilfloroglucinol	
Dipsacussaponin A	Triterpenoide	Oleanano
Eclalbasaponin I	Triterpenoide	Saponina
Saikosaponin A	Triterpenoide	Oleanano
Saikosaponin B1	Triterpenoide	Oleanano
Saikosaponin B2	Triterpenoide	Oleanano
Saikosaponin D	Triterpenoide	Oleanano
Saikosaponin G	Triterpenoide	Oleanano
Bryonioside G	Triterpenoide	
Corchorusin D	Triterpenoide	Saponina
meso-Dihydroguaiaretic acid	Lignano	Lignano dibencillbutano
Carnosol	Diterpenoide	Diterpenoide abietano
Jolkinolide B	Diterpenoide	Diterpenoide abeoabietano
Triptoquinone B	Diterpenoide	Diterpenoide abeoabietano
Geranyl ferulate	Éster fenilpropanoide	
17-Hydroxyjolkinolide A	Diterpenoide	Diterpenoide abeoabietano
Hedychilactone D	Diterpenoide	Diterpenoide labdano
Carnosic acid	Diterpenoide	Diterpenoide abietano
Glaucocalyxin A	Diterpenoide	Diterpenoide ent-kaureno
Dehydroandrographolide	Diterpenoide	Diterpenoide labdano

20-Deoxyingenol	Diterpenoide	
Hautriwaic acid	Diterpenoide	
Taxoquinone	Diterpenoide	Diterpenoide ent-clerodano
Hulupone	Meroterpenoide	Policétido cíclico poliprenilado

Tabla 18. Identificación de péptidos bioactivos del nutraceutico.

Fuente proteica	Nombre proteína de origen	Secuencia	Carga	MH+ [Da]	ΔM [ppm]	Predicción de actividad (PeptideRanker)	Actividad biológica
<i>Lens culinaris</i> var. Castellana	Allergen Len c 1.0101	SDQENPFIF	2	1096.5	-0.831	0.785887	Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, antihiper glucemiante
<i>Trigonella foenum-graecum</i>	Cadenas Lectina beta-1 y beta-2	FIAPVDTKPQTGG GYL	2	1663.9	-0.076	0.474485	Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, ansiolítico, antioxidante, antihiper glucemiante
<i>Vigna angularis</i>	Proteína sin caracterizar	QEDEDEDDDDDE DEDESISRPSR	3	2611	0.1383	0.852354	Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, antihiper glucemiante
<i>Vigna angularis</i>	Proteína sin caracterizar	SDKDGSDDDDG GEDDDDDERPSK R	4	2640	-1.17	0.696345	Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, antioxidante, antihiper glucemiante
<i>Vigna angularis</i>	Proteína sin caracterizar	DGGGPGGGPGG GPGGGPR	2	1362.6	0.3879	0.9331	Antiinflamatorio, inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, antitrombótico, modulador de la actividad de la membrana mucosa del estómago, antihiper glucemiante

<i>Vigna angularis</i>	Proteína sin caracterizar	GRDGGGPGGGP GGGPGGGPR	3	1575.7	0.7718	0.87364	Antiamnésico, inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, antitrombótico, modulador de la actividad de la membrana mucosa del estómago, antihiperglucemiante
<i>Vigna angularis</i>	Proteína sin caracterizar	GGPGGGPGGGP GGGPR	2	1190.6	0.6139	0.944127	Antiamnésico, inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, antitrombótico, modulador de la actividad de la membrana mucosa del estómago, antihiperglucemiante
<i>Vigna angularis</i>	Proteína sin caracterizar	GGGPGGGPGGG PGGGPR	2	1247.6	0.5973	0.942357	Antiamnésico, inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, antitrombótico, modulador de la actividad de la membrana mucosa del estómago, antihiperglucemiante
<i>Vigna angularis</i>	Proteína sin caracterizar	DIDAPDPEGPIVP W	2	1520.7	0.0085	0.686577	Antiamnésico, inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, antitrombótico, modulador de la actividad de la membrana mucosa del estómago, antihiperglucemiante, antioxidante
<i>Vigna angularis</i>	Proteína con dominio lipoxigenasa	GGSDTLPYPR	2	1062.5	-0.996	0.7376	Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, antiinflamatorio, inhibidor HMG-CoA reductasa, antihiperglucemiante
<i>Vigna angularis</i>	Proteína sin caracterizar	FPMPDPK	2	831.41	3.1299	0.89891	Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, antihiperglucemiante

<i>Vigna angularis</i>	Proteína del centro de reacción del fotosistema II CP47	FDPSDPVLDP	2	1248.5	-0.896	0.579841	Antihiper glucemiante
<i>Onobrychis viciifolia</i>	Chalcona reductasa	AGPTKPQL	2	811.47	0.3014	0.524461	Antiinflamatorio, inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, antitrombótico, modulador de la actividad de la membrana mucosa del estómago, antioxidante, antihiper glucemiante
<i>Onobrychis viciifolia</i>	Albúmina putativa 1	STDcRcVPWGL	2	1350.6	-1.473	0.66199	Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, antioxidante, antihiper glucemiante
<i>Onobrychis viciifolia</i>	Proteína rica en glicina	GGVGAGMGAGG GGL	2	1017.5	4.3965	0.788259	Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, inhibidor HMG-CoA reductasa, antihiper glucemiante
<i>Onobrychis viciifolia</i>	Antocianidina reductasa	TWGYPASKAL	2	1093.6	0.1896	0.512822	Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, antioxidante, antihiper glucemiante
<i>Onobrychis viciifolia</i>	Chalcona reductasa	QIFDWAL	2	892.46	7.4266	0.841945	Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, antihiper glucemiante, activación de la proteólisis mediada por ubiquitina

Se incluye la secuencia observada del péptido junto a su número de cargas y la masa molecular observada (MH^+ , expresada en Daltons), así como las actividades a las que se les asocia. La predicción de actividad fue obtenida mediante la herramienta peptide ranker, que calcula la probabilidad de que un péptido sea bioactivo (0-1). ΔM es la diferencia entre la masa observada y la masa calculada, en partes por millón.

4.3 Experimentos en cultivos celulares

4.3.1 Viabilidad celular con formulación nutracéutica

En primer lugar, se ensayaron diferentes concentraciones de la formulación nutracéutica, en las diferentes líneas celulares empleadas, para determinar las concentraciones más altas que mantuvieran la viabilidad e integridad celular. Se ensayaron concentraciones crecientes del nutracéutico en la línea celular HT-29 (**Figura 20A**). La concentración máxima que no disminuyó la viabilidad celular fue de 500 µg/mL. En base a ese resultado se ensayaron nuevas concentraciones en las líneas celulares de HT-29 (**Figura 20B**) y HepG2 (**Figura 20C**). En la línea celular de HT-29 las concentraciones de 0.5 y 1 mg/mL aumentan la viabilidad celular, mientras que en la línea celular de HepG2 disminuyen este parámetro (aunque con 0.5 mg/mL NT disminuyó ligeramente). Por tanto, se seleccionaron como concentraciones de trabajo, para los siguientes ensayos, 0.5 y 1 mg/mL para la línea celular HT-29 y 0.1 y 0.5 mg/mL para HepG2. Otra curva de concentraciones del nutracéutico fue ensayada en la línea celular de hepatocitos murinos AML12, sobre la que se analizó la muerte celular y la toxicidad del nutracéutico, además de la viabilidad celular (**Figura 21**). Se observó que el nutracéutico a concentración de 0.5 y 1 mg/mL disminuía los marcadores de muerte celular y de toxicidad, manteniendo e incluso aumentando, en el caso de 0.5 mg/mL NT, la viabilidad celular.

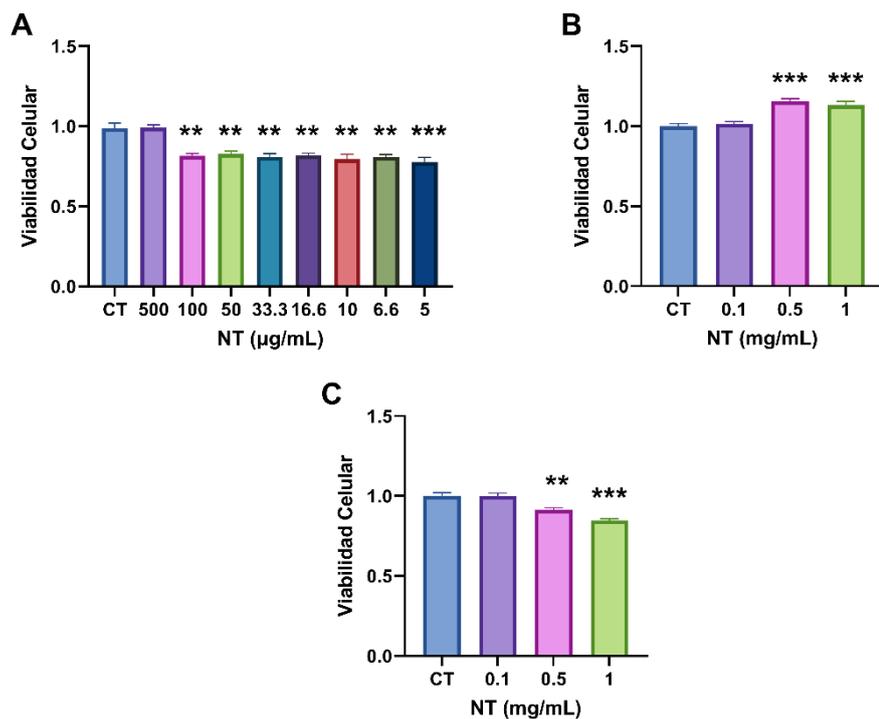


Figura 20. Viabilidad celular (MTT) frente a una curva de concentraciones del nutraceutico en (A y B) la línea celular HT-29 y en (C) la línea celular HepG2. Los datos se representan como media \pm EEM de 8 réplicas. **: $p < .01$ y ***: $p < .001$ frente al control (CT).

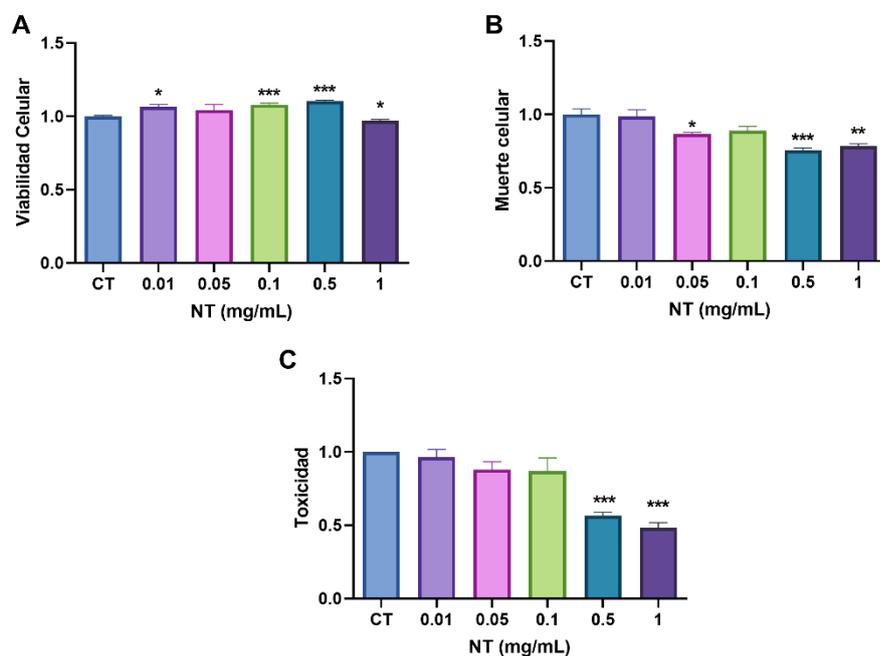


Figura 21. (A) Viabilidad celular (MTS); (B) muerte celular (LDH) y (C) toxicidad frente a una curva de diferentes concentraciones del nutraceutico en la línea celular de hepatocitos murinos AML12. Los datos se representan como media \pm EEM de 3 réplicas. *: $p < .05$; **: $p < .01$ y ***: $p < .001$ frente al control (CT).

4.3.2 Capacidad antioxidante *in vitro* de la formulación nutracéutica

Previamente al ensayo de la capacidad antioxidante *in vitro* del nutracéutico, se realizaron curvas de concentraciones de los agentes oxidantes H₂O₂ y Paraquat para determinar las concentraciones que disminuyeran la viabilidad en cada línea celular en un 50%. En la línea celular HT-29 se seleccionaron 1.5 y 2 mM de H₂O₂ y 3.5 y 4 mM de Paraquat, mientras que para la línea HepG2 1 y 1.5 mM de H₂O₂ y 1.5 y 2 mM de Paraquat (**Figura 22**). El efecto de la capacidad antioxidante del nutracéutico se muestra en la **Figura 23**, en la que se observa que la viabilidad celular aumentó al preincubar con el nutracéutico independientemente de la línea celular y ensayo. El efecto antioxidante es muy notorio en el ensayo de Paraquat en la línea celular HT-29, donde la concentración de 1 mg/mL del nutracéutico aumenta en 4.34 y 3.50 unidades de recuperación la viabilidad celular tras incubar con 3.5 y 4 mM de Paraquat, respectivamente (**Figura 23C**). Un efecto similar se produjo en la línea celular HepG2 tras la incubación con 1 y 1.5 mM de H₂O₂, en que la 0.5 mg/mL del nutracéutico aumentó la viabilidad celular en 3.64 y 1.97 unidades de recuperación (**Figura 23B**).

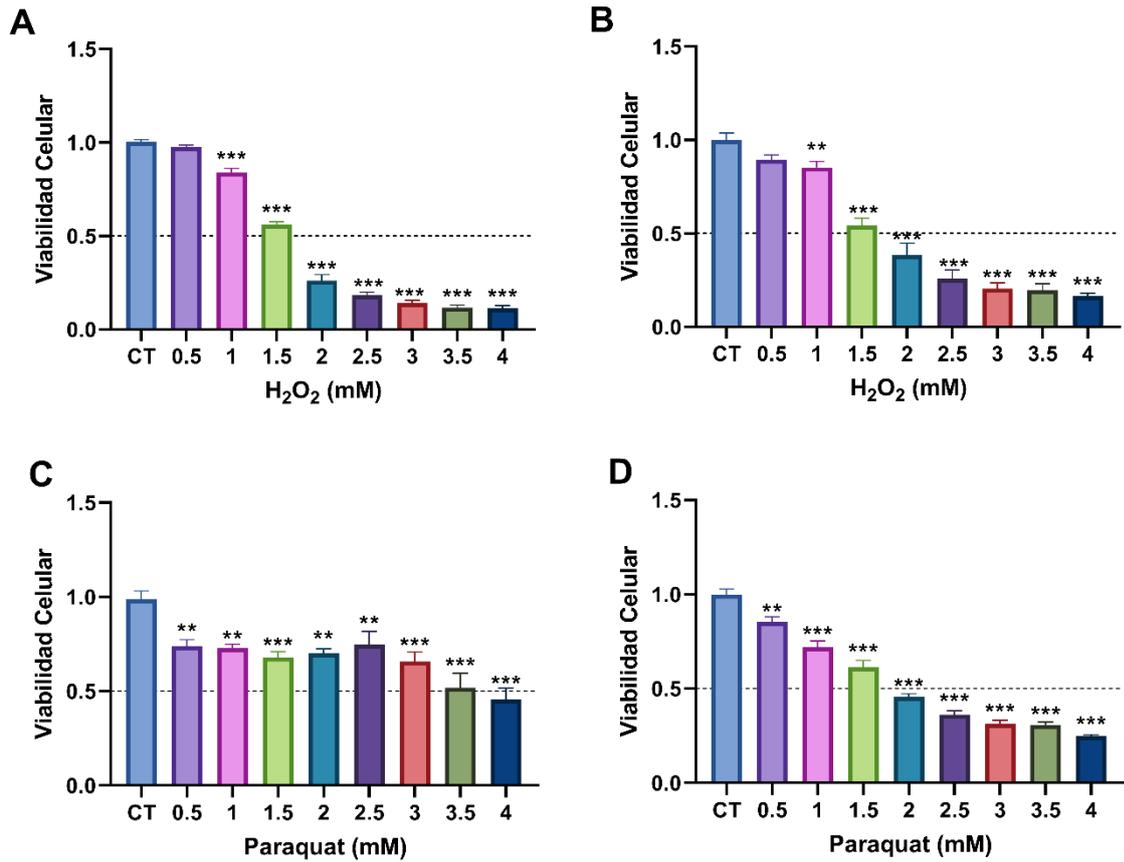


Figura 22. Viabilidad celular (MTT) frente a una curva de concentraciones H₂O₂ en (A) la línea celular HT-29 y (B) HepG2, así como, frente a una curva de concentraciones Paraquat en (C) la línea celular HT-29 y (D) HepG2. Los datos se representan como media ± EEM de 8 réplicas. Se representa el 50% de viabilidad celular mediante una línea discontinua. *: $p < .05$; **: $p < .01$ y ***: $p < .001$ frente al control (CT).

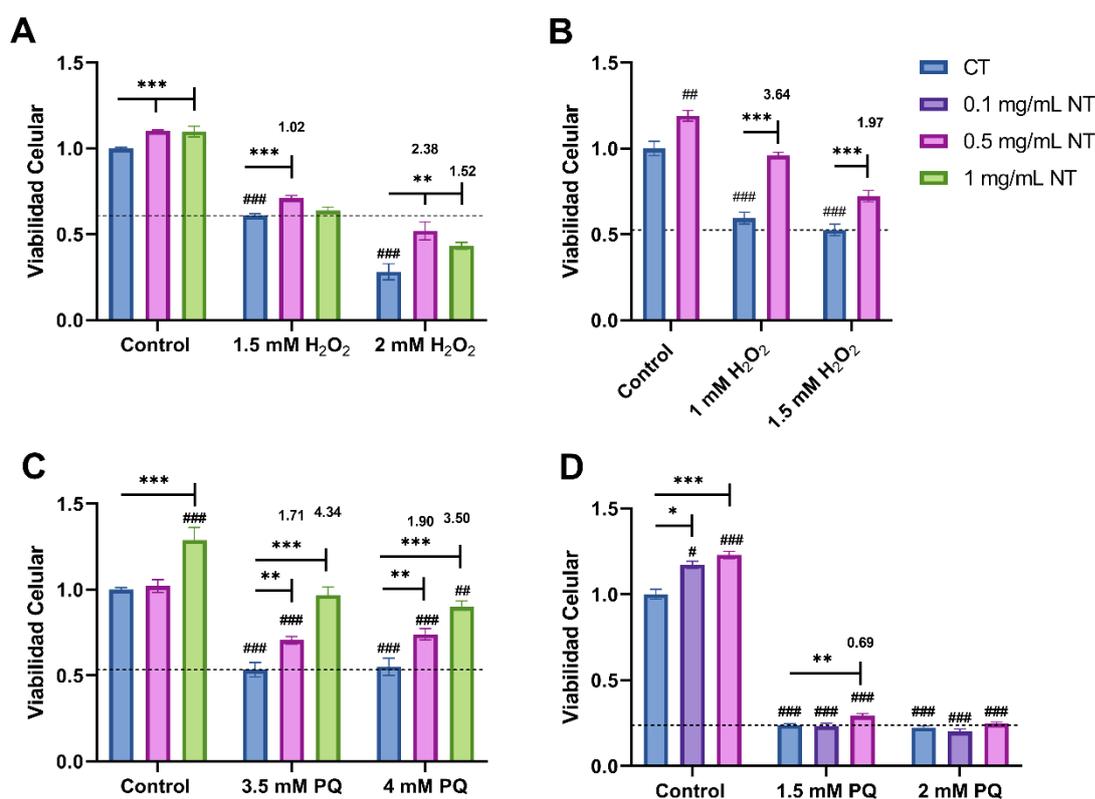


Figura 23. Capacidad antioxidante *in vitro* del nutracéutico frente a condiciones de estrés oxidativo con H_2O_2 en (A) la línea celular HT-29 y (B) HepG2, así como, frente a condiciones de estrés oxidativo con Paraquat (PQ) en (C) la línea celular HT-29 y (D) HepG2. Los datos se representan como media \pm EEM de 8 réplicas. Se representa la viabilidad celular observada mediante una línea discontinua en torno al 50% de viabilidad celular, a excepción de en (D) que corresponde a la viabilidad mínima. Se indica mediante números las unidades de recuperación frente a cada concentración de agente oxidante. Una unidad de recuperación corresponde a un aumento del 10% en la viabilidad celular. #: $p < .05$; ##: $p < .01$ y ###: $p < .001$ frente al control. *: $p < .05$; **: $p < .01$ y ***: $p < .001$ frente al control (CT) de cada concentración de agente oxidante.

4.3.3 Ensayo *in vitro* del nutracéutico sobre la lipotoxicidad

Los resultados del ensayo *in vitro* del nutracéutico sobre la lipotoxicidad en la línea celular AML12 se muestran en la **Figura 24**. Se utilizó como control positivo el fármaco semaglutida a concentraciones de 100 y 500 nM. No se observó ninguna disminución en la viabilidad celular por parte del nutracéutico ni de la semaglutida tras la incubación con ácido palmítico (PA), pero sí una tendencia positiva, no estadísticamente significativa, a aumentarla. Así mismo, se produjo una disminución de la muerte y toxicidad celular con la adición de semaglutida, que alcanzó significación

estadística a 500 nM para la toxicidad celular. Además, se comprobó que la concentración de 1 mg/mL del nutraceutico aumentó significativamente la toxicidad.

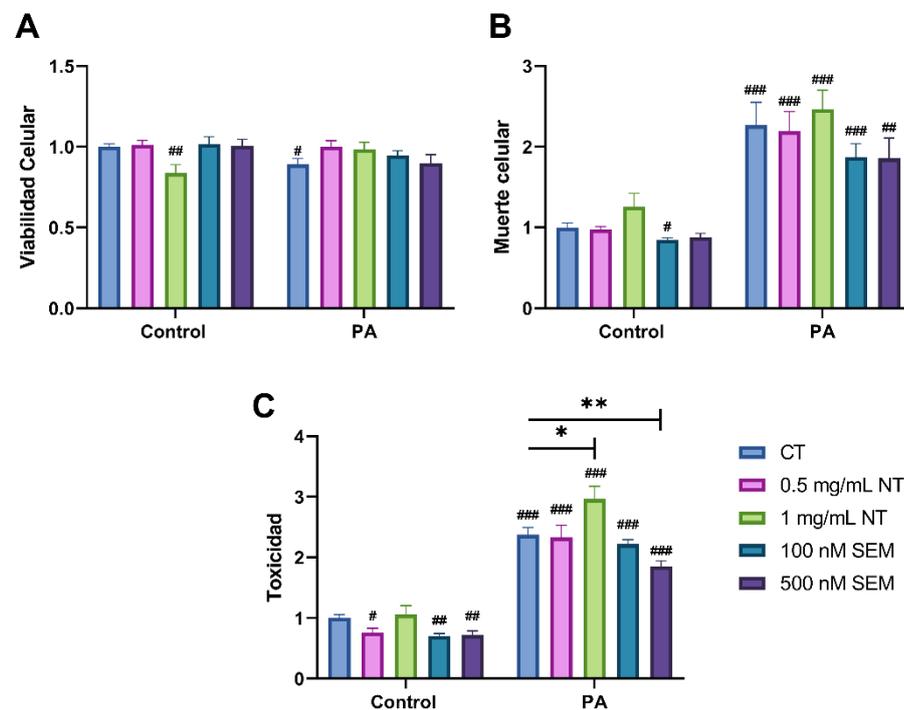


Figura 24. Capacidad antiinflamatoria *in vitro* del nutraceutico frente a condiciones proinflamatorias con ácido palmítico (PA) medida mediante (A) viabilidad celular (MTS); (B) muerte celular (LDH) y (C) toxicidad en la línea celular AML12. Los datos se representan como media \pm EEM de 8 réplicas. NT: nutraceutico; SEM: semaglutida. #: $p < .05$; ##: $p < .01$ y ###: $p < .001$ frente al control. *: $p < .05$ y **: $p < .01$ frente al control (CT) de cada experimento.

4.3.4 Determinación de acumulación de triglicéridos

El efecto del nutraceutico sobre la acumulación de triglicéridos se muestra en la **Figura 25**, dónde se observó que ambas concentraciones del nutraceutico disminuyeron marcadamente la acumulación de triglicéridos hasta un 50 %, siendo el descenso estadísticamente significativo con o sin incubación con ácido palmítico. No se observó ningún efecto estadísticamente significativo con la preincubación de semaglutida independientemente de la concentración.

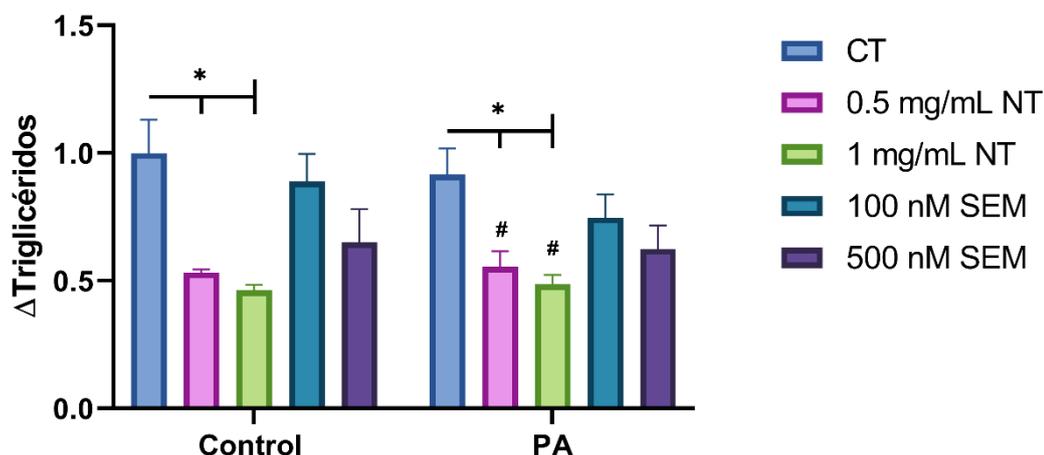


Figura 25. Determinación de la disminución en acumulación de triglicéridos por parte del nutraceutico con o sin incubación con ácido palmítico (PA) en la línea celular AML12. Los datos se representan como media \pm EEM de 3 réplicas. NT: nutraceutico; SEM: semaglutida. #: $p < .05$ frente al control; *: $p < .05$ frente al control (CT) de cada experiencia.

4.3.5 Retrotranscripción y qPCR: mi-ARN

Para comprobar la modulación por parte del nutraceutico y el semaglutida sobre la expresión de mi-ARNs, se seleccionaron el miR-21 y miR-34a, los cuales están relacionados con la acumulación de ácidos grasos hepáticos *in vitro* e *in vivo* (219–221). Los resultados del nutraceutico y semaglutida sobre la expresión relativa de miR-21 y miR-34a se muestran en la **Figura 26**. No hubo diferencias significativas en la expresión relativa de estos mi-ARNs al tratar las células con 0.5 mg/mL de nutraceutico o 500 nM de semaglutida con o sin incubación con ácido palmítico.

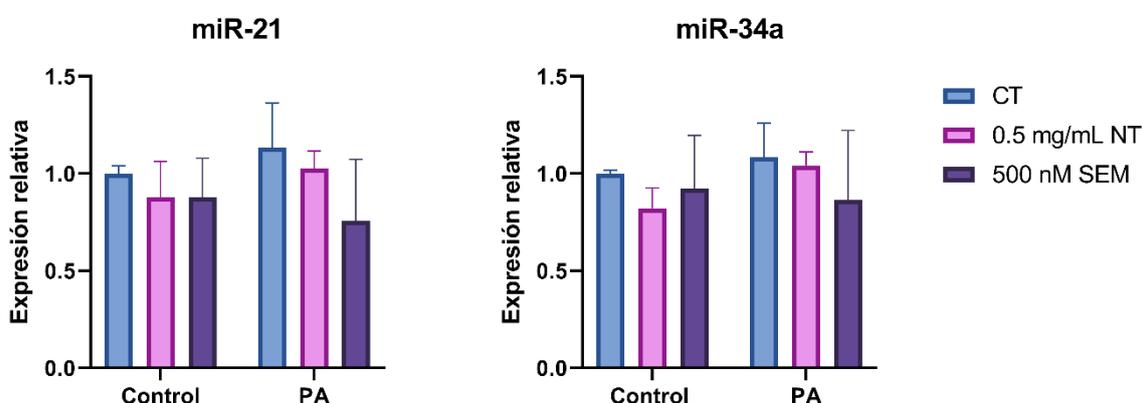


Figura 26. Efecto del nutraceutico sobre la expresión relativa de miR-21 y miR-34a con o sin incubación con ácido palmítico (PA) en la línea celular AML12. Los datos se representan como media \pm EEM de 3 réplicas. NT: nutraceutico; SEM: semaglutida.

4.3.6 Retrotranscripción y qPCR: ARNm

Para comprobar la modulación por parte del nutraceutico y la semaglutida sobre el metabolismo lipidico, se seleccionaron dos genes claves implicados en dos vias diferentes: *Cpt1a* (lipolisis) y *Srebp1* (lipogenesis)(57,66). Los efectos del nutraceutico y la semaglutida sobre la expresion relativa de estos genes se muestran en la **Figura 27**. El nutraceutico a una concentracion de 0.5 mg/mL fue capaz de inducir un aumento en la expresion de *Cpt1a* en ausencia o presencia de acido palmítico. Además, a esa concentracion y en presencia de acido palmítico disminuyó la expresion de *Srebp1*.

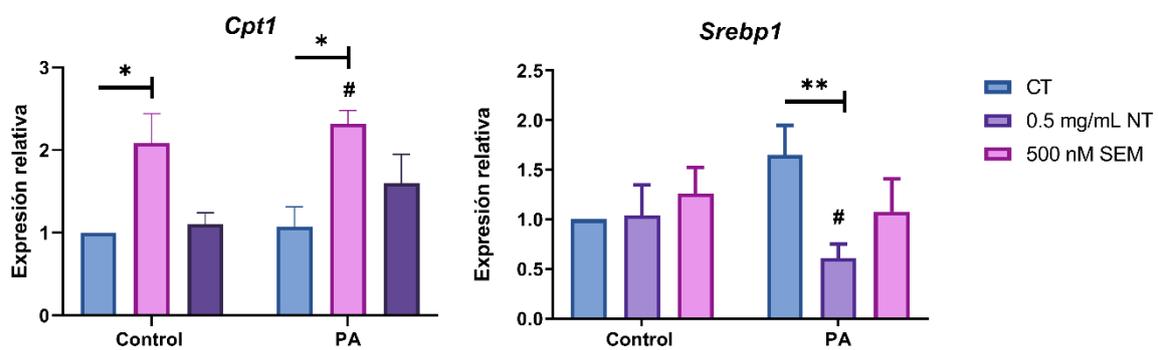


Figura 27. Efecto del nutraceutico sobre la expresion relativa de *Cpt1a* y *Srebp1* con o sin incubacion con acido palmítico (PA) en la linea celular AML12. Los datos se representan como media \pm EEM de 3 réplicas. NT: nutraceutico; SEM: semaglutida. #: $p < .05$ frente al control; *: $p < .05$ y **: $p < .01$ frente al control (CT) de cada experiencia.

4.4 Ensayos *in vivo*

4.4.1 Fase 1: Desarrollo de un modelo de obesidad inducida por la dieta

4.4.1.1 Ingesta y peso corporal

La influencia del tratamiento dietético (SD o HFHF) y de la duración del periodo experimental (13 o 21 semanas) sobre la ingesta de alimento, líquido y calorías, así como sobre el aumento de peso corporal de las ratas se muestra en la **Figura 28**. Se observó una ingesta mayor en el grupo de ratas alimentadas con dieta estándar (SD) en relación a los grupos alimentados con dieta alta en grasa y fructosa (HFHF) desde el inicio del experimento hasta el final. Por el contrario, la ingesta calórica y de líquidos fue mayor en las ratas alimentadas con HFHF a lo largo de todo el periodo experimental frente a los animales alimentados con SD. Tales diferencias condujeron a una mayor ganancia de peso corporal en las ratas que consumieron la dieta HFHF frente a las alimentadas con SD.

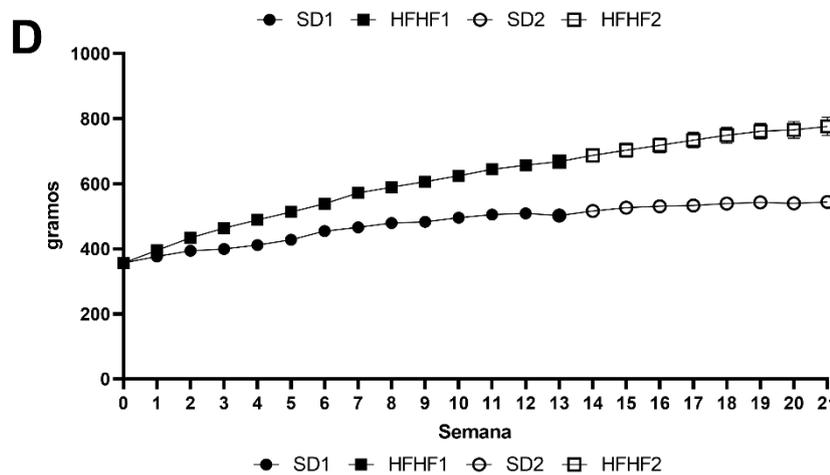
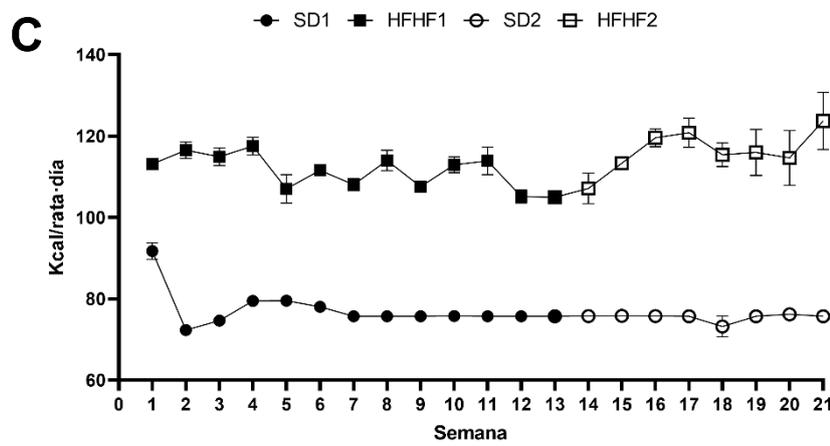
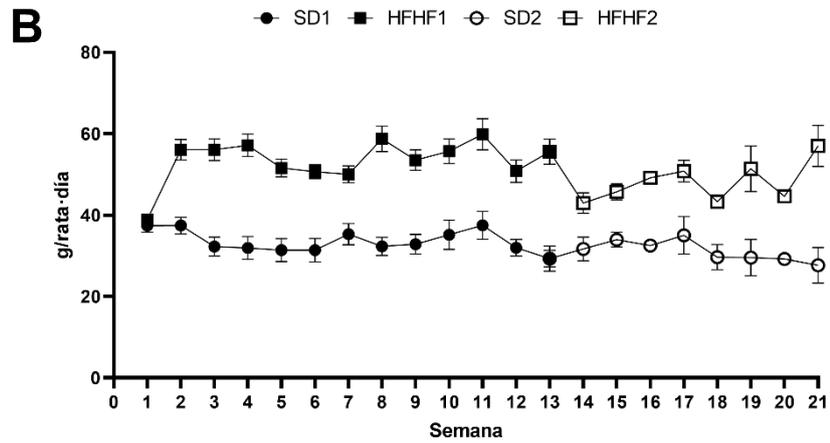
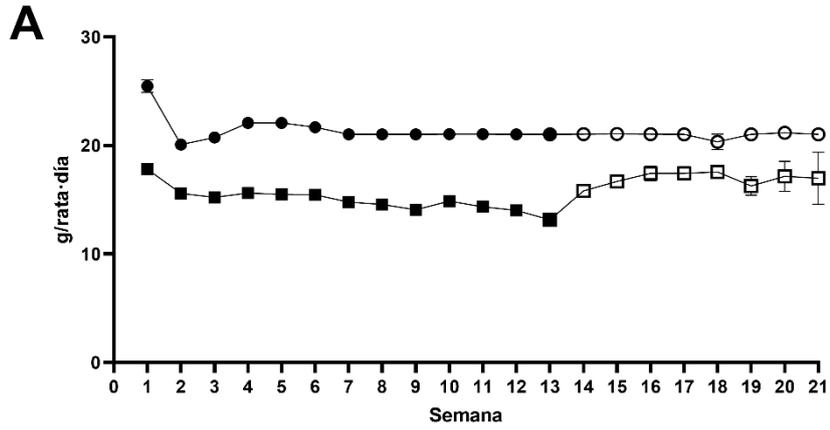


Figura 28. Efecto de la obesidad inducida por la dieta y la duración del periodo experimental sobre la ingesta de alimentos (gramos por rata y día, Figura 1A), líquidos (agua o solución de fructosa al 20%, gramos por rata y día, Figura 1B) o calorías (Kcal por rata y día, Figura 1C), y el aumento de peso corporal (gramos, Figura 1D) de las ratas Sprague-Dawley. Para diferenciar mejor los resultados, en los gráficos sólo se incluyen las semanas más representativas del periodo experimental. SD1, dieta estándar durante 13 semanas; HFHF1, dieta alta en grasa y fructosa durante 13 semanas; SD2, dieta estándar durante 21 semanas; HFHF2, dieta alta en grasa y fructosa durante 21 semanas. Los puntos y las barras representan la media y el EEM, respectivamente (n = 8).

4.4.1.2 Pesos corporales y de los órganos

El peso final de los animales fue significativamente superior en el grupo que consumió la dieta HFHF tanto, en 13 como en 21 semanas, en comparación con los animales que consumieron la dieta estándar. No hubo diferencias de peso en los animales que consumieron la dieta estándar a lo largo del periodo experimental, por lo que se observó un claro efecto entre la dieta y el tiempo (**Tabla 19**). Esta misma línea se observó en el peso total del hígado, corazón, riñón y tejido graso abdominal y epididimal. Por otro lado, el peso del ciego fue siempre superior en el grupo que consumió la dieta estándar a lo largo de todo el experimento.

4.4.1.3 Prueba de tolerancia a una sobrecarga oral de glucosa

En la última semana de cada periodo experimental los animales se sometieron a una prueba de tolerancia oral de glucosa. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 29A**. Los animales que consumieron la dieta alta en grasa y fructosa presentaron valores mayores de glucosa plasmática a lo largo de la prueba, en comparación con los animales que consumieron dieta estándar, e independientemente del tiempo. Tras realizar la prueba, los resultados fueron finalmente expresados y representados como el área bajo la curva (AUC) de cada uno de los grupos experimentales (**Figura 29B**). Hubo un claro efecto tanto del tratamiento dietético como de la duración del periodo experimental: el consumo de una dieta alta en grasa y fructosa aumentó el AUC en comparación con el consumo de una dieta estándar. Además, los valores de AUC disminuyeron con el periodo experimental en ambos grupos, pero se mantuvieron significativamente más altos en el grupo HFHF2 respecto al SD2.

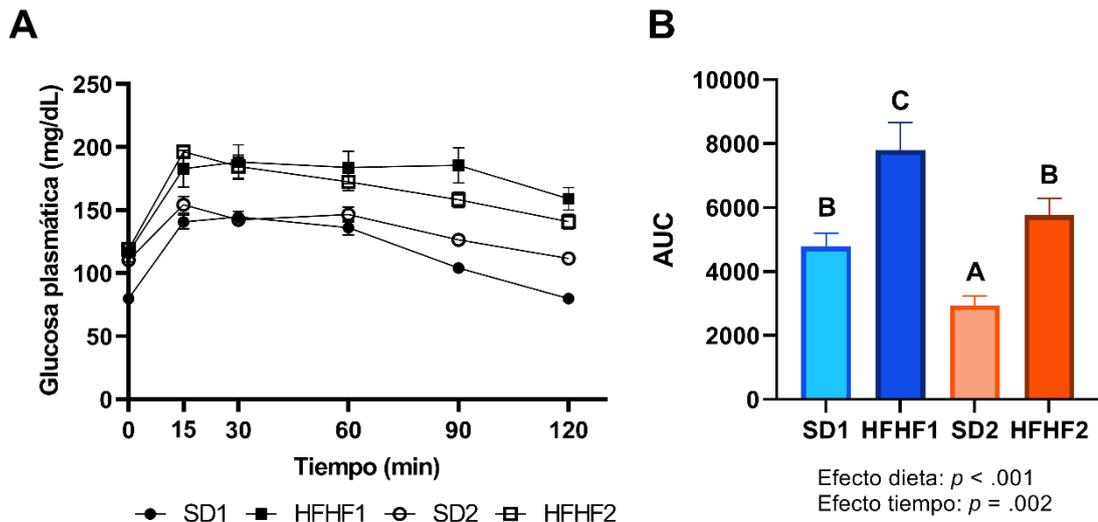


Figura 29. (A) Prueba de tolerancia oral a una sobrecarga de glucosa en los diferentes grupos experimentales. La concentración sanguínea de glucosa fue determinada antes y tras 15, 30, 60, 90 y 120 min de la sobrecarga oral de glucosa. (B) Efecto del tratamiento dietético y de la duración del periodo experimental sobre el área bajo la curva (AUC) de la prueba de tolerancia oral a una sobrecarga de glucosa. SD1, dieta estándar durante 13 semanas; HFHF1, dieta alta en grasa y fructosa durante 13 semanas; SD2, dieta estándar durante 21 semanas; HFHF2, dieta alta en grasa y fructosa durante 21 semanas. Las columnas o puntos y las barras representan la media y el EEM, respectivamente ($n = 8$). Los valores dentro de cada tratamiento seguidos de letras distintas son significativamente diferentes significativamente ($p < .05$).

4.4.1.4 Parámetros hemáticos

La duración del periodo experimental tuvo un mayor efecto sobre los parámetros hemáticos que el tipo de dieta consumida (Tabla 20). Tras 21 semanas de periodo experimental se produjo un aumento en los niveles de hemoglobina (HGB), hematocrito (HCT), volumen corpuscular medio (MCV) y hemoglobina corpuscular media (MCH) en el grupo que consumió una dieta estándar. Por otro lado, se observó que el consumo de una dieta alta en grasa y fructosa aumentó el número total de glóbulos blancos (WBC) en comparación con el consumo de una dieta estándar, mientras que la prolongación del periodo experimental produjo un descenso de este parámetro independientemente de la dieta consumida.

Tabla 19. Influencia del tratamiento dietético y el periodo experimental sobre los pesos corporales y de los distintos órganos de los animales de los cuatros grupos experimentales.

	SD1	HFHF1	SD2	HFHF2	R²	EEM	Efecto Dieta	Efecto tiempo	Efecto Dieta x Tiempo
Peso final (g)	512.0 A	643.3 B	544.3 A	776.5 C	0.81	17.9	$p < .001$	$p < .001$	$p = .009$
Hígado (g)	12.63 A	19.9 C	13.1 A	17.8 B	0.82	0.51	$p < .001$	$p = .123$	$p = .020$
Riñón (g)	1.67 A	1.84 B	1.67 A	1.83 B	0.25	0.04	$p = .001$	$p = .982$	$p = .984$
Bazo (g)	0.81 A	0.81 A	0.77 A	0.89 A	0.08	0.06	$p = .292$	$p = .741$	$p = .292$
Corazón (g)	1.47 A	1.62 A	1.54 A	1.92 B	0.48	0.06	$p < .001$	$p = .005$	$p = .077$
Encéfalo (g)	2.13 AB	2.24 B	2.09 A	2.12 AB	0.11	0.04	$p = .133$	$p = .064$	$p = .387$
Colon (g)	1.37 A	1.50 A	1.29 A	1.27 A	0.08	0.12	$p = .673$	$p = .211$	$p = .509$
Ciego (g)	0.91 B	0.75 A	0.93 B	0.78 A	0.38	0.03	$p < .001$	$p = .465$	$p = .452$
Tejido graso abdominal (g)	11.3 A	23.0 B	14.4 A	37.3 C	0.61	2.81	$p < .001$	$p = .005$	$p = .054$
Tejido graso epididimal (g)	7.59 A	16.2 B	12.9 B	20.2 C	0.63	1.25	$p < .001$	$p < .001$	$p = .001$

Los datos corresponden a la media de 8 ratas. R², coeficiente de determinación; EEM, error estándar de la media agrupada. A-C medias dentro de la misma fila con letras diferentes difieren significativamente ($p < .05$). SD1, dieta estándar durante 13 semanas; HFHF1, dieta alta en grasa y fructosa durante 13 semanas; SD2, dieta estándar durante 21 semanas; HFHF2, dieta alta en grasa y fructosa durante 21 semanas.

Tabla 20. Influencia del tratamiento dietético y el periodo experimental sobre parámetros hemáticos determinados.

	SD1	HFHF1	SD2	HFHF2	R²	EEM	Efecto Dieta	Efecto tiempo	Efecto Dieta x Tiempo
WBC (x10³/μL)	3.56 B	5.66 C	1.94 A	2.79 AB	0.6	0.39	<i>p</i> = .001	<i>p</i> < .001	<i>p</i> = .120
RBC (x10⁶/μL)	7.35 A	7.57 A	7.57 A	7.55 A	0.04	0.16	<i>p</i> = .541	<i>p</i> = .561	<i>p</i> = .478
HGB (g/dL)	13.2 A	14.0 AB	14.8 B	14.1 AB	0.29	0.29	<i>p</i> = .958	<i>p</i> = .008	<i>p</i> = .012
HCT (%)	35.4 A	35.1 A	38.4 B	36.3 AB	0.20	0.80	<i>p</i> = .144	<i>p</i> = .012	<i>p</i> = .281
PLT (x10³/μL)	617.3 A	674.6 A	693.4 A	696.8 A	0.04	59.5	<i>p</i> = .614	<i>p</i> = .416	<i>p</i> = .653
MCV (fL)	48.1 A	46.3 A	50.8 B	48.2 A	0.30	0.80	<i>p</i> = .009	<i>p</i> = .008	<i>p</i> = .607
MCH (pg)	18.0 A	18.5 A	19.6 B	18.6 A	0.25	0.31	<i>p</i> = .395	<i>p</i> = .010	<i>p</i> = .031
MCHC (g/dL)	37.5 A	39.9 B	38.7 AB	38.7 AB	0.22	0.51	<i>p</i> = .022	<i>p</i> = .987	<i>p</i> = .020
RDW (%)	16.0 A	15.9 A	16.8 A	16.4 A	0.06	0.30	<i>p</i> = .348	<i>p</i> = .054	<i>p</i> = .662

Los datos corresponden a la media de 8 ratas. R², coeficiente de determinación; EEM, error estándar de la media agrupada. A-C medias dentro de la misma fila con letras diferentes difieren significativamente (*p* < .05). WBC, número total de glóbulos blancos (x10³/μL); RBC, número total de glóbulos rojos (x10⁶/μL); HGB, hemoglobina (g/dL); HCT, % volumen de sangre ocupado por glóbulos rojos (hematocrito); PLT, número total de plaquetas ((x10³/μL); MCV, volumen corpuscular medio (fL); MCH, hemoglobina corpuscular media (pg); MCHC, concentración de hemoglobina corpuscular media (g/dL); RDW, amplitud de distribución eritrocitaria (%). SD1, dieta estándar durante 13 semanas; HFHF1, dieta alta en grasa y fructosa durante 13 semanas; SD2, dieta estándar durante 21 semanas; HFHF2, dieta alta en grasa y fructosa durante 21 semanas.

4.4.1.5 Bioquímica plasmática

El efecto del tratamiento dietético y el periodo experimental sobre los diferentes parámetros determinados relacionados con el metabolismo lipídico, así como marcadores de riesgo cardiovascular y enzimas plasmáticas relacionadas con daño hepático se muestran en la **Tabla 21**.

En cuanto a los parámetros relacionados con el metabolismo lipídico, hubo un efecto significativo de la interacción dieta × tiempo, se observó un aumento muy pronunciado en los niveles de triglicéridos tras el consumo de una dieta alta en grasa y fructosa durante 13 semanas en comparación con el consumo de una dieta estándar. Al aumentar el periodo experimental dichos valores disminuyeron hasta valores similares al grupo de consumo de una dieta estándar. Esto último también se observó en los niveles de colesterol total. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en los niveles de HDL- y LDL-colesterol.

Por otro lado, los marcadores de riesgo cardiovascular siguieron la misma tendencia descrita para los niveles de triglicéridos, como se pudo observar en el índice triglicéridos-glucosa, no-HDL y TG/HDL. Estos índices presentaron valores más elevados a las 13 semanas en el grupo HFHF1 en comparación con SD1 y tras 21 semanas de periodo experimental disminuyeron los valores en el grupo que consumió una dieta alta en grasa y fructosa, igualándose los valores entre los dos grupos experimentales.

Las enzimas plasmáticas relacionadas con daño hepático tuvieron la misma evolución que los resultados previamente comentados; la actividad enzimática tanto de la aspartato aminotransferasa (AST), gamma-glutamilttransferasa (GGT) y fosfatasa alcalina (ALP) aumentó tras 13 semanas de consumo de una dieta alta en grasa y fructosa en comparación con la dieta estándar, e igualándose los niveles de actividad enzimática entre ambos grupos experimentales tras 21 semanas de periodo experimental. El envejecimiento también produjo un efecto sobre los niveles de actividad enzimática, ya que disminuyó la actividad de la AST y aumentó la de la GGT en el grupo de dieta estándar. Finalmente, la actividad enzimática de la alanina aminotransferasa (ALT) aumentó significativamente por efecto del tipo de dieta consumida a las 21 semanas de periodo experimental, presentando valores más elevados el grupo HFHF2 en comparación con SD2.

Tabla 21. Efecto de la dieta y del periodo experimental sobre distintos parámetros plasmáticos.

	SD1	HFHF1	SD2	HFHF2	R²	EEM	Efecto Dieta	Efecto tiempo	Efecto Dieta x Tiempo
Triglicéridos (mg/dL)	83.9 A	332.3 B	50.5 A	71.7 A	0.75	23.2	$p < .001$	$p < .001$	$p < .001$
Colesterol total (mg/dL)	66.6 AB	78.9 B	61.7 A	56.6 A	0.16	5.51	$p = .523$	$p = .020$	$p = .124$
HDL-colesterol (mg/dL)	26.3 A	28.9 A	24.9 A	21.3 A	0.05	2.53	$p = .858$	$p = .860$	$p = .226$
LDL-colesterol (mg/dL)	6.58 A	7.05 A	6.39 A	6.13 A	0.03	0.75	$p = 0.890$	$p = .461$	$p = .626$
AST (U/L)	79.0 B	109.8 C	50.8 A	59.5 AB	0.45	8.51	$p = .028$	$p < .001$	$p = .205$
ALT (U/L)	19.3 AB	22.8 BC	16.7 A	25.5 C	0.26	1.81	$p = .002$	$p = .953$	$p = .155$
GGT (U/L)	2.27 A	4.16 B	4.03 B	4.19 B	0.40	0.33	$p = .005$	$p = .012$	$p = .015$
ALP (U/L)	60.9 A	121.1 B	59.1 A	48.9 A	0.62	7.74	$p = .003$	$p < .001$	$p < .001$
Índice aterogénico	2.54 AB	2.83 B	2.51 A	2.66 AB	0.12	0.09	$p = .028$	$p = .274$	$p = .484$
Índice triglicéridos-glucosa	8.07 A	9.91 B	7.98 A	8.29 A	0.77	0.15	$p < .001$	$p < .001$	$p < .001$
no-HDL	40.3 B	49.6 C	36.8 AB	31.6 A	0.38	2.80	$p = .474$	$p = .001$	$p = .014$
TG/HDL	3.15 A	14.4 B	2.03 A	3.63 A	0.78	0.94	$p < .001$	$p < .001$	$p < .001$

Los datos corresponden a la media de 8 ratas. R², coeficiente de determinación; EEM, error estándar de la media agrupada. A-C medias dentro de la misma fila con letras diferentes difieren significativamente ($p < .05$). AST, aspartato aminotransferasa; ALT, alanina aminotransferasa; GGT, gamma-glutamyltransferasa; ALP, fosfatasa alcalina; TG, triglicéridos. SD1, dieta estándar durante 13 semanas; HFHF1, dieta alta en grasa y fructosa durante 13 semanas; SD2, dieta estándar durante 21 semanas; HFHF2, dieta alta en grasa y fructosa durante 21 semanas.

4.4.1.6 Peso del hígado y contenido de grasa hepática

El tratamiento dietético con una dieta alta en grasa y fructosa (HFHF1, HFHF2) tuvo un efecto significativo tanto sobre el peso del hígado como sobre el contenido total de grasa hepática (**Figura 30**), que mostró valores más elevados en los grupos HFHF en comparación con los alimentados con la dieta SD. La duración del periodo experimental afectó significativamente a la cantidad de grasa hepática en los grupos HFHF, resultando en valores mayores de dicho parámetro a las 21 frente a las 13 semanas (**Tabla 22**).

Tabla 22. Efecto de la dieta y el periodo experimental sobre la grasa hepática.

	SD1	HFHF1	SD2	HFHF2	R ²	EEM	Efecto Dieta	Efecto tiempo	Efecto Dieta x Tiempo
Grasa hepática (g)	0.7 A	1.31 B	0.67 A	1.4 B	0.44	0.13	$p < .001$	$p = .831$	$p = .635$
Grasa hepática (%)	5.52 AB	7.27 AB	4.98 A	8.00 B	0.16	0.83	$p = .007$	$p = .909$	$p = .447$

Los datos corresponden a la media de 8 ratas. R², coeficiente de determinación; EEM, error estándar de la media agrupada. A-C medias dentro de la misma fila con letras diferentes difieren significativamente ($p < .05$). SD1, dieta estándar durante 13 semanas; HFHF1, dieta alta en grasa y fructosa durante 13 semanas; SD2, dieta estándar durante 21 semanas; HFHF2, dieta alta en grasa y fructosa durante 21 semanas.

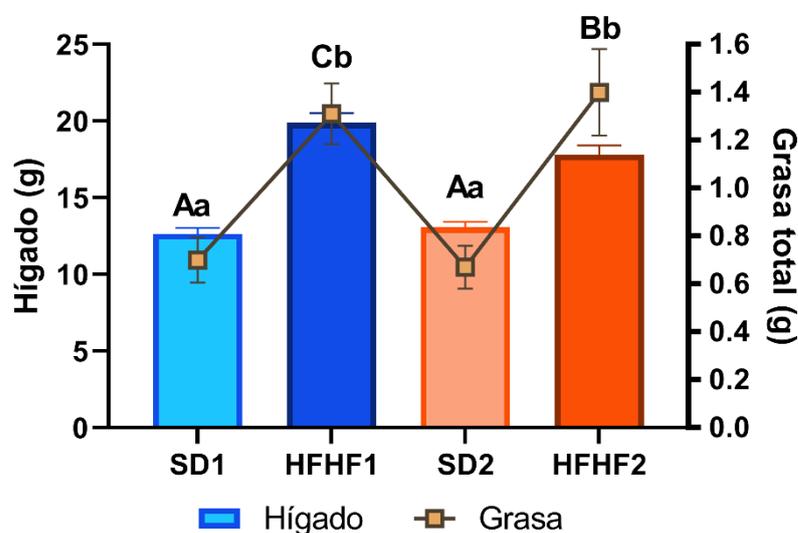


Figura 30. Efecto del tratamiento dietético y la duración del periodo experimental sobre el peso del hígado y la grasa hepática total (g). Las columnas o puntos y las barras representan la media y el EEM, respectivamente (n = 8). Los valores dentro de cada tratamiento seguidos de letras distintas son significativamente diferentes (A-C, peso hepático; a-b, grasa hepática total) $p < .05$. SD1, dieta estándar durante 13 semanas; HFHF1, dieta alta en grasa y fructosa durante 13 semanas; SD2, dieta estándar durante 21 semanas; HFHF2, dieta alta en grasa y fructosa durante 21 semanas. Peso del hígado, efecto de la dieta: $p < .001$; Dieta x Tiempo: $p = .02$. Grasa total, efecto de la dieta: $p < .001$.

4.4.1.7 Determinación del perfil de ácidos grasos del hígado

En la **Tabla 23** se presenta el efecto del tratamiento dietético y la duración del periodo experimental sobre el perfil y los índices de ácidos grasos hepáticos. La mayor proporción de ácidos grasos hepáticos correspondió a los saturados (ácidos palmítico y esteárico), seguido de los monoinsaturados (ácido palmitoleico, oleico y vaccénico) y poliinsaturados (linoleico, dihomo-gamma-linolénico (DGLA), araquidónico y docosahexaenoico). La obesidad inducida por la dieta (DIO) tuvo un efecto significativo en el perfil de ácidos grasos hepáticos, resultando en porcentajes más altos de ácido oleico y linoleico, junto con porcentajes más bajos de ácidos saturados (palmítico y esteárico), palmitoleico, esteárico, DGLA y docosahexaenoico.

Los índices de elongasa-desaturasa (docosahexaenoico/linolénico y araquidónico/linoleico) se modificaron significativamente por la administración de la dieta, con índices más bajos en los animales que consumieron dieta estándar (SD) frente a dieta alta en grasa y fructosa (HFHF). Además, la actividad esteroil-CoA desaturasa se vio afectada de forma diferencial por la DIO, mostrando valores más altos para la relación oleico/esteárico y más bajos para la relación palmitoleico/palmítico. La relación palmitoleico/palmítico también se vio alterada por la duración del periodo experimental, disminuyendo en la semana 21. La actividad de la delta-5 desaturasa (araquidónico/DGLA) se caracterizó por los efectos opuestos de la DIO en relación con la duración del periodo experimental (disminución a las 13 semanas o aumento a las 21 semanas), lo que dio lugar a una interacción significativa dieta x tiempo.

Tabla 23. Influencia de la obesidad inducida por la dieta y de la duración del periodo experimental en el perfil de ácidos grasos hepáticos (%) y en los índices de ácidos grasos de las ratas.

	SD1	HFHF1	SD2	HFHF2	R²	EEM	Efecto Dieta	Efecto tiempo	Efecto Dieta x Tiempo
Ácido palmítico (C16:0)	29.9 A	27.0 A	33.8 B	26.4 A	0.58	0.84	$p < .001$	$p = .096$	$p = .026$
Ácido palmitoleico (C16:1)	5.92 B	4.37 AB	5.39 B	2.46 A	0.44	0.50	$p < .001$	$p = .038$	$p = .222$
Ácido esteárico (C18:0)	11.4 B	7.56 A	10.1 AB	9.41 AB	0.27	0.68	$p = .006$	$p = .71$	$p = .048$
Ácido oleico (C18:1n9)	25.6 A	31.2 B	26.4 AB	29.3 AB	0.21	1.26	$p = .006$	$p = .713$	$p = .339$
Ácido linoleico (C18:2n6)	9.56 AB	14.1 BC	8.61 A	17.4 C	0.55	1.10	$p < .001$	$p = .356$	$p = .098$
DGLA (C20:3n6)	0.36 B	0.32 AB	0.36 B	0.21 A	0.36	0.03	$p = .004$	$p = .063$	$p = .086$
Ácido araquidónico (C20:4n6)	10.5 A	7.84 A	9.55 A	9.73 A	0.13	0.91	$p = .242$	$p = .631$	$p = .18$
Ácido docosahexaenoico (C22:6n3)	2.28 B	1.23 A	2.04 B	1.61 AB	0.32	0.18	$p = .001$	$p = .741$	$p = .137$
Ácido vaccénico (C18:1n7)	4.08 B	3.91 AB	3.16 AB	2.83 A	0.27	0.26	$p = .391$	$p = .002$	$p = .789$
Otros	1.28 A	1.61 B	1.19 A	1.34 A	0.44	0.06	$p = .001$	$p = .01$	$p = .161$
AGS	41.4 B	35.6 A	44.8 C	36.0 A	0.75	0.76	$p < .001$	$p = .034$	$p = .101$
AGM	35.6 A	39.6 A	35.0 A	34.7 A	0.07	1.62	$p = .309$	$p = .138$	$p = .239$

AGP	23.0 AB	24.8 AB	20.2 A	29.3 B	0.29	1.63	$p = .006$	$p = .645$	$p = .058$
DC/LN	11.2 AB	5.65 A	16.1 B	5.20 A	0.53	1.42	$p < .001$	$p = .169$	$p = .103$
ARA/LE	1.13 B	0.62 B	1.22 B	0.61 A	0.53	0.09	$p < .001$	$p = .709$	$p = .599$
PE/PI	0.20 B	0.16 B	0.16 AB	0.09 A	0.39	0.02	$p = .006$	$p = .004$	$p = .403$
OLE/STE	2.61 A	4.65 A	2.75 A	3.75 A	0.16	0.52	$p = .014$	$p = .516$	$p = .375$
ARA/EI	34.9 AB	27.0 A	26.8 A	49.8 B	0.44	3.53	$p = .068$	$p = .077$	$p = .001$

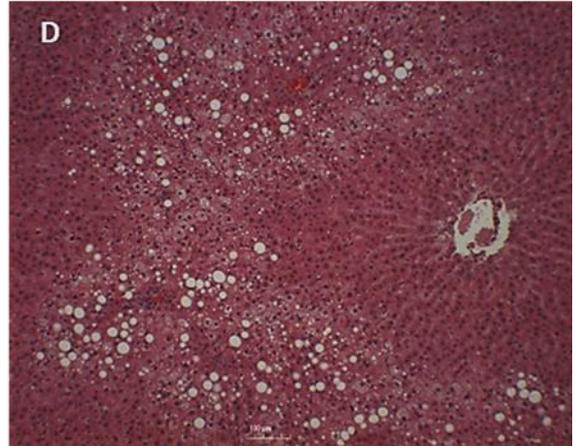
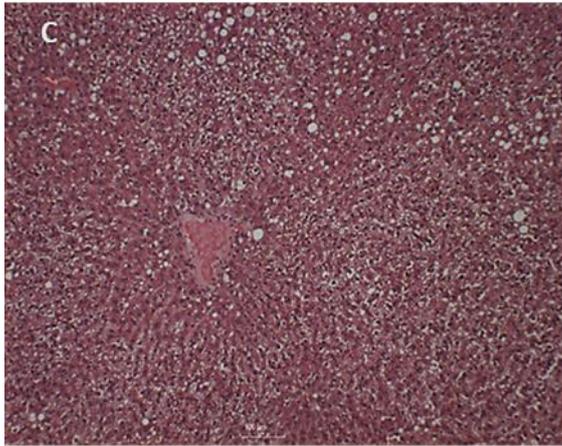
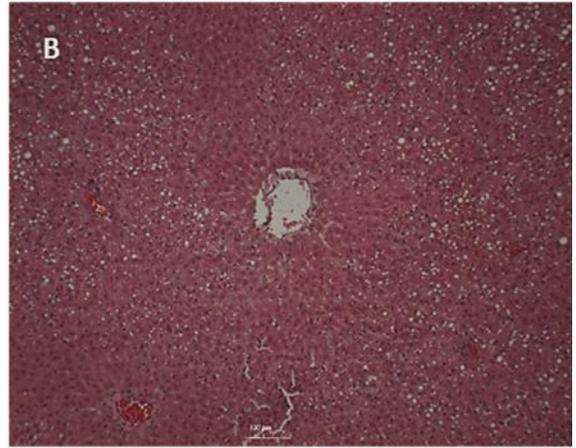
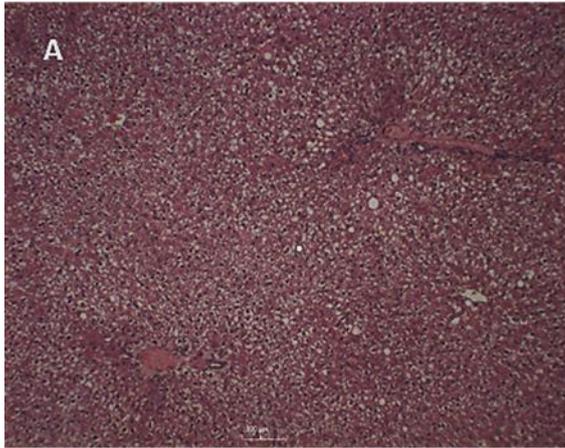
Los datos corresponden a la media de 8 ratas. A-C medias dentro de la misma fila con letras diferentes difieren significativamente ($p < .05$). DGLA, dihomogamma-linolénico; AGS, ácidos grasos saturados; AGM, ácidos grasos monoinsaturados; AGP, ácidos grasos poliinsaturados; DC/LN, ácido docosahexaenoico/linolénico (desaturasa-elongasa); ARA/LE, ácido araquidónico/linoleico (desaturasa-elongasa); PE/PI, ácido palmitoleico/palmitico (actividad estearil-CoA); OLE/STE, ácido oleico/esteárico (actividad estearil-CoA); ARA/EI, ácido araquidónico/DGLA (5-desaturasa). SD1, dieta estándar durante 13 semanas; HFHF1, dieta alta en grasa y fructosa durante 13 semanas; SD2, dieta estándar durante 21 semanas; HFHF2, dieta alta en grasa y fructosa durante 21 semanas.

4.4.1.8 Valoración histológica del hígado

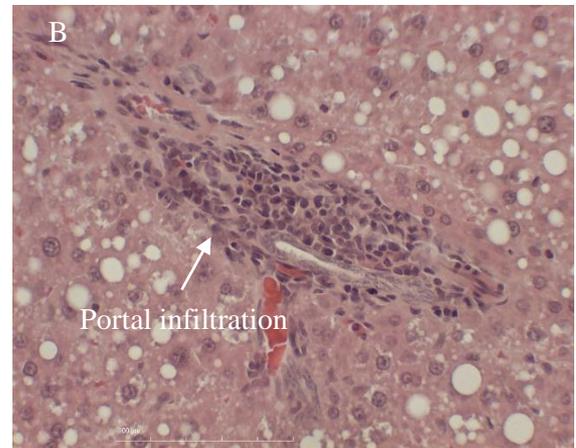
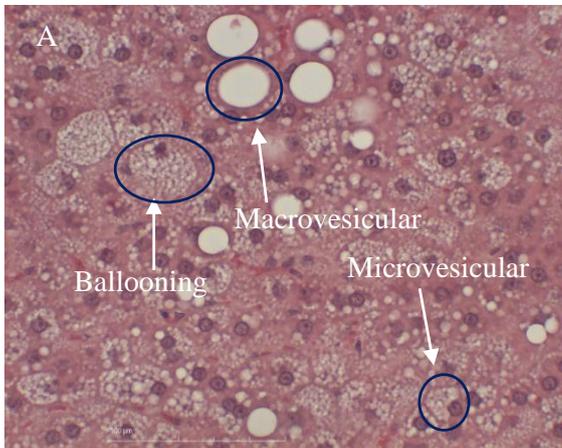
Los cambios histológicos hepáticos resultantes de la DIO a lo largo de 13 o 21 semanas de periodo experimental se describen en las **Figura 31A-C** y en las **Tabla 24** y **Tabla 25**. Los animales sometidos a los tratamientos dietéticos SD o HFHF durante 13 semanas presentaron esteatosis hepática de leve a moderada, principalmente microvesicular, con un bajo grado de esteatosis macrovesicular o balonización celular (**Figura 31A-B**). En el grupo experimental SD, entre el 33-66% de las ratas presentaron esteatosis, mientras que ese porcentaje se elevó a más del 66% en los animales del grupo HFHF (**Tabla 24**). Por el contrario, las ratas alimentadas durante 21 semanas con la dieta SD presentaban un grado similar de esteatosis (33-66%), pero una menor extensión de los cambios microvesiculares y unos cambios macrovesiculares ligeramente superiores. Entre el 33 y el 66% de las ratas del grupo experimental alimentado durante 21 semanas con HFHF mostraron esteatosis. Sin embargo, los cambios macrovesiculares experimentaron un marcado aumento a expensas de la esteatosis microvesicular, mientras que un número significativamente mayor de hepatocitos mostró claros signos de balonización. Curiosamente, la esteatosis macrovesicular tuvo lugar principalmente en la zona convexa del lóbulo hepático seleccionado en forma de columnas que se extendían radialmente (**Figura 31C**).

El índice de puntuación de NAFLD (NAS), señala alteraciones histológicas hepáticas que pueden ser potencialmente revertidas como la esteatosis, la inflamación lobular y la balonización. Las puntuaciones de las ratas alimentadas con la dieta SD a lo largo del periodo experimental de 13 o 21 semanas correspondieron a un valor de 2 (sin NAFLD), mientras que la DIO durante 13 o 21 semanas condujo a valores de 3 y 4 (probable NAFLD), respectivamente (**Tabla 25**).

A



B



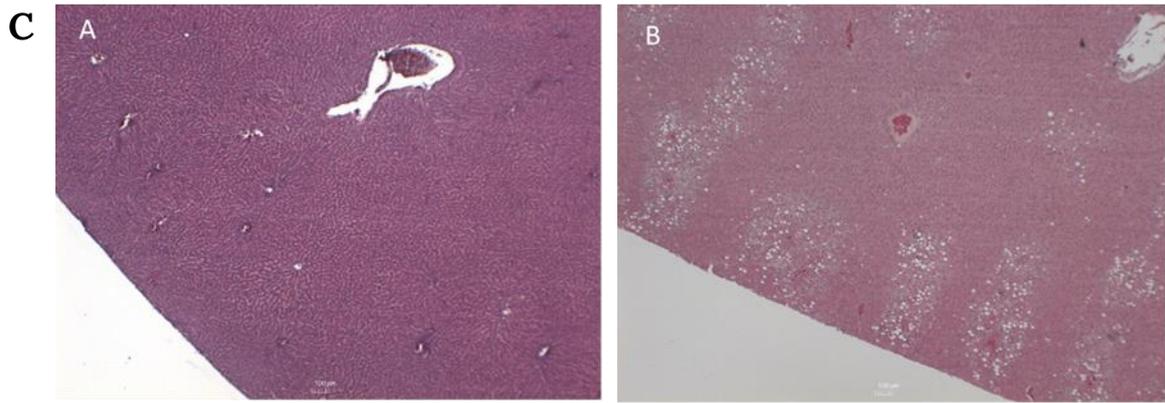


Figura 31. Imágenes de microscopía óptica de preparaciones hepáticas de ratas alimentadas con dietas SD o HFHF a lo largo de 13 o 21 semanas de periodo experimental. **Figura 31A**, efecto de la inducción dietética de la obesidad y de la duración del periodo experimental sobre la histología hepática (tinción de hematoxilina-eosina) de ratas Sprague Dawley (50x). (A) SD1, (B) SD2, (C) HFHF1, (D) HFHF2. Las fotografías son representativas de hígados de 8 ratas diferentes para cada grupo experimental. **Figura 31B**, principales alteraciones de la histología hepática causadas por el tratamiento dietético y la duración del periodo experimental. A, esteatosis; B, inflamación (tinción de hematoxilina-eosina, 200x). Las fotografías son representativas de hígados de 8 ratas diferentes de cada grupo experimental. **Figura 31C**, micrografías que muestran el área convexa de preparaciones hepáticas de diferentes grupos experimentales de ratas Sprague-Dawley (tinción de hematoxilina-eosina, 20x). A, dieta estándar (13 semanas), B, HFHF2. Las fotografías son representativas de hígados de 8 ratas diferentes para cada grupo experimental. SD1, dieta estándar durante 13 semanas; HFHF1, dieta alta en grasa y fructosa durante 13 semanas; SD2, dieta estándar durante 21 semanas; HFHF2, dieta alta en grasa y fructosa durante 21 semanas.

Tabla 24. Puntuación cruzada semicuantitativa de las alteraciones histológicas asociadas a la obesidad inducida por la dieta y a la duración del periodo experimental.

	Cambio microvesicular	Cambio macrovesicular	Balonización	Inflamación periportal	Inflamación lobular	Fibrosis
SD1	+ / ++	- / +	-	- / +	-	-
HFHF1	++	- / +	-	- / +	-	-
SD2	+	- / +	-	-	-	-
HFHF2	- / +	+	- / +	- / +	-	-

(-) inexistente, (+) leve, (++) leve-moderado, (+++) moderado, (+++++) severo, (- / +) entre inexistente y leve, (+ / ++) entre leve y leve-moderado. SD1, dieta estándar durante 13 semanas; HFHF1, dieta alta en grasa y fructosa durante 13 semanas; SD2, dieta estándar durante 21 semanas; HFHF2, dieta alta en grasa y fructosa durante 21 semanas.

Tabla 25. Sistema de puntuación semicuantitativo para evaluar el rango de características histológicas de NAFLD en hígado de ratas Sprague Dawley tratadas con SD o HFHF en diferentes etapas del periodo experimental.

	Ítem	Definición	Puntuación	SD1	SD2		HFHF1	HFHF2
ESTEATOSIS	Grado Baja a media potencia de afectación parenquimatosa por esteatosis	<5%	0	2	2		3	2
		5%-33%	1					
		33%-66%	2					
		>66%	3					
	Localización Patrón de distribución predominante	Zona 3 (Centrolobulillar)	0	1	1		1	1
		Zona 1 (Periportal)	1					
		Azonal	2					
		Panacinar	3					
	Esteatosis microvesicular Parches contiguos	Ausencia	0	1	1		1	1
		Presencia	1					
INFLAMACIÓN	Inflamación lobular Evaluación global de todos los focos inflamatorios	Sin focos	0	0	0		0	0
		<2 focos por campo 200 x	1					
		2-4 focos por campo 200 x	2					
		>4 focos por campo 200 x	3					
	Microgranulomas Pequeños agregados de macrófagos	Ausencia	0	0	0		0	0
		Presencia	1					
	Lipogranulomas grandes Generalmente en áreas portales o adyacentes a venas centrales	Ausencia	0	0	0		0	0
		Presencia	1					
	Inflamación portal Evaluado desde bajo aumento	Ninguna o mínima	0	0	0		0	0
		Mayor que mínima	1					

LESIÓN CELULAR HEPÁTICA	Balonización o Degeneración balonaria	Ninguna	0	0	0	0	2	
		Pocas células balonizadas	1					
		Muchas células/balonización prominente	2					
	Cuerpos acidófilos	Ninguno o poco frecuente	0	0	0	0	0	
		Muchos	1					
	Macrófagos pigmentados	Ninguno o poco frecuente	0	0	0	0	0	
		Muchos	1					
	Megamitocondria	Ninguna o poco frecuente	0	0	0	0	0	
		Muchas	1					
	OTROS HALLAZGOS	Cuerpos de Mallory o hialina alcohólica Visible en manchas habituales	Ninguno o poco frecuente	0	0	0	0	0
			Muchos	1				
		Núcleos glucogenados o Núcleos glucogénicos Parches contiguos	Ninguno o poco frecuente	0	0	0	0	0
Muchos			1					
FIBROSIS	Etapas	Ninguna	0	0	0	0	0	
		Perisinusoidal o periportal	1					
		Leve, zona 3, perisinusoidal	1A					
		Moderada, zona 3, perisinusoidal	1B					
		Portal/periportal	1C					
		Perisinusoidal y portal/periportal	2					
		Fibrosis en puente	3					
		Cirrosis	4					

Puntuación NAS (Grado de esteatosis + Inflamación lobular + Balonización) =	2	2	3	4
--	---	---	---	---

SD1, dieta estándar durante 13 semanas; HFHF1, dieta alta en grasa y fructosa durante 13 semanas; SD2, dieta estándar durante 21 semanas; HFHF2, dieta alta en grasa y fructosa durante 21 semanas.

4.4.1.9 Análisis transcriptómico del hígado

Se llevó a cabo un perfil transcriptómico hepático completo (más de 32.000 genes, **Figura 32**) en ratas alimentadas con SD o HFHF para estudiar la influencia del tratamiento dietético y la duración del periodo experimental sobre la estructura celular, el metabolismo de la glucosa y los lípidos, así como en la actividad enzimática antioxidante y detoxificante. Como era de esperar, estos dos factores indujeron cambios profundos en la expresión de genes hepáticos. Al comparar las ratas DIO y magras en la semana 13 del periodo experimental, un total de 4506 transcritos hepáticos se regularon diferencialmente de acuerdo con el criterio de dos filtros (tasa de cambio $> 1,3$ o $< -1,3$, $p < .05$). De ellos, 645 transcritos estaban regulados al alza y 3861 a la baja en el grupo HFHF1 frente a SD1. Se hicieron comparaciones similares entre los primeros grupos y aquellos en los que el periodo experimental duró 21 semanas: SD2 vs SD1 (948 regulados al alza, 1551 regulados a la baja), HFHF2 vs HFHF1 (3505 regulados al alza, 1364 regulados a la baja) y HFHF2 vs SD2 (1222 regulados al alza, 1781 regulado a la baja). Entre los transcritos hepáticos regulados diferencialmente según el consumo de la dieta HFHF o la duración del periodo experimental, se seleccionaron 32 en función de su acción fisiológica y se filtraron en tres categorías: estructura celular, metabolismo de glucosa/lípidos y capacidad antioxidante y desintoxicante (**Tabla 8**).

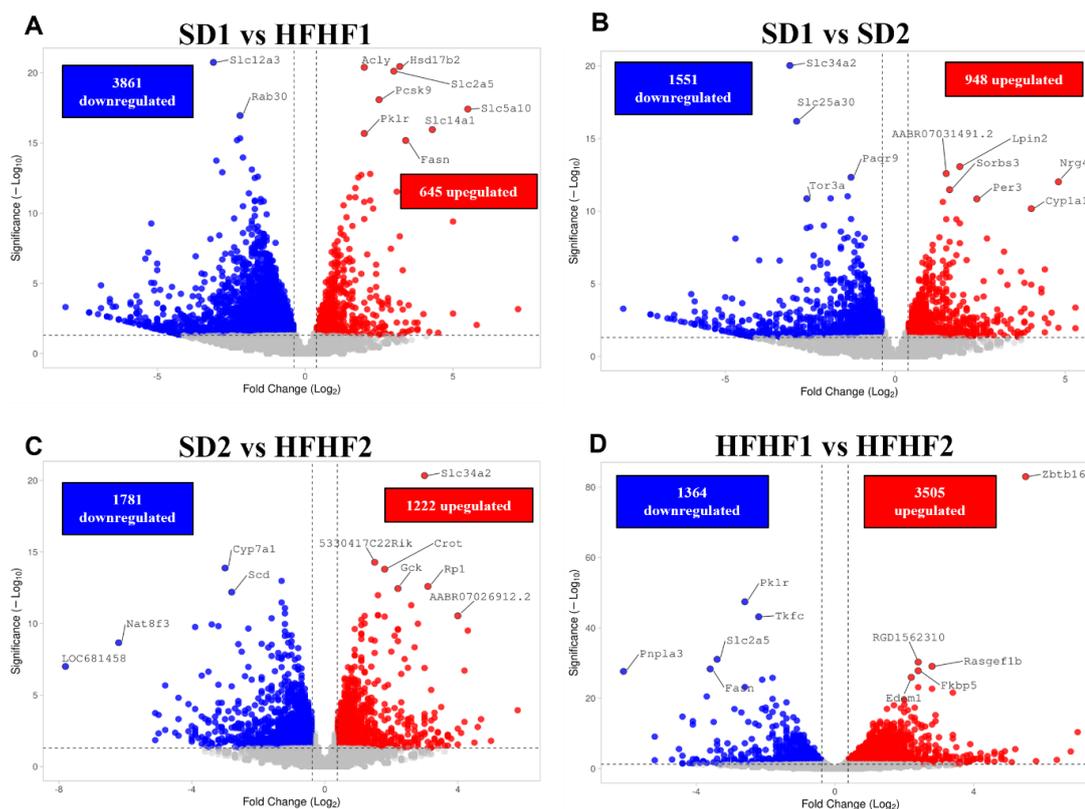


Figura 32. Gráfico volcano que muestra los transcritos hepáticos regulados diferencialmente entre los grupos experimentales (n = 6): (A) SD1 frente a HFHF1, (B) SD1 frente a SD2, (C) SD2 frente a HFHF2 y (D) HFHF1 frente a HFHF2. Los criterios de filtrado doble se indican mediante líneas discontinuas horizontales (valor $p < .05$) y verticales (tasa de cambio (*fold change*): $> \log_2 (1,3)$ o $< \log_2 (-1,3)$). Los transcritos en las esquinas superior izquierda y superior derecha representan los transcritos regulados a la baja y al alza, respectivamente. SD1, dieta estándar durante 13 semanas; HFHF1, dieta alta en grasa y fructosa durante 13 semanas; SD2, dieta estándar durante 21 semanas; HFHF2, dieta alta en grasa y fructosa durante 21 semanas.

4.4.1.10 Expresión génica en hígado

Para confirmar los resultados del análisis del transcriptoma hepático, se llevó a cabo un análisis de expresión qPCR en los genes seleccionados. En las **Tabla 26A-D** se presentan los efectos del tratamiento dietético y la duración del periodo experimental sobre la expresión hepática de los transcritos implicados en la estructura celular, el metabolismo lipídico y la actividad antioxidante y detoxificante. La expresión de los genes agrupados en la categoría de estructura celular se vio afectada de forma diferencial por el tratamiento dietético con una dieta HFHF que dio lugar a una inducción significativa de *Col26a1*, *Psmb9*, *Gadd45a* y *Slc2a2* en comparación con la dieta SD en la semana 13 (**Tabla 26A**), mientras que *Cdkn1a*, *Myc*, *Abcg5* y *Slc34a2* fueron reducidos significativamente. Por otro lado, el tratamiento con HFHF provocó un aumento significativo de la expresión de *Cdkn1a*, *Gdf15*, *Myc* y *Slc34a2* frente a la SD en la semana 21, mientras que disminuyó significativamente la de *Slc2a2*. La duración del

también mostró un efecto significativo sobre la expresión génica, causando una disminución general en la expresión de la mayoría de los transcritos estudiados, con la excepción de *Mmp15* tanto en los grupos SD y HFHF o de *CdKn1a* y *Myc* solo con el tratamiento HFHF.

En cuanto a la expresión de genes lipogénicos (**Tabla 26B**), la DIO a medio plazo causó una marcada regulación al alza del factor de transcripción *Srebf1* y de los transcritos *Hmgcr*, *Pnpla3*, *Fasn*, *Scd1* y *Fabp5* asociados a la síntesis de colesterol, la acumulación de grasa hepática, la síntesis de lípidos y ácidos grasos o el transporte de lípidos en la semana 13. Por el contrario, la mayoría de los transcritos anteriores a la DIO en la semana 13 estaban asociados a la síntesis de colesterol. Por el contrario, la mayoría de los transcritos anteriores y los relacionados con el metabolismo del colesterol fueron regulados a la baja por el consumo de HFHF en la semana 21, que mostró en cambio un aumento significativo del factor de transcripción *Pparg* y del transcrito *Gck* asociado al metabolismo de la glucosa. El envejecimiento mostró una acción diferencial en los grupos SD o HFHF. En el primero, se produjo una regulación a la baja de los factores de transcripción y una marcada regulación al alza de los genes relacionados con el metabolismo del colesterol, la acumulación de grasa hepática y la síntesis lípidos y ácidos grasos. Por el contrario, el envejecimiento reguló a la baja la mayoría de los transcritos relacionados con la lipogénesis en la intervención HFHF, con la excepción de *Gck*, que fue aumentado.

La expresión génica de los transcritos lipolíticos *Cpt1a* y *Cyp7a1* fue significativamente regulada a la baja por el tratamiento dietético tanto en la inducción de la obesidad a medio como a largo plazo (**Tabla 26C**), mientras que *Crot* no se vio afectada a las 13 semanas y mostró una regulación al alza significativa en la semana 21. No se encontró ningún efecto importante para el factor de transcripción *Ppara*. La duración del periodo experimental también afectó a la expresión génica tanto en el grupo control como en el obesogénico; en el primero, se observó un aumento significativo de la expresión del factor de transcripción *Ppara*, mientras que ocurrió lo contrario con la expresión de *Crot*, *Cpt1a* y *Cyp7a1*. Se observaron efectos similares en los grupos obesogénicos.

Los resultados de la expresión génica de las enzimas antioxidantes y detoxificantes están marcados por dos tendencias diferentes. En primer lugar, una

interacción significativa entre DIO y la duración del periodo experimental caracterizó la expresión de *Akr7a3* o *Sod1* que fueron significativamente regulados al alza por DIO en la semana 13, pero significativamente regulados a la baja por este mismo tratamiento en la semana 21 (**Tabla 26D**). En segundo lugar, se observó un efecto constante del tratamiento dietético a lo largo del periodo experimental para la expresión de *Gpx* (regulada al alza) o *Ucp2* (regulada a la baja). Sólo se observó un claro efecto de envejecimiento en los grupos SD y HFHF para la expresión del factor de transcripción *Nfe2l2* y para *Sod1*, que fueron menores en la semana 21 frente a la 13. La expresión de los transcritos *Akr7a3* y *Nqo1* no se vio afectada por la duración del periodo experimental en los grupos SD control, pero mostró una regulación a la baja significativa en los animales obesos.

4.4.1.11 Actividades enzimáticas antioxidantes en hígado

Los efectos del tratamiento dietético y la duración del periodo experimental sobre las actividades de las enzimas antioxidantes y desintoxicantes hepáticas se muestran en la **Tabla 27**. DIO tuvo un efecto significativo durante todo el periodo experimental en las actividades catalasa (CAT), superóxido dismutasa dependiente de Mn (Mn-SOD), glutatión S-transferasa (GST) y NADH:Quinona reductasa (QR). CAT y GST aumentaron con el tratamiento HFHF, mientras que se observó la acción opuesta para las actividades Mn-SOD y QR. Cuando se estudió el efecto en el grupo experimental HFHF desde la semana 13 a la 21 se observó un descenso significativo en las actividades de Cu/Zn-SOD, Mn-SOD y GPX. En cuanto a las interacciones dieta × tiempo, se derivaron ya sea de una acción diferencial (aumento o disminución de la actividad enzimática) del tratamiento dietético a las 13 o 21 semanas, como es el caso de Cu/Zn SOD y GPX, o de la mayor fuerza del tratamiento dietético en una etapa concreta, como por ejemplo con las actividades CAT y QR. El análisis de correlación de Pearson entre la expresión del gen de la enzima antioxidante o del transcrito y la actividad enzimática se presenta en la **Tabla 28**. Se encontraron correlaciones positivas entre la expresión génica y la actividad enzimática para *Sod1* y *Nqo1*, mientras que no se encontró correlación entre la expresión y la actividad de la enzima glutatión peroxidasa. Los resultados del análisis del transcriptoma denotaron una alta correlación positiva entre la actividad de GST y la expresión de varios genes funcionales de *Gst*, entre los que *Gstm1* fue de especial relevancia. Se encontró una correlación más débil entre la actividad de Mn-SOD

y la expresión de *Sod2*, mientras que no se encontró correlación entre la expresión génica y la actividad de la catalasa.

Tabla 26A. Influencia del tratamiento dietético y la duración del periodo experimental en la expresión hepática de transcritos relacionados con la estructura celular.

Función	Gen	SD1 vs HFHF1			SD1 vs SD2			SD2 vs HFHF2			HFHF1 vs HFHF2		
		SD1	HFHF1	p	SD1	SD2	p	SD2	HFHF2	p	HFHF1	HFHF2	p
Estructura celular anatómica	<i>Mmp15</i>	1.00 ± 0.09	0.90 ± 0.09	.46	1.00 ± 0.09	1.51 ± 0.21	.041	1.00 ± 0.14	1.05 ± 0.08	.743	1.00 ± 0.10	1.76 ± 0.13	<.001
	<i>Psmb9</i>	1.00 ± 0.11	1.63 ± 0.15	.005	1.00 ± 0.11	0.81 ± 0.10	.215	1.00 ± 0.13	0.99 ± 0.11	.971	1.00 ± 0.09	0.49 ± 0.05	<.001
Adhesión celular	<i>Col26a1</i>	1.00 ± 0.09	11.24 ± 3.88	.065	1.00 ± 0.09	1.37 ± 0.26	.302	1.00 ± 0.19	3.44 ± 1.64	.163	1.00 ± 0.35	0.42 ± 0.20	.167
Daño celular	<i>Cdkn1a</i>	1.00 ± 0.14	0.58 ± 0.14	.051	1.00 ± 0.14	0.57 ± 0.10	.023	1.00 ± 0.18	2.07 ± 0.27	.005	1.00 ± 0.24	2.01 ± 0.26	.013
	<i>Gadd45a</i>	1.00 ± 0.18	1.54 ± 0.13	.3	1.00 ± 0.18	0.62 ± 0.05	.06	1.00 ± 0.08	0.86 ± 0.12	.36	1.00 ± 0.09	0.35 ± 0.05	<.001
Proliferación celular	<i>Gdf15</i>	1.00 ± 0.16	1.04 ± 0.14	.859	1.00 ± 0.16	0.44 ± 0.07	.006	1.00 ± 0.15	1.65 ± 0.21	.026	1.00 ± 0.13	0.69 ± 0.09	.073
	<i>Myc</i>	1.00 ± 0.18	0.38 ± 0.04	.004	1.00 ± 0.18	0.39 ± 0.03	.004	1.00 ± 0.09	2.14 ± 0.18	<.001	1.00 ± 0.11	2.15 ± 0.19	<.001
Transporte de solutos	<i>Abcg5</i>	1.00 ± 0.20	0.27 ± 0.06	.003	1.00 ± 0.20	0.27 ± 0.07	.004	1.00 ± 0.27	1.58 ± 0.27	.15	1.00 ± 0.22	1.61 ± 0.28	.106
	<i>Slc2a2</i>	1.00 ± 0.11	1.48 ± 0.14	.02	1.00 ± 0.11	1.15 ± 0.09	.319	1.00 ± 0.08	0.61 ± 0.07	.002	1.00 ± 0.10	0.47 ± 0.05	<.001
	<i>Slc34a2</i>	1.00 ± 0.10	0.65 ± 0.13	.049	1.00 ± 0.10	0.21 ± 0.03	<.001	1.00 ± 0.13	4.02 ± 0.46	<.001	1.00 ± 0.20	1.28 ± 0.15	.263

Análisis qRT-PCR de *Mmp15*, Metaloproteinasa de matriz-15; *Psmb9*, Subunidad beta tipo 9 del proteasoma; *Col26a1*, Cadena de colágeno alfa-1(XXVI); *Cdkn1a*, Inhibidor 1 de la cinasa dependiente de ciclina; *Gadd45a*, Proteína alfa inducible por daño al ADN y detención del crecimiento; *Gdf15*, factor de crecimiento/diferenciación 15; *Myc*, proteína protooncogénica Myc; *Abcg5*, cassette de unión a ATP subfamilia G miembro 5; *Slc2a2*, familia de transportadores de solutos 2, transportador facilitado de glucosa miembro 2; *Slc34a2*, proteína transportadora de fosfato dependiente de sodio 2B. Los datos corresponden a la media ± EEM de la tasa de cambio de 8 ratas. SD1, dieta estándar durante 13 semanas; HFHF1, dieta alta en grasa y fructosa durante 13 semanas; SD2, dieta estándar durante 21 semanas; HFHF2, dieta alta en grasa y fructosa durante 21 semanas.

Tabla 26B. Influencia del tratamiento dietético y la duración del periodo experimental en la expresión hepática de transcritos relacionados con el metabolismo lipídico y glucídico.

Función	Gen	SD1 vs HFHF1			SD1 vs SD2			SD2 vs HFHF2			HFHF1 vs HFHF2		
		SD1	HFHF1	p	SD1	SD2	p	SD2	HFHF2	p	HFHF1	HFHF2	p
Factor de transcripción	<i>Srebf1</i>	1.00 ± 0.25	3.13 ± 0.47	.001	1.00 ± 0.25	0.53 ± 0.11	.113	1.00 ± 0.20	1.08 ± 0.09	.735	1.00 ± 0.15	0.18 ± 0.02	<.001
	<i>Pparg</i>	1.00 ± 0.07	1.21 ± 0.14	.216	1.00 ± 0.07	0.39 ± 0.05	<.001	1.00 ± 0.12	1.92 ± 0.28	.01	1.00 ± 0.12	0.62 ± 0.09	.021
Metabolismo colesterol	<i>Cyp1a1</i>	1.00 ± 0.16	1.30 ± 0.35	.449	1.00 ± 0.16	6.83 ± 2.72	.05	1.00 ± 0.40	0.19 ± 0.03	.061	1.00 ± 0.27	0.98 ± 0.14	.959
	<i>Cyp1a2</i>	1.00 ± 0.15	0.45 ± 0.05	.003	1.00 ± 0.15	1.58 ± 0.27	.085	1.00 ± 0.17	0.57 ± 0.07	.037	1.00 ± 0.12	2.01 ± 0.24	.002
	<i>Hmgcr</i>	1.00 ± 0.21	1.55 ± 0.21	.087	1.00 ± 0.21	1.52 ± 0.11	.049	1.00 ± 0.07	0.71 ± 0.16	.128	1.00 ± 0.13	0.70 ± 0.16	.17
Metabolismo glucosa	<i>Gck</i>	1.00 ± 0.23	0.55 ± 0.09	.086	1.00 ± 0.23	0.67 ± 0.08	.203	1.00 ± 0.12	3.55 ± 0.30	<.001	1.00 ± 0.16	4.39 ± 0.37	<.001
Acumulación de grasa hepática	<i>Pnpla3</i>	1.00 ± 0.42	12.96 ± 4.60	.021	1.00 ± 0.42	3.82 ± 1.09	.03	1.00 ± 0.28	0.14 ± 0.04	.01	1.00 ± 0.35	0.04 ± 0.01	.017
Síntesis de lípidos y ácidos grasos	<i>Agpat3</i>	1.00 ± 0.11	0.91 ± 0.07	.507	1.00 ± 0.11	0.64 ± 0.11	.039	1.00 ± 0.17	1.51 ± 0.21	.083	1.00 ± 0.08	1.07 ± 0.15	.702
	<i>Fasn</i>	1.00 ± 0.12	6.72 ± 0.64	<.001	1.00 ± 0.12	3.88 ± 0.50	<.001	1.00 ± 0.13	0.25 ± 0.04	<.001	1.00 ± 0.09	0.14 ± 0.02	<.001
	<i>Scd1</i>	1.00 ± 0.42	5.42 ± 1.03	.001	1.00 ± 0.42	3.89 ± 0.42	<.001	1.00 ± 0.11	0.17 ± 0.03	<.001	1.00 ± 0.19	0.12 ± 0.02	<.001
Transporte de lípidos	<i>Fabp5</i>	1.00 ± 0.15	2.91 ± 0.65	.012	1.00 ± 0.15	1.40 ± 0.31	.268	1.00 ± 0.22	0.16 ± 0.04	.002	1.00 ± 0.22	0.08 ± 0.02	.001

Análisis qRT-PCR de *Srebf1*, factor de transcripción de unión al elemento regulador de esteroides 1; *Pparg*, receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas; *Cyp1a1*, citocromo P450 1A1; *Cyp1a2*, colesterol 25-hidroxilasa; *Hmgcr*, 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa; *Gck*, hexoquinasa-4; *Pnpla3*, proteína 3 que

contiene dominio fosfolipasa similar a patatina; *Agpat3*, 1-acil-sn-glicerol-3-fosfato aciltransferasa gamma; *Fasn*, ácido graso sintasa; *Scd1*, estearoil-CoA desaturasa-1 y *Fabp5*, proteína fijadora de ácidos grasos 5. Los datos corresponden a la media \pm EEM de la tasa de cambio de 8 ratas. SD1, dieta estándar durante 13 semanas; HFHF1, dieta alta en grasa y fructosa durante 13 semanas; SD2, dieta estándar durante 21 semanas; HFHF2, dieta alta en grasa y fructosa durante 21 semanas.

Tabla 26C. Influencia del tratamiento dietético y la duración del periodo experimental en la expresión hepática de transcritos relacionados con la acción lipolítica.

Función	Gen	SD1 vs HFHF1			SD1 vs SD2			SD2 vs HFHF2			HFHF1 vs HFHF2		
		SD1	HFHF1	p	SD1	SD2	p	SD2	HFHF2	p	HFHF1	HFHF2	p
Factor de transcripción	<i>Ppara</i>	1.00 \pm 0.11	1.19 \pm 0.53	.733	1.00 \pm 0.11	1.98 \pm 0.19	<.001	1.00 \pm 0.09	0.91 \pm 0.08	.487	1.00 \pm 0.45	1.52 \pm 0.14	.287
β-oxidación de ácidos grasos	<i>Cpt1a</i>	1.00 \pm 0.08	0.67 \pm 0.05	.004	1.00 \pm 0.08	0.57 \pm 0.04	<.001	1.00 \pm 0.07	0.70 \pm 0.09	.02	1.00 \pm 0.08	0.59 \pm 0.08	.003
	<i>Crot</i>	1.00 \pm 0.10	1.19 \pm 0.15	.324	1.00 \pm 0.10	0.58 \pm 0.09	.009	1.00 \pm 0.15	2.96 \pm 0.47	.001	1.00 \pm 0.13	1.45 \pm 0.23	.11
Colesterol a ácidos biliares	<i>Cyp7a1</i>	1.00 \pm 0.34	0.30 \pm 0.03	.059	1.00 \pm 0.34	0.36 \pm 0.07	.086	1.00 \pm 0.19	0.20 \pm 0.03	.001	1.00 \pm 0.11	0.24 \pm 0.04	<.001

Análisis qRT-PCR de *Ppara*, receptor alfa activado por proliferador de peroxisomas, *Cpt1a*, carnitina palmitoil transferasa 1A; *Crot*, carnitina O-octanoiltransferasa peroxisomal y *Cyp7a1*, colesterol 7 alfa-hidroxilasa. Los datos corresponden a la media \pm EEM de la tasa de cambio de 8 ratas. SD1, dieta estándar durante 13 semanas; HFHF1, dieta alta en grasa y fructosa durante 13 semanas; SD2, dieta estándar durante 21 semanas; HFHF2, dieta alta en grasa y fructosa durante 21 semanas.

Tabla 26D. Influencia del tratamiento dietético y la duración del periodo experimental en la expresión hepática de transcritos relacionados con la acción antioxidante y detoxificante.

Función	Gen	SD1 vs HFHF1			SD1 vs SD2			SD2 vs HFHF2			HFHF1 vs HFHF2		
		SD1	HFHF1	p	SD1	SD2	p	SD2	HFHF2	p	HFHF1	HFHF2	p
Factor de transcripción	<i>Nfe2l2</i>	1.00 ±	1.02 ±	.925	1.00 ±	0.61 ±	.003	1.00 ±	1.28 ±	.041	1.00 ±	0.78 ±	.175
		0.09	0.15		0.09	0.06		0.09	0.09		0.15	0.05	
Actividad antioxidante	<i>GPX1</i>	1.00 ±	1.77 ±	.004	1.00 ±	1.11 ±	.555	1.00 ±	1.53 ±	.026	1.00 ±	0.96 ±	.792
		0.11	0.20		0.11	0.15		0.13	0.17		0.11	0.10	
	<i>SOD1</i>	1.00 ±	1.65 ±	.016	1.00 ±	0.79 ±	.398	1.00 ±	0.75 ±	.257	1.00 ±	0.36 ±	<.001
		0.20	0.12		0.20	0.13		0.16	0.13		0.07	0.06	
<i>Ucp2</i>	1.00 ±	0.76 ±	.107	1.00 ±	1.17 ±	.243	1.00 ±	0.70 ±	.004	1.00 ±	1.09 ±	.494	
	0.11	0.09		0.11	0.09		0.08	0.03		0.11	0.05		
Actividad detoxificante	<i>Akr7a3</i>	1.00 ±	2.65 ±	<.001	1.00 ±	1.48 ±	.118	1.00 ±	0.47 ±	.013	1.00 ±	0.27 ±	<.001
		0.12	0.22		0.12	0.26		0.18	0.05		0.08	0.03	
	<i>Nqo1</i>	1.00 ±	1.08 ±	.729	1.00 ±	1.26 ±	.239	1.00 ±	0.45 ±	.005	1.00 ±	0.52 ±	.045
	0.13	0.20	0.13		0.17	0.13		0.10	0.19		0.11		

Análisis qRT-PCR de *Nfe2l2*, factor nuclear eritroide 2 tipo2; *GPX1*, glutatión peroxidasa 1; *SOD1*, superóxido dismutasa [Cu-Zn]; *Ucp2*, proteína desacopladora mitocondrial 2; *Akr7a3*, aflatoxina B1 aldo-ceto reductasa miembro 3 y *Nqo1*, NAD(P)H: quinona oxidoreductasa 1. Los datos corresponden a la media ± EEM de la tasa de cambio de 8 ratas. SD1, dieta estándar durante 13 semanas; HFHF1, dieta alta en grasa y fructosa durante 13 semanas; SD2, dieta estándar durante 21 semanas; HFHF2, dieta alta en grasa y fructosa durante 21 semanas.

Tabla 27. Actividad hepática de enzimas antioxidantes y desintoxicantes.

Función	Enzima	SD1	HFHF1	SD2	HFHF2	R ²	EEM	Efecto Dieta	Efecto tiempo	Efecto Dieta x Tiempo
Actividad antioxidante	CAT (UAE/min·mg prot)	7.8 A	19.3 D	11.8 B	14.7 C	0.74	0.87	$p < .001$	$p = .770$	$p < .001$
	GPx (nmol NADPH/min·mg prot)	14.4 B	14.4 B	13.8 B	9.5 A	0.36	0.91	$p = .026$	$p = .005$	$p = .027$
	Mn-SOD (UAE/min·mg prot)	30.5 AB	48.0 C	37.5 B	28.1 A	0.55	2.44	$p = .109$	$p = .013$	$p < .001$
	Cu/Zn-SOD (UAE/min·mg prot)	1433.3 B	1365.6 B	1175.3 AB	898.6 A	0.36	86.0	$p = .014$	$p = .001$	$p = .558$
Actividad detoxificante	GST (UAE/min·mg prot)	708.3 A	958.4 B	720.4 A	813.4 AB	0.27	52.48	$p = .003$	$p = .216$	$p = .146$
	QR (UAE/min·mg prot)	198.4 B	182.6 B	217.2 B	106.4 A	0.35	18.93	$p = .002$	$p = .141$	$p = .018$

Los datos corresponden a la media de 8 ratas. A-C medias dentro de la misma fila con letras diferentes difieren significativamente ($p < .05$). R², coeficiente de determinación; EEM, error estándar de la media agrupada. CAT, catalasa; SOD, superóxido dismutasa; GPx, glutatión peroxidasa; GST, glutatión S-transferasa; QR, NADH:Quinona Reductasa. SD1, dieta estándar durante 13 semanas; HFHF1, dieta alta en grasa y fructosa durante 13 semanas; SD2, dieta estándar durante 21 semanas; HFHF2, dieta alta en grasa y fructosa durante 21 semanas.

Tabla 28. Correlación de Pearson entre la expresión de genes o transcritos y la actividad enzimática.

	Coefficiente de Pearson	p
Mn-SOD (Actividad enzimática-expresión transcrito)	0.448	.028
Cu/Zn-SOD (Actividad enzimática-expresión génica)	0.500	.004
GST (Actividad enzimática-expresión transcrito)	0.557	.005
QR (Actividad enzimática-expresión génica)	0.575	.001

SOD, superóxido dismutasa; GST, glutatión transferasa; QR: NADH:Quinona Reductasa.

4.4.1.12 Análisis microbiológico del contenido cecal

El análisis de abundancia relativa al nivel de filo y género se representa en la **Figura 33**. Se observó que el filo mayoritario en todos los grupos (>50 %) fue Firmicutes, y especialmente en el grupo que consumió una dieta estándar durante 21 semanas; seguido de Verrucomicrobia (40 %) y en mucha menor medida Actinobacteria (5 %). No se observaron bacterias pertenecientes al filo Bacteroidetes en los grupos experimentales que consumieron una dieta alta en grasa y fructosa independientemente del periodo experimental. Los géneros mayoritarios en todos los grupos fueron Akkermansia (40 %) y Romboutsia (20 %). El consumo de una dieta alta en grasa y fructosa durante 13 semanas en comparación con una dieta estándar indujo un aumento remarcable en la población del género *Clostridium sensu stricto 1* y un aumento menor en *Ruminococcus* y *Roseburia* a expensas de disminuir *Christensenellaceae R7 group* y otros géneros minoritarios. Al aumentar el periodo experimental en el grupo que consumió una dieta hipercalórica disminuyó el número de especies pertenecientes al género *Clostridium sensu stricto 1* y *Romboutsia*, mientras que aparecieron más especies que no fueron posibles identificar. En el caso del consumo de una dieta estándar el aumento del periodo experimental disminuyó el número de especies pertenecientes al género *Akkermansia* y *Romboutsia* y aumentó el de *Ruminococcus* y el de otros géneros minoritarios y sin identificar.

La diversidad beta se muestra en la **Figura 34**, representándose mediante la distancia de Jaccard, que mide el grado de similitud entre grupos considerando la ausencia o presencia de comunidades microbianas. Se manifestó una marcada diferencia entre las comunidades microbianas presentes en los cuatro grupos experimentales. La diversidad beta también se midió mediante la distancia de Bray-Curtis (**Figura 34B**), que en este caso mide el grado de similitud considerando la abundancia relativa de las comunidades microbianas presentes; y se observó una homogeneidad de las comunidades microbianas presentes entre grupos, a excepción del grupo SD2. Finalmente, se representa mediante un diagrama de Venn (**Figura 35**) las similitudes entre grupos a nivel de comunidades. Las agrupaciones más cercanas se producen en función del tipo de dieta consumido y el periodo experimental empleado. Se conservan 90 comunidades entre los 4 grupos experimentales.

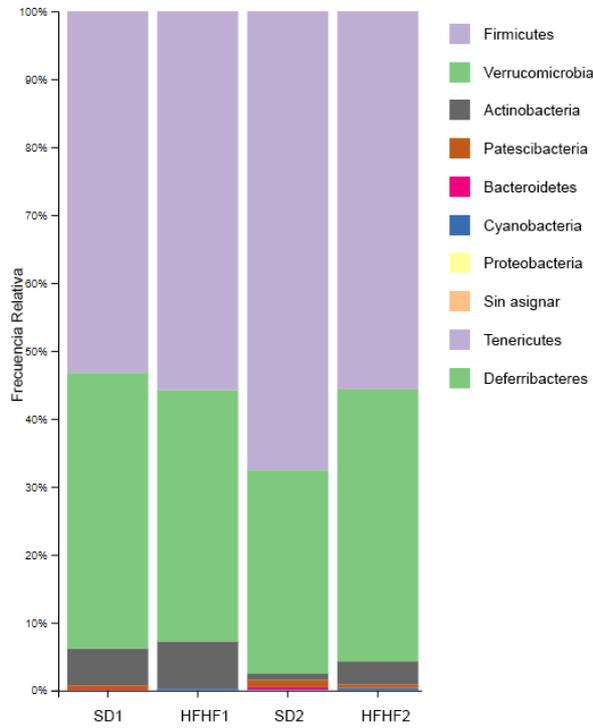
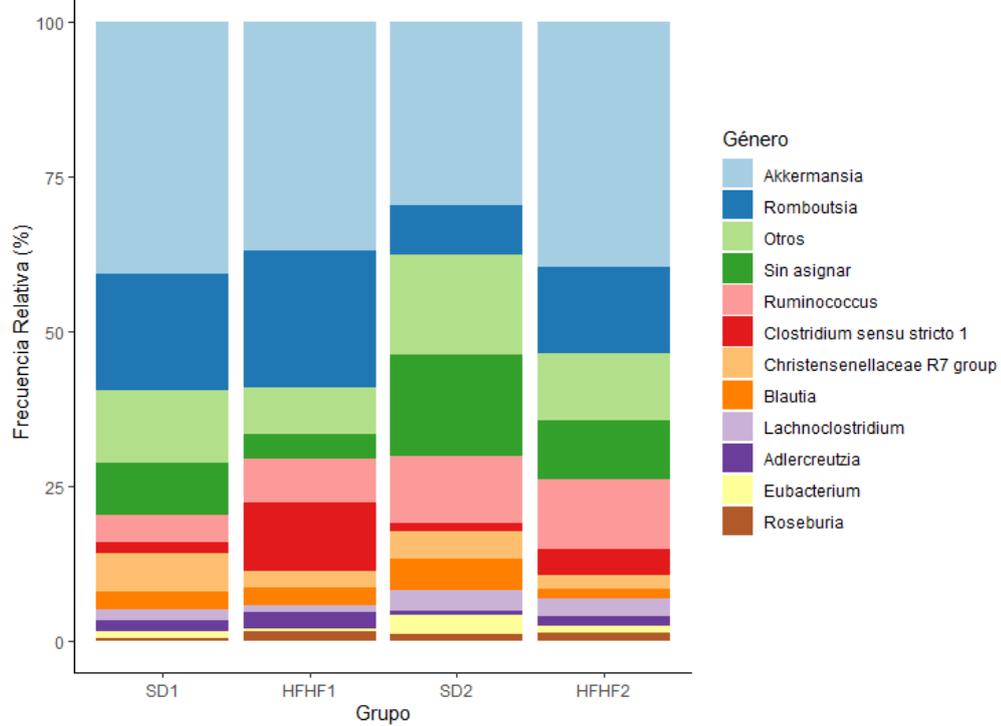
A**B**

Figura 33. Abundancia relativa en el contenido cecal a nivel de (A) filo y (B) género entre los diferentes grupos experimentales. SD1, dieta estándar durante 13 semanas; HFHF1, dieta alta en grasa y fructosa durante 13 semanas; SD2, dieta estándar durante 21 semanas; HFHF2, dieta alta en grasa y fructosa durante 21 semanas.

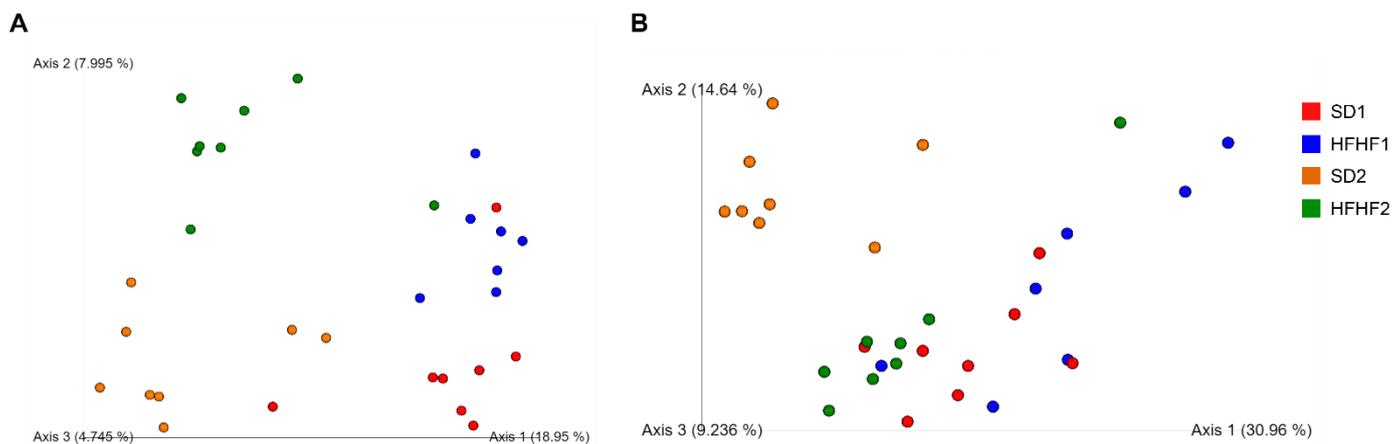


Figura 34. Diversidad beta de la microbiota del contenido cecal entre los grupos experimentales, representada mediante (A) distanciad de Jaccard y (B) distancia de Bray-Curtis. SD1, dieta estándar durante 13 semanas; HFHF1, dieta alta en grasa y fructosa durante 13 semanas; SD2, dieta estándar durante 21 semanas; HFHF2, dieta alta en grasa y fructosa durante 21 semanas.

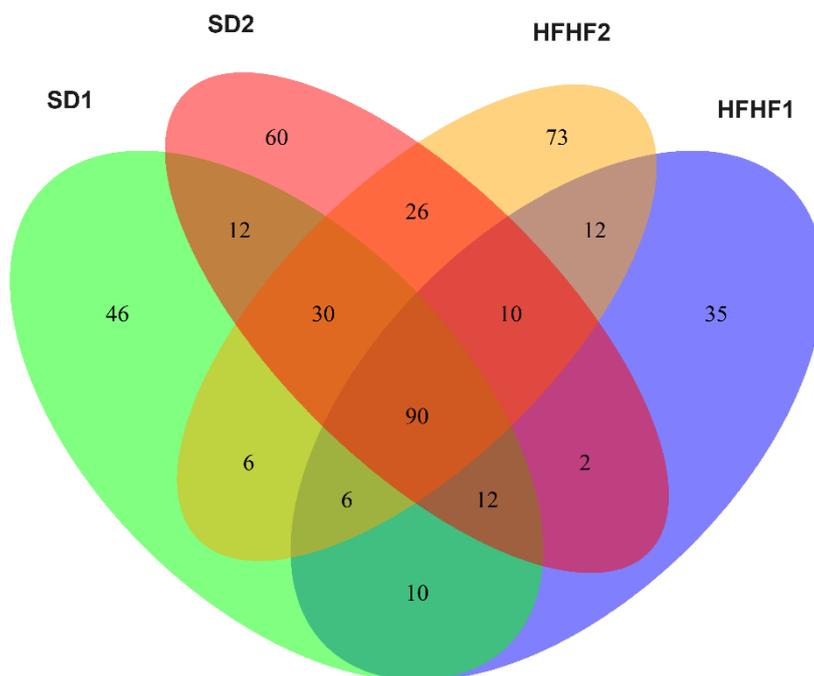


Figura 35. Diagrama de Venn de las diferentes comunidades microbianas presentes en los grupos experimentales. SD1, dieta estándar durante 13 semanas; HFHF1, dieta alta en grasa y fructosa durante 13 semanas; SD2, dieta estándar durante 21 semanas; HFHF2, dieta alta en grasa y fructosa durante 21 semanas.

4.4.2 Fase 2: Tratamiento de la obesidad mediante combinación del nutracéutico y HIIT

4.4.2.1 Ingesta y peso corporal

El efecto de las distintas intervenciones de restricción calórica, inclusión del nutracéutico en la dieta, protocolo de entrenamiento interválico de alta intensidad (HIIT) y la administración de la semaglutida sobre la ingesta de comida, líquido, de calorías y peso de los animales se muestra en la **Figura 36A-D**. Durante las primeras 8 semanas de inducción de la obesidad el consumo de dieta estándar (SD) fue superior al de una dieta alta en grasa y fructosa (HF) (**Figura 36A**), mientras que el líquido consumido fue similar (**Figura 36B**). A partir de la semana 9 se observó una marcada diferencia, descendiendo el consumo de alimento por parte del grupo HF, mientras que aumentó el consumo de líquido en este mismo grupo y descendió en el grupo SD. La implementación de las distintas intervenciones no produjo grandes cambios en cuánto a ingesta de alimento o líquido se refiere, a excepción de la administración de semaglutida, que redujo la ingesta en relación al resto de intervenciones. Los grupos de animales a los que se les aplicó únicamente una restricción calórica (HF/SD) o únicamente se les incluyó el nutracéutico en la dieta (HF/NT) tuvieron una ingesta similar al grupo SD. La combinación de estas intervenciones junto al protocolo de entrenamiento interválico de alta intensidad (HF/EX o HF/NEX) produjo un descenso en el consumo de alimento por parte de los animales, más acusado al comienzo de su implementación y asemejándose al del grupo SD con el avance del periodo experimental. La misma tendencia, pero de forma más marcada, se observó en los grupos de animales a los que se les inyectó de forma subcutánea, una vez a la semana, semaglutida y agravándose el efecto al combinarlo con HIIT. La ingesta de líquido fue similar al grupo SD independientemente de la intervención. La ingesta calórica, por tanto, fue superior en el grupo HF durante todo el periodo experimental, y en los grupos tratados siguió la misma tendencia que para la ingesta de alimento (**Figura 36C**). Las diferencias comentadas condujeron a una mayor ganancia de peso corporal en el grupo HF (**Figura 36D**) y se observó que la intervención que más redujo el peso fue la administración de semaglutida (HF/S y HF/SE), alcanzando el peso final del grupo SD, seguida del protocolo de HIIT (HF/EX y HF/NEX) y, finalmente, la restricción de calórica (HF/SD y

HF/NT). No se observó un efecto diferencial al incluir el nutracéutico en la dieta en comparación con la simple dieta estándar.

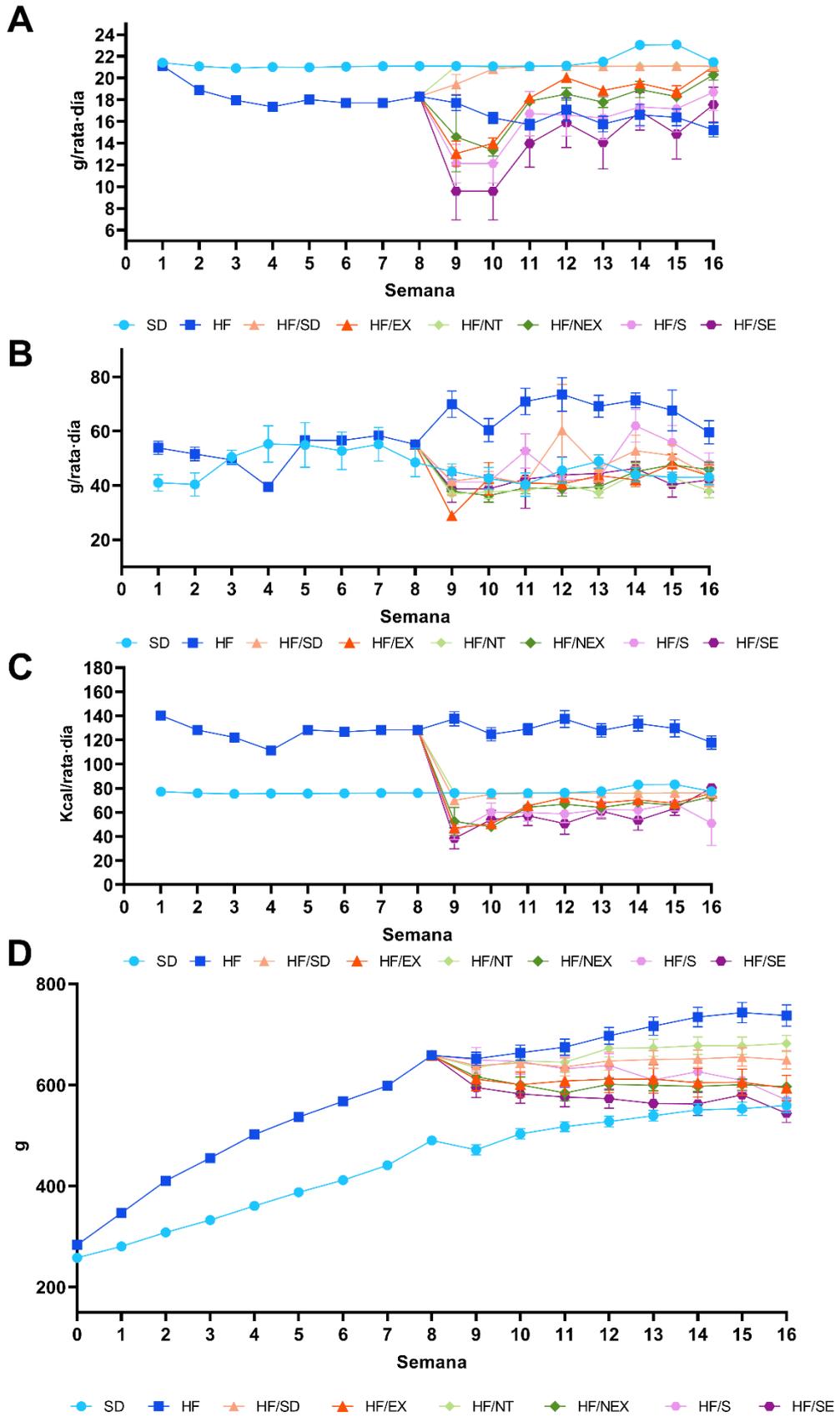


Figura 36. Efecto de las intervenciones sobre la ingesta de alimentos (gramos por rata y día, **Figura 36A**), líquidos (agua o solución de fructosa al 20%, gramos por rata y día, **Figura 36B**) o calorías (Kcal por rata y día, **Figura 36C**), y el aumento de peso corporal (gramos, **Figura 36D**) de las ratas Sprague-Dawley. Para diferenciar mejor los resultados, en los gráficos sólo se incluyen las semanas más representativas del periodo experimental. SD, dieta estándar durante 16 semanas; HF, dieta alta en grasa y fructosa durante 16 semanas; HF/SD, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar durante 8 semanas; HF/EX, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar y entrenamiento interválico de alta intensidad (HIIT) durante 8 semanas; HF/NT, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar con nutraceutico durante 8 semanas; HF/NEX, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar con nutraceutico y HIIT durante 8 semanas; HF/S, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar e inyección subcutánea de semaglutida durante 8 semanas; HF/SE, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar, inyección subcutánea de semaglutida y HIIT durante 8 semanas. Los puntos y las barras representan la media y el EEM, respectivamente (n = 8).

4.4.2.2 Análisis de la composición corporal

El efecto de las distintas intervenciones sobre la composición corporal se representa en la **Tabla 29**. Los animales que consumieron una dieta alta en grasa y fructosa durante todo el periodo experimental presentaron el peso final más elevado, difiriendo significativamente de los animales que consumieron una dieta estándar. Además, todas las intervenciones aplicadas sobre los animales obesos redujeron significativamente el peso final (ver sección 4.4.2.1). La realización de un protocolo de entrenamiento fue la intervención más efectiva, así como, la administración de la semaglutida, y especialmente la combinación de ambas. Esta misma tendencia se observó en la masa grasa, tanto en porcentaje como peso final.

La masa magra y agua total no difirieron significativamente entre las intervenciones y el grupo HF, aunque sí hubo diferencias significativas entre las propias intervenciones. Sin embargo, al focalizarnos en el porcentaje de masa magra y agua total se observó que todas las intervenciones aumentaron significativamente el porcentaje de masa magra y redujeron el de agua total hasta valores similares al grupo SD.

Los índices antropométricos, IMC e índice de Lee, fueron estadísticamente superiores en el grupo HF en comparación con el resto de grupos experimentales. Las intervenciones aplicadas redujeron significativamente ambos índices, especialmente la administración de semaglutida combinado o no con un protocolo de HIIT. La implementación de este protocolo de HIIT en las demás intervenciones redujo en mayor medida ambos índices que las mismas intervenciones en animales sedentarios.

4.4.2.3 Pesos de los órganos

El consumo de una dieta alta en grasa y fructosa produjo un aumento significativo en el peso del hígado, tejido graso abdominal y epididimal en comparación con el

consumo de una dieta estándar (**Tabla 30**). Las intervenciones más efectivas para reducir el peso de estos órganos fueron el protocolo interválico de alta intensidad (HIIT) y la administración de semaglutida; y especialmente la combinación de ambos. Se observó una tendencia a disminuir el peso de estos órganos al combinar el HIIT con restricción calórica, con o sin inclusión del nutraceutico, más que dichas intervenciones por sí solas. El peso del corazón no se vio aumentado tras el consumo de una dieta HF en comparación con SD; solo la combinación de HIIT y semaglutida disminuyó significativamente su peso. Por otro lado, el paso de una dieta alta en grasa y fructosa a una dieta estándar, con o sin inclusión del nutraceutico, y en ausencia o presencia HIIT condujo a un aumento significativo en el peso del bazo, mientras que la administración de la semaglutida lo disminuyó. Un efecto opuesto se produjo en el peso tanto de colon como ciego, aumentando sus pesos en los grupos que incluían semaglutida en comparación con el grupo HF, mientras que con el resto de las intervenciones disminuían (colon) o se mantenían constantes (ciego) en comparación con el grupo HF. No se observaron efectos significativos de las intervenciones en cuánto al peso del riñón y encéfalo en comparación con el grupo HF, pero sí que hubo diferencias entre grupos. En el riñón, se observó un mayor peso en el grupo HF/EX en comparación con SD, HF/SD y HF/NT; mientras que el peso del encéfalo de SD, HF/S y HF/SE fue superior que en comparación con HF/SD.

Tabla 29. Efecto de las intervenciones sobre la composición corporal.

	SD	HF	HF/SD	HF/EX	HF/NT	HF/NEX	HF/S	HF/SE
Peso (g)	559.4 ± 14.5 A	737.4 ± 21.1 D	649.7 ± 18.2 BC	593.6 ± 25.6 A	681.9 ± 16.22 C	596.7 ± 9.70 AB	570.2 ± 20.7 A	543.8 ± 19.2 A
Masa grasa (g)	81.4 ± 9.02 ABC	192.4 ± 11.7 D	98.7 ± 19.8 BC	66.3 ± 9.48 AB	115.1 ± 6.41 C	86.4 ± 8.72 ABC	66.1 ± 9.16 AB	54.2 ± 11.7 A
Masa grasa (%)	12.9 ± 1.15 AB	34.6 ± 3.53 C	14.9 ± 2.88 AB	11.0 ± 1.48 AB	17.0 ± 1.08 B	14.4 ± 1.35 AB	11.4 ± 1.51 AB	9.89 ± 1.94 A
Masa magra (g)	444.4 ± 9.14 A	499.3 ± 12.8 BCD	505.0 ± 16.1 CD	466.4 ± 10.5 ABC	523.94 ± 17.4 D	472.1 ± 10.9 ABC	469.5 ± 16.3 ABC	459.4 ± 18.1 AB
Masa magra (%)	81.83 ± 9.02 BC	68.02 ± 2.29 A	78.11 ± 3.22 B	79.11 ± 2.05 BC	76.76 ± 1.15 B	79.14 ± 1.42 BC	82.48 ± 1.41 BC	84.54 ± 1.88 C
Agua total (g)	361.9 ± 11.3 A	410.6 ± 9.71 BC	417.1 ± 13.4 BC	385.7 ± 8.55 AB	430.4 ± 13.7 C	389.9 ± 10.1 AB	386.7 ± 13.3 AB	380.0 ± 14.8 AB
Agua total (%)	64.2 ± 3.36 A	72.7 ± 3.22 B	64.5 ± 2.73 A	65.4 ± 1.66 A	63.1 ± 0.98 A	65.3 ± 1.30 A	68.0 ± 1.23 AB	69.9 ± 1.63 AB
IMC (kg/m²)	7.34 ± 0.21 AB	8.97 ± 0.28 D	7.83 ± 0.24 BC	7.26 ± 0.24 AB	8.24 ± 0.08 C	7.75 ± 0.10 ABC	7.11 ± 0.22 A	7.12 ± 0.24 A
Índice de Lee	2.72 ± 0.02 AB	2.95 ± 0.03 E	2.82 ± 0.03 CD	2.75 ± 0.03 AB	2.87 ± 0.01 D	2.78 ± 0.01 BC	2.72 ± 0.03 AB	2.70 ± 0.03 A

Los datos corresponden a la media de 8 ratas \pm EEM. A-E medias dentro de la misma fila con letras diferentes difieren significativamente ($p < .05$). SD, dieta estándar durante 16 semanas; HF, dieta alta en grasa y fructosa durante 16 semanas; HF/SD, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar durante 8 semanas; HF/EX, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar y entrenamiento interválico de alta intensidad (HIIT) durante 8 semanas; HF/NT, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar con nutracéutico durante 8 semanas; HF/NEX, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar con nutracéutico y HIIT durante 8 semanas; HF/S, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar e inyección subcutánea de semaglutida durante 8 semanas; HF/SE, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar, inyección subcutánea de semaglutida y HIIT durante 8 semanas.

Tabla 30. Efecto de las intervenciones sobre los pesos de los órganos.

g/100 g masa magra	SD	HF	HF/SD	HF/EX	HF/NT	HF/NEX	HF/S	HF/SE
Hígado	3.06 ± 0.21 AB	3.72 ± 0.11 C	3.20 ± 0.21 AB	3.04 ± 0.12 AB	3.43 ± 0.13 BC	3.09 ± 0.11 AB	3.34 ± 0.07 ABC	2.94 ± 0.11 A
Riñón	0.33 ± 0.00 A	0.36 ± 0.01 AB	0.34 ± 0.01 A	0.38 ± 0.02 B	0.34 ± 0.01 A	0.37 ± 0.01 AB	0.36 ± 0.01 AB	0.35 ± 0.01 AB
Corazón	0.34 ± 0.01 ABC	0.37 ± 0.01 BCD	0.35 ± 0.01 ABC	0.39 ± 0.01 D	0.37 ± 0.01 CD	0.35 ± 0.01 ABC	0.34 ± 0.01 AB	0.33 ± 0.01 A
Bazo	0.17 ± 0.01 AB	0.18 ± 0.01 BCD	0.21 ± 0.01 E	0.21 ± 0.01 DE	0.20 ± 0.01 CDE	0.19 ± 0.01 BCDE	0.17 ± 0.01 BC	0.15 ± 0.01 A
Ciego	0.16 ± 0.01 BC	0.14 ± 0.01 AB	0.13 ± 0.01 A	0.13 ± 0.01 A	0.13 ± 0.01 A	0.16 ± 0.01 BC	0.20 ± 0.02 D	0.19 ± 0.01 CD
Colon	0.28 ± 0.01 BC	0.30 ± 0.01 CD	0.25 ± 0.01 AB	0.26 ± 0.02 BC	0.22 ± 0.01 A	0.24 ± 0.01 AB	0.28 ± 0.01 BC	0.32 ± 0.01 D
Encéfalo	0.48 ± 0.01 B	0.45 ± 0.01 AB	0.44 ± 0.02 A	0.47 ± 0.01 AB	0.45 ± 0.01 AB	0.47 ± 0.01 AB	0.49 ± 0.01 B	0.49 ± 0.01 B
Tejido graso abdominal	4.06 ± 0.34 BC	7.32 ± 0.62 D	4.55 ± 0.80 BC	3.65 ± 0.44 ABC	5.02 ± 0.38 C	4.24 ± 0.42 BC	3.06 ± 0.38 AB	2.40 ± 0.23 A
Tejido graso epididimal	2.37 ± 0.21 ABC	4.18 ± 0.36 D	2.99 ± 0.54 BC	2.32 ± 0.28 ABC	3.15 ± 0.26 C	2.38 ± 0.14 ABC	2.05 ± 0.24 AB	1.90 ± 0.34 A

Los datos corresponden a la media de 8 ratas ± EEM. A-E medias dentro de la misma fila con letras diferentes difieren significativamente ($p < .05$). SD, dieta estándar durante 16 semanas; HF, dieta alta en grasa y fructosa durante 16 semanas; HF/SD, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar durante 8 semanas; HF/EX, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar y entrenamiento interválico de alta intensidad (HIIT) durante 8 semanas; HF/NT, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar con nutraceutico durante 8 semanas; HF/NEX, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar con nutraceutico y HIIT durante 8 semanas; HF/S, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar e inyección subcutánea de semaglutida durante 8 semanas; HF/SE, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar, inyección subcutánea de semaglutida y HIIT durante 8 semanas.

4.4.2.4 Digestibilidad *in vitro* en discontinuo de dietas experimentales

La digestibilidad *in vitro* en discontinuo de las dietas experimentales se determinó utilizando el método *in vitro* de Miller et al. (205) modificado por Porres et al. (206) (**Figura 37**). La dieta estándar que incluía a la formulación nutraceutica presentó un porcentaje de dializabilidad significativamente mayor que las dietas experimentales estándar y alta en grasa.

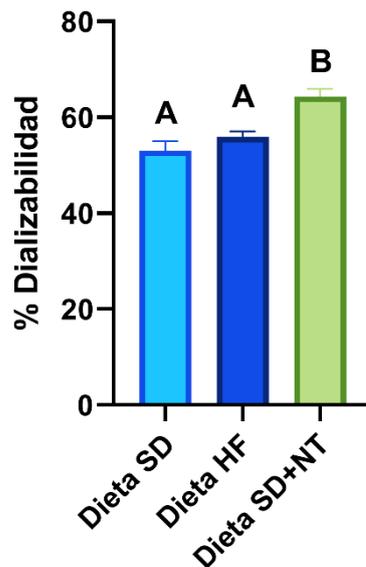


Figura 37. Porcentaje de dializabilidad de las dietas experimentales. SD, estándar; HF, alta en grasa; SD+NT, estándar con inclusión del nutraceutico.

4.4.2.5 Capacidad aeróbica

El efecto de las intervenciones sobre la capacidad aerobia y rendimiento físico de ratas Sprague-Dawley se recoge en la **Tabla 31**. El volumen máximo de oxígeno consumido (VO_2 max.) fue similar en los animales sedentarios independientemente del tipo de dieta consumido, a excepción de HF/SD que sí que fue superior a HF. Los animales sometidos a un protocolo de entrenamiento interválico de alta intensidad (HIIT) presentaron los mayores niveles de VO_2 max., aunque en el grupo HF/EX no se observaron diferencias significativas. Las diferencias entre animales sedentarios y ejercitados fueron más notorias en la velocidad máxima (V_{max}) alcanza, distancia recorrida y duración del protocolo. Los animales que realizaron el protocolo de HIIT presentaron los mayores valores en todos parámetros anteriores, especialmente si el ejercicio físico se combinó con una dieta estándar con inclusión del nutraceutico o la administración de semaglutida. El consumo de una dieta estándar produjo un aumento

significativo en estos parámetros en comparación con el consumo de una dieta alta en grasa y fructosa. Sin embargo, las intervenciones que no incluían el protocolo de HIIT no produjeron diferencias significativas en comparación con el grupo obeso inicial, a excepción de la administración farmacológica. Finalmente, el coeficiente respiratorio (RQ) fue similar en el grupo de ratas HF y en todos los grupos tras las distintas intervenciones, con una tendencia a disminuir en estas últimas. Esta disminución dio lugar a una diferencia significativa en este parámetro entre el grupo SD y, en general, los grupos tras las intervenciones.

Tabla 31. Efecto de las intervenciones sobre la capacidad aeróbica.

	SD	HF	HF/SD	HF/EX	HF/NT	HF/NEX	HF/S	HF/SE
VO₂ max. (mL/min·Kg)	47.1 ± 1.47 AB	43.6 ± 2.49 A	58.7 ± 2.6 B	50.6 ± 6.18 AB	52.9 ± 3.24 AB	70.9 ± 5.7 C	43.5 ± 2.36 A	77.3 ± 7.64 C
V_{max} (cm/s)	60.9 ± 1.52 BC	50 ± 1.20 A	52.4 ± 2.44 A	65 ± 3.43 C	54.4 ± 1.58 AB	75.6 ± 3.27 D	62.6 ± 4.52 BC	76 ± 2.48 D
V_{max} /100 g peso corporal	11 ± 0.32 BC	6.04 ± 0.81 A	7.88 ± 0.53 A	10.9 ± 0.82 BC	7.77 ± 0.23 A	12.6 ± 0.67 CD	10.2 ± 1.11 B	13.42 ± 0.75 D
Distancia (cm)	20798.6 ± 1090.1 BC	13511.8 ± 719.3 A	13685.9 ± 2410.5 A	24157.9 ± 2442.7 C	16191.5 ± 978.4 AB	33203.3 ± 2749.7 D	22840 ± 3932.9 BC	33312.4 ± 2314.6 D
Duración (min)	14.2 ± 0.31 BC	12.1 ± 0.24 A	12.2 ± 0.48 A	14.8 ± 0.69 C	12.9 ± 0.31 AB	17.2 ± 0.65 D	14.6 ± 0.9 C	17.2 ± 0.51 D
RQ	1 ± 0.01 B	0.95 ± 0.02 AB	1 ± 0.03 B	0.93 ± 0.03 A	0.94 ± 0.01 A	0.91 ± 0.02 A	0.95 ± 0.01 AB	0.9 ± 0.01 A

Los datos corresponden a la media de 8 ratas ± EEM. A-D medias dentro de la misma fila con letras diferentes difieren significativamente ($p < .05$). VO₂ max, volumen máximo de oxígeno consumido; V_{max}, velocidad máxima; RQ, coeficiente respiratorio. SD, dieta estándar durante 16 semanas; HF, dieta alta en grasa y fructosa durante 16 semanas; HF/SD, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar durante 8 semanas; HF/EX, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar y entrenamiento interválico de alta intensidad (HIIT) durante 8 semanas; HF/NT, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar con nutraceutico durante 8 semanas; HF/NEX, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar con nutraceutico y HIIT durante 8 semanas; HF/S, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar e inyección subcutánea de semaglutida durante 8 semanas; HF/SE, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar, inyección subcutánea de semaglutida y HIIT durante 8 semanas.

4.4.2.6 Prueba de tolerancia a una sobrecarga oral de glucosa

En la última semana del periodo experimental los animales se sometieron a una prueba de tolerancia oral de glucosa. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 38A**. Los animales que consumieron la dieta alta en grasa y fructosa presentaron valores mayores de glucosa plasmática a lo largo de la prueba que los que consumieron una dieta estándar. Además, se observó un efecto positivo con las intervenciones aplicadas. Tras realizar la prueba, los resultados fueron finalmente expresados y representados como el área bajo la curva (AUC) de cada uno de los grupos experimentales (**Figura 38B**). La realización de ejercicio físico en HF/EX y HF/NEX no provocó cambios significativos en comparación con el grupo HF, aunque, los menores valores de AUC se encontraron al combinar la semaglutida con el protocolo HIIT (HF/SE), además, de en el grupo que incluyó el nutraceutico en la dieta (HF/NT). La restricción calórica y la administración de semaglutida por sí solas lograron disminuir el AUC en comparación con el grupo HF, alcanzando valores similares al grupo que consumió exclusivamente una dieta estándar durante todo el periodo experimental.

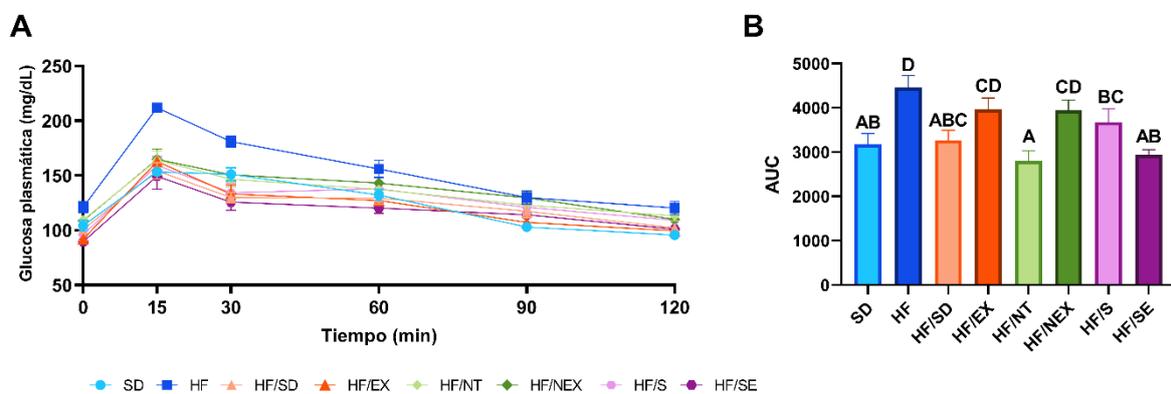


Figura 38. Efecto de las distintas intervenciones sobre (A) prueba de tolerancia oral a una sobrecarga de glucosa y (B) sobre el área bajo la curva (AUC) de la prueba de tolerancia oral a una sobrecarga de glucosa. La concentración sanguínea de glucosa fue determinada antes y tras 15, 30, 60, 90 y 120 min de la sobrecarga oral de glucosa. SD, dieta estándar durante 16 semanas; HF, dieta alta en grasa y fructosa durante 16 semanas; HF/SD, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar durante 8 semanas; HF/EX, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar y entrenamiento interválico de alta intensidad (HIIT) durante 8 semanas; HF/NT, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar con nutraceutico durante 8 semanas; HF/NEX, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar con nutraceutico y HIIT durante 8 semanas; HF/S, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar e inyección subcutánea de semaglutida durante 8 semanas; HF/SE, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar, inyección subcutánea de semaglutida y HIIT durante 8 semanas. Las columnas o puntos y las barras representan la media y el EEM, respectivamente (n = 8). Los valores dentro de cada tratamiento seguidos de letras distintas son significativamente diferentes significativamente ($p < .05$).

4.4.2.7 Parámetros hemáticos

Se observó un aumento significativo del número total de glóbulos blancos (WBC) tras consumir una dieta alta en grasa y fructosa en comparación con el consumo de una dieta estándar (**Tabla 32**). Sin embargo, no hubo diferencias significativas tras aplicar las intervenciones en el grupo obeso, aunque sí que se observó una tendencia a descender dichos niveles. La implementación de las distintas intervenciones produjo un leve descenso en los niveles de hemoglobina (HGB) y en la concentración de hemoglobina corpuscular media (MCHC), así como un leve ascenso en el volumen corpuscular medio (MCV) en comparación con el grupo obeso. El número total de plaquetas (PLT) aumentó significativamente en HF/SD y HF/NEX y la amplitud de distribución eritrocitaria (RDW) en HF/SE en comparación con el grupo obeso. Por otro lado, se observó exclusivamente una disminución significativa en los niveles de hemoglobina corpuscular media (MCH) en el grupo HF/NEX en comparación con HF. No hubo diferencias entre los grupos experimentales en número total de glóbulos rojos (RBC) y el hematocrito (HCT).

Tabla 32. Efecto de las intervenciones sobre parámetros hemáticos determinados.

	SD	HF	HF/SD	HF/EX	HF/NT	HF/NEX	HF/S	HF/SE
WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1.98 ± 0.24 A	3.73 ± 0.22 B	3.41 ± 0.31 B	2.84 ± 0.46 AB	2.89 ± 0.43 AB	2.72 ± 0.36 AB	2.59 ± 0.38 AB	2.59 ± 0.48 AB
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	7.92 ± 0.32 A	8.17 ± 0.36 A	7.93 ± 0.11 A	7.67 ± 0.36 A	7.59 ± 0.07 A	7.75 ± 0.31 A	7.88 ± 0.12 A	7.62 ± 0.23 A
HGB (g/dL)	15.5 ± 0.60 BC	15.8 ± 0.52 C	14.8 ± 0.18 ABC	14.1 ± 0.65 A	14.4 ± 0.07 AB	13.9 ± 0.35 A	15.1 ± 0.16 ABC	14.5 ± 0.27 AB
HCT (%)	39.2 ± 1.34 A	39.8 ± 1.01 A	41.8 ± 0.57 A	41.3 ± 1.15 A	40.2 ± 0.14 A	41.9 ± 1.45 A	41.8 ± 0.66 A	39.8 ± 1.33 A
PLT ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	605.0 ± 52.5 A	625.9 ± 60.7 A	1,025.3 ± 197.5 B	656.7 ± 68.1 A	729.2 ± 54.2 AB	1,057.9 ± 161.3 B	850.4 ± 80.7 AB	860.4 ± 78.9 AB
MCV (fL)	51.1 ± 0.50 AB	50.0 ± 0.65 A	52.8 ± 0.21 B	51.8 ± 1.05 AB	53.1 ± 0.40 B	52.3 ± 0.42 B	53.1 ± 0.74 B	52.2 ± 0.81 B
MCH (pg)	19.6 ± 0.10 C	19.4 ± 0.28 BC	18.6 ± 0.16 AB	18.4 ± 0.41 AB	19.1 ± 0.22 BC	17.9 ± 0.49 A	19.1 ± 0.20 BC	19.1 ± 0.55 BC
MCHC (g/dL)	38.4 ± 0.38 C	38.7 ± 0.11 C	35.3 ± 0.21 AB	35.4 ± 0.20 AB	36.0 ± 0.23 B	34.2 ± 0.86 A	36.1 ± 0.46 B	36.6 ± 1.18 B
RDW (%)	15.9 ± 0.19 BCD	15.5 ± 0.19 ABC	14.8 ± 0.14 A	14.7 ± 0.37 A	14.6 ± 0.38 A	15.0 ± 0.31 AB	16.3 ± 0.47 CD	16.7 ± 0.48 D

Los datos corresponden a la media de 8 ratas ± EEM. A-D medias dentro de la misma fila con letras diferentes difieren significativamente ($p < .05$). WBC, número total de glóbulos blancos ($\times 10^3/\mu\text{L}$); RBC, número total de glóbulos rojos ($\times 10^6/\mu\text{L}$); HGB, hemoglobina (g/dL); HCT, % volumen de sangre ocupado por glóbulos rojos (hematocrito); PLT, número total de plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$); MCV, volumen corpuscular medio (fL); MCH, hemoglobina corpuscular media (pg); MCHC, concentración de hemoglobina corpuscular media (g/dL); RDW, amplitud de distribución eritrocitaria (%). SD, dieta estándar durante 16 semanas; HF, dieta alta en grasa y fructosa durante 16 semanas; HF/SD, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar durante 8 semanas; HF/EX, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar y entrenamiento interválico de alta intensidad (HIIT) durante 8 semanas; HF/NT, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar con nutracéutico durante 8 semanas; HF/NEX, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar con nutracéutico y HIIT durante 8 semanas; HF/S, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar e inyección subcutánea de semaglutida durante 8 semanas; HF/SE, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar, inyección subcutánea de semaglutida y HIIT durante 8 semanas.

4.4.2.8 Bioquímica plasmática

El efecto de las intervenciones sobre los diferentes parámetros determinados relacionados con el metabolismo lipídico, así como marcadores de riesgo cardiovascular y enzimas plasmáticas relacionadas con daño hepático se muestran en la **Tabla 33**.

En cuanto a los parámetros relacionados con el metabolismo lipídico, se observó un aumento muy pronunciado en los niveles de triglicéridos tras el consumo de una dieta alta en grasa y fructosa en comparación con el consumo de una dieta estándar. Todas las intervenciones implementadas descendieron significativamente los niveles triglicéridos, especialmente los grupos que incluyeron la semaglutida. Además, la inclusión del nutracéutico en la dieta produjo un descenso más pronunciado que la dieta estándar por sí sola. El consumo de una dieta alta en grasa y fructosa también elevó significativamente los niveles de colesterol en comparación con el consumo de una dieta estándar. La restricción calórica disminuyó levemente el nivel de colesterol, mientras que la administración exclusiva de semaglutida lo aumentó significativamente en comparación con el grupo obeso HF. Esta misma tendencia se observó en los niveles de HDL- y LDL-colesterol. Los niveles de fosfolípidos descendieron tras implementar exclusivamente una restricción calórica en comparación con el grupo HF; no se observaron diferencias significativas con el resto de intervenciones.

Por otro lado, entre los marcadores de riesgo cardiovascular, los índices glucemia-triglicéridos, c-no-HDL, y TG/HDL, aumentaron tras el consumo de una dieta alta en grasa y fructosa en comparación con una dieta estándar. Todas las intervenciones aplicadas disminuyeron significativamente los índices glucemia-triglicéridos y TG/HDL, mientras que el índice c-no-HDL solo disminuyó significativamente tras aplicar exclusivamente una restricción calórica. No se observaron diferencias significativas en el índice aterogénico entre los grupos experimentales.

Las enzimas plasmáticas relacionadas con daño hepático (AST, ALT, ALP y LDH) disminuyeron tras el consumo de una dieta alta en grasa y fructosa en comparación con una dieta estándar. Las intervenciones tuvieron efectos diferentes en función de la enzima analizada. Los niveles de aspartato aminotransferasa (AST) y fosfatasa alcalina (ALP) disminuyeron en HF/SE en comparación con HF, así como, en HF/EX en el caso de la ALP. Por otro lado, los niveles de la alanina aminotransferasa (ALT) aumentaron

significativamente en HF/NEX y HF/S en comparación con HF. Además, se observó una tendencia a aumentar los niveles de la actividad lactato deshidrogenasa (LDH) con todas las intervenciones, pero solo resultó significativa tras la administración de semaglutida.

Tabla 33. Efecto de las intervenciones sobre parámetros plasmáticos determinados.

	SD	HF	HF/SD	HF/EX	HF/NT	HF/NEX	HF/S	HF/SE
Triglicéridos (mg/dL)	35.0 ± 2.97 A	122.6 ± 23.8 C	75.3 ± 14.7 B	45.1 ± 6.51 AB	48.8 ± 5.78 AB	47.3 ± 5.02 AB	35.3 ± 1.95 A	35.8 ± 4.54 A
Colesterol (mg/dL)	51.1 ± 4.34 A	73.4 ± 5.37 BC	57.4 ± 6.21 AB	70.7 ± 3.35 BC	80.0 ± 7.84 CD	79.7 ± 4.66 CD	91.5 ± 5.34 D	77.1 ± 6.57 CD
HDL-colesterol (mg/dL)	25.9 ± 1.47 A	34.1 ± 2.29 ABC	28.0 ± 6.06 AB	33.9 ± 1.81 ABC	40.5 ± 3.86 C	38.0 ± 2.08 C	36.6 ± 1.49 BC	34.4 ± 1.43 ABC
LDL-colesterol (mg/dL)	3.84 ± 0.19 A	5.05 ± 0.70 AB	4.35 ± 0.73 AB	5.79 ± 0.68 AB	6.02 ± 1.11 AB	5.07 ± 1.06 AB	9.80 ± 0.92 C	6.79 ± 0.93 B
Fosfolípidos (mg/dL)	104.2 ± 8.64 A	132.5 ± 9.58 B	102.8 ± 8.29 A	113.1 ± 5.80 AB	126.3 ± 9.18 AB	138.8 ± 13.1 B	128.2 ± 4.67 AB	119.5 ± 5.48 AB
AST (U/L)	65.5 ± 3.88 C	56.4 ± 4.86 B	52.8 ± 0.85 AB	55.8 ± 2.65 B	56.5 ± 3.51 B	53.6 ± 2.83 AB	50.9 ± 1.72 AB	45.3 ± 1.62 A
ALT (U/L)	21.3 ± 1.84 BC	17.5 ± 1.27 AB	17.0 ± 1.41 AB	13.2 ± 1.73 A	18.2 ± 1.57 AB	25.5 ± 3.00 CD	30.3 ± 2.74 D	18.5 ± 1.42 AB
ALP (U/L)	83.7 ± 4.93 C	56.9 ± 5.92 B	53.6 ± 4.65 AB	39.6 ± 3.15 A	50.7 ± 5.06 AB	51.4 ± 4.85 AB	50.8 ± 5.30 AB	38.4 ± 3.77 A
LDH (U/L)	639.6 ± 109.82 C	316.4 ± 40.6 A	482.1 ± 47.9 ABC	349.8 ± 43.0 A	417.9 ± 36.0 AB	482.2 ± 47.9 ABC	551.8 ± 49.2 BC	426.4 ± 37.8 AB
Índice aterogénico	1.82 ± 0.11 A	2.48 ± 0.26 A	1.92 ± 0.29 A	2.62 ± 0.50 A	1.99 ± 0.08 A	2.11 ± 0.11 A	2.41 ± 0.05 A	2.24 ± 0.16 A
Índice glucemia-triglicéridos	7.60 ± 0.18 AB	8.91 ± 0.25 C	8.08 ± 0.23 B	7.65 ± 0.21 AB	7.90 ± 0.15 AB	7.97 ± 0.22 AB	7.42 ± 0.08 A	7.43 ± 0.16 A
Índice no-HDL	22.2 ± 2.05 A	41.8 ± 3.68 CD	29.1 ± 4.96 AB	39.7 ± 3.70 BC	39.5 ± 4.42 BC	41.7 ± 3.61 CD	51.9 ± 3.14 D	38.3 ± 3.97 BC
Índice TG/HDL	1.44 ± 0.13 A	4.89 ± 1.07 B	2.30 ± 0.29 A	1.57 ± 0.35 A	1.40 ± 0.24 A	1.28 ± 0.12 A	0.97 ± 0.03 A	1.20 ± 0.22 A

Los datos corresponden a la media de 8 ratas ± EEM. A-E medias dentro de la misma fila con letras diferentes difieren significativamente ($p < .05$). AST, aspartato aminotransferasa; ALT, alanina aminotransferasa; GGT, gamma-glutamilttransferasa; ALP, fosfatasa alcalina; LDH, lactato deshidrogenasa; TG, triglicéridos. SD, dieta estándar durante 16 semanas; HF, dieta alta en grasa y fructosa durante 16 semanas; HF/SD, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar durante 8 semanas; HF/EX, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar y entrenamiento interválico de alta intensidad (HIIT) durante 8

semanas; HF/NT, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar con nutracéutico durante 8 semanas; HF/NEX, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar con nutracéutico y HIIT durante 8 semanas; HF/S, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar e inyección subcutánea de semaglutida durante 8 semanas; HF/SE, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar, inyección subcutánea de semaglutida y HIIT durante 8 semanas.

4.4.2.9 Contenido grasa hepática total

El consumo de una dieta alta en grasa y fructosa duplicó el contenido en grasa hepática en comparación con el consumo de una dieta estándar (**Tabla 34**). Todas las intervenciones aplicadas sobre el grupo obeso fueron efectivas y redujeron significativamente el contenido en grasa hepática. La combinación con ejercicio físico mostró un efecto mayor que las intervenciones individuales, así mismo se observó que la inclusión del nutraceutico en la dieta descendió el porcentaje de grasa hepática en mayor medida que la dieta estándar. Por último, los grupos de animales a los que se les administró la semaglutida presentaron los menores valores de grasa hepática. Se observó una relación directa entre los cambios del peso del hígado y los cambios de su contenido graso (**Figura 39**).

Tabla 34. Efecto de las intervenciones sobre la grasa hepática.

	SD	HF	HF/SD	HF/EX	HF/NT	HF/NEX	HF/S	HF/SE
Grasa hepática (g)	0.62 ± 0.04 A	1.78 ± 0.12 D	1.34 ± 0.05 C	0.94 ± 0.04 B	1.22 ± 0.07 C	0.83 ± 0.07 AB	0.84 ± 0.08 B	0.62 ± 0.06 A
Grasa hepática (%)	4.66 ± 0.38 A	9.55 ± 0.50 D	8.46 ± 0.23 C	6.69 ± 0.30 B	6.74 ± 0.21 B	5.69 ± 0.47 AB	5.13 ± 0.32 A	4.58 ± 0.34 A

Los datos corresponden a la media de 8 ratas ± EEM. A-D medias dentro de la misma fila con letras diferentes difieren significativamente ($p < .05$). SD, dieta estándar durante 16 semanas; HF, dieta alta en grasa y fructosa durante 16 semanas; HF/SD, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar durante 8 semanas; HF/EX, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar y entrenamiento interválico de alta intensidad (HIIT) durante 8 semanas; HF/NT, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar con nutraceutico durante 8 semanas; HF/NEX, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar con nutraceutico y HIIT durante 8 semanas; HF/S, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar e inyección subcutánea de semaglutida durante 8 semanas; HF/SE, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar, inyección subcutánea de semaglutida y HIIT durante 8 semanas.

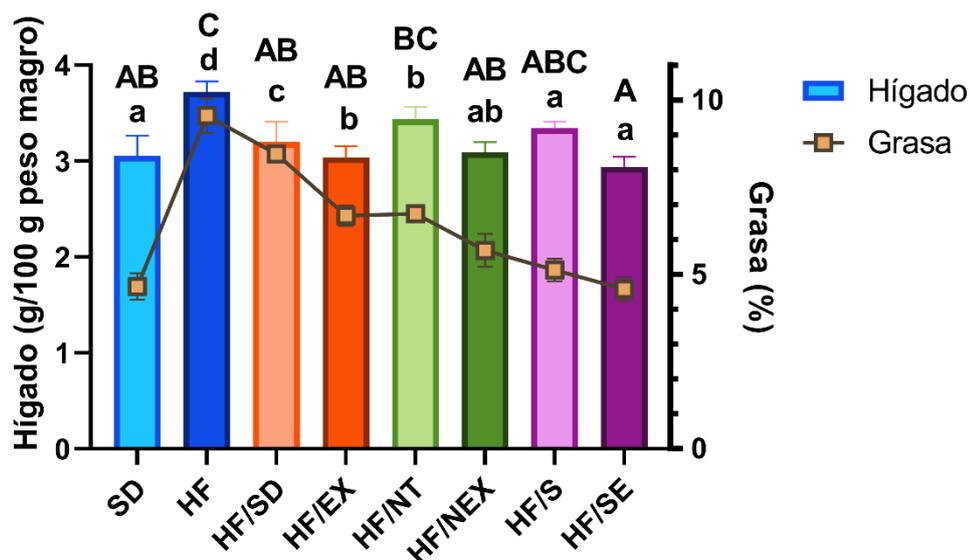


Figura 39. Efecto de las intervenciones sobre el peso del hígado (g/100 g peso magro) y la grasa hepática (%). Las columnas o puntos y las barras representan la media y el EEM, respectivamente (n = 8). Los valores dentro de cada tratamiento seguidos de letras distintas son significativamente diferentes (A-C, peso hepático; a-c, grasa hepática) $p < .05$. SD, dieta estándar durante 16 semanas; HF, dieta alta en grasa y fructosa durante 16 semanas; HF/SD, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar durante 8 semanas; HF/EX, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar y entrenamiento interválico de alta intensidad (HIIT) durante 8 semanas; HF/NT, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar con nutraceutico durante 8 semanas; HF/NEX, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar con nutraceutico y HIIT durante 8 semanas; HF/S, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar e inyección subcutánea de semaglutida durante 8 semanas; HF/SE, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar, inyección subcutánea de semaglutida y HIIT durante 8 semanas.

4.4.2.10 Valoración histológica del hígado

Los cambios histológicos hepáticos resultantes de la DIO durante 16 semanas, así como los de las diferentes intervenciones dietéticas, farmacológicas y de ejercicio físico se describen en **Tabla 35** y se observan en la **Figura 40**. Los animales sometidos al tratamiento dietético estándar (SD) durante 16 semanas (grupo SD) presentaron esteatosis hepática moderada, principalmente microvesicular con un bajo grado de balonización celular y con una inflamación portal leve-moderada (**Figura 41A**). Sin embargo, el consumo de una dieta alta en grasa y fructosa (HFHF) durante 16 semanas (grupo HF) condujo a una esteatosis hepática leve-moderada, tanto micro- como macrovesicular, sin balonización celular y con inflamación portal leve (**Figura 41B**). Las intervenciones que incluyeron el cambio de una dieta HFHF a una dieta SD, con o sin suplementación del nutraceutico (grupos HF/SD y HF/NT), incrementaron la esteatosis micro- y macrovesicular; presentando principalmente una esteatosis de tipo

macrovesicular al suplementarse la dieta con nutracéutico (**Figura 41D**), y de tipo microvesicular en ausencia de suplementación (**Figura 41C**). Además, dichas intervenciones dietéticas produjeron una inflamación centrolobulillar moderada y una marcada inflamación portal, siendo esta moderada en el grupo HF/SD (**Figura 41C**) y grave en el grupo HF/NT (**Figura 41D**). Por otra parte, tanto el consumo de una dieta SD durante 16 semanas, como el cambio de una dieta HFHF a SD a partir de la semana 8, indujo una ligera presencia de microgranulomas aislados (**Tabla 35**), aunque no se apreciaron dichas estructuras en los grupos que además de dieta SD se les administró semaglutida (grupo HF/S) y en el grupo que incluyó ejercicio físico y suplementación con nutracéutico (grupo HF/NEX).

En relación con las restantes intervenciones, la implementación de un protocolo de HIIT en los animales que consumieron las dietas SD con o sin inclusión de nutracéutico (**Figura 41E-F**), no tuvo efectos en los parámetros estudiados en comparación con el grupo HF; aunque sí se observó una reducción de estos a niveles leves o leves-moderados en comparación con los mismos grupos que no incluyeron el protocolo de HIIT (**Tabla 35**). La única intervención que redujo la esteatosis hepática en mayor medida, y a valores inexistentes, fue la inyección subcutánea de semaglutida en ausencia o presencia del protocolo de HIIT (**Figura 41G-H**).

Finalmente, una de las observaciones destacables, fue la existencia de esteatosis macrovesicular en forma de columnas o hileras con una disposición radial en la zona convexa del lóbulo hepático estudiado (**Figura 42B**) en todos los grupos, excepto en los grupos que incluyeron la administración de semaglutida (grupos HF/S y HF/SE).

En relación a la puntuación de la valoración de NASH mediante el índice NAS (**Tabla 36**), ninguno de los grupos experimentales presentó un valor indicativo de NASH. Así, los animales alimentados con la dieta SD a lo largo del periodo experimental de 16 semanas presentaron un valor de índice NAS de 2, mientras que en los animales a los que se indujo la obesidad durante 16 semanas el valor de este índice fue de 1. Por otra parte, las implementaciones de un cambio de dieta HFHF a SD con o sin inclusión del nutracéutico (grupos HF/SD y HF/NT) obtuvieron una puntuación de índice NAS de 1, en cambio los grupos en los que se implementó un protocolo de HIIT (grupos HF/EX y HF/NEX) y/o se administró semaglutida (grupos HF/SE y HF/S) el valor de este índice se redujo a 0.

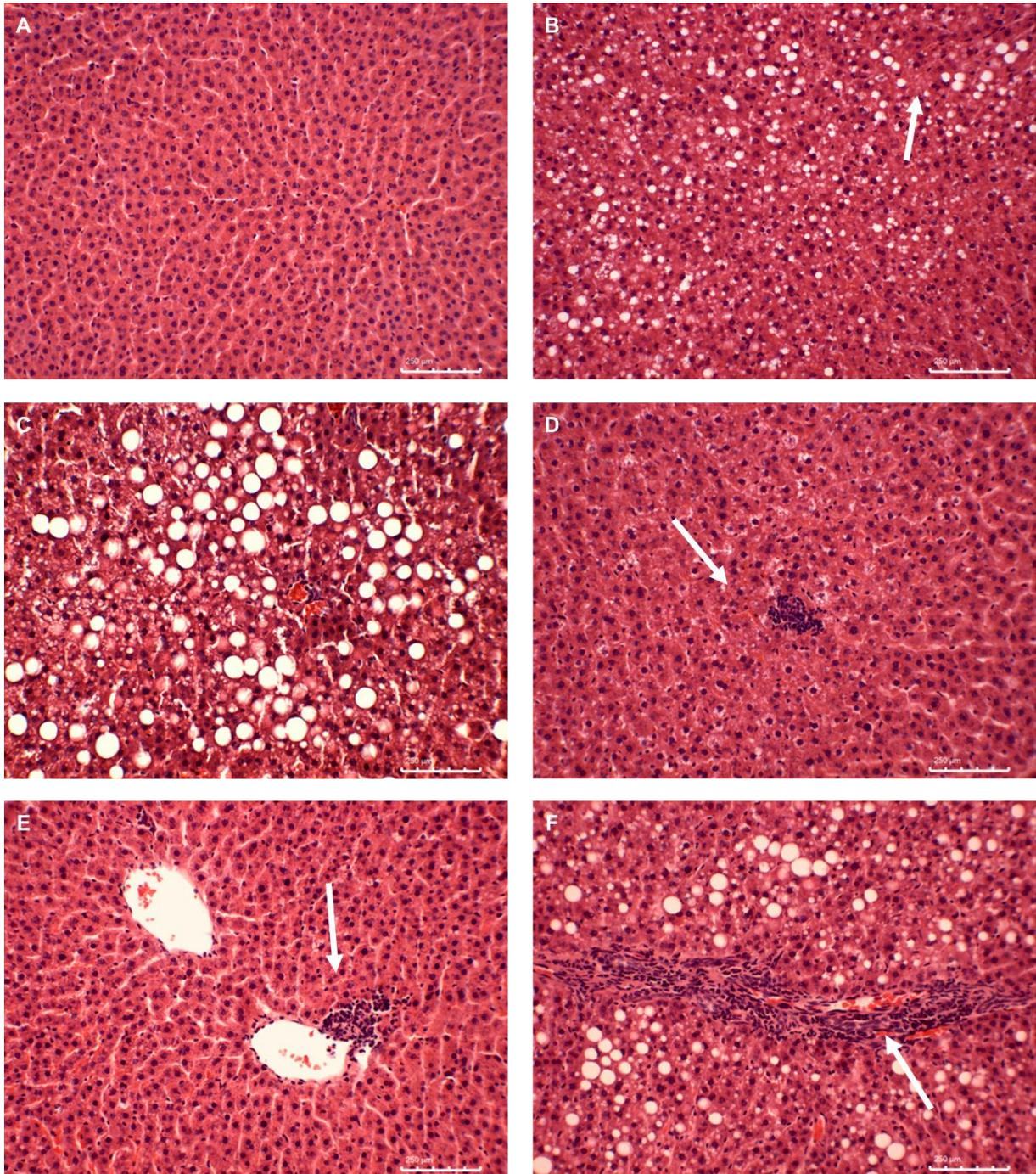


Figura 40. Microfotografías de las alteraciones encontradas en los hígados de ratas Sprague-Dawley de los diferentes grupos experimentales teñidos con hematoxilina-eosina a un aumento de 200x. (A) Hígado con morfología normal; (B) hígado con esteatosis microvesicular; (C) hígado con esteatosis macrovesicular; (D) hígado con microgranuloma; (E) hígado con infiltrado inflamatorio centrolobulillar; (F) hígado con infiltrado inflamatorio en espacio porta.

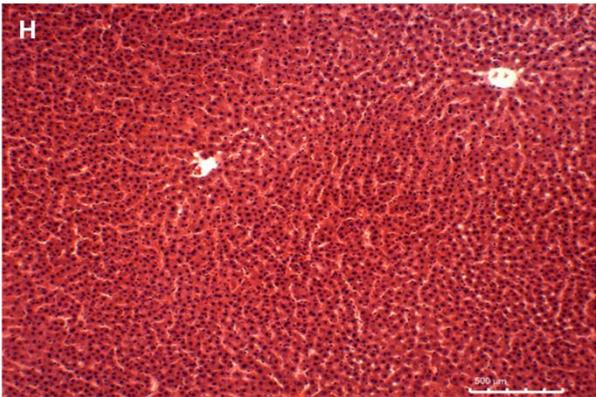
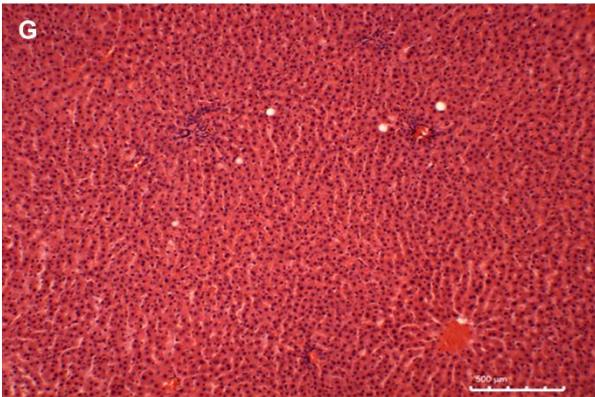
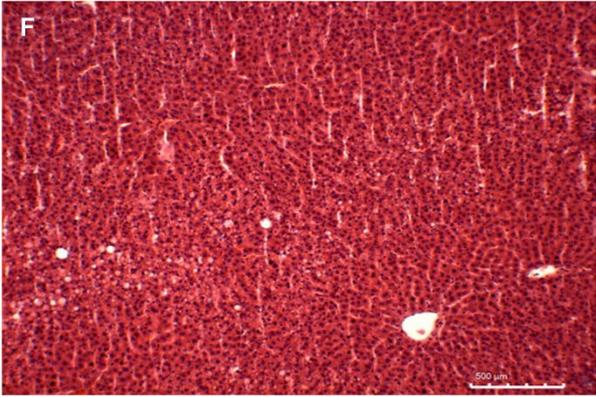
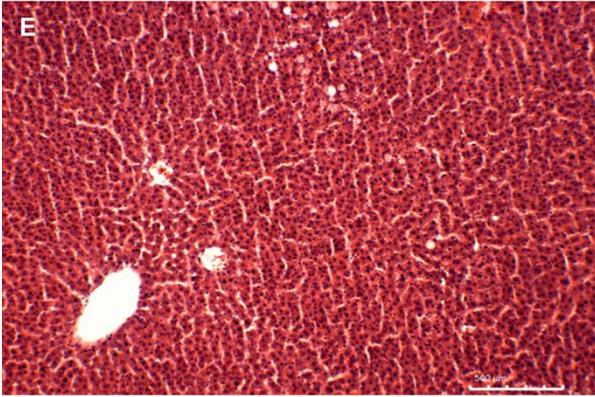
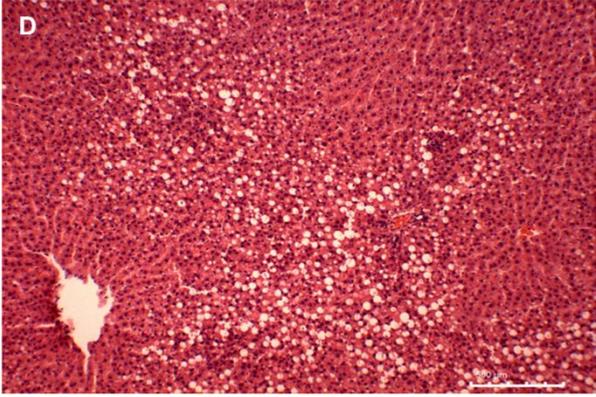
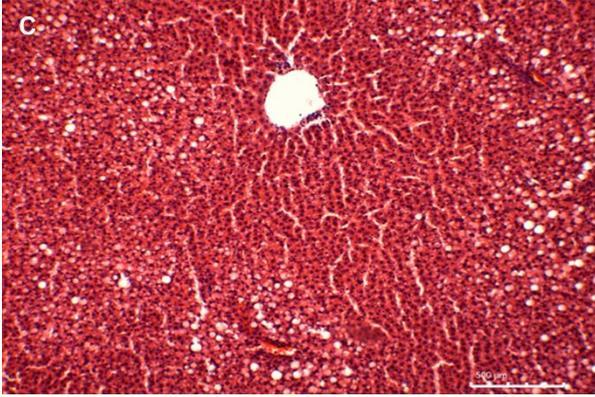
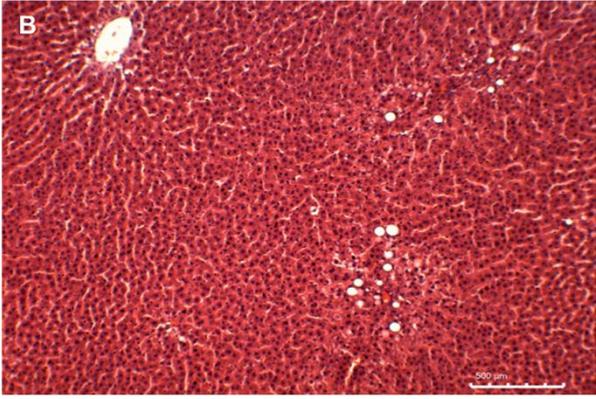
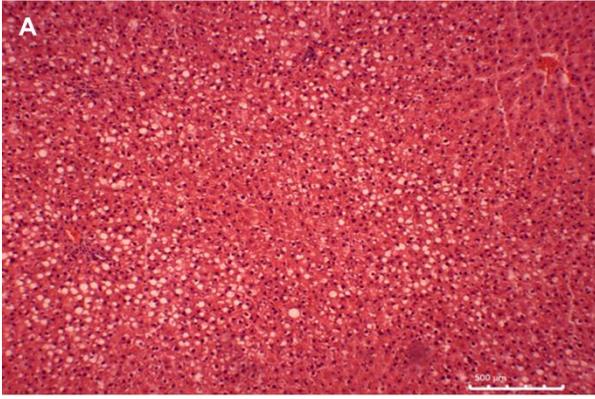


Figura 41. Microfotografías representativas de los hígados de las ratas Sprague-Dawley de cada grupo experimental teñidas con hematoxilina-eosina a un aumento de 100x. (A) SD, dieta estándar durante 16 semanas; (B) HF, dieta alta en grasa y fructosa durante 16 semanas; (C) HF/SD, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar durante 8 semanas; (D) HF/NT, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar con nutracéutico durante 8 semanas; (E) HF/EX, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar y entrenamiento interválico de alta intensidad (HIIT) durante 8 semanas; (F) HF/NEX, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar con nutracéutico y HIIT durante 8 semanas; (G) HF/S, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar e inyección subcutánea de semaglutida durante 8 semanas; (H) HF/SE, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar, inyección subcutánea de semaglutida y HIIT durante 8 semanas.

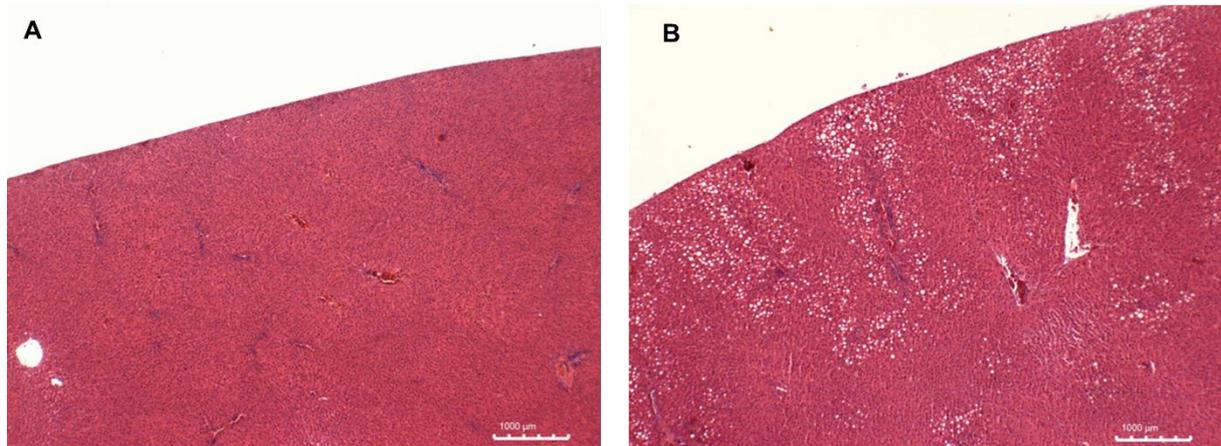


Figura 42. Microfotografías del área convexa de hígados de ratas Sprague-Dawley teñidos con hematoxilina-eosina a un aumento de 40x, donde se aprecia la ausencia (A) o presencia (B) de esteatosis en forma de hileras con disposición radial.

Tabla 35. Puntuación cruzada semicuantitativa de las alteraciones histológicas en los diferentes grupos experimentales.

	SD	HF	HF/SD	HF/EX	HF/NT	HF/NEX	HF/S	HF/SE
Cambio microvesicular	++	-/+	+/>++	-/+	+	-/+	-	-
Cambio macrovesicular	+	+	+	-/+	+/>++	-/+	-/+	-
Balonización	-/+	-	-/+	-	-	-	-	-
Inflamación portal	+/>++	+	+/>++	+	++/>+++	+/>++	+/>++	+
Inflamación centrolobulillar	-/+	-/+	+	-/+	+	-/+	-/+	-/+
Microgranulomas	-/+	-	-/+	-/+	-/+	-	-	-/+
Fibrosis	-	-	-	-	-	-	-	-

(-) inexistente, (+) leve, (++) leve-moderado, (+++) moderado, (++++) severo, (-/+) entre inexistente y leve, (+/++) entre leve y leve-moderado. SD, dieta estándar durante 16 semanas; HF, dieta alta en grasa y fructosa durante 16 semanas; HF/SD, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar durante 8 semanas; HF/EX, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar y entrenamiento interválico de alta intensidad (HIIT) durante 8 semanas; HF/NT, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar con nutracéutico durante 8 semanas; HF/NEX, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar con nutracéutico y HIIT durante 8 semanas; HF/S, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar e inyección subcutánea de semaglutida durante 8 semanas; HF/SE, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar, inyección subcutánea de semaglutida y HIIT durante 8 semanas.

Tabla 36. Sistema de puntuación semicuantitativo para evaluar el rango de características histológicas de EHNA en hígado de ratas Sprague Dawley de los diferentes grupos experimentales.

	Ítem	Definición	Puntuación	SD	HF	HF/SD	HF/EX	HF/NT	HF/NEX	HF/S	HF/SE
ESTEATOSIS	Grado Baja a media potencia de afectación parenquimatosa por esteatosis	<5%	0	2	1	1	0	1	0	0	0
		5%-33%	1								
		33%-66%	2								
		>66%	3								
	Localización Patrón de distribución predominante	Zona 3 (Centrolobulillar)	0	1	1	1	1	1	1	0	0
		Zona 1 (Periportal)	1								
		Azonal	2								
		Panacinar	3								
	Esteatosis microvesicular Parches contiguos	Ausencia	0	1	1	1	1	1	1	0	0
		Presencia	1								
INFLAMACIÓN	Inflamación lobular Evaluación global de todos los focos inflamatorios	Sin focos	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		<2 focos por campo 200 x	1								
		2-4 focos por campo 200 x	2								
		>4 focos por campo 200 x	3								
	Microgranulomas Pequeños agregados de macrófagos	Ausencia	0	1	0	1	1	1	0	0	1
		Presencia	1								
	Lipogranulomas grandes Generalmente en áreas portales o adyacentes a venas centrales	Ausencia	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Presencia	1								
	Inflamación portal Evaluado desde bajo aumento	Ninguna o mínima	0	1	1	1	1	1	1	0	1
		Mayor que mínima	1								
LESIÓN CELULAR HEPÁTICA	Balonización o Degeneración balonaria	Ninguna	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Pocas células balonizadas	1								
		Muchas células/balonización prominente	2								
	Cuerpos acidófilos	Ninguno o poco frecuente	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Muchos	1								
	Macrófagos pigmentados	Ninguno o poco frecuente	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Muchos	1								
	Megamitocondria	Ninguna o poco frecuente	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Muchas	1								

OTROS HALLAZGOS	Cuerpos de Mallory o hialina alcohólica Visible en manchas habituales	Ninguno o poco frecuente	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Muchos	1								
	Núcleos glucogenados o Núcleos glucogénicos Parches contiguos	Ninguno o poco frecuente	0								
		Muchos	1								
FIBROSIS	Etapas	Ninguna	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Perisinusoidal o periportal	1								
		Leve, zona 3, perisinusoidal	1A								
		Moderada, zona 3, perisinusoidal	1B								
		Portal/periportal	1C								
		Perisinusoidal y portal/periportal	2								
		Fibrosis en puente	3								
		Cirrosis	4								
Puntuación NAS (Grado de esteatosis + Inflamación lobular + Balonización) =				2	1	1	0	1	0	0	0

SD, dieta estándar durante 16 semanas; HF, dieta alta en grasa y fructosa durante 16 semanas; HF/SD, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar durante 8 semanas; HF/EX, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar y entrenamiento interválico de alta intensidad (HIIT) durante 8 semanas; HF/NT, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar con nutraceutico durante 8 semanas; HF/NEX, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar con nutraceutico y HIIT durante 8 semanas; HF/S, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar e inyección subcutánea de semaglutida durante 8 semanas; HF/SE, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar, inyección subcutánea de semaglutida y HIIT durante 8 semanas.

4.4.2.11 Expresión génica: mi-ARN

La expresión de mi-ARNs relacionados con obesidad y NAFLD en hígado y tejido adiposo se muestran en las **Tablas 37 y 38**. En el hígado se observó que el consumo de una dieta alta en grasa y fructosa aumentó significativamente la expresión los mi-ARNs estudiados a excepción de miR-21. En el caso de este mi-ARN sí que se observó una tendencia biológica aumentar su expresión en el grupo HF, y a descender tras aplicar las intervenciones, existiendo diferencias significativas entre HF/NT y HF. Respecto a la expresión de miR-34a, la realización de un protocolo de HIIT no fue efectiva, mientras que el resto de las intervenciones redujo su expresión en comparación con el grupo obeso, siendo estadísticamente significativas estas diferencias en los grupos a los que se les administró semaglutida. La realización de ejercicio físico o la administración de semaglutida, en ausencia de combinación, fueron las únicas intervenciones que redujeron significativamente la expresión de miR-122, mientras que solo la administración de semaglutida lo hizo en miR-192 en comparación con el grupo HF.

Al igual que en el hígado, en el tejido adiposo el consumo de una dieta alta en grasa y fructosa aumentó significativamente la expresión los mi-ARNs estudiados, a excepción de miR-122. En el caso de este mi-ARN no hubo diferencias significativas entre grupos. Respecto a la expresión de miR-21 tampoco se observaron diferencias significativas entre el grupo obeso y los grupos tratados, aunque sí pareció existir una tendencia a disminuir su expresión, a excepción de la administración con semaglutida que incluso la aumentó. Por otro lado, las intervenciones redujeron significativamente la expresión de miR-34a y miR-192 en comparación con grupo obeso, a excepción de la administración de semaglutida (HF/S).

Tabla 37. Efecto de las intervenciones sobre la expresión de mi-ARNs en hígado.

	SD	HF	HF/SD	HF/EX	HF/NT	HF/NEX	HF/S	HF/SE
miR-21	1.00 ± 0.09 AB	1.09 ± 0.05 B	0.90 ± 0.03 AB	0.90 ± 0.07 AB	0.86 ± 0.02 A	0.91 ± 0.03 AB	0.89 ± 0.10 AB	0.96 ± 0.08 AB
miR-34a	1.00 ± 0.19 AB	2.35 ± 0.38 D	1.81 ± 0.35 BCD	2.25 ± 0.25 CD	1.71 ± 0.25 ABCD	2.15 ± 0.69 CD	0.69 ± 0.05 A	1.28 ± 0.26 ABC
miR-122	1.00 ± 0.12 A	1.29 ± 0.06 B	1.05 ± 0.02 AB	1.01 ± 0.08 A	1.13 ± 0.05 AB	1.07 ± 0.04 AB	0.99 ± 0.07 A	1.24 ± 0.14 AB
miR-192	1.00 ± 0.10 A	1.32 ± 0.10 B	1.29 ± 0.03 B	1.19 ± 0.09 AB	1.40 ± 0.03 B	1.44 ± 0.06 B	1.05 ± 0.05 A	1.41 ± 0.11 B

Los datos corresponden a la media de 8 ratas ± EEM. A-D medias dentro de la misma fila con letras diferentes difieren significativamente ($p < .05$). SD, dieta estándar durante 16 semanas; HF, dieta alta en grasa y fructosa durante 16 semanas; HF/SD, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar durante 8 semanas; HF/EX, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar y entrenamiento interválico de alta intensidad (HIIT) durante 8 semanas; HF/NT, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar con nutraceutico durante 8 semanas; HF/NEX, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar con nutraceutico y HIIT durante 8 semanas; HF/S, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar e inyección subcutánea de semaglutida durante 8 semanas; HF/SE, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar, inyección subcutánea de semaglutida y HIIT durante 8 semanas.

Tabla 38. Efecto de las intervenciones sobre la expresión de mi-ARNs en tejido adiposo.

	SD	HF	HF/SD	HF/EX	HF/NT	HF/NEX	HF/S	HF/SE
miR-21	1.00 ± 0.11 A	2.45 ± 0.54 BC	1.90 ± 0.59 AB	1.97 ± 0.30 AB	1.50 ± 0.38 AB	1.60 ± 0.58 AB	3.51 ± 0.44 C	2.42 ± 0.33 BC
miR-34a	1.00 ± 0.18 A	3.33 ± 0.43 B	1.76 ± 0.33 A	1.40 ± 0.22 A	1.26 ± 0.31 A	1.42 ± 0.41 A	2.79 ± 0.37 B	1.59 ± 0.22 A
miR-122	1.00 ± 0.38 A	0.76 ± 0.21 A	0.98 ± 0.36 A	0.28 ± 0.04 A	1.06 ± 0.31 A	0.78 ± 0.21 A	1.07 ± 0.30 A	0.48 ± 0.12 A
miR-192	1.00 ± 0.10 A	1.92 ± 0.33 BC	1.16 ± 0.21 A	0.85 ± 0.14 A	1.27 ± 0.24 A	1.34 ± 0.21 AB	2.04 ± 0.15 C	1.29 ± 0.17 A

Los datos corresponden a la media de 8 ratas ± EEM. A-C medias dentro de la misma fila con letras diferentes difieren significativamente ($p < .05$). SD, dieta estándar durante 16 semanas; HF, dieta alta en grasa y fructosa durante 16 semanas; HF/SD, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar durante 8 semanas; HF/EX, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar y entrenamiento interválico de alta intensidad (HIIT) durante 8 semanas; HF/NT, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar con nutraceutico durante 8 semanas; HF/NEX, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar con nutraceutico y HIIT durante 8 semanas; HF/S, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar e inyección subcutánea de semaglutida durante 8 semanas; HF/SE, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar, inyección subcutánea de semaglutida y HIIT durante 8 semanas.

4.4.2.12 Expresión génica: OpenArray

La expresión diferencial de los 105 genes de estudio en hígado, colon y tejido adiposo se representa en las **Figuras 43-49**. Cabe destacar que la expresión de múltiples genes fue difícil de detectar e incluir en el *Heatmap*, puesto que el tejido adiposo es un órgano de complicada extracción de ARN y expresión génica (222).

El consumo de una dieta alta en grasa y fructosa durante 21 semanas provocó una reducción en la expresión en los genes relacionados con el estrés oxidativo en comparación con el consumo de una dieta estándar en el hígado. La intervención más eficaz para reducir la expresión de dichos genes en las ratas obesas (**Figura 43**) tanto en hígado como en tejido adiposo fue la incorporación del nutraceutico en la dieta combinado o no con el protocolo de HIIT. El resto de las intervenciones, especialmente, la administración de semaglutida aumentó la expresión de algunos genes en comparación con el grupo HF. En el caso del colon no hubo una gran diferencia en base a la elección del tipo de dieta SD vs HFHF, por lo que presentan una agrupación cercana. Las intervenciones dietéticas y de ejercicio físico fueron más efectivas que la farmacológica, la cual incluso aumentó la expresión de ciertos genes.

Respecto al efecto sobre el metabolismo lipídico (mecanismos lipogénicos como lipolíticos), la incorporación del nutraceutico y la realización de ejercicio físico actuaron diferencialmente en general en todos los tejidos. En primer lugar, se observó que el consumo de una dieta estándar aumentaba los niveles de expresión génica de genes implicados en la acción lipogénica, principalmente en hígado y en tejido adiposo (**Figura 44**). Por otra parte, todas las intervenciones aplicadas condujeron a niveles de expresión génica similar en el hígado y tejido adiposo, aunque en este último, la intervención farmacológica aumentó ligeramente la expresión relativa de genes lipogénicos. Las diferencias más acusadas se observaron a nivel del colon donde el nutraceutico y el protocolo de HIIT disminuyeron la expresión de prácticamente la totalidad de los genes estudiados. Por otro lado, estas mismas intervenciones influyeron positivamente en la acción lipolítica hepática (**Figura 45**). Aunque resultados contrarios se observaron en el tejido adiposo disminuyendo la expresión de los genes relacionados con la lipólisis. Se halló una segmentación bien diferenciada a nivel del colon de la expresión génica en base a las intervenciones aplicadas. La incorporación del nutraceutico en la dieta (HF/NT) y la realización de un protocolo de HIIT (HF/EX) disminuyó ligeramente en la

expresión de genes implicados en vías lipolíticas, mientras que el resto de las intervenciones regularon al alza su expresión.

En relación al metabolismo del colesterol (**Figura 46**), no se observó expresión de los genes estudiados en el tejido adiposo y escasamente en el colon, donde la expresión de *Hmgcr* y *Cyp11a1* estaba aumentada y disminuida, respectivamente, en todos los grupos. En el hígado se observó una segmentación bien diferenciada agrupándose próximamente cada intervención con su homóloga más ejercicio. La expresión de *Hmgcr* y *Cyp11a1* se vio reducida en HF/SD y HF/EX; aumentando ligeramente en HF/S y HF/SE. La incorporación del nutracéutico en la dieta provocó un aumento de la expresión hepática de *Cyp11a1* y una disminución en *Hmgcr*.

La expresión de los genes relacionados con el metabolismo glucídico (**Figura 47**) fue similar en el hígado, colon y tejido adiposo en todos los grupos, a excepción del grupo que al que se le administró semaglutida, en el que la expresión general disminuyó en el hígado y aumentó en el colon y tejido adiposo.

Los animales que consumieron una dieta normocalórica durante 16 semanas presentaban una expresión general aumentada en hígado en los genes relacionados con la inflamación (**Figura 48**) en comparación con una dieta hipercalórica durante el mismo periodo experimental. En este mismo tejido todas las intervenciones redujeron la expresión génica; aunque la intervención menos efectiva fue el cambio a una dieta normocalórica en ausencia o en combinación con ejercicio físico. En colon y en tejido adiposo la expresión génica fue similar en todos los grupos, a excepción del grupo HF/S en la que los niveles de expresión fueron ligeramente superiores. Destaca el hecho de que el grupo HF/S se situó más alejado que el grupo HF en el diagrama *Heatmap*, mientras que en el tejido adiposo ambos grupos estaban próximos.

En la **Figura 49**, se agrupan genes involucrados en distintas funciones celulares. En cuanto al daño celular (*Cdkn1a* y *Gadd45a*), todas las intervenciones redujeron de forma general la expresión en los 3 tejidos de estudio, aunque se observó un ligero aumento de *Gadd45a* en el tejido adiposo.

Los genes relacionados con la estructura celular anatómica (*Mmp15* y *Psmb9*) se encontraban ligeramente aumentados en el hígado; la expresión de *Psmb9* se encontraba ligeramente inferior en colon y tejido adiposo a excepción de en HF/S y HF/SE en el

primer tejido; en estos mismos grupos y tejido se vio aumentada la expresión de *Mmp15*, y dicho gen sufrió una ligera sobreexpresión en el tejido adiposo en todos los grupos y especialmente en HF/NT.

Gdf15 y *Myc* son genes relacionados con la proliferación celular, la expresión del primero de ellos fue reducida por todas las intervenciones a excepción del grupo HF/SE, donde se vio fuertemente aumentada. El caso contrario se observó en el colon donde la expresión de este gen fue regulada al alza, especialmente en HF/S. No se observó expresión en tejido adiposo. Resultados contrarios se obtuvieron en la expresión de *Myc*, en el hígado los valores de expresión fueron cercanos a los del grupo HF, a excepción de HF/EX que aumentó considerablemente, mientras que en colon disminuyó su expresión en todas las intervenciones, menos en HF/S, al igual que en el tejido adiposo.

Finalmente, se analizó la expresión de diferentes genes involucrados en el transporte de solutos (*Abcg5*, *Rbp4*, *Slc27a2*, *Slc27a5*, *Slc2a2* y *Slc34a2*). *Abcg5*, es un transportador de esteroides y colesterol y solo se expresó en el hígado; la inyección de semaglutida disminuyó su expresión mientras que el protocolo de HIIT lo aumentó en comparación con el grupo HF. *Rbp4* es un transportador de retinol que se encontró ligeramente sobreexpresado en hígado y tejido adiposo en todos los grupos, excepto a los que se les administró semaglutida en el hígado. Sin embargo, en el colon disminuyó su expresión en todos los grupos. *Slc27a2* y *Slc27a5* están relacionados con el transporte de lípidos, ambos genes presentaron una expresión similar en todos los grupos incluido en grupo HF, a excepción de los grupos a los que se les administró semaglutida, que disminuyeron su expresión en *Slc27a2* y aumentando en *Slc27a5*. No se observó expresión en tejido adiposo de ninguno de los dos genes, y solo una sobreexpresión de *Slc27a2* en colon. Finalmente, *Slc34a2* es un transportador de fosfato dependiente de sodio y sensible al pH, que mostró una infraexpresión en el hígado y una sobreexpresión en el colon.

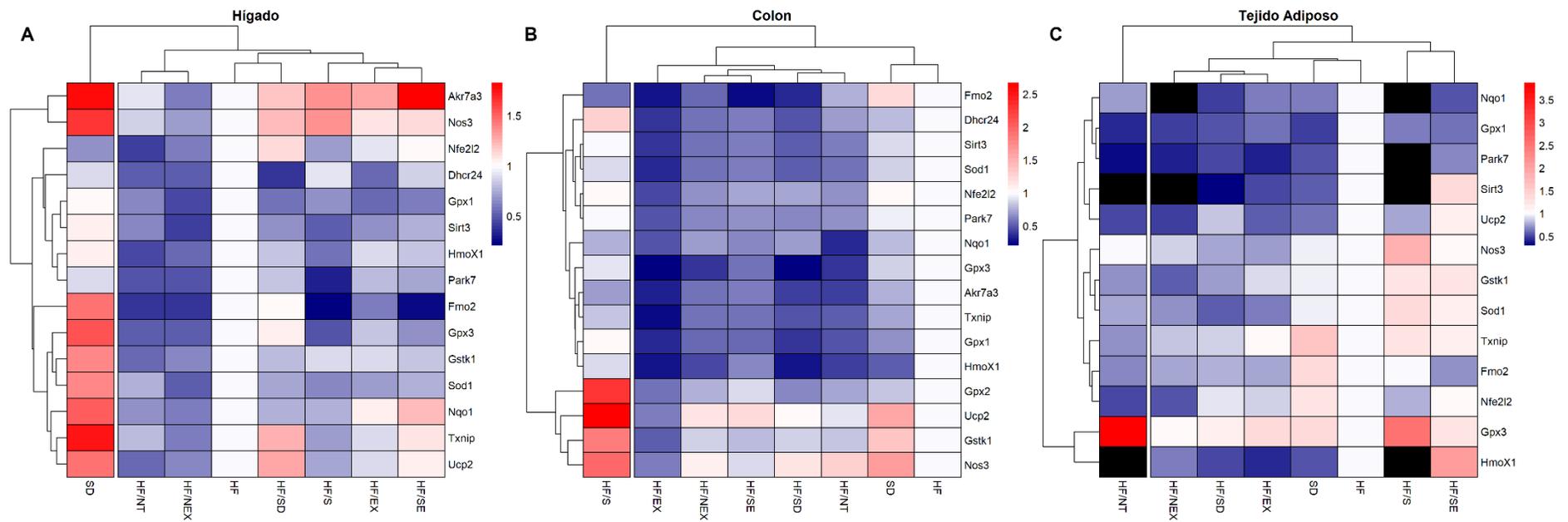


Figura 43. Representación mediante *Heatmap* de la expresión relativa de genes (*fold-change*) relacionados con el estrés oxidativo en (A) Hígado, (B) Colon y (C) Tejido adiposo. El *Heatmap* fue generado a partir de los *fold-change* con respecto al grupo HF. Las casillas en negro indican que no existe amplificación de ese gen. SD, dieta estándar durante 16 semanas; HF, dieta alta en grasa y fructosa durante 16 semanas; HF/SD, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar durante 8 semanas; HF/EX, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar y entrenamiento interválico de alta intensidad (HIIT) durante 8 semanas; HF/NT, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar con nutraceutico durante 8 semanas; HF/NEX, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar con nutraceutico y HIIT durante 8 semanas; HF/S, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar e inyección subcutánea de semaglutida durante 8 semanas; HF/SE, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar, inyección subcutánea de semaglutida y HIIT durante 8 semanas.

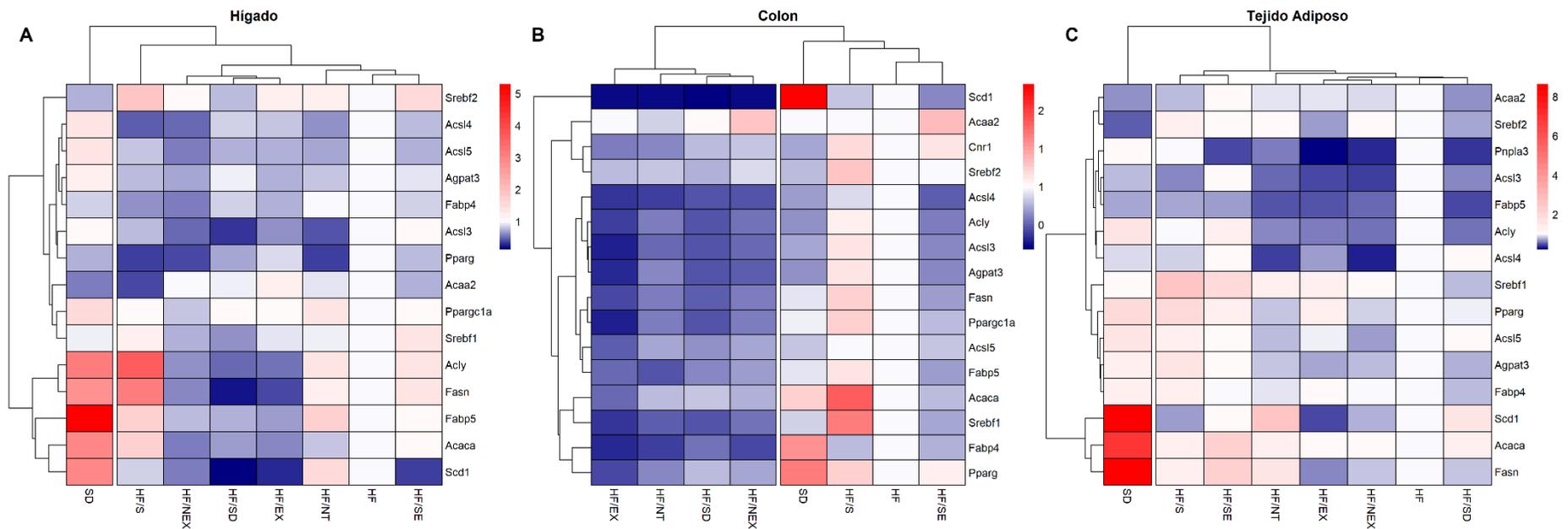


Figura 44. Representación mediante *Heatmap* de la expresión relativa de genes (*fold-change*) relacionados con la lipogénesis en (A) Hígado, (B) Colon y (C) Tejido adiposo. El *Heatmap* fue generado a partir de los *fold-change* con respecto al grupo HF. Las casillas en negro indican que no existe amplificación de ese gen. SD, dieta estándar durante 16 semanas; HF, dieta alta en grasa y fructosa durante 16 semanas; HF/SD, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar durante 8 semanas; HF/EX, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar y entrenamiento interválico de alta intensidad (HIIT) durante 8 semanas; HF/NT, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar con nutraceutico durante 8 semanas; HF/NEX, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar con nutraceutico y HIIT durante 8 semanas; HF/S, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar e inyección subcutánea de semaglutida durante 8 semanas; HF/SE, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar, inyección subcutánea de semaglutida y HIIT durante 8 semanas.

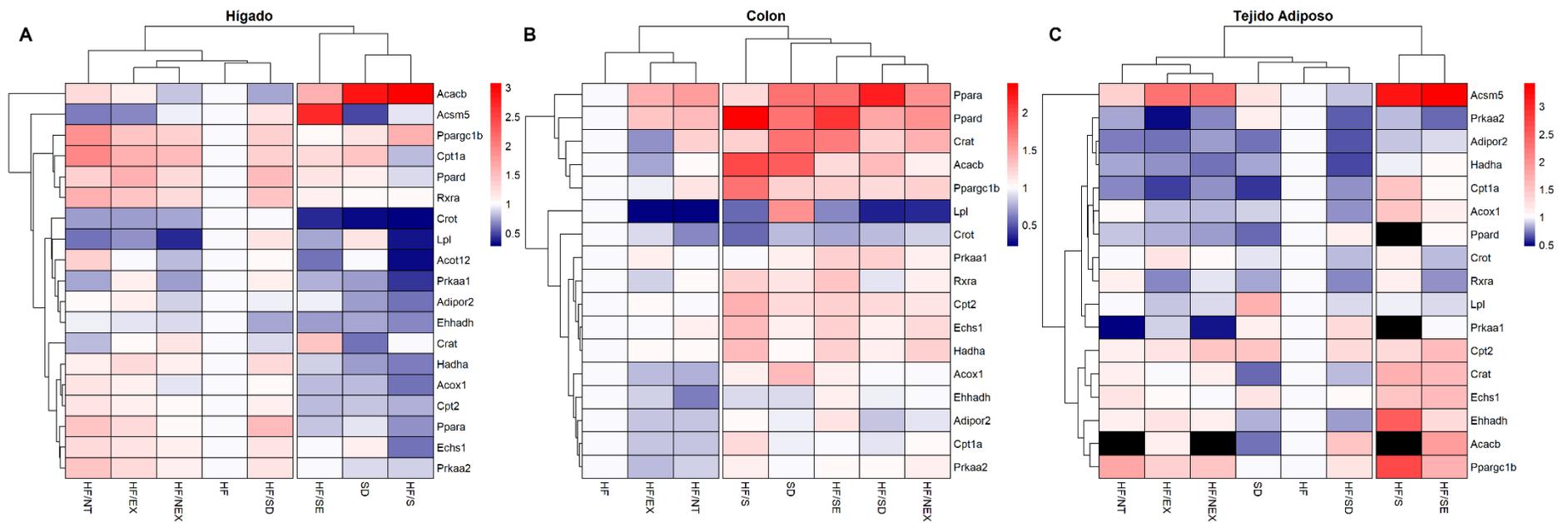


Figura 45. Representación mediante *Heatmap* de la expresión relativa de genes (*fold-change*) relacionados con la lipólisis en (A) Hígado, (B) Colon y (C) Tejido adiposo. El *Heatmap* fue generado a partir de los *fold-change* con respecto al grupo HF. Las casillas en negro indican que no existe amplificación de ese gen. SD, dieta estándar durante 16 semanas; HF, dieta alta en grasa y fructosa durante 16 semanas; HF/SD, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar durante 8 semanas; HF/EX, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar y entrenamiento interválico de alta intensidad (HIIT) durante 8 semanas; HF/NT, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar con nutraceutico durante 8 semanas; HF/NEX, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar con nutraceutico y HIIT durante 8 semanas; HF/S, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar e inyección subcutánea de semaglutida durante 8 semanas; HF/SE, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar, inyección subcutánea de semaglutida y HIIT durante 8 semanas.

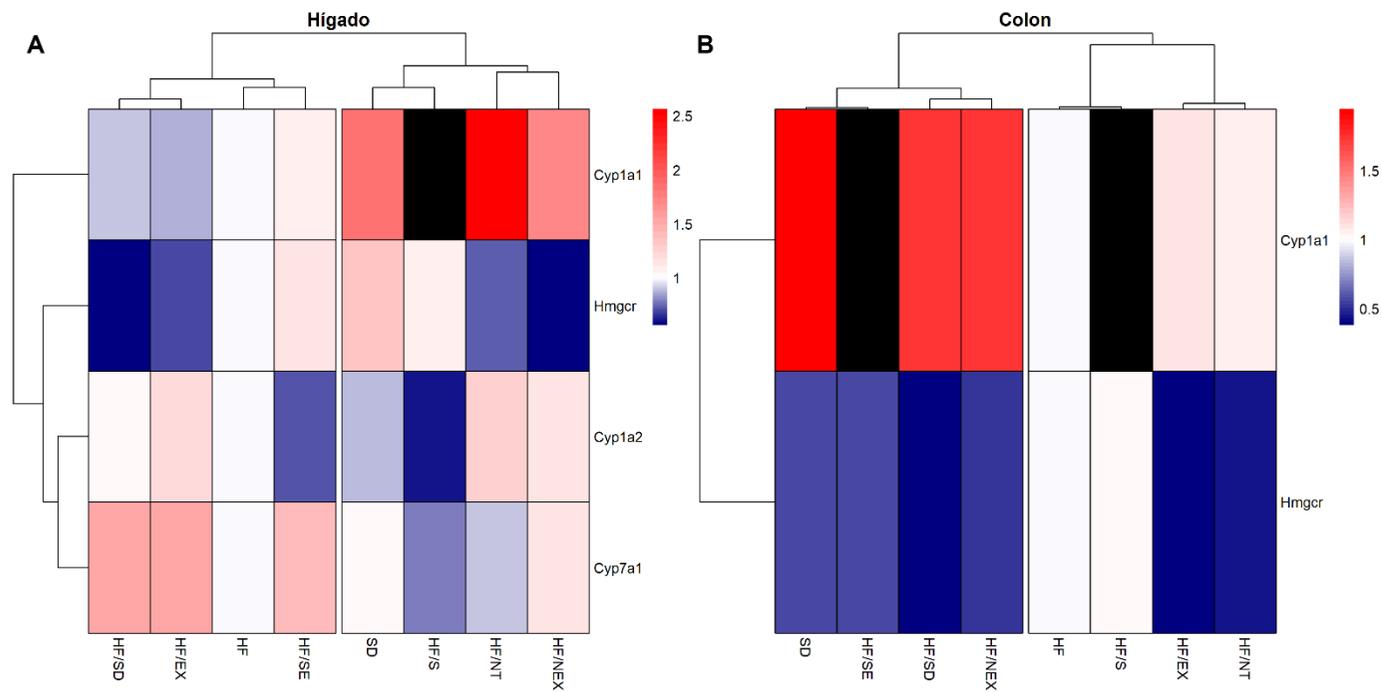


Figura 46. Representación mediante *Heatmap* de la expresión relativa de genes (*fold-change*) relacionados con el metabolismo del colesterol en (A) Hígado, (B) Colon y (C) Tejido adiposo. El *Heatmap* fue generado a partir de los *fold-change* con respecto al grupo HF. Las casillas en negro indican que no existe amplificación de ese gen. SD, dieta estándar durante 16 semanas; HF, dieta alta en grasa y fructosa durante 16 semanas; HF/SD, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar durante 8 semanas; HF/EX, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar y entrenamiento interválico de alta intensidad (HIIT) durante 8 semanas; HF/NT, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar con nutraceutico durante 8 semanas; HF/NEX, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar con nutraceutico y HIIT durante 8 semanas; HF/S, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar e inyección subcutánea de semaglutida durante 8 semanas; HF/SE, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar, inyección subcutánea de semaglutida y HIIT durante 8 semanas.

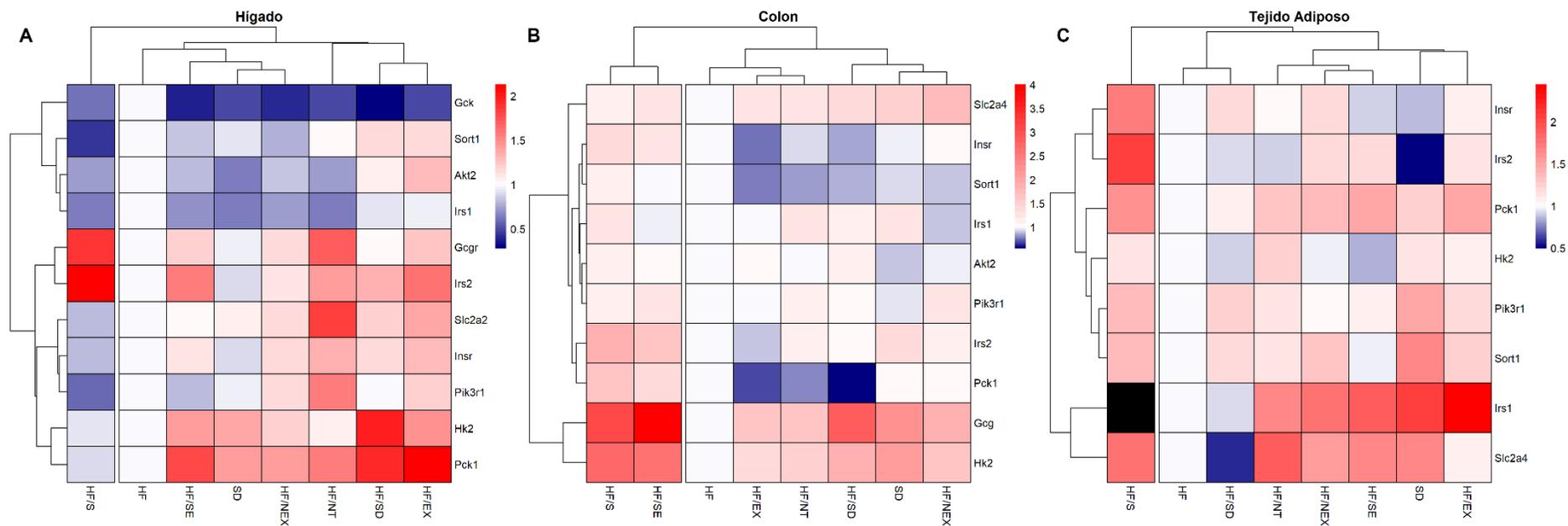


Figura 47. Representación mediante *Heatmap* de la expresión relativa de genes (*fold-change*) relacionados con el metabolismo glucídico en (A) Hígado, (B) Colon y (C) Tejido adiposo. El *Heatmap* fue generado a partir de los *fold-change* con respecto al grupo HF. Las casillas en negro indican que no existe amplificación de ese gen. SD, dieta estándar durante 16 semanas; HF, dieta alta en grasa y fructosa durante 16 semanas; HF/SD, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar durante 8 semanas; HF/EX, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar y entrenamiento interválico de alta intensidad (HIIT) durante 8 semanas; HF/NT, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar con nutraceutico durante 8 semanas; HF/NEX, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar con nutraceutico y HIIT durante 8 semanas; HF/S, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar e inyección subcutánea de semaglutida durante 8 semanas; HF/SE, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar, inyección subcutánea de semaglutida y HIIT durante 8 semanas.

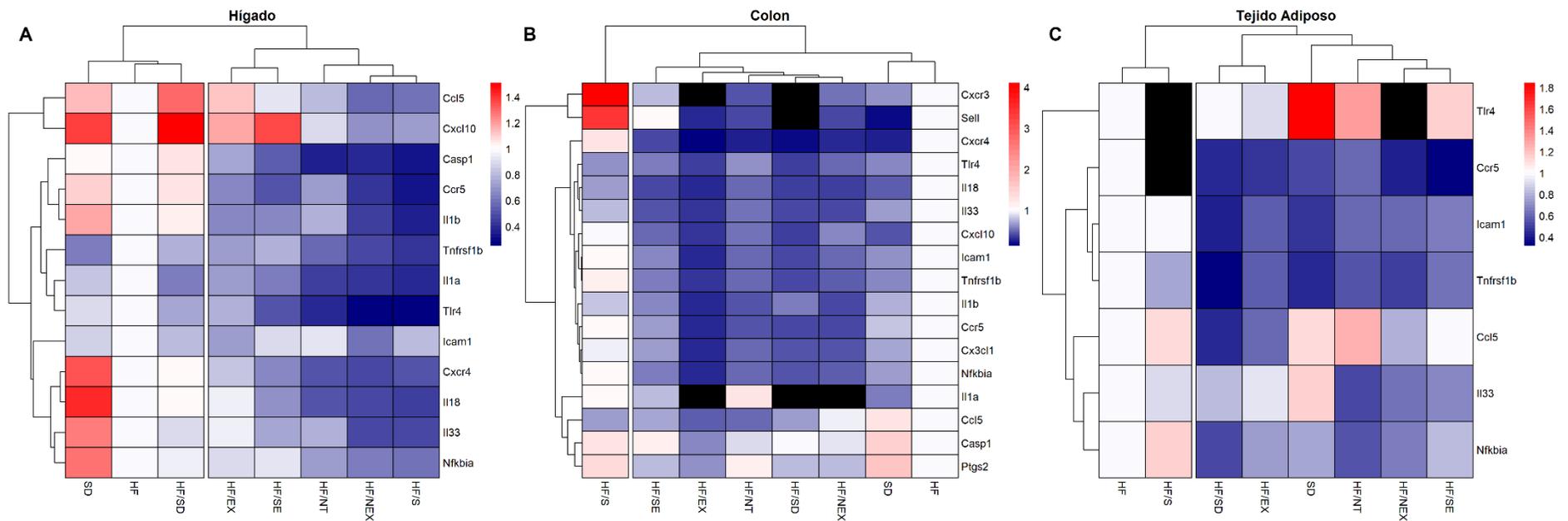


Figura 48. Representación mediante *Heatmap* de la expresión relativa de genes (*fold-change*) relacionados con la inflamación en (A) Hígado, (B) Colon y (C) Tejido adiposo. El *Heatmap* fue generado a partir de los *fold-change* con respecto al grupo HF. Las casillas en negro indican que no existe amplificación de ese gen. SD, dieta estándar durante 16 semanas; HF, dieta alta en grasa y fructosa durante 16 semanas; HF/SD, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar durante 8 semanas; HF/EX, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar y entrenamiento interválico de alta intensidad (HIIT) durante 8 semanas; HF/NT, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar con nutraceutico durante 8 semanas; HF/NEX, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar con nutraceutico y HIIT durante 8 semanas; HF/S, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar e inyección subcutánea de semaglutida durante 8 semanas; HF/SE, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar, inyección subcutánea de semaglutida y HIIT durante 8 semanas.

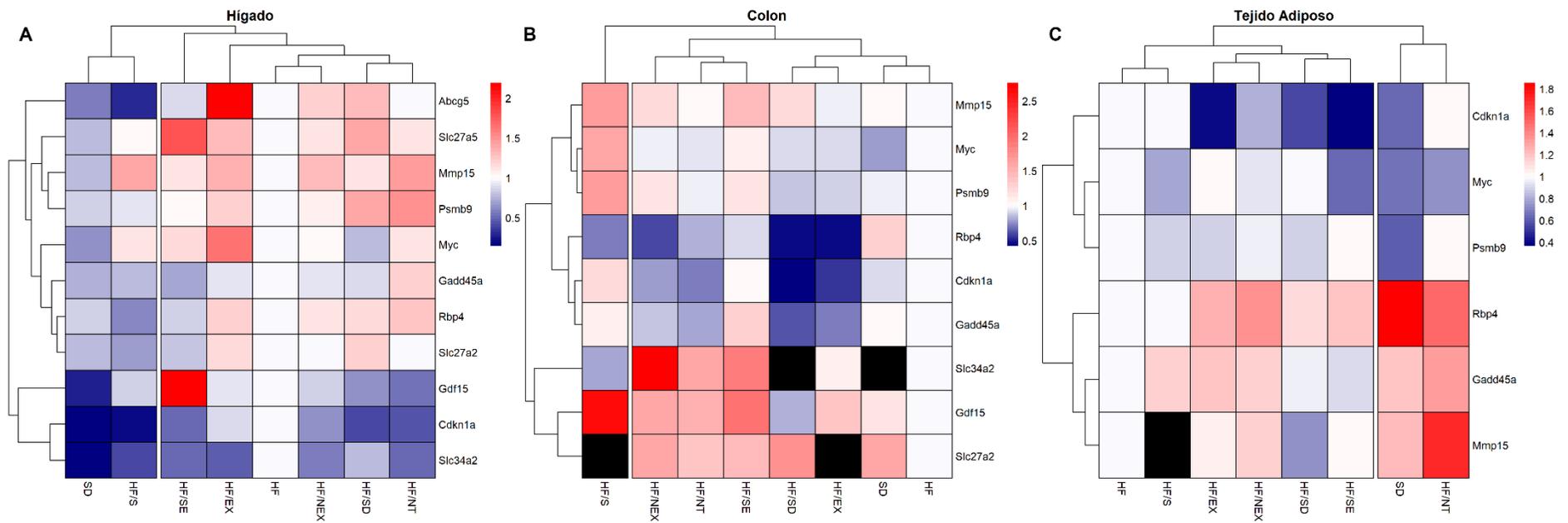


Figura 49. Representación mediante *Heatmap* de la expresión relativa de genes (*fold-change*) relacionados con el daño celular, estructura celular anatómica, proliferación celular y transporte de solutos en (A) Hígado, (B) Colon y (C) Tejido adiposo. El *Heatmap* fue generado a partir de los *fold-change* con respecto al grupo HF. Las casillas en negro indican que no existe amplificación de ese gen. SD, dieta estándar durante 16 semanas; HF, dieta alta en grasa y fructosa durante 16 semanas; HF/SD, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar durante 8 semanas; HF/EX, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar y entrenamiento interválico de alta intensidad (HIIT) durante 8 semanas; HF/NT, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar con nutraceutico durante 8 semanas; HF/NEX, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar con nutraceutico y HIIT durante 8 semanas; HF/S, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar e inyección subcutánea de semaglutida durante 8 semanas; HF/SE, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar, inyección subcutánea de semaglutida y HIIT durante 8 semanas.

4.4.2.13 Actividades enzimáticas antioxidantes en hígado

El consumo de una dieta alta en grasa y fructosa provocó un incremento muy marcado en la actividad hepática de enzimas antioxidantes y detoxificantes en comparación con el consumo de una dieta estándar (**Tabla 39**). Por otra parte, los tratamientos de cambio de dieta con o sin inclusión del nutraceutico redujeron significativamente la actividad de todas las enzimas antioxidantes, y la implementación de un protocolo de HIIT mantuvo esa reducción, salvo en el valor de glutatión peroxidasa (GPx) que incrementó en el grupo HF/NEX. El efecto del nutraceutico en animales sedentarios fue especialmente marcado en la reducción de GPx y superóxido dismutasa (SOD). Por otro lado, se observó que la administración de semaglutida aumentó significativamente la actividad enzimática de la catalasa (CAT) y Cu/Zn-SOD, y no tuvo efecto en la Mn-SOD en comparación con el grupo obeso. La combinación del fármaco con el ejercicio físico dio lugar a una reducción significativa en todas las actividades enzimáticas en comparación con el grupo obeso. La actividad detoxificante de la enzima glutatión S-transferasa se vio reducida significativamente por la acción de las distintas intervenciones, a excepción de la administración de la semaglutida que la aumentó significativamente en comparación con el grupo obeso, al igual que lo comentado anteriormente para la actividad CAT y Cu/Zn-SOD.

Tabla 39. Efecto de las intervenciones sobre la actividad hepática de enzimas antioxidantes y detoxificantes.

Función	Enzima	SD	HF	HF/SD	HF/EX	HF/NT	HF/NEX	HF/S	HF/SE
Actividad antioxidante	CAT (UAE/min-mg prot)	8.51 ± 0.69 A	11.9 ± 0.41 C	8.77 ± 0.30 A	7.76 ± 0.30 A	8.77 ± 0.53 A	10.5 ± 0.50 B	14.6 ± 0.35 D	9.24 ± 0.57 AB
	GPx (nmol NADPH/min-mg prot)	4.65 ± 0.44 A	8.79 ± 0.74 CD	7.89 ± 0.26 C	7.87 ± 0.39 C	3.93 ± 0.24 A	10.4 ± 0.14 E	9.14 ± 0.52 D	5.90 ± 0.26 B
	Mn-SOD (UAE/min-mg prot)	41.8 ± 1.25 A	79.1 ± 1.38 E	56.2 ± 1.12 C	50.8 ± 1.65 B	46.0 ± 1.63 A	57.8 ± 1.72 C	77.3 ± 1.81 E	65.1 ± 1.99 D
	Cu/Zn-SOD (UAE/min-mg prot)	267.2 ± 14.9 AB	402.9 ± 19.0 D	369.9 ± 11.0 CD	265.7 ± 11.7 AB	307.5 ± 33.0 B	226.3 ± 6.94 A	480.4 ± 11.82 E	356.9 ± 15.7 C
Actividad detoxificante	GST (UAE/min-mg prot)	566.1 ± 45.3 A	966.5 ± 34.4 C	662.1 ± 51.8 AB	647.4 ± 38.9 AB	719.6 ± 51.6 AB	733.8 ± 16.4 B	1,179.7 ± 89.8 D	747.5 ± 39.2 B

Los datos corresponden a la media de 8 ratas ± EEM. A-E medias dentro de la misma fila con letras diferentes difieren significativamente ($p < .05$). CAT, catalasa; SOD, superóxido dismutasa; GPx, glutatión peroxidasa; GST, glutatión S-transferasa; QR, NADH:Quinona Reductasa. SD, dieta estándar durante 16 semanas; HF, dieta alta en grasa y fructosa durante 16 semanas; HF/SD, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar durante 8 semanas; HF/EX, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar y entrenamiento interválico de alta intensidad (HIIT) durante 8 semanas; HF/NT, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar con nutraceutico durante 8 semanas; HF/NEX, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar con nutraceutico y HIIT durante 8 semanas; HF/S, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar e inyección subcutánea de semaglutida durante 8 semanas; HF/SE, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar, inyección subcutánea de semaglutida y HIIT durante 8 semanas.

4.4.2.14 Análisis microbiológico del contenido cecal

El análisis de abundancia relativa al nivel de filo y género se representa en la **Figura 50**. Se observó que el filo mayoritario en todos los grupos experimentales fue Firmicutes (60 %) seguido de Verrucomicrobiota (20 %) y Bacteroidota (10%). El consumo de una dieta alta en grasa y fructosa no condujo a grandes diferencias a nivel de filo en comparación con el consumo de una dieta estándar, aumentó ligeramente el número de Actinobacterias y disminuyó el de Proteobacterias. Las distintas intervenciones produjeron una tendencia a disminuir el número de bacterias presentes en Firmicutes y Actinobacteria, a expensas de aumentar Verrucomicrobiota y Bacteroidota, a excepción del protocolo de entrenamiento interválico de alta intensidad que no alteró la frecuencia relativa de este último filo en comparación con el grupo HF. Por otro lado, el consumo del nutrácutico en la dieta experimental y la administración de la semaglutida fueron las intervenciones que más aumentaron el número de especies pertenecientes al filo Bacteroidota en comparación con el grupo HF. Por lo tanto, dichas intervenciones fueron las que redujeron significativamente la relación Firmicutes/Bacteroidota (**Figura 51**) en comparación con el grupo obesogénico. La implementación del HIIT pareció reducir el efecto del nutrácutico sobre el filo de Bacteroidota. La intervención de restricción calórica sola o en combinación con el ejercicio físico no produjo diferencias significativas en comparación con dicho grupo.

En relación al género, el consumo de una dieta alta en grasa y fructosa aumentó la proporción de bacterias pertenecientes al género *Clostridium sensu stricto 1* y *Blautia*, y disminuyeron las pertenecientes a *Romboutsia*, *Ligilactobacillus* y *Dorea* en comparación con una dieta estándar. Las diferentes intervenciones en comparación con el grupo obesogénico aumentaron las poblaciones de *Akkermansia* y *Muribaculaceae*, esta última especialmente en los grupos HF/NT, HF/S y HF/SE.; y disminuyeron las poblaciones de *Lactobacillus*, *Clostridium sensu stricto 1* y *Blautia*. Sin embargo, la administración de semaglutida aumentó drásticamente la población de *Lactobacillus*. El consumo del nutrácutico en la dieta aumentó acusadamente la población de *Ligilactobacillus*, alcanzando valores similares al grupo que consumió una dieta estándar. La restricción calórica aumentó el número de especies pertenecientes a *Romboutsia*, mientras que la administración de semaglutida lo disminuyó. Finalmente, se observó que la inclusión del nutrácutico en la dieta aumentó el número de otros géneros minoritarios, mientras que

la restricción calórica aumentó el número de especies sin identificar en comparación con el resto de los grupos.

Para conocer la diversidad alfa, que mide la diversidad dentro de cada muestra, se utilizaron dos índices: el índice de Pielou y el índice de Faith (**Figura 52**). El índice de Pielou, que mide la proporción de la diversidad observada con relación a la máxima diversidad esperada, indicó que existían diferencias entre el consumo de una dieta alta en grasa y fructosa y una dieta estándar, mientras que la única reducción de la diversidad alfa se produjo en el grupo HF/SD. El índice de Faith, el cual mide la abundancia y la diversidad, pero considerando la distancia filogenética que abarca todas las características de una muestra, mostró que la menor diversidad filogenética se encontraba de nuevo tras consumir una dieta estándar, mientras que en los grupos a los que se administró la semaglutida la diversidad estaba aumentando en comparación con el grupo HF.

La diversidad beta, que mide la diversidad entre muestras, se expresa en la **Figura 53**, representándose mediante la distancia de Jaccard y de Bray-Curtis. En el primer caso, se observó que existía una marcada diferencia entre los grupos SD y HF/NEX con el resto de los grupos experimentales. Al utilizar la distancia de Bray-Curtis las diferencias fueron menores, se observó que el protocolo de HIIT no alteraba la diversidad beta al combinarlo con cada uno de los tratamientos.

Finalmente, en la **Figura 54** se representa el *Heatmap* de la abundancia relativa de la población bacteriana a nivel de familia del contenido cecal. Se observó que los dos grupos a los que se administró semaglutida presentaban una diferencia en las familias bacterianas en relación a todos los demás. Así mismo, destacó que los dos grupos del nutracéutico estaban próximos entre sí, como también estaban próximos entre sí los dos grupos HF/SD y HF/EX y los dos grupos controles (HF y SD).

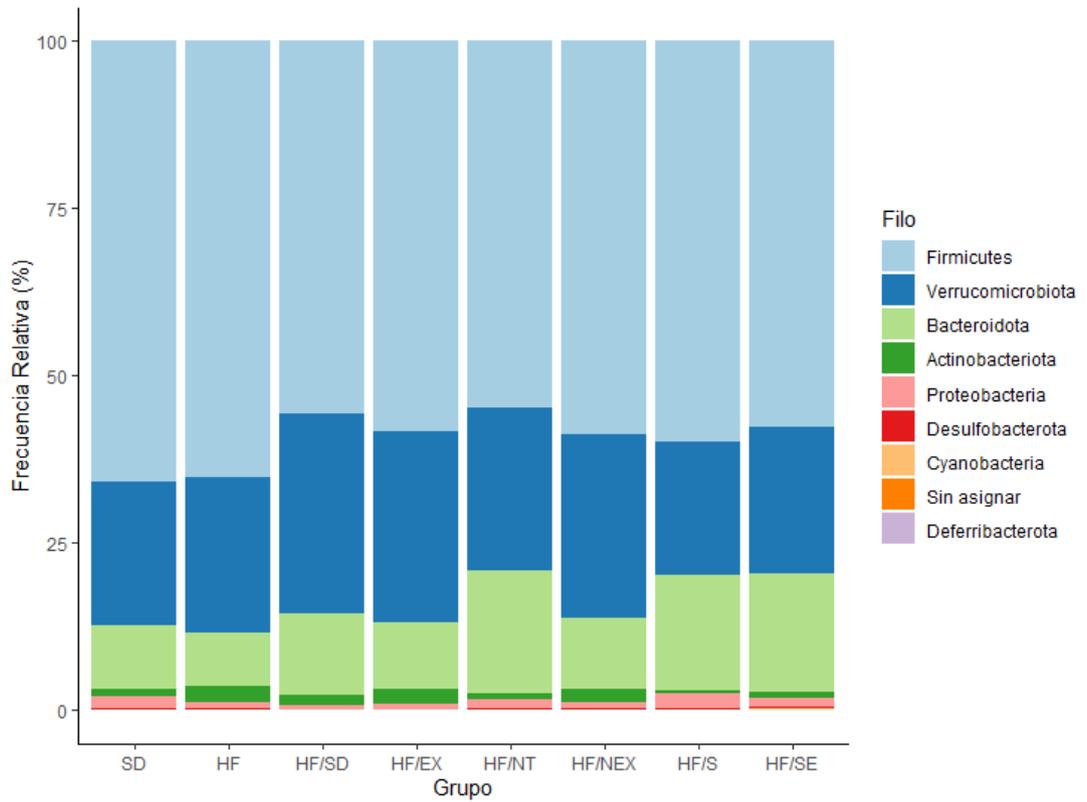
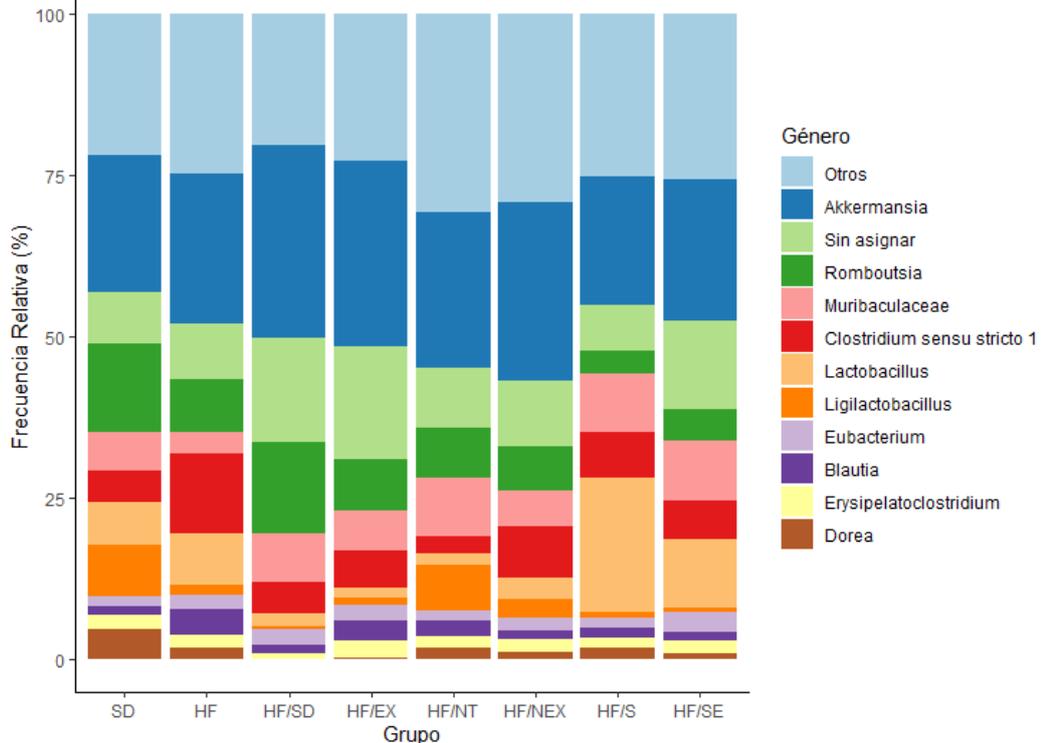
A**B**

Figura 50. Abundancia relativa en el contenido cecal a nivel de (A) filo y (B) género entre los diferentes grupos experimentales. SD, dieta estándar durante 16 semanas; HF, dieta alta en grasa y fructosa durante 16 semanas; HF/SD, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar durante 8 semanas; HF/EX, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar y entrenamiento interválico de alta intensidad (HIIT) durante 8 semanas; HF/NT, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar con nutraceutico durante 8 semanas; HF/NEX, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar con nutraceutico y HIIT durante 8 semanas; HF/S, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar e inyección subcutánea de 31 semaglutida durante 8 semanas; HF/SE, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar, inyección subcutánea de semaglutida y HIIT durante 8 semanas.

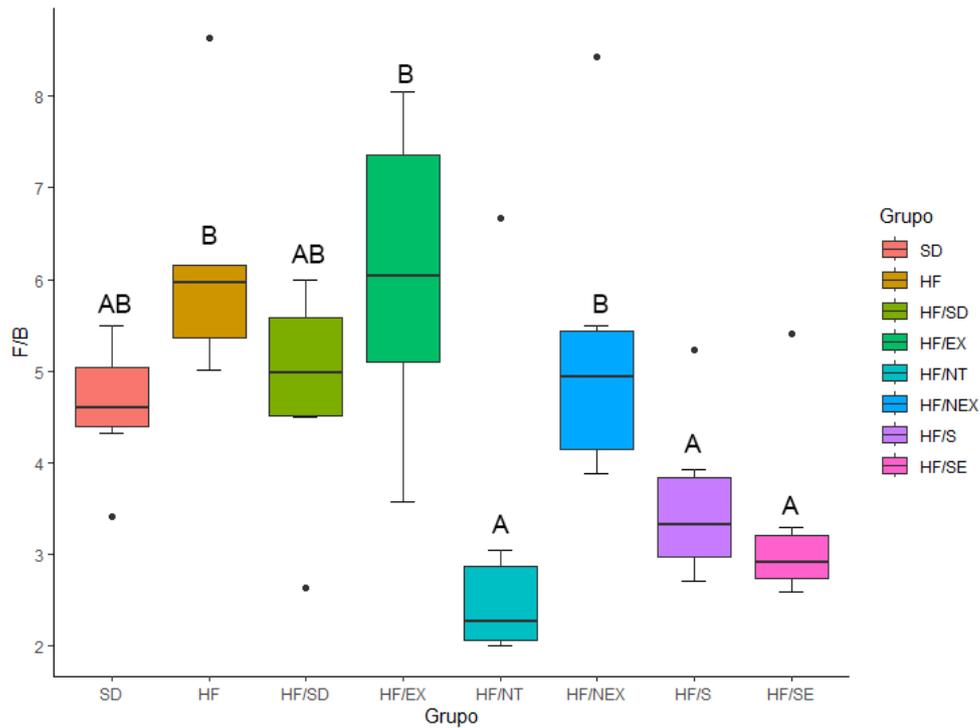


Figura 51. Efecto de las distintas intervenciones sobre la relación Firmicutes/Bacteroidota. SD, dieta estándar durante 16 semanas; HF, dieta alta en grasa y fructosa durante 16 semanas; HF/SD, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar durante 8 semanas; HF/EX, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar y entrenamiento interválico de alta intensidad (HIIT) durante 8 semanas; HF/NT, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar con nutraceutico durante 8 semanas; HF/NEX, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar con nutraceutico y HIIT durante 8 semanas; HF/S, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar e inyección subcutánea de semaglutida durante 8 semanas; HF/SE, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar, inyección subcutánea de semaglutida y HIIT durante 8 semanas.

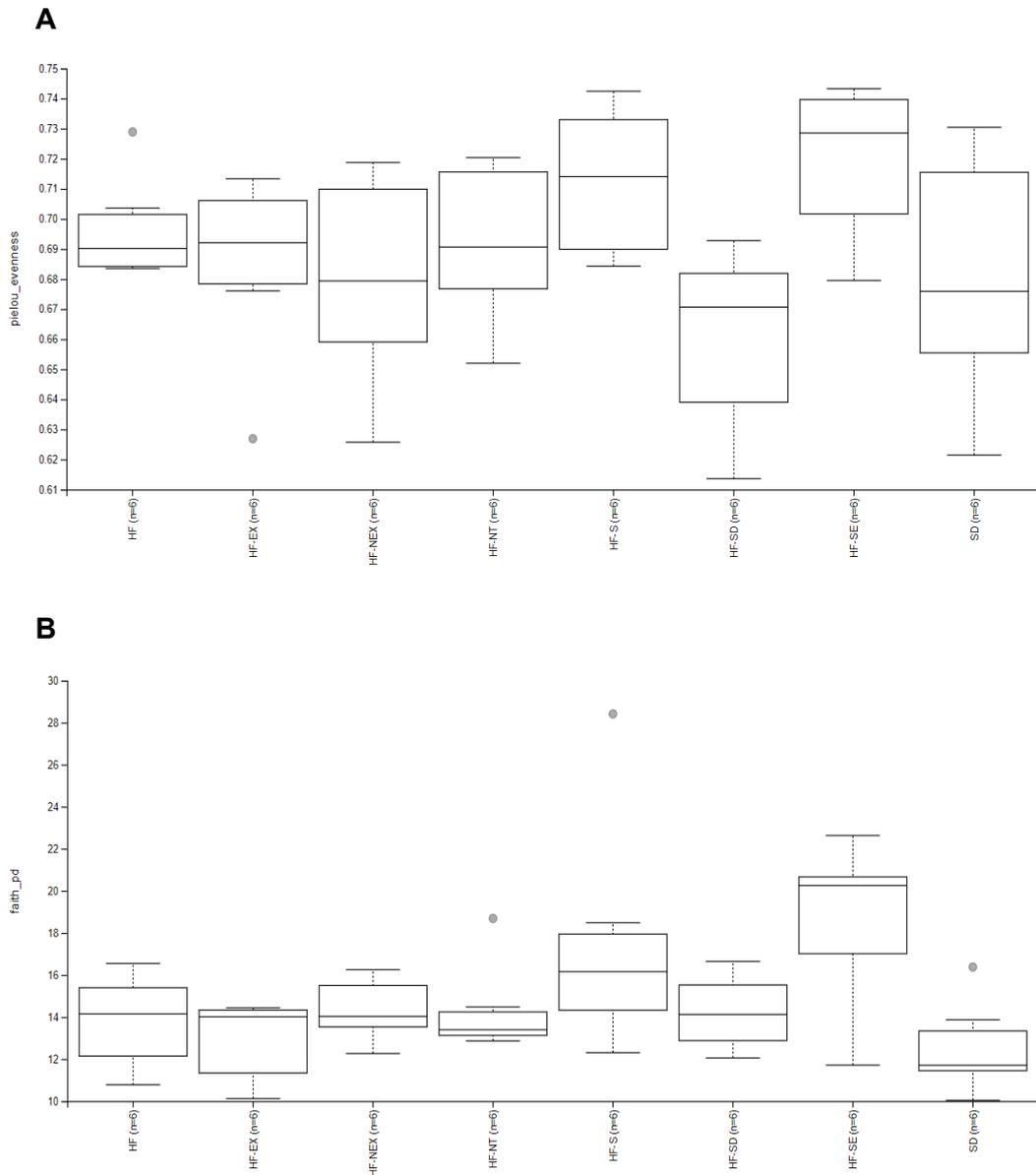


Figura 52. Diversidad alfa de la microbiota del contenido cecal entre los grupos experimentales, representada mediante (A) índice de Pielou y (B) índice de Faith. SD, dieta estándar durante 16 semanas; HF, dieta alta en grasa y fructosa durante 16 semanas; HF/SD, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar durante 8 semanas; HF/EX, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar y entrenamiento interválico de alta intensidad (HIIT) durante 8 semanas; HF/NT, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar con nutraceutico durante 8 semanas; HF/NEX, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar con nutraceutico y HIIT durante 8 semanas; HF/S, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar e inyección subcutánea de semaglutida durante 8 semanas; HF/SE, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar, inyección subcutánea de semaglutida y HIIT durante 8 semanas

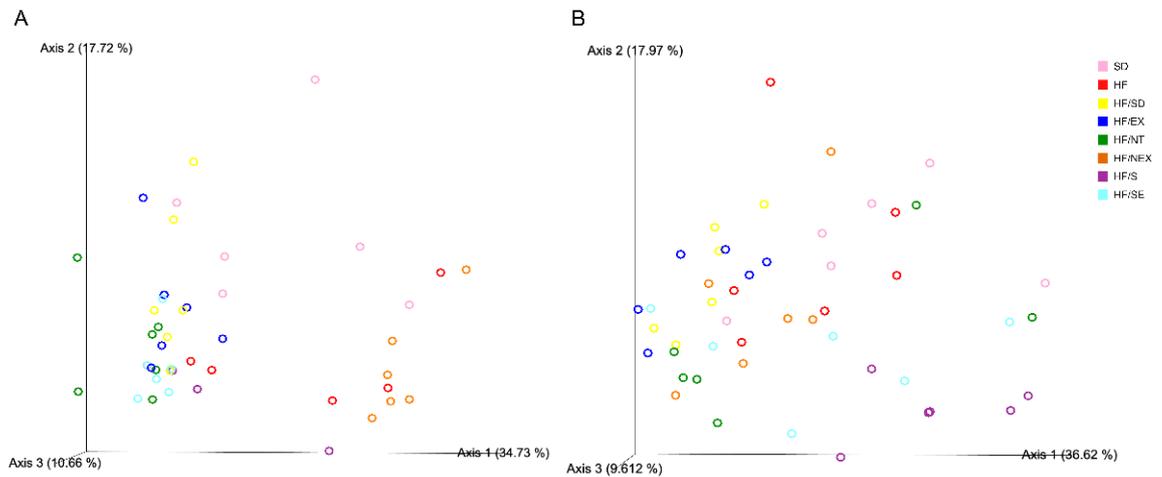


Figura 53. Diversidad beta de la microbiota del contenido cecal entre los grupos experimentales, representada mediante (A) distanciad de Jaccard y (B) distancia de Bray-Curtis. SD, dieta estándar durante 16 semanas; HF, dieta alta en grasa y fructosa durante 16 semanas; HF/SD, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar durante 8 semanas; HF/EX, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar y entrenamiento interválico de alta intensidad (HIIT) durante 8 semanas; HF/NT, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar con nutraceutico durante 8 semanas; HF/NEX, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar con nutraceutico y HIIT durante 8 semanas; HF/S, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar e inyección subcutánea de semaglutida durante 8 semanas; HF/SE, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar, inyección subcutánea de semaglutida y HIIT durante 8 semanas.

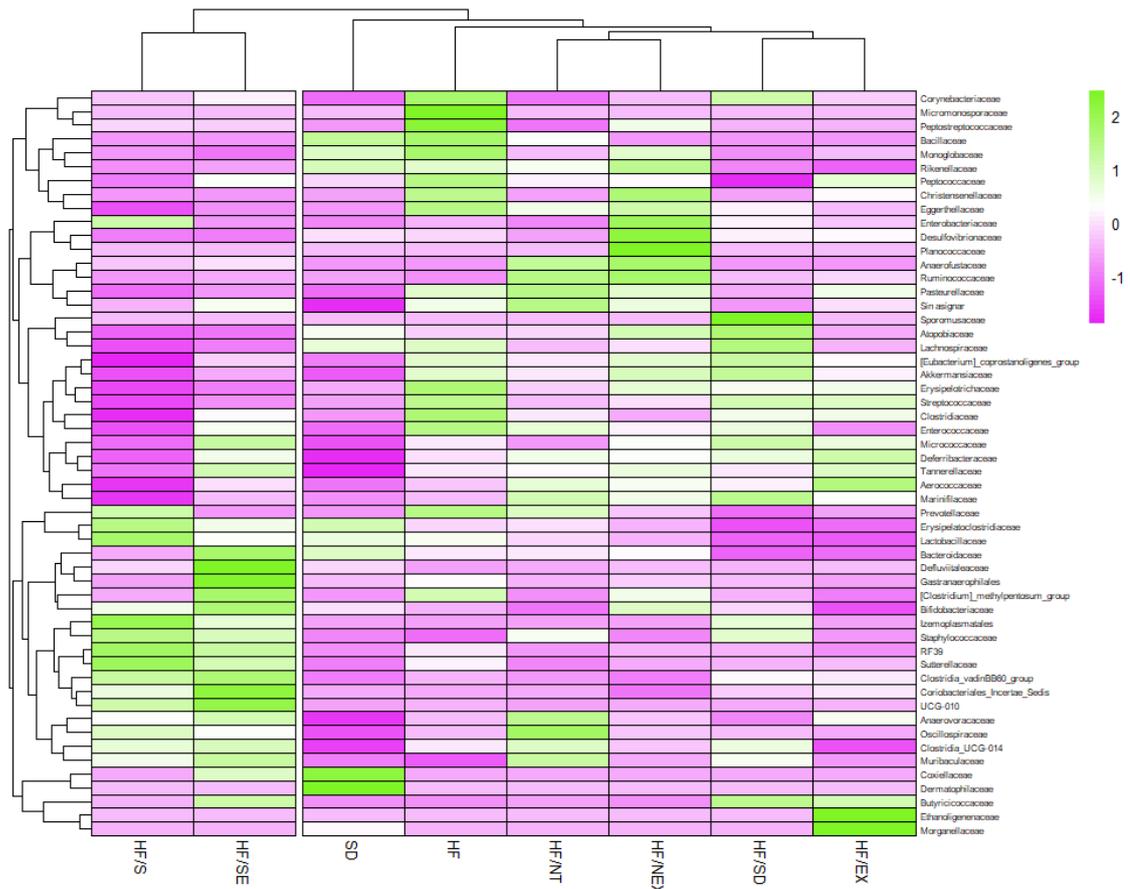


Figura 54. Heatmap de la abundancia relativa del contenido cecal de los diferentes grupos experimentales a nivel de familia. SD, dieta estándar durante 16 semanas; HF, dieta alta en grasa y fructosa durante 16 semanas; HF/SD, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar durante 8 semanas; HF/EX, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar y entrenamiento interválico de alta intensidad (HIIT) durante 8 semanas; HF/NT, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar con nutraceutico durante 8 semanas; HF/NEX, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar con nutraceutico y HIIT durante 8 semanas; HF/S, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar e inyección subcutánea de semaglutida durante 8 semanas; HF/SE, dieta alta en grasa y fructosa durante 8 semanas + dieta estándar, inyección subcutánea de semaglutida y HIIT durante 8 semanas.

5 Discusión

La obesidad actualmente es una pandemia que representa uno de los mayores peligros para la salud. Es bien sabido que la obesidad es un proceso patológico que afecta a todos los órganos y se asocia habitualmente, entre otras, a enfermedades como la diabetes mellitus tipo 2, la hipertensión, la apnea obstructiva del sueño, el reflujo gastroesofágico y la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), actualmente denominada enfermedad del hígado graso asociada a disfunción metabólica (MAFLD). El desarrollo de la obesidad se debe habitualmente a la combinación de dos factores: aumento de la ingesta calórica y disminución del gasto energético. Se prevé que la prevalencia mundial de obesidad aumente hasta 54 % para 2035 (10). Por tanto, mejorar los patrones dietéticos, como la reducción de ingesta calórica y la elección de alimentos saludables y ricos en compuestos bioactivos, así como, aumentar el gasto energético mediante programas de ejercicio físico adecuadamente diseñados son puntos clave en el tratamiento de la obesidad y sus alteraciones asociadas. Algunos de los mecanismos relacionados incluyen la inflamación, el estrés oxidativo, la deposición de lípidos en el hígado y la resistencia a la insulina.

En este contexto, el trabajo de esta tesis doctoral se centró en el desarrollo de un nutraceutico con alto potencial bioactivo, en combinación con otras intervenciones (restricción calórica y protocolo de entrenamiento interválico de alta intensidad) para el tratamiento de la obesidad y patologías crónicas asociadas vs tratamiento farmacológico (semaglutida), en un modelo experimental animal de obesidad inducida por la dieta.

Extractos vegetales y valor funcional del nutraceutico

Los productos a base de compuestos bioactivos presentes en las plantas han mostrado su capacidad protectora frente a diversas enfermedades debido a su capacidad de prevenir el estrés oxidativo, especialmente, los compuestos fenólicos. La mayor funcionalidad de estos compuestos es su capacidad antioxidante, aunque también pueden presentar capacidad antiinflamatoria, anticancerígena y antilipogénica (224). Estos compuestos bioactivos pueden ser extraídos y aislados mediante extracción con disolventes orgánicos o agua. En este sentido, se realizó una extracción etanólica (50 %) para poder extraer los compuestos bioactivos y maximizar la extracción de compuestos

fenólicos, y una extracción acuosa con hidrólisis proteica para la obtención de péptidos bioactivos, además de los compuestos bioactivos.

En primer lugar, se realizó un análisis de capacidad antioxidante de los distintos hidrolizados proteicos y extractos etanólicos generados a partir de semillas vegetales, de la pulpa del argán (*Argania spinosa*) y las hojas de Salicornia (*Salicornia* spp.). De todas las especies vegetales estudiadas la mayor capacidad antioxidante y rendimiento de extracción de los extractos etanólicos correspondió para los extractos etanólicos a *Argania spinosa*, *Cynara scolymus*, *Origanum vulgare*, *Citrullus lanatus* y *Coriandrum sativum*; y por ello se seleccionaron para incluirlos en la formulación nutracéutica. Por otra parte, en base a este mismo criterio se seleccionaron los hidrolizados proteicos de *Lens culinaris* var. Castellana, *Vigna angularis*, *Onobrychis viciifolia* y *Trigonella foenum-graecum*. Además, la inclusión de *Trigonella foenum-graecum* se justificó por sus efectos hipoglucemiantes e hipercolesterolémicos y por la presencia del mucílago que pudiera servir de matriz en la que sustentar el nutracéutico, ya que se ha descrito que puede ser utilizado como agente espesante, estabilizante y emulsionante en productos alimenticios (231). Finalmente, el nutracéutico se formuló con un 80 % de hidrolizados proteicos y un 20 % de extractos etanólicos, de lo que derivó un gran un potencial funcional.

Las propiedades antioxidantes del nutracéutico se debían a los compuestos bioactivos presentes en los extractos. De hecho, en la formulación nutraceútica se identificaron 72 componentes caracterizados por UPLC, entre los que destacaron por su alta capacidad antioxidante los siguientes: **Kaempferol**, identificado según la bibliografía consultada en diferentes tipos de extractos de diferentes porciones de *Argania spinosa* (232), *Cynara scolymus* (233), *Origanum vulgare* (234), *Citrullus lanatus* (235,236), *Coriandrum sativum* (224), *Lens culinaris* (237), *Onobrychis viciifolia* (238) y *Trigonella foenum-graecum* (224); así como, **Luteolin** identificado en *Argania spinosa* (239), *Cynara scolymus*, (240,241), *Origanum vulgare* (234) *Citrullus lanatus* (236), *Coriandrum sativum* (242) *Lens culinaris* (237) y *Trigonella foenum-graecum* (243); **Apigenin** identificado en *Cynara scolymus* (233,240), *Origanum vulgare* (234), *Citrullus lanatus* (235) y *Coriandrum sativum* (242); **Genistein** y **Vitexin** identificadas en *Vigna angularis* (244), *Onobrychis viciifolia* (245) y *Trigonella foenum-graecum* (243,245). **Cynarine** y **Apiin** fueron identificadas exclusivamente en *Cynara scolymus* (241), **Vicenin** en *Coriandrum sativum*

(242) y **Fenugreek saponin I** en *Trigonella foenum-graecum* (246). Además, a excepción de Cynarine y Fenugreek saponin I, los compuestos anteriores han sido identificados por su capacidad antiinflamatoria (247–254). Estas propiedades se pueden atribuir a que la mayoría de los compuestos identificados son flavonoides, una gran familia de compuestos polifenólicos sintetizados por las plantas que tienen una estructura química común a partir de los aminoácidos aromáticos fenilalanina y tirosina y del malonato (255,256). Debido a su estructura los flavonoides con un alta presencia de grupos hidroxilos (-OH) presentan capacidad antioxidante, principalmente por su bajo potencial redox y por su capacidad para donar electrones o átomos de hidrógeno (255). De hecho, se ha indicado que esto es debido a la presencia de un grupo catecol en uno de sus anillos aromáticos y a un doble enlace conjugado con un grupo “oxo”, que es responsable de la deslocalización de electrones (256).

Por otro lado, los péptidos bioactivos presentes en el nutracéutico (**Tabla 18**) le confiere propiedades antioxidantes debido a la presencia de residuos aminoácidos con dicha propiedad (257); antiinflamatorias al regular las vías MAPK y NF- κ B (258); antihiper glucemiantes al actuar como inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa-IV (DPP-IV) y antihipertensivas al poseer actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina (259).

Para comprobar la bioaccesibilidad de la capacidad antioxidante del nutracéutico, se simularon las condiciones fisiológicas del tracto gastrointestinal superior mediante un método *in vitro* de flujo continuo. Se comprobó que la mayoría del potencial antioxidante se mantuvo en el retenido y el 20 % era potencialmente absorbible. Valores similares fueron descritos por D'Antuono et al. (260) tras la digestión *in vitro* de un extracto acuoso de *Cynara scolymus* y Zhang et al. (261) en un extracto metanólico de *Len culinaris* cocinada. Bajo nuestras condiciones experimentales, la mayor absorción potencial de la capacidad antioxidante del nutraceutico se produjo tras 30 minutos de absorción intestinal simulada, lo cual puede deberse a que en los primeros minutos de digestión intestinal el pH es ligeramente ácido pudiendo facilitar la solubilidad de los compuestos fenólicos en la mezcla (262). Estos datos concuerdan con lo observado por D'Antuono et al. (260) en células Caco-2, donde describieron una mayor acumulación de compuestos fenólicos en los primeros 30 minutos de digestión intestinal. Estos autores atribuían un posible efecto de saturación dependiente del tiempo, que consideraba la

presencia de un mecanismo primario o secundario de transporte activo o facilitado. Además, la presencia de una mezcla de compuestos fenólicos en células intestinales puede apoyar el posible efecto protector que estos compuestos puedan tener contra los estímulos oxidativos (260). Finalmente, la mayor cantidad de potencial antioxidante en el retenido fue debida a un mayor volumen de retenido que de dializado (datos no mostrados), provocado por la presencia del mucílago de *Trigonella foenum-graecum*, que aumentaba la viscosidad del nutraceutico y disminuía la capacidad de absorción de los compuestos bioactivos. Sin embargo, esta mayor retención de compuestos bioactivos podría tener un efecto positivo, ya que se ha descrito que el consumo de fibra alimentaria soluble, como podría ser este mucílago, está relacionado con su capacidad para alterar la viscosidad luminal del intestino delgado e implicarse en la atenuación de las respuestas glucémicas postprandiales tras el consumo de la misma (263).

Por lo tanto, según los datos mostrados en las pruebas químicas y la presencia de compuestos bioactivos (compuestos fenólicos y péptidos) el nutraceutico tenía propiedades bioactivas prometedoras para su uso como tratamiento en patologías asociadas a alteraciones metabólicas, por lo que se decidió ensayar dichas actividades en cultivos celulares.

En relación a los ensayos realizados en cultivos celulares, para comprobar su potencial capacidad antioxidante y antiinflamatoria, se observó que la adición del nutraceutico en hepatocitos murino AML12 disminuyó la muerte y toxicidad celular en ausencia de agente tóxico, lo que podría indicar que el nutraceutico mejora no sólo la viabilidad, si no la funcionalidad celular. Al ensayar el nutraceutico en condiciones con agentes oxidantes como H_2O_2 y Paraquat, se observó una acción antioxidante muy marcada, ya que aumentó la viabilidad celular hasta 4 veces. Ha sido descrito que extractos metanólicos, etanólicos, acuosos y comerciales procedentes de *Cynara scolymus*, en presencia de H_2O_2 , disminuían la producción de ROS y mejoraban la viabilidad celular en hepatocitos murinos, HepG2 (264), HT-29 (265), células endoteliales, monocitos (266) y neutrófilos humanos (267). Además, presentaba propiedades de protección del ADN en HepG2 (268), reducía la liberación de LDH, la producción de malondialdehído (MDA) e inhibían la actividad de la enzima xantina oxidasa (269,270). En esta mismo sentido, se ha observado que los extractos etanólicos de orégano eran capaces de disminuir los niveles de ROS y glutatión en la línea celular

Caco-2 (271,272). Por otra parte, los péptidos extraídos de la semilla de *Citrullus lanatus* mostraron una alta capacidad antioxidante en células HepG2 al aumentar viabilidad celular en presencia de H₂O₂ y aumentar actividad enzimática de SOD, GPx y CAT y reducir niveles de MDA (273). Se ha visto que un extracto de acetona/agua/ácido acético de *Lens culinaris* poseía propiedades antioxidantes en células de adenocarcinoma gástrico humano (AGS) (274). También, Wang et al. (275) reportaron que la utilización de un extracto metanólico de *Vigna angularis* como pretratamiento o en coincubación con H₂O₂ aumentaba la viabilidad de células H9c2.

Además, se estudiaron los efectos del nutraceutico sobre la lipotoxicidad asociada a la NAFLD, utilizando la línea celular de hepatocitos murinos AML12 que fue coincubada con ácido palmítico. En este caso, además, se incluyó en el experimento el fármaco semaglutida, que se conoce por su potente efecto para disminuir la acumulación de ácidos grasos en hígado. Se determinó la acumulación de triglicéridos mediante la tinción con Nile Red. El nutraceutico fue capaz de disminuir significativamente (hasta un 50 %) la acumulación de triglicéridos, mientras la incubación con semaglutida no mostró ningún efecto. Algunos extractos de especies incluidas en el nutraceutico han sido descritos por disminuir la acumulación de lípidos en cultivos celulares. Por ejemplo, el extracto acuoso de *Cynara scolymus* en células Huh7.5 (276), un extracto etanólico de *Origanum vulgare* en adipocitos 3T3-L1 (277) y un extracto acuoso de *Vigna angularis* en adipocitos humanos (278).

Aun siendo resultados preliminares, se mostró el potente efecto del nutraceutico disminuyendo la acumulación de lípidos en cultivos celulares de hepatocitos murinos, incluso actuando de forma más marcada que el fármaco semaglutida al que se le atribuyen efectos reductores de la esteatosis hepática (279).

Fase 1: Desarrollo de un modelo de obesidad inducida por la dieta

El objetivo de esta fase fue definir y estandarizar el desarrollo de un modelo de obesidad inducida por dieta y estudiar el efecto del consumo a medio plazo (13 semanas) y a largo plazo (21 semanas) de una dieta alta en grasa y fructosa (HFHF) sobre el metabolismo de la glucosa y los lípidos, el sistema hepático de defensa antioxidante y detoxificante y la microbiota. Este proceso de envejecimiento en ratas obesas se comparó con el mismo proceso en ratas delgadas. Además, como control, este

mecanismo se comparó con animales que consumieron una dieta estándar durante el mismo periodo experimental. Para lograr este objetivo, se administró una dieta alta en grasa y fructosa en el agua de bebida y se evaluó la ingesta de alimento, el peso corporal, el contenido de grasa hepática y su perfil de ácidos grasos, así como la expresión génica de enzimas lipogénicas, lipolíticas y antioxidantes. El modelo ensayado presentó una gran similitud con el perfil metabólico de la enfermedad humana: obesidad, resistencia a la insulina y aumento del contenido sérico de ácidos grasos libres (AGL) y triglicéridos hepáticos (TG) que se observan a partir de las 10 semanas tras la alimentación con una dieta HFHF en modelos experimentales de roedores (168).

Ingesta y cambios ponderales

El consumo de la dieta alta en grasa y en fructosa condujo al establecimiento de la obesidad (la diferencia de peso corporal entre los animales alimentados con la dieta estándar (SD) y los alimentados con la dieta experimental fue igual o superior a 2 desviaciones estándar) a partir de la tercera semana de periodo experimental. De este modo, se demostró una mayor eficacia en comparación con otras estrategia de inducción de la obesidad con una dieta hipercalórica (60% Kcal procedentes de la grasa), en la que las diferencias anteriores se alcanzaron tras cinco semanas de periodo experimental (169) o lo descrito por Woods et al. (280) tras alimentar a ratas con una dieta alta en grasa y sin fructosa durante 12 semanas. Además, los cambios de peso corporal debidos a la DIO fueron similares a los modelos de obesidad genética (281).

En consonancia con los resultados anteriores, encontramos cambios drásticos en la composición de la masa corporal tras la obesidad inducida por la dieta (DIO) que incluyeron un aumento general de la masa grasa total. Los lípidos tienden a acumularse dentro de gotas lipídicas en el tejido adiposo, pero también en tejidos no adiposos, como el hígado, riñón y corazón. El exceso de esta deposición ectópica de lípidos y la alteración de la homeostasis de las gotas lipídicas pueden contribuir a la patogénesis de enfermedades relacionadas con el síndrome metabólico (282). Se sabe que la alimentación a medio y largo plazo con una dieta alta en grasa aumenta el peso del hígado (283,284). En nuestro estudio, la inducción de la obesidad también condujo a la acumulación de grasa en el hígado tanto a las 13 como a las 21 semanas, que fue acompañada por la acumulación de TG en el hígado y el plasma. Además, aunque el peso del hígado disminuyó con el envejecimiento en HFHF2 (**Figura 30**), contenía la misma

cantidad de grasa total que HFHF1. Este resultado indicó que el envejecimiento condujo a una mayor concentración de grasa hepática en las ratas obesas comparado con las ratas que consumieron la dieta estándar. Este mismo efecto se vio reflejado en el peso del corazón, aumentando tras 21 semanas de DIO. Otros autores han descrito un incremento del peso del corazón tras 12 semanas (285) e incluso tras 3 semanas de inducción de obesidad a través de la dieta (286). Por otro lado, el consumo de una HFHF también aumentó el peso del riñón independientemente del tiempo de estudio. Esto coincide con lo propuesto por Yang et al. (287) donde el peso del riñón aumentó significativamente en ratas Sprague-Dawley tras consumir una dieta HFHF durante 12 semanas. Además, de Castro et al. (288) describieron como el peso del riñón no se vio afectado por el envejecimiento (4 vs 12 semanas de edad) tras consumir una dieta alta en grasa durante 13 semanas.

Metabolismo glucídico y marcadores plasmáticos y sanguíneos

La obesidad y el desarrollo de NALFD están íntimamente ligadas con la resistencia a la insulina y alteraciones en el metabolismo glucídico, como el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 (289,290). Además, en nuestro modelo experimental de DIO se añadió fructosa en el agua de bebida al 20 % para agravar dichos efectos sobre el metabolismo glucídico, según lo sugerido por Apaijai et al. (291). Bajo nuestras condiciones experimentales, el consumo de la dieta HFHF produjo un efecto muy marcado sobre la PTOG al aumentar los niveles plasmáticos de glucosa y el AUC independientemente del tiempo de consumo. Sin embargo, el envejecimiento provocó un descenso en los valores de AUC en los dos grupos experimentales, No obstante, la glucemia en ayunas aumentó tras el consumo de una dieta SD durante 21 semanas debido a un aumento de la resistencia a la insulina producida por el envejecimiento (292).

Respecto a la bioquímica plasmática, el consumo de una dieta HFHF durante 13 semanas indujo un marcado aumento en los niveles de triglicéridos plasmáticos en comparación con el consumo de una dieta SD, similar al observado por Jakobsdottir et al. (293). Este hecho mantenido en el tiempo, desencadena el desarrollo de lipotoxicidad y acumulación de lípidos en el hígado (283). Además, esta misma tendencia fue seguida por algunos marcadores de riesgo cardiovascular como el índice triglicéridos-glucosa, no-HDL y TG/HDL. Por otro lado, el incremento en plasma de las actividades

enzimáticas de AST, ALT, GGT y ALP se asoció a un daño hepático (283) como consecuencia del consumo de una dieta alta en grasa (169,283). Sin embargo, el envejecimiento puede provocar un descenso de estas enzimas en plasma según lo comprobado por Martínez et al. (169).

Con respecto a los parámetros hemáticos, podemos decir que el aumento en el número total de glóbulos blancos producido como consecuencia del desarrollo de la obesidad podría indicar un aumento de la respuesta inflamatoria, acorde a lo observado por otros autores (294,295). Hernández et al. (296) sugirieron que el tipo de dieta consumido tenía un mayor efecto sobre los parámetros hemáticos que el tiempo durante el cual se llevaba a cabo este consumo. Este mismo efecto fue observado bajo nuestras condiciones experimentales, ya que tras 21 semanas de periodo experimental se observó un ligero descenso de los valores de HGB, HCT, MCV y MCH en los animales que consumieron la dieta obesogénica en comparación con la dieta estándar.

Repercusión de la obesidad en la funcionalidad hepática

Los mecanismos que subyacen a la obesidad a nivel hepático se estudiaron desde cuatro puntos de vista: la determinación del perfil de ácidos grasos, la valoración histológica, la expresión génica de factores relacionados con la funcionalidad hepática y la actividad de enzimas antioxidantes.

En primer lugar, se produjo una acumulación de grasa hepática como consecuencia de la ingesta elevada de grasa y fructosa, modificándose, además, el perfil de ácidos grasos disminuyendo los ácidos grasos saturados y, aumentando los niveles de ácidos grasos poliinsaturados. Estos cambios se mantuvieron con el tiempo. Esto es importante, ya que la sustitución de grasas saturadas por grasas poliinsaturadas hace que el hígado sea más susceptible al ataque de las ROS. Como se ha señalado en otros estudios, la ingesta a medio y largo plazo de una dieta alta en grasa basada en manteca de cerdo aumenta principalmente los niveles de ácido oleico (C18:1n9) y linoleico (C18:2n6), mientras que disminuye los niveles de ácido docosahexaenoico (C22:6n3) (297,298). El aumento de ácido oleico y la disminución de ácido esteárico hallados en nuestro estudio podrían estar relacionados con la mayor ingesta de ácido oleico proporcionada por la dieta HFHF e indicar la activación de la enzima Δ -9 desaturasa, que realiza la conversión de C18:0 en C18:1n9 (298). Ha sido descrito que durante el

desarrollo de la esteatosis hepática, se produce una acumulación excesiva de ácido oleico como producto final de la lipogénesis *de novo* (299). La eficiencia de la biotransformación de los ácidos grasos puede determinarse utilizando diferentes índices hepáticos (129).

Los niveles de ácido oleico, los cocientes PE/PI y OLE/STE están relacionados con la actividad de la esteroil-CoA desaturasa-1 (SCD1) y estos se utilizan a menudo como medida sustitutiva de su actividad (300). La SCD1 introduce una desaturación Δ -9 en los ácidos grasos estearato (C18:0) y palmitato (C16:0) formando los MUFA de ácido oléico (C18:1n-9) y ácido palmitoleico (C16:1n-7), respectivamente (301). El consumo de una dieta alta en grasa durante 13 semanas está relacionado con un aumento de la expresión del gen *Scd1* y del nivel de ácido oleico, acorde a lo descrito por Ciapaite et al. (300). La tendencia de la relación OLE/STE se relacionó con la expresión del gen *Scd1* en la semana 13, pero no con la relación PE/PI. La expresión de *Scd1* fue modulada por la interacción dieta x tiempo, lo que demuestra que el envejecimiento de las ratas obesas condujo a una reducción de la expresión de *Scd1*, que previamente había sido sobreexpresado por el desarrollo de la obesidad a medio plazo. Por lo tanto, dependiendo del tiempo elegido el nivel de expresión génica puede diferir drásticamente en *Scd1* y otros transcritos lipogénicos. Además, los ratios elongasa-desaturasa (DC/LN y ARA/LE) fueron menores tras el consumo de una dieta alta en grasa y fructosa, independientemente del tiempo. Estos ratios indicaban un mayor potencial para inducir la formación de ácidos grasos con mayor susceptibilidad a la oxidación y agentes proinflamatorios (129).

Los datos de contenido graso se vieron reforzados por los resultados de la valoración histológica, que aportaron signos claros de esteatosis hepática y alteraciones que caracterizan el desarrollo de NAFLD. La puntuación de EHNA arrojó un valor de 3-4 basado en la evaluación semicuantitativa de la esteatosis y la balonización celular (*balloning*). Otro hallazgo interesante fue la evolución del patrón de esteatosis de microvesicular a macrovesicular a medida que las ratas envejecían durante el periodo experimental. Este cambio fue más evidente en las ratas que desarrollaron obesidad y coincide con los resultados de Kristiansen et al. (302) que describieron un aumento del cambio macrovesicular coincidiendo con fases más avanzadas del periodo experimental. Por lo tanto, con periodos mayores de consumo de una dieta alta en grasa y fructosa, los

cambios en la histología hepática fueron más perjudiciales y propensos a progresar hacia estadios más avanzados de la enfermedad, como fibrosis, cirrosis o hepatocarcinoma. El abombamiento o balonización de los hepatocitos, una alteración histológica que también aumentó con el envejecimiento, se asocia a un aumento del tamaño de los hepatocitos debido a una alteración en los filamentos intermedios del citoesqueleto derivada de la ruptura de las citoqueratinas 8 y 18 (303). En cuanto a la presencia de esteatosis macrovesicular localizada en la zona convexa de la sección del lóbulo hepático seleccionada y la organización en filas con disposición radial de los focos de hepatocitos con gotas de grasa de mayor tamaño (**Figura 31C**), diversos estudios demuestran que la esteatosis localizada en el hígado puede estar relacionada con la irrigación sanguínea hepática en lo que se conoce como teoría vascular (304,305). Además del flujo normal del hígado obtenido por la vena porta y la arteria hepática, existen otros flujos denominados aberrantes por las venas pancreaticoduodenales, las venas de Sappey, o las venas gástricas aberrantes izquierda y derecha, constituyendo lo que se denomina el tercer flujo de entrada (306). La existencia de esteatosis focal está asociada al tercer flujo de entrada y a varias hormonas en el flujo portal que causan niveles alterados de TG y ácidos grasos.

Para profundizar en los mecanismos promotores de la esteatosis hepática que habíamos observado, se estudió la expresión génica de factores relacionados con la funcionalidad hepática. La combinación de una ingesta elevada de grasa y fructosa desempeñó un papel importante en la expresión de diferentes genes regulados por factores de transcripción como SREBP-1, PPARA y PPARG. En el hígado, la lipogénesis *de novo* está regulada por SREBP-1 (*sterol regulatory element-binding protein 1*) codificada por *Srebf1* e inducida por la insulina a múltiples niveles. En cambio, desempeña un papel menor en la lipogénesis de los adipocitos (57) que, a su vez, está fuertemente influenciada por *Pparg* (307). Nuestros resultados mostraron un claro aumento de la expresión génica de *Srebf1* acompañado de un aumento de la expresión de *Fasn*, *Scd1* y *Hmgcr* tras la ingesta de una dieta HFHF durante 13 semanas. En este sentido, Flamment et al. (308) observaron un aumento de la expresión de *Srebf1* derivado del consumo de dieta alta en grasa durante 8 semanas. Además, el aumento de la acumulación de grasa hepática podría explicarse por una mayor expresión de *Pnpla3* en la semana 13, que está muy relacionada con el desarrollo de NAFLD (309). La hidrólisis de ésteres de retinilo a

través de la expresión de *Pnpla3* y el control de la homeostasis del colesterol a través de la expresión de *Hmgcr* también están regulados al alza por *Srebf1* (310). Todo esto puede indicar que la acumulación de grasa en el hígado a medio plazo puede deberse en gran medida a un aumento de la lipogénesis *de novo*. La acumulación de grasa también podría deberse a un mayor flujo de ácidos grasos libres al hígado debido a la expresión regulada de *Fabp5*, que se correlaciona con la grasa hepática (168). Este aumento coincide con el de otros transcritos lipogénicos (*Fasn*, *Hmgcr*, *Scd1*, *Pnpla3*) que muestran un aumento a medio plazo, mientras que el consumo de la dieta alta en grasa provoca una disminución a largo plazo.

La expresión del receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas (*Pparg*), un regulador de la adipogénesis (57,307,308) aumentó tanto con el patrón dietético obesogénico a medio o largo plazo, aunque el desarrollo de la obesidad asociada al envejecimiento provocó un mayor aumento (1.17 vs 1.86). Lee et al (311) describieron que los niveles de expresión de *Pparg* se correlacionaban positivamente con la acumulación de grasa inducida por la obesidad y la diabetes. El mismo patrón se observó en *Agpat3*, que codifica una aciltransferasa responsable de la conversión de ácido lisofosfatídico en ácido fosfatídico durante la síntesis *de novo* de fosfolípidos (312). Muchos genes diana de PPAR γ , incluidos *Fabp4/aP2*, *Cebpa/C/EBPa*, *Cfd/Adipsin*, CD36 y lipoproteína lipasa (*Lpl*), desempeñan papeles importantes en la adipogénesis y la lipogénesis. Estas observaciones sugieren que PPAR γ activa sinérgicamente estos genes lipogénicos posiblemente en asociación con SREBP1 activado o induciendo la escisión de SREBP1 para activar estos genes indirectamente (312).

Otro importante mecanismo de control del metabolismo lipídico que tiene lugar en los hepatocitos es la β -oxidación de los ácidos grasos en las mitocondrias, donde el *Ppara* es un importante activador transcripcional (299,300). Por tanto, bajo una elevada expresión de genes lipogénicos y una reducida transcripción de los principales genes lipolíticos (*Ppara* y *Cpt1a*), los ácidos grasos libres hepáticos se incorporarían a los hepatocitos en lugar de ser oxidados (300,313). A largo plazo, el principal mecanismo de acumulación de grasa es la reducción del catabolismo de los ácidos grasos por oxidación en las mitocondrias (expresión reducida de *Ppara*, *Cpt1a* y *Cyp7a1*), mientras que a medio plazo es la lipogénesis *de novo*.

Se han estudiado otros genes implicados en el metabolismo de los lípidos y el desarrollo de obesidad o NAFLD. La familia Cyp es el principal grupo de enzimas implicadas en el metabolismo de fármacos, pero también están relacionadas con el metabolismo del colesterol y los lípidos. En modelos de roedores obesos y diabéticos, su expresión estaba principalmente disminuida (314), como pudimos detectar bajo nuestras condiciones. Estos genes podrían utilizarse como posibles candidatos terapéuticos para el NAFLD. En este sentido, cabe destacar el aumento de la expresión del gen *Col26a1*, relacionado con el desarrollo de la enfermedad hepática no alcohólica, tanto en la semana 13 como la 21. Además, las condiciones de estrés oxidativo derivadas del consumo de dieta HFHF podrían a su vez producir daño en el ADN y probablemente estar asociadas con el aumento de *Gadd45a* a las 13 semanas o de *Cdkn1a* a las 21 semanas. Ambos genes codifican proteínas implicadas en el daño celular. Por otro lado, *Gdf15*, un gen asociado al programa de respuesta al estrés de las células tras una lesión celular, y *Myc*, un protooncogen implicado en numerosos procesos cancerígenos, siguieron un patrón similar al de *Cdkn1a* experimentando un aumento a largo plazo inducido por la ingesta de dieta HFHF.

Por otra parte, cabe esperar que la alteración del entorno intracelular también afecte a las mitocondrias, provocando un deterioro funcional o una adaptación a través de mecanismos como cambios en la expresión génica, que afecten a su capacidad antioxidante (315). Se considera que el estrés oxidativo es un factor crucial en el desarrollo de las complicaciones de la obesidad inducida por la dieta (313). Muchos estudios (283,313) han mostrado una relación inversa entre los niveles de ROS y la actividad antioxidante, disminuyendo así la capacidad protectora del hígado. Por el contrario, otros estudios, incluidos nuestros resultados a las 13 semanas, mostraron que el consumo a medio plazo de una dieta alta en grasa aumentaba la actividad de las enzimas antioxidantes y detoxificantes, CAT, Mn-SOD y GST, probablemente en un intento de contrarrestar el aumento de la producción de ROS relacionada con la obesidad (316). Nuestros resultados de actividad de SOD y GPx coinciden con los de Longhi et al. (317) quienes mostraron que tras 8 semanas de administración de una dieta rica en manteca de cerdo, una elevada actividad de SOD junto con una baja actividad de GPx conducía a un aumento de los niveles de H_2O_2 que desempeñan un papel en la iniciación y propagación del daño oxidativo. En nuestras condiciones experimentales, la elevada actividad de las enzimas antioxidantes y detoxificantes en la semana 13 del

periodo experimental puede indicar altos niveles de ROS. Esto se ve respaldado por la disminución de la expresión del transcrito *Ucp2*, que podría estar relacionada con un aumento de la producción de ROS, debido a la incapacidad de UCP2 para inhibir la producción de H₂O₂ (318). Aunque la acumulación de lípidos en el hígado aumenta los niveles de ROS, no se observó una disminución adicional de la expresión de *Ucp2* con el paso del tiempo.

Cabe destacar el aumento de la expresión de genes de enzimas antioxidantes y detoxificantes, *Gpx1* y *Sod1*, *Akr7a3*, y *Nqo1* en la semana 13 del periodo experimental, una vez establecida la obesidad. *Akr7a3* y *Nqo1* participan en el proceso de detoxificación y están regulados por la expresión de *Nfe2l2* (319,320), aunque no se observó un aumento de la expresión de *Nfe2l2* tras la ingesta de la dieta HFHF. No obstante, se sabe que la actividad de NRF2 aumenta tras su translocación nuclear, sin necesidad de que aumente su expresión génica (321).

En relación a la duración del periodo experimental, un periodo de inducción de la obesidad de 13 semanas no pareció provocar desequilibrio en el estado oxidativo. Un periodo de inducción de la obesidad mayor (21 semanas) causó los efectos esperados, disminuyendo la actividad de todas las enzimas antioxidantes hepáticas medidas, así como, una disminución de la expresión de *Akr7a3*, *Nqo1* y *SOD1*, lo que indica la ineficiencia del sistema de defensa contra ROS. Estos hallazgos apuntan de nuevo al daño acumulativo causado por el envejecimiento y la exposición a una dieta desequilibrada. Además, existió una alta correlación entre los cambios encontrados a nivel de expresión génica y la actividad antioxidante de de Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, QR y GST. Así pues, una dieta obesogénica asociada al proceso de envejecimiento fue la variable más crucial para afectar a la actividad antioxidante en las condiciones experimentales del presente estudio.

Repercusión de la obesidad en microbiota intestinal

Se ha demostrado que tanto la obesidad inducida por dietas altas en grasa como la obesidad genética van acompañadas de alteraciones en la microbiota intestinal, disminuyendo la diversidad bacteriana, y modificando la capacidad de obtención de energía por parte del huésped (47). Además, es conocido que una dieta alta en grasa provoca tanto una inflamación sistémica como intestinal (53). El tipo de dieta y la

duración del periodo experimental afectó al tipo de poblaciones microbianas presentes en el contenido cecal, ya que mediante el diagrama de Venn o la distancia beta se asociaron diferencialmente los grupos. El desarrollo de la obesidad provocó una disminución en la diversidad bacteriana cecal. Además, aumentó la proporción de *Clostridium sensu stricto* 1 y *Ruminococcus* acorde a lo descrito por Li et al. (322), los cuales describieron una asociación entre estos géneros y una inflamación intestinal. Otros estudios también han asociado el consumo de una dieta alta en grasa con un incremento en la proporción de *Clostridium sensu stricto* 1 (55,323,324) y *Ruminococcus* (47,54). Tian et al. (54) sugirieron que un incremento en poblaciones de *Ruminococcus* puede provocar un aumento en la inflamación intestinal, ya que pueden alterar su permeabilidad, dañando a las células epiteliales y a las uniones estrechas. *Clostridium* y *Ruminococcus* son bacterias que producen ácidos de cadena corta como el butirato, acetato y propionato a partir de glúcidos no digeribles. Tanto el acetato y el propionato se han descrito por sus propiedades obesogénicas (55,56,325). Por último, los cambios en la microbiota durante el envejecimiento pueden afectar de forma importante a la salud del huésped. Por ejemplo, se ha detectado un incremento asociado al envejecimiento del género *Ruminococcus* independientemente del tipo de dieta consumida, lo cual se ha asociado con una elevada susceptibilidad a enfermarse en pacientes de edad avanzada (325).

En base a los resultados obtenidos se consiguió definir y estandarizar un modelo de obesidad inducida por la dieta, y se puso de manifiesto la importancia de la elección de la duración de la inducción de la obesidad, debiendo controlarse en cada diseño experimental específico. En la Fase 2, para la evaluación del efecto del nutracéutico como tratamiento de la obesidad y el hígado graso no alcohólico, se optó por seleccionar un modelo de obesidad inducida por la dieta de 16 semanas, intermedio entre los dos periodos experimentales ensayados.

Fase 2: Tratamiento de la obesidad mediante combinación del nutracéutico y HIIT

El objetivo de esta fase fue contrarrestar las alteraciones asociadas a la obesidad inducida por dieta, en primer lugar, interviniendo en el balance positivo de energía característico de esta patología con un control de la ingesta calórica (*pair-fed*, dieta

estándar normocalórica), y al mismo tiempo, con un aumento del gasto energético (entrenamiento interválico de alta intensidad (HIIT)). Además, utilizamos diversas estrategias terapéuticas para potenciar las mejoras sobre las alteraciones metabólicas: la administración de un nutraceutico de combinación de extractos vegetales (NT), la administración de un análogo del péptido-1 similar al glucagón (GLP-1) (semaglutida), así como la combinación de estas estrategias con el protocolo de HIIT; todas ellas asociadas al *pair-fed*. Se evaluó el efecto de dichas intervenciones sobre las principales alteraciones inducidas por obesidad en parámetros metabólicos, función y estructura hepática y microbiota intestinal, estudiados en la Fase 1.

Ingesta, cambios ponderales y composición corporal

La dieta obesogénica fue más eficaz en el establecimiento de la obesidad en la Fase 2 (primera semana) en comparación con lo observado en la Fase 1 (tercera semana), probablemente debido a menor edad de los animales en el segundo caso, encontrándose estos en una fase exponencial de crecimiento, y a la mayor ingesta calórica observada.

La reducción de peso final observada en todos los grupos siguió la relación esperada con la restricción de la ingesta de alimento, y, por consiguiente, de la ingesta calórica. La inclusión del nutraceutico en la dieta no alteró la ingesta de alimento en comparación con una dieta estándar, lo que indica que el nutraceutico no altera negativamente la palatabilidad. Por otro lado, la incorporación del protocolo interválico de alta intensidad (HIIT) resultó ser una intervención muy eficaz sobre el peso corporal porque, además de aumentar el gasto energético, disminuyó la ingesta de alimento en todos los grupos (HF/EX, HF/NEX y HF/SE). Este último efecto puede atribuirse al papel anorexigénico del ejercicio físico alterando a las hormonas relacionadas con el control del apetito, aumentando el PYY y descendiendo la grelina, entre otras (326). Además, se ha descrito que el HIIT incrementa la secreción de GLP-1, una hormona incretina secretada por las células L del intestino delgado, que incrementa la saciedad reduciendo la ingesta de alimento (327) y estimula la liberación de insulina e inhibe la secreción de glucagón de los islotes pancreáticos en función de la glucosa, lo que a su vez reduce los niveles de glucemia (328). En esta misma línea, se observó como la inyección subcutánea de semaglutida (HF/S) redujo marcadamente el peso corporal y la ingesta de alimento, especialmente, al combinarla con ejercicio físico (HF/SE), sumándose los efectos anorexigénicos de ambas intervenciones. La semaglutida disminuye el apetito e

incrementa la sensación de saciedad, ya que este fármaco actúa como un agonista del receptor de GLP-1 (GLP-1R) que se une selectivamente a este receptor, el cual es la diana del GLP-1 nativo, y lo activa (328).

Con respecto a la composición corporal, en los animales obesos la ganancia de peso afectó a los dos compartimentos: masa libre de grasa y, muy especialmente, la masa grasa. Esta acumulación de grasa se relaciona con la cantidad de tejido graso abdominal y epididimal. Esta misma tendencia se evidenció en los índices antropométricos (IMC e índice de Lee), los cuales se asocian con la composición corporal (329). La intervención más eficaz para reducir la masa grasa fue la implementación del protocolo de HIIT debido a su capacidad para aumentar la lipólisis (143). El descenso en el tejido adiposo se puede deber a la movilización y utilización de grasa como fuente de energía, a través de la β -oxidación de ácidos grasos, para compensar dicho déficit de energía (330). Este mismo efecto movilizador de grasa se observó en los grupos a los que se les administró semaglutida, como han indicado algunos autores debido a un aumento en las vías lipolíticas por parte de agonistas de GLP-1R (331). Cabe destacar, la sinergia observada entre los factores que contribuyeron al balance energético negativo: por una parte, el aumento del gasto energético por el HIIT y, por otra parte, el potente efecto anorexigénico que se manifestó por la administración de semaglutida.

Siguiendo la misma tendencia que la observada en el peso y composición corporal, las intervenciones que redujeron en mayor medida la grasa hepática y el peso de los órganos, sobre todo del hígado y tejido graso abdominal y epididimal, fueron el protocolo de entrenamiento solo o combinado con la administración de semaglutida, y el descenso en el peso de estos órganos se asoció a la menor ingesta calórica. Otros autores, también han demostrado un efecto positivo sobre la reducción de la esteatosis hepática por acción del protocolo de HIIT (332) y de la semaglutida (279).

Por otra parte, la inclusión del nutraceutico en la dieta también tuvo un efecto muy positivo sobre la esteatosis del hígado. Nuestros resultados concuerdan con otros trabajos en los que se demostró que algunas especies vegetales incluidas en nuestra formulación nutraceutica (*Lens culinaris*, *Vigna angularis*, *Trigonella foenum-graecum*, *Origanum vulgare*, *Cynara scolymus*) tuvieron un efecto positivo sobre la esteatosis hepática disminuyendo el contenido en triglicéridos en este órgano (129,333–336). En la misma línea de la reducción del porcentaje de grasa hepática se observó un descenso en

los niveles de triglicéridos plasmáticos y tejido adiposo. Por lo tanto, el nutraceutico asociado a ejercicio se podría considerar como una posible estrategia para el tratamiento del NAFLD.

Condición física

La obesidad influyó negativamente en la capacidad aeróbica y en la condición física cuando estos parámetros se expresan en función del peso del animal, es decir, en la capacidad para realizar un trabajo mientras se transporta el peso del cuerpo, ya que es menor en ratas obesas que en delgadas. La estrategia de implementar un protocolo de ejercicio HIIT a ratas obesas dio resultados muy positivos en la mejora del fitness cardiopulmonar, evaluada por la capacidad aeróbica, lo cual se explica porque el HIIT optimiza la oxidación de la grasa y la pérdida de peso en relación a la población obesa sedentaria (337). Además, este efecto positivo se potenció cuando el HIIT se asoció a la ingesta de un nivel de inclusión del 0.75 % del nutraceutico en la dieta o a la administración subcutánea de semaglutida, con valores mayores de velocidad máxima alcanzada, distancia recorrida y tiempo de duración; no solamente en comparación con animales sedentarios sino también en relación a los que hacen ejercicio físico. Este resultado podría indicar que tanto el nutraceutico como la semaglutida presentan propiedades positivas como suplemento para mejorar el rendimiento físico, y lo que es más importante, pueden mejorar la salud cardiorrespiratoria al aumentar el VO_2 max. La bibliografía consultada aporta datos de la eficacia de estas dos intervenciones, administración de nutraceutico y administración de semaglutida. Ingersen et al. (338) comprobaron que la combinación de dicho fármaco con ejercicio físico mejoraba algunos parámetros metabólicos en mayor medida que solo el ejercicio físico, aunque no se observaron diferencias en cuanto a la capacidad aeróbica. Otros agonistas del GLP1-R, como pueden ser la liraglutida y exenatida, tampoco mostraron una mejora la capacidad aeróbica (339,340). Algunos investigadores han sugerido que agonistas de GLP1-R (exenatina) pueden aumentar el rendimiento físico y capacidad aeróbica al inducir la remodelación músculo esquelético y aumentar la toma de glucosa en el propio músculo (341). Por otra parte, el nutraceutico podría promover la oxidación de lípidos al disminuir el RQ (342) y son numerosos los estudios que relacionan el efecto de compuestos aislados de extractos vegetales, presentes en el nutraceutico, con la condición física y la capacidad aeróbica (129,343-345). Así mismo, es muy relevante que, si una persona

obesa consigue llegar a los objetivos de ejercicio físico trazados en su programa de adelgazamiento con un menor sufrimiento o sensación de angustia, o consigue superar en un tiempo relativamente corto dichos objetivos del programa de entrenamiento para alcanzar metas más elevadas, es indudablemente un efecto positivo para el programa general de pérdida de peso diseñado.

Valoración histológica del hígado

A diferencia de lo observado en la Fase 1, donde el consumo de una dieta alta en grasa y fructosa durante 13 y 21 semanas indujo claros signos de esteatosis hepática con valores semicuantitativos de NAS de 2 y 4, respectivamente, bajo nuestras condiciones experimentales el consumo de este tipo de dieta durante 16 semanas arrojó un valor de NAS de 1, mostrando leves signos de esteatosis hepática, principalmente de tipo macrovesicular, la cual está más asociada al desarrollo de NAFLD (100). Para explicar este resultado, hay que tener en cuenta la edad inicial de los animales que fue de 10 semanas en la Fase 1, más cercana a meseta y de 6 semanas en la Fase 2, en plena fase crecimiento. Los animales más jóvenes desarrollaron más rápido obesidad, pero su hígado mostró menos signos de esteatosis al tener mayor capacidad de activar los mecanismos de compensación hepática con más eficacia. Sin embargo, en los animales de la Fase 1 estos mecanismos estaban agotados a las 13 semanas de periodo experimental y la esteatosis fue manifiesta (346).

Por el contrario, el consumo de una dieta estándar resultó en una acumulación grasa de tipo microvesicular, induciendo en algunas ocasiones un mayor daño hepático que una dieta HFHF. Aguiar et al. (347) propusieron que la dieta del *American Institute of Nutrition* (AIN) podría no ser la mejor dieta de control para utilizar en el protocolo de obesidad inducida por dieta. Así mismo, Farias Santos et al. (348) indicaron que el consumo de dietas estándar AIN-93 son capaces de inducir hígado graso con alteraciones en el perfil hepático de ácidos grasos, sugirieron que el alto contenido en glúcidos, especialmente sacarosa, pueden contribuir al desarrollo de esta patología. En esta línea, Yan et al. (349) describieron como el consumo a largo plazo de dietas baja en grasa y alta en glúcidos podría generar NAFLD en ratones, pero sin llegar a conducir a obesidad, tal y como se comprobó en nuestro estudio con la diferencia de peso de los animales. En las condiciones experimentales del estudio de Yan et al. (349), el consumo de una dieta con manteca de cerdo (10 %), similar a la nuestra, indujo esteatosis hepática

moderada e inflamación, tal y cómo observamos en nuestro trabajo. Existen evidencias de que la ingesta de ácidos grasos saturados aumenta la acumulación de lípidos hepáticos en roedores (350) y las dietas con manteca de cerdo, ricas en estos ácidos grasos saturados, son dañinas para el organismo (349).

Para el tratamiento del hígado graso se han propuesto intervenciones farmacológicas y no farmacológicas, principalmente de modificaciones en el estilo de vida (351). En este último sentido, el ejercicio físico se ha propuesto como una estrategia para mejorar los signos histológicos de NALFD (352) al promover un aumento de la oxidación lipídica en los hepatocitos, lo que reduce los niveles de triglicéridos almacenados (353). Kistler et al. (354) informaron que el ejercicio de alta intensidad, pero no el volumen del mismo, estaba inversamente correlacionada con la gravedad de la enfermedad en NAFLD. Esto va en consonancia con los resultados hallados en nuestro estudio, donde un protocolo de HIIT redujo la esteatosis hepática, tanto micro- como macrovesicular, en todos los grupos donde se implementó (HF/EX, HF/NEX y HF/SE); así como, mejoró los efectos inducidos por las intervenciones en animales sedentarios (HF/SD, HF/NT y HF/S).

Otra de las estrategias para el manejo del NAFLD es el tratamiento dietético, entre las que se encuentran intervenciones como la restricción calórica y la ingesta de compuestos dietéticos bioactivos. Bajo nuestras condiciones experimentales, el paso de una dieta HFHF a una dieta estándar asociado a un proceso de restricción calórica, provocó un efecto negativo aumentando la proporción de esteatosis microvesicular e inflamación en comparación con el grupo que consumió una dieta HFHF durante todo el periodo experimental. Esto puede ser debido a los efectos negativos del tipo de dieta estándar descritos anteriormente. Por otra parte, se ha descrito que los compuestos fenólicos y otros compuestos bioactivos son capaces de reducir la esteatosis (355). Concretamente, estos compuestos fenólicos pueden promover la oxidación de la grasa hepática e inhibir la síntesis de grasa a través de la vía PPAR, y aliviar la inflamación a través de la vía VB6/TLR4/NF- κ B (356). Aunque, se ha visto que la administración de diferentes especies vegetales del nutraceutico ensayado (333,356-362) reducen la esteatosis hepática, bajo nuestras condiciones experimentales, los compuestos bioactivos asociados a la inclusión del nutraceutico en la dieta estándar (HF/NT) no consiguieron prevenir los efectos negativos de este tipo de dieta.

Finalmente, en relación a la semaglutida, se ha descrito que este fármaco es capaz de corregir, tanto en humanos como en roedores, las alteraciones asociadas al NAFLD, entre las que se incluye la esteatosis hepática (279). Aunque este fármaco es relativamente novedoso, estudios en otros fármacos agonistas del GLP-1R, como la exenatida, han sugerido que la mejora en la esteatosis hepática era debido a una reducción del apetito y al aumento de la utilización de lípidos en el tejido adiposo de ratas con NAFLD (363). Así mismo, Zhou et al. (364) demostraron que la liraglutida reducía la acumulación hepática de lípidos y la lesión hepática en ratas con diabetes mellitus tipo 2 mediante la activación de la expresión de PPAR α a través de una vía AMPK dependiente del GLP-1R. Además, Saad et al. (363) comprobaron que la exenatida mejoraba el NAFLD en ratas mediante la supresión de la señalización del receptor tipo Toll4/NF κ B. Sin embargo, hasta la fecha, la expresión del GLP-1R en el hígado sigue siendo controvertida (365). Bajo nuestras condiciones experimentales, la única intervención que fue capaz de revertir la esteatosis hepática, tanto micro- como macrovesicular, fue la intervención farmacológica mediante la inyección subcutánea de semaglutida, siendo este efecto máximo al combinarse con la capacidad reductora de esteatosis, previamente descrita, de un protocolo de HIIT.

Metabolismo glucídico

La resistencia a la insulina de los animales que desarrollaron obesidad fue patente a las 16 semanas, en el que los animales se encontraban en fase exponencial de crecimiento, lo cual supuso un adelanto de este efecto patológico en relación a los experimentos de la Fase 1. Este efecto se vio reflejado en los resultados obtenidos tras la prueba de tolerancia oral a una sobrecarga de glucosa (PTOG) (área bajo la curva y perfil glucémico). Estos parámetros disminuyeron tras la aplicación de todas las intervenciones (restricción calórica, protocolo de HIIT, administración del nutracéutico, administración de semaglutida) con distinta eficacia. La restricción calórica junto al cambio de dieta con suplementación del nutracéutico fue la intervención que mayor efecto tuvo sobre este test, por lo que, podemos atribuir al nutracéutico formulado propiedades hipoglucemiantes, que podrían deberse a algunos de los péptidos bioactivos presentes en la formulación (231,366–373). Con respecto a la administración de semaglutida, aunque varios estudios han descrito el efecto positivo de la semaglutida sobre el metabolismo de la glucosa en ratas, reduciendo el perfil glucémico y el AUC

(374,375), bajo nuestras condiciones experimentales no se encontró esta eficacia al combinarlo con restricción calórica. La semaglutida induce una disminución de la ingesta al disminuir el apetito, por lo que no se puede afirmar que la mejora del perfil glucémico sea debida directamente al efecto del fármaco a nivel central sobre los mecanismos hipotalámicos que controlan la ingesta de alimento o que sea un efecto secundario de la restricción calórica asociada a la semaglutida.

Ya que el hígado actúa como reserva de glucosa y también puede aumentar la síntesis de esta para contribuir a mantener los niveles plasmáticos según las necesidades del organismo, se creó un panel de genes hepáticos relacionados con el metabolismo glucídico, incluidos en una placa de *OpenArray*, para determinar el papel de estos mecanismos en el efecto de las intervenciones aplicadas. El estudio del *Heatmap* obtenidos a partir de este análisis mostró que las intervenciones incrementaron la expresión génica en hígado (también en colon y tejido adiposo) de hexoquinasa 2 (*Hk2*), fosfoenolpiruvato carboxiquinasa 1 (*Pck1*) y el sustrato del receptor de insulina 1 (*Irs1*), mejorando la resistencia a insulina y la captación de glucosa (376–378), lo cual concuerda con los cambios en el perfil glucémico tras una PTOG. Además, todas las intervenciones redujeron la expresión hepática de glucoquinasa o hexoquinasa 4 (*Gck*), la cual, aparte de controlar la disponibilidad de glucosa hepática, se asocia con un aumento de la lipogénesis en este órgano (379). En el hígado la glucoquinasa es una enzima que fosforila la glucosa y otros azúcares simples como la fructosa; esta enzima sólo actúa cuando los niveles de glucosa plasmática son muy elevados, por lo tanto, la actividad en las células está regulada tanto a nivel transcripcional como postranscripcional (380). Esto concuerda con la menor expresión de *Gck* encontrada en todos los grupos intervenidos en relación con el grupo HF, donde se produjo una hiperglucemia que pudo observarse en la PTOG.

El aumento de la expresión de los genes *Hk2* y *Irs1* tras las intervenciones realizadas, a excepción del grupo de animales a los que se administró la semaglutida, explicarían la una caída en los niveles plasmáticos de glucosa y la evolución más favorable de la PTOG. Por otra parte, el aumento de la expresión del gen de *Pck1* podría deberse al estado de ayuno prolongado a los que los animales estuvieron sometidos al *pair-fed*, y, por tanto, se produjo una estimulación de la gluconeógenesis para prevenir la hipoglucemia. Sin embargo, la intervención con semaglutida presentó un perfil singular

de expresión génica, con una mayor expresión del gen del sustrato del receptor de insulina 2 (*Irs2*), que explicaría en parte el efecto hipoglucemiante del fármaco y un aumento del gen del receptor del glucagón (*Gcgr*), cuya expresión contribuiría a equilibrar los niveles plasmáticos de glucosa tras la hipoglucemia asociada al *pair-fed*.

Con respecto a los otros tejidos analizados en el panel de *OpenArray* relacionados con el metabolismo glucídico, se encontró que todas las intervenciones aumentaron la expresión del glucagón (*Gcg*) en colon, cuya traducción da lugar a GLP-1 (381). Este aumento en GLP-1 conllevaría a un incremento en la secreción de insulina en el páncreas, y por consiguiente, favoreciendo la captación de glucosa por los tejidos y elevando la sensibilidad a la glucosa (148). Por todo ello, las intervenciones aplicadas en este trabajo podrían ser consideradas como alternativas para el control de la glucemia y especialmente la suplementación con nutracéutico en la dieta.

Metabolismo lipídico

La funcionalidad del hígado depende de un adecuado equilibrio entre los procesos lipogénicos y lipolíticos, que se ve alterado por el desarrollo de la obesidad y el hígado graso asociado. En este contexto, la intervención tiene varios enfoques, ya sea mediante la reducción de los mecanismos lipogénicos o la estimulación de los mecanismos lipolíticos y de los procesos de β -oxidación de los ácidos grasos. Bajo nuestras condiciones experimentales, en el hígado la restricción calórica por si sola o asociada al ejercicio físico consiguieron una reducción de la expresión de genes asociados a procesos lipogénicos y este efecto positivo se potenció, aún más, al incorporar el nutracéutico a la dieta. Diversos autores han descrito para algunos de los componentes incluidos en nuestra formulación nutracéutica propiedades antilipogénicas (129,360,382,383), que manifiestan su eficacia en condiciones en las que el animal está sujeto a un balance negativo de energía, con una disminución de la ingesta calórica y un aumento del gasto energético. Los efectos positivos de las intervenciones anteriormente descritas se observaron en la expresión génica del colon y el tejido adiposo, con la ventaja añadida de que el nutracéutico, *per se*, produjo esa marcada disminución de la lipogénesis. Por otro lado, la administración de semaglutida condujo a una sobreexpresión de este panel de genes lipogénicos, que se podría explicar como un efecto secundario de la fuerte reducción de la ingesta asociada a la semaglutida (384) y que fisiológicamente se intenta compensar con un aumento de la expresión de los genes

de las enzimas encargadas de potenciar la acumulación de grasa para hacer frente el desabastecimiento de energía (385).

Asociado a esta reducción de los procesos lipogénicos se produjo un incremento de los mecanismos lipolíticos en el hígado, cuando se realizó la intervención de restricción calórica y cuando esta se asoció a ejercicio físico o/a suplementación con nutracéutico, y, también, se observó en la asociación de las tres intervenciones. El efecto es muy destacable en los genes como *Cpt1a* y *Ppara* (300,386) entre otros, cuyos productos de transcripción contribuyen a la eliminación de ácidos grasos hepáticos. La combinación de los resultados de disminución de lipogénesis y aumento de lipólisis debe conducir a una mejora de la funcionalidad hepática, por lo que se podría sugerir el uso del nutracéutico como suplemento para la pérdida de grasa hepática, si se combina con un protocolo de ejercicio bien estructurado.

Finalmente, la administración de semaglutida produjo una disminución de la expresión hepática de los genes incluidos en el panel lipolítico de *OpenArray* analizado. Este efecto contribuye, junto al aumento de la lipogénesis, a paliar el efecto “ahorrador de energía”, para compensar la anorexia que produce este fármaco, anteriormente comentada. Así mismo, el aumento de la expresión de estos genes en el tejido adiposo sugiere una movilización de la grasa de reserva hacia el hígado, para ser utilizada en los procesos lipogénicos en el hígado, que como vimos se encontraba aumentada.

Todos estos cambios con las intervenciones en el equilibrio lipogénesis-lipólisis no produjeron cambios destacables en el colesterol plasmático, salvo en la semaglutida cuyo tratamiento resultó en un aumento del colesterol circulante. Este aumento podría ser transitorio y asociado al periodo de mayor pérdida de peso de estos animales, en el que se produce una movilización del colesterol almacenado en el tejido adiposo, ya que como han indicado Phinney et al. (387), los niveles de colesterol plasmático disminuyen cuándo la pérdida de peso se estabiliza. Por otra parte, la intervención del nutracéutico por sí mismo o asociado al protocolo de HIIT se relacionó con una regulación a la baja de la de 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa (*Hmgcr*), una de las enzimas limitante de la biosíntesis del colesterol (388). Así mismo, la expresión de *Cyp11a1*, la cual se ha asociado con un descenso en los niveles de colesterol plasmático (389), estaba expresada al alza en dichos grupos en hígado y colon. Si bien, el efecto hipocolesterolémico no se observó en el plasma tras aplicar estas intervenciones.

Marcadores de inflamación

El proceso obesogénico lleva consigo la inflamación de distintos tejidos y su consiguiente alteración de la función fisiológica. En nuestro estudio, hemos observado un claro efecto proinflamatorio de la dieta hipercalórica mediante el análisis de la expresión hepática relativa de genes asociados. De todas las intervenciones ensayadas, la más eficaz en reducir la expresión de estos genes fue la administración del nutraceutico solo o asociado a un protocolo de HIIT y a una restricción de dieta. Concretamente este efecto del nutraceutico se puede relacionar con la disminución de la expresión de los genes inflamatorios *Il1a*, *Il18*, *Casp1* y *Tlr4* entre otros (390–393), debido posiblemente a la presencia de péptidos bioactivos y compuestos fenólicos en su formulación, algunos de ellos descritos por otros autores (383,394,395).

El tratamiento con semaglutida, también, presentó un efecto antiinflamatorio en el hígado. Se ha sugerido que la activación de los receptores de GLP-1 podría mitigar la inflamación hepática al reducir la infiltración de macrófagos que expresan dichos receptores (396). Además, se ha postulado que los mecanismos que protegen la barrera intestinal podrían contribuir a los efectos hepatoprotectores de los agonistas de los receptores de GLP-1 (397).

La inflamación del colon y del tejido adiposo producida por la dieta obesogénica, se redujo con todas las intervenciones. Destacamos el efecto del nutraceutico mejorando la funcionalidad del colon, cuyo efecto antiinflamatorio puede relacionarse con algunos de sus componentes bioactivos no absorbibles en el tracto digestivo y que ejercen un efecto local, como comprobamos tras las diferentes pruebas de digestibilidad *in vitro*. Contrariamente, la administración de semaglutida produjo un aumento de la expresión de los genes proinflamatorios *Casp1*, *Sell*, *Cxcr3* en colon.

mi-ARNs

Se ha sugerido que los mi-ARNs desempeñan un papel importante en la modulación de la progresión de NAFLD (219). Unos de los principales mi-ARNs implicados en esta patología y estudiados como dianas terapéuticas novedosas son el mir-21, miR-34a, el miR-122 y miR-192 (221,398). El miR-122 y miR-192 se expresan con mayor abundancia en el hígado, donde regulan varios procesos fisiológicos, como el metabolismo de los TG y el colesterol (146,398). Bajo nuestras condiciones

experimentales, el consumo de una dieta alta en grasa y fructosa durante 16 semanas aumentó la expresión hepática de miR-122. Sin embargo, Pirola et al. (399) reportaron niveles de expresión de miR-122 disminuidos en hígados de pacientes con NASH, mientras que la expresión de este mi-ARN se encontraba aumentada en suero; describiendo así una relación inversa entre la expresión de este mi-ARN en tejido y sus niveles circulantes en sangre. Sugirieron que la menor expresión de miR-122 en hígado es consecuencia de una alta tasa de liberación a la circulación. Por lo que, en nuestro estudio hubiera sido necesario evaluar la expresión de miR-122 en sangre para comprobar si esta estaba aumentada. No obstante, otros estudios han hallado niveles de expresión elevados de miR-122 en hígado (400,401). Auguet et al. (400) comprobaron como los niveles de expresión de miR-122 variaban en función del grado de obesidad del paciente. Con una obesidad moderada el nivel de expresión en hígado aumentaba, mientras que el agravamiento de esta patología hasta una obesidad mórbida disminuía los niveles de expresión hepáticos. En base a estos hallazgos, podría considerarse que, en el presente trabajo, los niveles de expresión hepáticos de miR-122 se encontraban aumentados porque, si bien el grado de obesidad estaba establecido en los animales, la esteatosis hepática no fue muy severa. Esto se pudo comprobar con la histología del hígado, en la que la puntuación NAS obtenida no se relacionó con NASH. Aun así, la implementación de las distintas intervenciones logró normalizar los valores de expresión de miR-122.

Por otro lado, miR-21 está implicado en la regulación de la adipogénesis y la diferenciación, número y tamaño de los adipocitos (402). Además, miR-21 promueve la acumulación de lípidos al interactuar con diversos factores, como la proteína de unión a elementos reguladores de esteroides (SREBP1) y la 3-hidroxi-3-metilglutaril-co-enzima A reductasa (HMGCR) (403,404). El miR-21 también contribuye a la lesión celular, la inflamación y la fibrosis, a través de su inhibición de la vía de señalización del receptor alfa activado por el proliferador de peroxisomas (PPARA) (221,403,404). En base a estos resultados, se sugiere que miR-21 puede estar implicado en (1) etapas tempranas de acumulación de lípidos y aparición de esteatosis en los hepatocitos y/o (2) en la inflamación y fibrosis en etapas posteriores de la enfermedad (221,403). Como cabría esperar, la expresión de miR-21 incrementó tanto en hígado como en tejido adiposo, paralelamente al desarrollo de la obesidad y de la esteatosis hepática. La ingesta del

nutracéutico formulado, rico en compuestos bioactivos, disminuyó la acumulación de grasa en el hígado asociada a una menor expresión de miR-21.

Los niveles de expresión de miR-34a en hígado y tejido adiposo aumentaron tras el desarrollo de la obesidad, tal y como han descrito otros autores. (219,221). Algunos estudios han encontrado una asociación favorable entre miR-34a con GLP1 o GLP-1RAs (146), así como, con el ejercicio físico (405). Sin embargo, en nuestro estudio no existió una modulación positiva por parte del protocolo de HIIT y las intervenciones nutricionales y farmacológicas presentaron una tendencia a disminuir los valores de expresión de este mi-ARN en hígado. Aunque no se ha encontrado información sobre la modulación de miR-34a por la acción de extractos vegetales, en la bibliografía consultada se han descrito efectos positivos de compuestos fenólicos presentes en extractos vegetales sobre la modulación de diferentes mi-ARNs (401). En el tejido adiposo, la mayoría de las intervenciones redujeron la expresión de este mi-34a. Las discrepancias entre ambos tejidos puede ser debida a que miR-34a es un mi-ARN de amplia expresión y no específico del hígado, expresándose más abundantemente en adipocitos que en los hepatocitos (398), al igual que observamos en este trabajo.

Finalmente, el aumento en la expresión de miR-192 provocado por el desarrollo de la obesidad, tanto en hígado como en tejido adiposo, fue revertido por acción de la semaglutida en hígado, mientras que el programa de ejercicio físico fue la intervención que revirtió la expresión en el tejido adiposo. Existe evidencia de que el ejercicio físico modula positivamente el desarrollo del NAFLD al regular la expresión de mi-ARNs (405). Se ha descrito un aumento de los niveles circulantes de mi-ARNs, tras episodios de una sesión aguda de ejercicio físico en humanos (406). Sin embargo, el tiempo para restaurar los niveles a valores basales era variable en función del mi-ARN analizado (406).

Estrés oxidativo

Al igual que lo observado en la Fase 1, se comprobó que la dieta HFHF tuvo una acción prooxidante, con alta capacidad de generar ROS, debido a la acumulación de compuestos de naturaleza lipídica, como triglicéridos, diacilglicerolos o ceramidas (407). Para contrarrestar esta agresión se elevó la actividad de enzimas antioxidantes y detoxificantes. Sin embargo, observamos una disminución en la expresión génica de enzimas antioxidantes hepáticas. Esto pone de manifiesto la existencia de una

regulación hepática a distintos niveles moleculares (a nivel transcripcional, post-transcripcional y post-transduccional) debido a la alta actividad enzimática antioxidante, los sistemas de defensa no requieren de un aumento en su expresión génica (408).

El nutraceutico asociado a restricción calórica fue la intervención con mejor efecto sobre la reducción de la actividad de las enzimas antioxidantes (Cu/Zn-SOD, Mn-SOD y GPx) y de la expresión del panel de genes (*OpenArray*) de estrés oxidativo. La marcada acción antioxidante la podemos atribuir a los extractos funcionales derivados de las diferentes especies vegetales incluidas en él (409–411), y en mayor medida a los compuestos fenólicos y otras moléculas bioactivas presentes (412). Estos compuestos bioactivos caracterizados, muchos de ellos por su capacidad antioxidante, tienen la propiedad de captar radicales libres y, por tanto, de disminuir el estrés oxidativo. Esto propiciaría una menor actividad de las enzimas antioxidantes como la SOD, reduciéndose la producción de H₂O₂ y, por consiguiente, la actividad de las enzimas encargadas de degradar este producto (CAT y GPx) disminuyen su actividad (85). Diferentes autores, como Martínez et al. (409), han demostrado que la ingesta de la pulpa de Argán disminuye tanto la actividad enzimática como la expresión génica de la Mn-SOD, así como la actividad enzimática de la GPx. Otros autores han descrito una modulación positiva por parte de extractos de hoja de *Origanum vulgare* (413), de semillas de *Coriandrum Sativum* (414) y de hojas de *Cynara scolymus* (395), reestableciendo a valores de actividad enzimática normales tras su administración en ratas a las que se les había inducido un daño hepático. Además de esta ventaja sobre la actividad de enzimas antioxidantes, la incorporación del nutraceutico en la dieta disminuyó la actividad enzimática detoxificante de la enzima GST, la cual está implicada en procesos de detoxificación de numerosos compuestos (415). Esto manifiesta la baja toxicidad del nutraceutico, lo que concuerda con los resultados de toxicidad de las pruebas *in vitro*. Por otra parte, la influencia del nutraceutico sobre el estrés oxidativo también se vio reflejado en el tejido adiposo, donde se produjo una caída de la expresión génica de las enzimas antioxidantes estudiadas.

En contraposición con el efecto positivo ejercido por el nutraceutico, la administración de semaglutida mostró un efecto prooxidante, al elevar la actividad antioxidante y detoxificante de las enzimas hepáticas, incluso por encima de los niveles alcanzados en el grupo obeso. Esto indica que este fármaco podría ser perjudicial en la

funcionalidad hepática, lo que no coincide con lo descrito por otros autores (279,416). Sin embargo, cuando se asocia su administración a un protocolo de HIIT el efecto negativo sobre la actividad enzimática desaparece, gracias a la capacidad del ejercicio físico de regular los sistemas antioxidantes (140,142).

La semaglutida produjo, también, un efecto prooxidante al aumentar la expresión del panel de genes de estrés oxidativo en colon y tejido adiposo, y la asociación de este fármaco con ejercicio físico consiguió contrarrestar este efecto en el colon mediante una disminución de la expresión génica. Existen otros estudios en los que se analizaron el efecto de otros agonistas de GLP1-R en dichos tejidos, que respaldan los resultados anteriores. Por ejemplo, Lyu et al. (417) observaron un aumento en la actividad de enzimas antioxidantes en tejido adiposo subcutáneo en comparación con un grupo que consumió una dieta alta en grasa. Además, se ha comprobado que la semaglutida puede provocar disfunciones gastrointestinales en humanos mostrando una potencial toxicidad (418). Esta tesis doctoral es una de las primeras investigaciones en estudiar el efecto de la semaglutida sobre ambos tejidos. Se requieren de más estudios para profundizar en los mecanismos capaces de minimizar los efectos prooxidantes en el hígado, colon y tejido adiposo.

Finalmente, el estrés oxidativo inducido por el consumo de la dieta hipercalórica produjo alteraciones sobre la expresión de genes asociados a daño celular, estructura celular anatómica, proliferación celular y transporte de soluto, especialmente en el hígado y tejido adiposo. El aumento de la expresión de *Cdkn1a*, *Gadd45a*, asociado a daño celular en el ADN, fue revertido por las distintas intervenciones. Destacamos también el efecto positivo de las intervenciones sobre el gen *Gdf15*, relacionado con el programa de respuesta al estrés tras una lesión celular.

Microbiota intestinal

La microbiota intestinal es un importante factor ambiental que contribuye a la obesidad. Se ha demostrado que las dietas ricas en grasas o azúcares provocan una alteración de la composición de la microbiota intestinal, así como una reducción de la diversidad microbiana (45,46). Sin embargo, bajo nuestras condiciones experimentales el consumo de una dieta alta en grasa y fructosa aumentó la diversidad microbiana en comparación con el consumo de una dieta estándar. Este efecto ha sido descrito por

otros autores como Wang et al. (46), que asociaron el incremento de la biodiversidad microbiana a un mayor contenido en fibra presente en la dieta alta en grasa. La administración de semaglutida aumentó la diversidad microbiana, aunque al tratarse de un fármaco de reciente comercialización no se ha encontrado bibliografía que puedan corroborar nuestros hallazgos.

Por otro lado, a nivel de filo, el análisis de la microbiota intestinal de roedores DIO se caracteriza por una reducción del filo Bacteroidota y un aumento del filo Firmicutes (419). Este hecho se atribuye a que los Firmicutes pueden producir más energía que los Bacteroidota, debido a que son capaces de producir ácidos grasos de cadena corta a partir de la fermentación de glúcidos dietéticos, los cuales pueden ser utilizados para la lipogénesis hepática. Por tanto, una abundancia relativamente alta de Firmicutes conduce a una mayor absorción de calorías y promueve la obesidad (51,52). Las diferentes intervenciones, especialmente la inclusión del nutraceutico en la dieta, aumentaron de forma general el número de Bacteroidota, lo que se trasladó en una proporción menor de Firmicutes/Bacteroidota. Este efecto se asoció al contenido en compuestos bioactivos y compuestos fenólicos presentes en el nutraceutico, ya que se ha descrito que la ingesta de diferentes compuestos fenólicos modulan la composición de la microbiota intestinal reduciendo la proporción Firmicutes/Bacteroidota (420), como es el caso, se ha descrito que algunas especies incluidas en la formulación nutraceutica, como son *Lens culinaris* (421), *Vigna angularis* (422) y *Coriandrum sativum* (423).

Con respecto al ejercicio físico, se ha descrito que posee efectos beneficiosos sobre la microbiota intestinal al remodelarla positivamente, aumentando la diversidad microbiana y disminuyendo la proporción de Firmicutes/Bacteroidota (424–426); aunque los cambios en la estructura de la microbiota intestinal varían en función de la intensidad, el tiempo y el tipo de ejercicio (424). Sin embargo, al igual que lo observado por Yang et al. (424), bajo nuestras condiciones experimentales, estos parámetros no se vieron influenciados por el ejercicio físico.

A nivel de familia y tras el análisis del *Heatmap* realizado la mayor abundancia relativa detectada en los animales que consumieron una dieta alta en grasa y fructosa (grupo HF), probablemente se debió al mayor porcentaje de fibra incluido en la dieta, como ya se ha mencionado anteriormente. Esta abundancia relativa se revirtió en los

grupos a los que se les administró semaglutida, que redujo la ingesta total de alimento y, por consiguiente, de la fibra total (46).

A nivel de género, podemos decir que el consumo de una dieta alta en grasa y fructosa aumentó las proporciones de *Clostridium sensu stricto* 1, al igual que sucedió en la Fase 1, el cual está asociado con el consumo de una dieta alta en grasa y se relaciona con inflamación intestinal (55,322–324). Además, este tipo de dieta redujo la proporción de *Muribaculaceae* genus y *Ligilactobacillus*, y la única intervención capaz de aumentar la proporción estos últimos fue la inclusión del nutraceutico en la dieta. *Muribaculaceae* genus han sido identificadas como bacterias capaces de degradar carbohidratos y el descenso en su abundancia se ha asociado con el consumo de dietas hipercalóricas (46). Por otro lado, Liang et al. (427) describieron que *Ligilactobacillus salivarius* LCK11 prevenía la obesidad al estimular la secreción del péptido YY por su efecto anorexigénico. Con respecto al género *Lactobacillus*, aunque el desarrollo de la obesidad no tuvo ningún efecto sobre la abundancia de este género, todas las intervenciones aplicadas disminuyeron este parámetro, a excepción de la administración de semaglutida, que incrementó hasta 3 veces el valor de este parámetro. Aunque los *Lactobacillus* se emplean ampliamente como probióticos (428) y, además, se ha descrito su efecto hipolipemiente (429), también se han encontrados elevados en la microbiota intestinal de pacientes obesos (428). El género de *Lactobacillus* muestra una gran diversidad en su resistencia al estrés oxidativo entre especies (430) y cepas (431), basándose en su potencial actividad catalasa. Bajo nuestras condiciones experimentales, la administración de semaglutida se correlacionó con un alto grado de estrés oxidativo en el colon, determinado por una mayor expresión génica de las enzimas antioxidantes en este órgano, lo que se correlaciona con mayores niveles de estrés. Lee et al. (428) plantearon que la colonización por diferentes cepas de *Lactobacillus* del colon podría estar determinada por estos altos niveles de estrés oxidativo, que no permiten la supervivencia de otras cepas no resistentes a este tipo de estrés.

6 Conclusiones

1. Los excedentes de semillas y vegetales son una buena fuente de compuestos bioactivos con capacidad antioxidante, que pueden ser utilizadas en el tratamiento de alteraciones como la obesidad y la resistencia a la insulina. Su aprovechamiento

con estos fines contribuye, también, a la economía circular y promueve estrategias de sostenibilidad ambiental.

2. La valoración química y en cultivo celular del nutraceutico desarrollado mostró un amplio perfil de compuestos bioactivos que le confirieron un potente efecto antioxidante y antiesteatótico lo cual, junto a su nula toxicidad y su potencial bioaccesibilidad, podría utilizarse como tratamiento en la obesidad y sus alteraciones asociadas.
3. Para el desarrollo de un modelo de obesidad inducido por la dieta es crucial definir con precisión el tipo de dieta y la duración del periodo experimental. Una dieta alta en grasa (45 % de Kcal totales) y fructosa (20 % en agua de bebida) es idónea para el desarrollo de la obesidad, esteatosis hepática y resistencia a la insulina, y producir un marcado desequilibrio en el metabolismo lipídico y en el sistema de defensa antioxidante hepático, así como, una disbiosis intestinal. Un periodo experimental a medio o largo plazo determina diferencialmente los mecanismos de acúmulo de grasa hepática mediante la lipogénesis *de novo* o la alteración del catabolismo de ácidos grasos por β -oxidación, respectivamente.
4. El nutraceutico desarrollado a partir de extractos vegetales podría utilizarse como una estrategia en el tratamiento de las alteraciones asociadas a la obesidad, por su efecto *in vivo* antioxidante y antiinflamatorio, así como, su capacidad para reducir la resistencia a la insulina (con mayor eficacia aún que el fármaco semaglutida) y aminorar el desequilibrio en el metabolismo lipídico. A estos beneficios se añade su acción sobre la disbiosis intestinal por su marcado efecto prebiótico al disminuir la proporción Firmicutes/Bacteroidota.
5. La semaglutida es un potente fármaco que se utiliza para el tratamiento de la diabetes tipo 2 y la obesidad con acción hipoglucemiante y anorexigénica. Este fármaco promueve la reducción de la esteatosis hepática, pero muestra efectos secundarios como hipercolesterolemia, así como, prooxidante en hígado, y proinflamatorio en tejido adiposo y, especialmente, en el colon, donde contribuye a la disbiosis intestinal.
6. El protocolo de entrenamiento interválico de alta intensidad es una estrategia válida para programas de pérdida de peso, especialmente en la pérdida de masa grasa corporal, y grasa hepática a través de la activación de rutas lipolíticas. Dicho protocolo de entrenamiento combinado con la administración de nutraceutico y

semaglutida resulta beneficioso para la funcionalidad cardiopulmonar al mejorar la capacidad aeróbica. Finalmente, el protocolo de entrenamiento contrarresta los efectos negativos en hígado sobre el estrés oxidativo derivado de la administración de semaglutida.

Conclusión general: todas las intervenciones ensayadas han sido beneficiosas para el tratamiento de la obesidad inducida por la dieta a través de la pérdida de peso corporal o mayoritariamente a través de los efectos encontrados a nivel metabólico. A la dosis ensayada, el nutraceutico puede ser una importante herramienta terapéutica que produce efectos beneficiosos a distintos niveles en el organismo y contribuye a recuperar la salud. Este efecto puede ser potenciado por la práctica de ejercicio físico.

6 Conclusions

1. Surplus seeds and vegetables are a good source of bioactive compounds with antioxidant capacity, which can be used in the treatment of disorders such as obesity and insulin resistance. Their use for these purposes also contributes to the circular economy and promotes environmental sustainability strategies.
2. Chemical and cell culture assessment of the developed nutraceutical showed a broad profile of bioactive compounds that resulted in a strong antioxidant and anti-steatotic effect. These properties, together with its lack of toxicity and its potentially high bioaccessibility, make it an ideal candidate to be used in the treatment of obesity and its associated disorders.
3. For the development of a diet-induced obesity (DIO) model, it is crucial to precisely define the type of diet and the length of experimental period. A high fat (45% of total Kcal) and high fructose (20% in drinking water) dietary treatment is suitable for the development of obesity, hepatic steatosis and insulin resistance. In addition, it induces a marked imbalance in lipid metabolism and in the hepatic antioxidant defence system, as well as intestinal dysbiosis. A medium- or long-term experimental period differentially affects the mechanisms of hepatic fat accumulation through *de novo* lipogenesis or altered fatty acid catabolism by β -oxidation, respectively.
4. The nutraceutical developed from plant extracts can be used as a strategy in the treatment of disorders associated with obesity, due to its *in vivo* antioxidant and anti-inflammatory effect, as well as its ability to reduce insulin resistance (even

more effectively than the drug semaglutide) and revert the alterations in lipid metabolism. In addition to these benefits, it acts on intestinal dysbiosis through its marked prebiotic effect by reducing the Firmicutes/Bacteroidota ratio.

5. Semaglutide is an effective novel drug used for the treatment of type 2 diabetes and obesity, with hypoglycemic and anorexigenic action. It promotes the reduction of hepatic steatosis, but shows deleterious side effects such as high plasma cholesterol levels, as well as pro-oxidant action in the liver, and pro-inflammatory activity in adipose tissue and, especially, in the colon, where it contributes to intestinal dysbiosis.
6. The high intensity intervallic training protocol is a valid strategy for weight loss programs due to its marked effects in the loss of body and liver fat content through the activation of lipolytic pathways. Such training protocol combined with nutraceutical and semaglutide administration is beneficial for cardiopulmonary function by improving aerobic capacity, and counteracts the negative effects on liver oxidative stress resulting from semaglutide administration.

Overall conclusion: all the interventions tested have been beneficial for the treatment of diet-induced obesity. Either through body weight loss or, mainly, through effects at the metabolic level. At the dose tested, the nutraceutical developed can be an important therapeutic tool that produces beneficial effects at different levels, and contributes to restoring the compromised health status. These beneficial actions can be enhanced by physical exercise.

7 Limitaciones

Una de las principales limitaciones que hemos encontrado en este estudio ha sido el tipo de dieta estándar utilizado. Aunque la dieta SD es un control muy preciso de la dieta alta en grasa y es la recomendada, ya que muestra una composición química similar a la de esta última y sólo difiere en la cantidad de grasa total y fructosa, provoca algunas alteraciones en la histología hepática en comparación con el pienso estándar para ratas, que contiene una mayor cantidad de proteínas de origen vegetal y un menor contenido de mono- y disacáridos. Esto ha podido enmascarar el efecto de las intervenciones aplicadas, especialmente las atribuidas al nutracéutico, y principalmente en el caso de los análisis histológicos. Además, los datos de expresión génica y actividad

antioxidante deberían complementarse con análisis de expresión proteica para obtener una visión más amplia de la influencia de la obesidad sobre el estado antioxidante. Así mismo, la expresión de múltiples genes fue difícil de detectar e incluir en el *Heatmap*, puesto que el tejido adiposo es un órgano de complicada extracción de ARN y de expresión génica. Por otra parte, sería necesario un análisis más exhaustivo de los compuestos bioactivos presentes en el nutracéutico, para poder concretar que moléculas son las responsables de los efectos beneficiosos sobre la salud o si se trata de una sinergia de estas. Por último, dado que los resultados del presente estudio se han obtenido en un modelo experimental con ratas, es necesario confirmarlos en un estudio clínico con seres humanos.

8 Referencias bibliográficas

1. World Health Organization. Obesity and overweight [Internet]. 2024 [citado 16 de abril de 2024]. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
2. Engin A. The Definition and Prevalence of Obesity and Metabolic Syndrome. En: Engin AB, Engin A, editores. Obesity and Lipotoxicity [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2017 [citado 16 de abril de 2024]. p. 1-17. (Advances in Experimental Medicine and Biology; vol. 960). Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-48382-5_1
3. Purnell JQ. Definitions, Classification, and Epidemiology of Obesity. En: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, Boyce A, Chrousos G, Corpas E, et al., editores. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000 [citado 18 de abril de 2024]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279167/>
4. Manuel Moreno G. Definición y clasificación de la obesidad. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 2012;23(2):124-8.
5. Mayoral LC, Andrade G, Mayoral EC, Huerta T, Canseco S, Rodal Canales F, et al. Obesity subtypes, related biomarkers & heterogeneity. *Indian J Med Res*. 2020;151(1):11.
6. Sørensen TIA, Martínez AR, Jørgensen TSH. Epidemiology of Obesity. En: Eckel J, Clément K, editores. From Obesity to Diabetes [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2022 [citado 17 de abril de 2024]. p. 3-27. (Handbook of Experimental Pharmacology; vol. 274). Disponible en: https://link.springer.com/10.1007/164_2022_581
7. Preda A, Carbone F, Tirandi A, Montecucco F, Liberale L. Obesity phenotypes and cardiovascular risk: From pathophysiology to clinical management. *Rev Endocr Metab Disord*. 2023;24(5):901-19.
8. Abarca-Gómez L, Abdeen ZA, Hamid ZA, Abu-Rmeileh NM, Acosta-Cazares B, Acuin C, et al. Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128·9 million children, adolescents, and adults. *The Lancet*. 2017;390(10113):2627-42.
9. European Commission. Overweight and obesity - BMI statistics [Internet]. 2024 [citado 16 de abril de 2024]. Disponible en: https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Overweight_and_obesity_-_BMI_statistics
10. World Obesity Federation. World Obesity Atlas 2024. London: World Obesity Federation; 2024.
11. Fruh SM. Obesity: Risk factors, complications, and strategies for sustainable long-term weight management. *Journal of the American Association of Nurse Practitioners*. 2017;29(S1):S3-14.

12. World Health Organization. Obesity [Internet]. 2024 [citado 16 de abril de 2024]. Disponible en: <https://www.who.int/data/gho/indicator-metadata-registry/indicator-metadata-registry/3420>
13. Flegal KM, Kit BK, Orpana H, Graubard BI. Association of All-Cause Mortality With Overweight and Obesity Using Standard Body Mass Index Categories: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA*. 2013;309(1):71.
14. Wells JCK, Siervo M. Obesity and energy balance: is the tail wagging the dog? *Eur J Clin Nutr*. 2011;65(11):1173-89.
15. Klein S, Gastaldelli A, Yki-Järvinen H, Scherer PE. Why does obesity cause diabetes? *Cell Metabolism*. 2022;34(1):11-20.
16. Ahmed B, Sultana R, Greene MW. Adipose tissue and insulin resistance in obese. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021;137:111315.
17. Butland B, Jebb S, Kopelman P, McPherson K, Thomas S, Mardell J, et al. Foresight, Tackling Obesities: Future Choices—Project Report [Internet]. United Kingdom: Government Office for Science; 2007. Report No.: DIUS/PUB 8654/2K/12/07/AR. Disponible en: <https://assets.publishing.service.gov.uk/media/5a759da7e5274a4368298a4f/07-1184x-tackling-obesities-future-choices-report.pdf>
18. Masood B, Moorthy M. Causes of obesity: a review. *Clinical Medicine*. 2023;23(4):284-91.
19. Faccioli N, Poitou C, Clément K, Dubern B. Current Treatments for Patients with Genetic Obesity. *Jcrpe*. 2023;15(2):108-19.
20. Obradovic M, Sudar-Milovanovic E, Soskic S, Essack M, Arya S, Stewart AJ, et al. Leptin and Obesity: Role and Clinical Implication. *Front Endocrinol*. 2021;12:585887.
21. Abuzzahab MJ, Roth CL, Shoemaker AH. Hypothalamic Obesity: Prologue and Promise. *Horm Res Paediatr*. 2019;91(2):128-36.
22. Rohde K, Keller M, La Cour Poulsen L, Blüher M, Kovacs P, Böttcher Y. Genetics and epigenetics in obesity. *Metabolism*. 2019;92:37-50.
23. Houde AA, Légaré C, Biron S, Lescelleur O, Biertho L, Marceau S, et al. Leptin and adiponectin DNA methylation levels in adipose tissues and blood cells are associated with BMI, waist girth and LDL-cholesterol levels in severely obese men and women. *BMC Med Genet*. 2015;16(1):29.
24. Milagro FI, Gómez-Abellán P, Campión J, Martínez JA, Ordovás JM, Garaulet M. CLOCK, PER2 and BMAL1 DNA Methylation: Association with Obesity and Metabolic Syndrome Characteristics and Monounsaturated Fat Intake. *Chronobiology International*. 2012;29(9):1180-94.
25. Hermsdorff HH, Mansego ML, Campión J, Milagro FI, Zulet MA, Martínez JA. TNF- α promoter methylation in peripheral white blood cells: Relationship with

- circulating TNF α , truncal fat and n-6 PUFA intake in young women. *Cytokine*. 2013;64(1):265-71.
26. Lima RPA, Do Nascimento RAF, Luna RCP, Persuhn DC, Da Silva AS, Da Conceição Rodrigues Gonçalves M, et al. Effect of a diet containing folate and hazelnut oil capsule on the methylation level of the ADRB3 gene, lipid profile and oxidative stress in overweight or obese women. *Clin Epigenet*. 2017;9(1):110.
 27. Pfeiffer L, Wahl S, Pilling LC, Reischl E, Sandling JK, Kunze S, et al. DNA Methylation of Lipid-Related Genes Affects Blood Lipid Levels. *Circ Cardiovasc Genet*. 2015;8(2):334-42.
 28. De Toro-Martín J, Guénard F, Tchernof A, Deshaies Y, Pérusse L, Hould FS, et al. Methylation quantitative trait loci within the TOMM20 gene are associated with metabolic syndrome-related lipid alterations in severely obese subjects. *Diabetol Metab Syndr*. 2016;8(1):55.
 29. Guay SP, Légaré C, Houde AA, Mathieu P, Bossé Y, Bouchard L. Acetylsalicylic acid, aging and coronary artery disease are associated with ABCA1 DNA methylation in men. *Clin Epigenet*. 2014;6(1):14.
 30. Truong V, Huang S, Dennis J, Lemire M, Zwingerman N, Aïssi D, et al. Blood triglyceride levels are associated with DNA methylation at the serine metabolism gene PHGDH. *Sci Rep*. 2017;7(1):11207.
 31. Silveira EA, Mendonça CR, Delpino FM, Elias Souza GV, Pereira De Souza Rosa L, De Oliveira C, et al. Sedentary behavior, physical inactivity, abdominal obesity and obesity in adults and older adults: A systematic review and meta-analysis. *Clinical Nutrition ESPEN*. 2022;50:63-73.
 32. Elagizi A, Kachur S, Carbone S, Lavie CJ, Blair SN. A Review of Obesity, Physical Activity, and Cardiovascular Disease. *Curr Obes Rep*. 2020;9(4):571-81.
 33. Ludwig DS, Ebbeling CB. The Carbohydrate-Insulin Model of Obesity: Beyond “Calories In, Calories Out”. *JAMA Intern Med*. 2018;178(8):1098.
 34. Hall KD, Farooqi IS, Friedman JM, Klein S, Loos RJ, Mangelsdorf DJ, et al. The energy balance model of obesity: beyond calories in, calories out. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2022;115(5):1243-54.
 35. Malik VS, Hu FB. The role of sugar-sweetened beverages in the global epidemics of obesity and chronic diseases. *Nat Rev Endocrinol*. 2022;18(4):205-18.
 36. Fryklund C, Borg M, Svensson T, Schumacher S, Negoita F, Morén B, et al. Impaired glucose transport in inguinal adipocytes after short-term high-sucrose feeding in mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2020;78:108338.
 37. Cortés-Rajo C, Vargas-Vargas MA, Olmos-Orizaba BE, Rodríguez-Orozco AR, Calderón-Cortés E. Interplay between NADH oxidation by complex I, glutathione redox state and sirtuin-3, and its role in the development of insulin resistance.

- Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease. 2020;1866(8):165801.
38. Wang L, Wang H, Zhang B, Popkin BM, Du S. Elevated Fat Intake Increases Body Weight and the Risk of Overweight and Obesity among Chinese Adults: 1991–2015 Trends. *Nutrients*. 2020;12(11):3272.
 39. Jura M, Kozak Leslie P. Obesity and related consequences to ageing. *AGE*. 2016;38(1):23.
 40. Chaput JP, McHill AW, Cox RC, Broussard JL, Dutil C, Da Costa BGG, et al. The role of insufficient sleep and circadian misalignment in obesity. *Nat Rev Endocrinol*. 2023;19(2):82–97.
 41. Chaput JP, Dutil C, Featherstone R, Ross R, Giangregorio L, Saunders TJ, et al. Sleep duration and health in adults: an overview of systematic reviews. *Appl Physiol Nutr Metab*. octubre de 2020;45(10 (Suppl. 2)):S218–31.
 42. Anekwe CV, Jarrell AR, Townsend MJ, Gaudier GI, Hiserodt JM, Stanford FC. Socioeconomics of Obesity. *Curr Obes Rep*. 2020;9(3):272–9.
 43. Pampel FC, Denney JT, Krueger PM. Obesity, SES, and economic development: A test of the reversal hypothesis. *Social Science & Medicine*. 2012;74(7):1073–81.
 44. Sankararaman S, Noriega K, Velayuthan S, Sferra T, Martindale R. Gut Microbiome and Its Impact on Obesity and Obesity-Related Disorders. *Curr Gastroenterol Rep*. 2023;25(2):31–44.
 45. Xiao L, Sonne SB, Feng Q, Chen N, Xia Z, Li X, et al. High-fat feeding rather than obesity drives taxonomical and functional changes in the gut microbiota in mice. *Microbiome*. 2017;5(1):43.
 46. Wang B, Kong Q, Li X, Zhao J, Zhang H, Chen W, et al. A High-Fat Diet Increases Gut Microbiota Biodiversity and Energy Expenditure Due to Nutrient Difference. *Nutrients*. 2020;12(10):3197.
 47. Lin H, An Y, Tang H, Wang Y. Alterations of Bile Acids and Gut Microbiota in Obesity Induced by High Fat Diet in Rat Model. *J Agric Food Chem*. 2019;67(13):3624–32.
 48. Xu Z, Jiang W, Huang W, Lin Y, Chan FKL, Ng SC. Gut microbiota in patients with obesity and metabolic disorders – a systematic review. *Genes Nutr*. 2022;17(1):2.
 49. Magne F, Gotteland M, Gauthier L, Zazueta A, Pessoa S, Navarrete P, et al. The Firmicutes/Bacteroidetes Ratio: A Relevant Marker of Gut Dysbiosis in Obese Patients? *Nutrients*. 2020;12(5):1474.
 50. Bisanz JE, Upadhyay V, Turnbaugh JA, Ly K, Turnbaugh PJ. Meta-Analysis Reveals Reproducible Gut Microbiome Alterations in Response to a High-Fat Diet. *Cell Host & Microbe*. 2019;26(2):265–272.e4.

51. Geng N, Li Y, Zhang Y, Wang H, Song J, Yu L, et al. Effects of Modified Dietary Fiber from Fresh Corn Bracts on Obesity and Intestinal Microbiota in High-Fat-Diet Mice. *Molecules*. 2023;28(13):4949.
52. Hildebrandt MA, Hoffmann C, Sherrill-Mix SA, Keilbaugh SA, Hamady M, Chen Y, et al. High-Fat Diet Determines the Composition of the Murine Gut Microbiome Independently of Obesity. *Gastroenterology*. 2009;137(5):1716-1724.e2.
53. Murphy EA, Velazquez KT, Herbert KM. Influence of high-fat diet on gut microbiota: a driving force for chronic disease risk. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 2015;18(5):515-20.
54. Tian G, Wang W, Xia E, Chen W, Zhang S. *Dendrobium officinale* alleviates high-fat diet-induced nonalcoholic steatohepatitis by modulating gut microbiota. *Front Cell Infect Microbiol*. 2023;13:1078447.
55. Kaakoush NO, Lecomte V, Maloney CA, Morris MJ. Cross-talk among metabolic parameters, esophageal microbiota, and host gene expression following chronic exposure to an obesogenic diet. *Sci Rep*. 2017;7(1):45753.
56. Tan J, McKenzie C, Potamitis M, Thorburn AN, Mackay CR, Macia L. The Role of Short-Chain Fatty Acids in Health and Disease. En: *Advances in Immunology* [Internet]. Elsevier; 2014 [citado 5 de febrero de 2024]. p. 91-119. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128001004000039>
57. Song Z, Xiaoli A, Yang F. Regulation and Metabolic Significance of De Novo Lipogenesis in Adipose Tissues. *Nutrients*. 2018;10(10):1383.
58. Ambele MA, Dhanraj P, Giles R, Pepper MS. Adipogenesis: A Complex Interplay of Multiple Molecular Determinants and Pathways. *IJMS*. 2020;21(12):4283.
59. Ghaben AL, Scherer PE. Adipogenesis and metabolic health. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019;20(4):242-58.
60. Hammarstedt A, Gogg S, Hedjazifar S, Nerstedt A, Smith U. Impaired Adipogenesis and Dysfunctional Adipose Tissue in Human Hypertrophic Obesity. *Physiological Reviews*. 2018;98(4):1911-41.
61. Tanaka T. Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene. *The EMBO Journal*. 1997;16(24):7432-43.
62. Ameer F, Scandiuzzi L, Hasnain S, Kalbacher H, Zaidi N. De novo lipogenesis in health and disease. *Metabolism*. 2014;63(7):895-902.
63. Grabner GF, Xie H, Schweiger M, Zechner R. Lipolysis: cellular mechanisms for lipid mobilization from fat stores. *Nat Metab*. 2021;3(11):1445-65.
64. Duncan RE, Ahmadian M, Jaworski K, Sarkadi-Nagy E, Sul HS. Regulation of Lipolysis in Adipocytes. *Annu Rev Nutr*. 2007;27(1):79-101.

65. Guerra IMS, Ferreira HB, Melo T, Rocha H, Moreira S, Diogo L, et al. Mitochondrial Fatty Acid β -Oxidation Disorders: From Disease to Lipidomic Studies—A Critical Review. *IJMS*. 2022;23(22):13933.
66. Serra D, Mera P, Malandrino MI, Mir JF, Herrero L. Mitochondrial Fatty Acid Oxidation in Obesity. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2013;19(3):269-84.
67. Fucho R, Casals N, Serra D, Herrero L. Ceramides and mitochondrial fatty acid oxidation in obesity. *FASEB j*. 2017;31(4):1263-72.
68. Singla P, Bardoloi A, Parkash AA. Metabolic effects of obesity: A review. *WJD*. 2010;1(3):76.
69. Jin X, Qiu T, Li L, Yu R, Chen X, Li C, et al. Pathophysiology of obesity and its associated diseases. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2023;13(6):2403-24.
70. Kosmas CE, Bousvarou MD, Kostara CE, Papakonstantinou EJ, Salamou E, Guzman E. Insulin resistance and cardiovascular disease. *J Int Med Res*. 2023;51(3):030006052311645.
71. Yazıcı D, Sezer H. Insulin Resistance, Obesity and Lipotoxicity. En: Engin AB, Engin A, editores. *Obesity and Lipotoxicity* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2017 [citado 23 de abril de 2024]. p. 277-304. (Advances in Experimental Medicine and Biology; vol. 960). Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-48382-5_12
72. Seo JB, Riopel M, Cabrales P, Huh JY, Bandyopadhyay GK, Andreyev AY, et al. Knockdown of ANT2 reduces adipocyte hypoxia and improves insulin resistance in obesity. *Nat Metab*. 2018;1(1):86-97.
73. Sun K, Asterholm IW, Kusminski CM, Bueno AC, Wang ZV, Pollard JW, et al. Dichotomous effects of VEGF-A on adipose tissue dysfunction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109(15):5874-9.
74. Crewe C, An YA, Scherer PE. The ominous triad of adipose tissue dysfunction: inflammation, fibrosis, and impaired angiogenesis. *Journal of Clinical Investigation*. 2017;127(1):74-82.
75. Straub LG, Scherer PE. Metabolic Messengers: adiponectin. *Nat Metab*. 2019;1(3):334-9.
76. Petersen MC, Shulman GI. Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiological Reviews*. 2018;98(4):2133-223.
77. Liu T, Sun YC, Cheng P, Shao HG. Adipose tissue macrophage-derived exosomal miR-29a regulates obesity-associated insulin resistance. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2019;515(2):352-8.
78. Thomou T, Mori MA, Dreyfuss JM, Konishi M, Sakaguchi M, Wolfrum C, et al. Adipose-derived circulating miRNAs regulate gene expression in other tissues. *Nature*. 2017;542(7642):450-5.

79. Ying W, Riopel M, Bandyopadhyay G, Dong Y, Birmingham A, Seo JB, et al. Adipose Tissue Macrophage-Derived Exosomal miRNAs Can Modulate In Vivo and In Vitro Insulin Sensitivity. *Cell*. 2017;171(2):372-384.e12.
80. Rogero M, Calder P. Obesity, Inflammation, Toll-Like Receptor 4 and Fatty Acids. *Nutrients*. 2018;10(4):432.
81. Kawai T, Autieri MV, Scalia R. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2021;320(3):C375-91.
82. Ghanim H, Abuaysheh S, Sia CL, Korzeniewski K, Chaudhuri A, Fernandez-Real JM, et al. Increase in Plasma Endotoxin Concentrations and the Expression of Toll-Like Receptors and Suppressor of Cytokine Signaling-3 in Mononuclear Cells After a High-Fat, High-Carbohydrate Meal. *Diabetes Care*. 2009;32(12):2281-7.
83. Engin AB. What Is Lipotoxicity? En: Engin AB, Engin A, editores. *Obesity and Lipotoxicity* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2017 [citado 22 de enero de 2024]. p. 197-220. (Advances in Experimental Medicine and Biology; vol. 960). Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-48382-5_8
84. Maris M, Overbergh L, Gysemans C, Waget A, Cardozo AK, Verdrengh E, et al. Deletion of C/EBP homologous protein (Chop) in C57Bl/6 mice dissociates obesity from insulin resistance. *Diabetologia*. 2012;55(4):1167-78.
85. McMurray F, Patten DA, Harper M. Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in Obesity—Recent Findings and Empirical Approaches. *Obesity*. 2016;24(11):2301-10.
86. Corkey BE. Reactive oxygen species: role in obesity and mitochondrial energy efficiency. *Phil Trans R Soc B*. 2023;378(1885):20220210.
87. Pérez-Torres I, Castrejón-Téllez V, Soto ME, Rubio-Ruiz ME, Manzano-Pech L, Guarner-Lans V. Oxidative Stress, Plant Natural Antioxidants, and Obesity. *IJMS*. 2021;22(4):1786.
88. Quinlan CL, Perevoshchikova IV, Hey-Mogensen M, Orr AL, Brand MD. Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria oxidizing different substrates. *Redox Biology*. 2013;1(1):304-12.
89. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 1 de enero de 2010;33(Supplement_1):S62-9.
90. Centers for Disease Control and Prevention. What is Diabetes? [Internet]. 2024 [citado 6 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/diabetes/basics/diabetes.html>
91. Olvera Lopez E, Ballard BD, Jan A. Cardiovascular Disease. En: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [citado 6 de mayo de 2024]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535419/>

92. WHO. Cardiovascular diseases (CVDs) [Internet]. 2017 [citado 28 de mayo de 2019]. Disponible en: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
93. Witztum JL, Lichtman AH. The Influence of Innate and Adaptive Immune Responses on Atherosclerosis. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2014;9(1):73-102.
94. Ketelhuth DFJ, Hansson GK. Adaptive Response of T and B Cells in Atherosclerosis. *Circ Res*. 2016;118(4):668-78.
95. Al Zarzour R, Ahmad M, Asmawi Mohd, Kaur G, Saeed M, Al-Mansoub M, et al. Phyllanthus Niruri Standardized Extract Alleviates the Progression of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Decreases Atherosclerotic Risk in Sprague–Dawley Rats. *Nutrients*. 2017;9(7):766.
96. Tavares TB, Santos IB, De Bem GF, Ognibene DT, Da Rocha APM, De Moura RS, et al. Therapeutic effects of açai seed extract on hepatic steatosis in high-fat diet-induced obesity in male mice: a comparative effect with rosuvastatin. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2020;72(12):1921-32.
97. Rinella ME, Lazarus JV, Ratziu V, Francque SM, Sanyal AJ, Kanwal F, et al. A multisociety Delphi consensus statement on new fatty liver disease nomenclature. *Journal of Hepatology*. 2023;79(6):1542-56.
98. Bessone F, Razori MV, Roma MG. Molecular pathways of nonalcoholic fatty liver disease development and progression. *Cell Mol Life Sci*. 2019;76(1):99-128.
99. Del Campo J, Gallego-Durán R, Gallego P, Grande L. Genetic and Epigenetic Regulation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *IJMS*. 2018;19(3):911.
100. Takahashi Y. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *WJG*. 2014;20(42):15539.
101. Friedman SL, Neuschwander-Tetri BA, Rinella M, Sanyal AJ. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat Med*. 2018;24(7):908-22.
102. Day CP, James OFW. Steatohepatitis: A tale of two “hits”? *Gastroenterology*. 1998;114(4):842-5.
103. Mohamed SM, Shalaby MA, El-Shiekh RA, El-Banna HA, Emam SR, Bakr AF. Metabolic syndrome: risk factors, diagnosis, pathogenesis, and management with natural approaches. *Food Chemistry Advances*. 2023;3:100335.
104. Fahed G, Aoun L, Bou Zerdan M, Allam S, Bou Zerdan M, Bouferraa Y, et al. Metabolic Syndrome: Updates on Pathophysiology and Management in 2021. *IJMS*. 2022;23(2):786.
105. Saklayen MG. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Curr Hypertens Rep*. 2018;20(2):12.

106. Haverinen E, Paalanen L, Palmieri L, Padron-Monedero A, Noguer-Zambrano I, Sarmiento Suárez R, et al. Comparison of metabolic syndrome prevalence using four different definitions – a population-based study in Finland. *Arch Public Health*. 2021;79(1):231.
107. Seravalle G, Grassi G. Obesity and hypertension. *Pharmacological Research*. 2017;122:1-7.
108. Neto A, Fernandes A, Barateiro A. The complex relationship between obesity and neurodegenerative diseases: an updated review. *Front Cell Neurosci*. 2023;17:1294420.
109. Jiang Z, Wang Y, Zhao X, Cui H, Han M, Ren X, et al. Obesity and chronic kidney disease. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2023;324(1):E24-41.
110. Yang M, Liu S, Zhang C. The Related Metabolic Diseases and Treatments of Obesity. *Healthcare*. 2022;10(9):1616.
111. Lv R, Liu X, Zhang Y, Dong N, Wang X, He Y, et al. Pathophysiological mechanisms and therapeutic approaches in obstructive sleep apnea syndrome. *Sig Transduct Target Ther*. 2023;8(1):218.
112. Jehan S, Zizi F, Pandi-Perumal SR, Wall S, Auguste E, Myers AK, et al. Obstructive Sleep Apnea and Obesity: Implications for Public Health. *Sleep Med Disord*. 2017;1(4):00019.
113. Peters U, Dixon AE, Forno E. Obesity and asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2018;141(4):1169-79.
114. Nedunchezhiyan U, Varughese I, Sun AR, Wu X, Crawford R, Prasadam I. Obesity, Inflammation, and Immune System in Osteoarthritis. *Front Immunol*. 2022;13:907750.
115. Parra-Landazury NM, Cordova-Gallardo J, Méndez-Sánchez N. Obesity and Gallstones. *Visc Med*. 2021;37(5):394-402.
116. Khatua B, El-Kurdi B, Singh VP. Obesity and pancreatitis. *Current Opinion in Gastroenterology*. 2017;33(5):374-82.
117. Ruban A, Stoenchev K, Ashrafian H, Teare J. Current treatments for obesity. *Clinical Medicine*. 2019;19(3):205-12.
118. Chao AM, Quigley KM, Wadden TA. Dietary interventions for obesity: clinical and mechanistic findings. *Journal of Clinical Investigation*. 2021;131(1):e140065.
119. Merra G, Gratteri S, De Lorenzo A, Barrucco S, Perrone MA, Avolio E, et al. Effects of very-low-calorie diet on body composition, metabolic state, and genes expression: a randomized double-blind placebo-controlled trial. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017;21(2):329-45.

120. Ellenbroek JH, Van Dijck L, Töns HA, Rabelink TJ, Carlotti F, Ballieux BEPB, et al. Long-term ketogenic diet causes glucose intolerance and reduced β - and α -cell mass but no weight loss in mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2014;306(5):E552-8.
121. Expert panel report: Guidelines (2013) for the management of overweight and obesity in adults. *Obesity*. 2014;22(S2):S41-410.
122. Schwingshackl L, Hoffmann G. Long-term effects of low-fat diets either low or high in protein on cardiovascular and metabolic risk factors: a systematic review and meta-analysis. *Nutr J*. 2013;12(1):48.
123. Santesso N, Akl EA, Bianchi M, Mente A, Mustafa R, Heels-Ansdell D, et al. Effects of higher- versus lower-protein diets on health outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Clin Nutr*. 2012;66(7):780-8.
124. Clifton PM, Keogh JB, Noakes M. Long-term effects of a high-protein weight-loss diet. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2008;87(1):23-9.
125. Brower V. Nutraceuticals: Poised for a healthy slice of the healthcare market? *Nat Biotechnol*. 1998;16(8):728-31.
126. Shahinfar H, Jayedi A, Torabynasab K, Payandeh N, Martami F, Moosavi H, et al. Comparative effects of nutraceuticals on body weight in adults with overweight or obesity: A systematic review and network meta-analysis of 111 randomized clinical trials. *Pharmacological Research*. 2023;196:106944.
127. Ramírez-Moreno E, Arias-Rico J, Jiménez-Sánchez RC, Estrada-Luna D, Jiménez-Osorio AS, Zafra-Rojas QY, et al. Role of Bioactive Compounds in Obesity: Metabolic Mechanism Focused on Inflammation. *Foods*. 2022;11(9):1232.
128. Kapravelou G, Martínez R, Andrade AM, López Chaves C, López-Jurado M, Aranda P, et al. 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(6):1207-16.
129. Martínez R, Kapravelou G, Donaire A, Lopez-Chaves C, Arrebola F, Galisteo M, et al. Effects of a combined intervention with a lentil protein hydrolysate and a mixed training protocol on the lipid metabolism and hepatic markers of NAFLD in Zucker rats. *Food Funct*. 2018;9(2):830-50.
130. Kapravelou G, Martínez R, Andrade AM, Sánchez C, Chaves CL, López-Jurado M, et al. Health promoting effects of Lupin (*Lupinus albus* var. *multolupa*) protein hydrolyzate and insoluble fiber in a diet-induced animal experimental model of hypercholesterolemia. *Food Research International*. 2013;54(2):1471-81.
131. Kapravelou G, Martínez R, Nebot E, López-Jurado M, Aranda P, Arrebola F, et al. The Combined Intervention with Germinated *Vigna radiata* and Aerobic Interval Training Protocol Is an Effective Strategy for the Treatment of Non-Alcoholic Fatty

Liver Disease (NAFLD) and Other Alterations Related to the Metabolic Syndrome in Zucker Rats. *Nutrients*. 19 de julio de 2017;9(7):774.

132. Urbano G, Porres JM, Frías J, Vidal-Valverde C. Nutritional Value. En: Yadav SS, McNeil DL, Stevenson PC, editores. *Lentil* [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2007 [citado 20 de mayo de 2024]. p. 47-93. Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4020-6313-8_5
133. Martínez R, López-Jurado M, Wanden-Berghe C, Sanz-Valero J, Porres JM, Kapravelou G. Beneficial effects of legumes on parameters of the metabolic syndrome: a systematic review of trials in animal models. *Br J Nutr*. 2016;116(3):402-24.
134. Porres JM, Constantino J, Kapravelou G, Lopez-Chaves C, Galisteo M, Aranda P, et al. 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(8):3473-90.
135. Nucera S, Bulotta RM, Ruga S, Caminiti R, Serra M, Bava R, et al. Natural Products for the Treatment of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Comprehensive Review. *Sci Pharm*. 2023;91(4):53.
136. Chelliah R, Wei S, Daliri EBM, Elahi F, Yeon SJ, Tyagi A, et al. The Role of Bioactive Peptides in Diabetes and Obesity. *Foods*. 2021;10(9):2220.
137. Bellicha A, Van Baak MA, Battista F, Beaulieu K, Blundell JE, Busetto L, et al. Effect of exercise training on weight loss, body composition changes, and weight maintenance in adults with overweight or obesity: An overview of 12 systematic reviews and 149 studies. *Obesity Reviews*. 2021;22(S4):e13256.
138. Muscella A, Stefano E, Lunetti P, Capobianco L, Marsigliante S. The Regulation of Fat Metabolism during Aerobic Exercise. *Biomolecules*. 2020;10(12):1699.
139. Thyfault JP, Bergouignan A. Exercise and metabolic health: beyond skeletal muscle. *Diabetologia*. 2020;63(8):1464-74.
140. Pillon Barcelos R, Freire Royes LF, Gonzalez-Gallego J, Bresciani G. Oxidative stress and inflammation: liver responses and adaptations to acute and regular exercise. *Free Radical Research*. 2017;51(2):222-36.
141. Sun L, Shen W, Liu Z, Guan S, Liu J, Ding S. Endurance exercise causes mitochondrial and oxidative stress in rat liver: Effects of a combination of mitochondrial targeting nutrients. *Life Sciences*. 2010;86(1-2):39-44.
142. Yuan Z, Xiao-wei L, Juan W, Xiu-juan L, Nian-yun Z, Lei S. HIIT and MICT attenuate high-fat diet-induced hepatic lipid accumulation and ER stress via the PERK-ATF4-CHOP signaling pathway. *J Physiol Biochem*. 2022;78(3):641-52.
143. Liu Y, Li Y, Cheng B, Feng S, Zhu X, Chen W, et al. Comparison of visceral fat lipolysis adaptation to high-intensity interval training in obesity-prone and obesity-resistant rats. *Diabetol Metab Syndr*. 2022;14(1):62.

144. Chakhtoura M, Haber R, Ghezzawi M, Rhayem C, Tcheroyan R, Mantzoros CS. Pharmacotherapy of obesity: an update on the available medications and drugs under investigation. *eClinicalMedicine*. 2023;58:101882.
145. Paternostro R, Trauner M. Current treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *J Intern Med*. 2022;292(2):190-204.
146. Capuani B, Pacifici F, Della-Morte D, Lauro D. Glucagon Like Peptide 1 and MicroRNA in Metabolic Diseases: Focusing on GLP1 Action on miRNAs. *Front Endocrinol*. 2018;9:719.
147. Goldenberg RM, Teoh H, Verma S. Glucagon-like peptide-1/glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor co-agonists for cardioprotection, type 2 diabetes and obesity: a review of mechanisms and clinical data. *Current Opinion in Cardiology*. 2023;38(6):539-45.
148. Barritt AS, Marshman E, Noureddin M. Review article: role of glucagon-like peptide-1 receptor agonists in non-alcoholic steatohepatitis, obesity and diabetes—what hepatologists need to know. *Aliment Pharmacol Ther*. 2022;55(8):944-59.
149. Wolfe BM, Kvach E, Eckel RH. Treatment of Obesity: Weight Loss and Bariatric Surgery. *Circulation Research*. 2016;118(11):1844-55.
150. Martínez-Villaluenga C, Urbano G, Porres JM, Frias J, Vidal-Valverde C. Improvement in food intake and nutritive utilization of protein from *Lupinus albus* var. *multolupa* protein isolates supplemented with ascorbic acid. *Food Chemistry*. 2007;103(3):944-51.
151. Megías C, Pedroche J, Yust MM, Girón-Calle J, Alaiz M, Millán F, et al. Affinity Purification of Copper Chelating Peptides from Chickpea Protein Hydrolysates. *J Agric Food Chem*. 2007;55(10):3949-54.
152. Martínez R, García-Beltrán A, Kapravelou G, Mesas C, Cabeza L, Perazzoli G, et al. In Vivo Nutritional Assessment of the Microalga *Nannochloropsis gaditana* and Evaluation of the Antioxidant and Antiproliferative Capacity of Its Functional Extracts. *Marine Drugs*. 2022;20(5):318.
153. Dewanto V, Wu X, Adom KK, Liu RH. Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity. *J Agric Food Chem*. 2002;50(10):3010-4.
154. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A Novel Method for Measuring Antioxidant Capacity and its Application to Monitoring the Antioxidant Status in Premature Neonates. *Clinical Science*. 1993;84(4):407-12.
155. Oyaizu M. Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *JpnJNutrDiet*. 1986;44(6):307-15.
156. Decker EA, Welch B. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *J Agric Food Chem*. 1990;38(3):674-7.

157. Oboh G, Puntel RL, Rocha JBT. Hot pepper (*Capsicum annum*, Tepin and *Capsicum chinese*, Habanero) prevents Fe²⁺-induced lipid peroxidation in brain – in vitro. *Food Chemistry*. 2007;102(1):178-85.
158. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*. 1979;95(2):351-8.
159. Minihane AM, Fox TE, Fairweather-Tait SJ. A continuous flow *in vitro* method to predict bioavailability of Fe from foods. En: Schlemmer U, editor. *Bioavailability 93, Nutritional, Chemical, and Food Processing Implications of Nutrient Availability, Proceedings Part 2*. Ettlingen: Bundesforschungsanstalt für Ernährung; 1993. p. 175-9.
160. Shen LH, Luten J, Robberecht H, Bindels J, Deelstra H. Modification of an in-vitro method for estimating the bioavailability of zinc and calcium from foods. *Z Lebensm Unters Forch*. 1994;199(6):442-5.
161. Brodkorb A, Egger L, Alminger M, Alvito P, Assunção R, Ballance S, et al. INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nat Protoc*. 2019;14(4):991-1014.
162. Käll L, Canterbury JD, Weston J, Noble WS, MacCoss MJ. Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets. *Nat Methods*. 2007;4(11):923-5.
163. Mooney C, Haslam NJ, Pollastri G, Shields DC. Towards the Improved Discovery and Design of Functional Peptides: Common Features of Diverse Classes Permit Generalized Prediction of Bioactivity. Kurgan L, editor. *PLoS ONE*. 2012;7(10):e45012.
164. Minkiewicz, Iwaniak, Darewicz. BIOPEP-UWM Database of Bioactive Peptides: Current Opportunities. *IJMS*. 2019;20(23):5978.
165. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983;65(1-2):55-63.
166. Gao Y, Chen G, Weselake RJ. A Rapid Nile Red Fluorescence-Based Method for Triacylglycerol Content in Microspore-Derived Cell Suspension Cultures of *Brassica napus*. *Lipids*. 2014;49(11):1161-8.
167. Small L, Brandon AE, Turner N, Cooney GJ. Modeling insulin resistance in rodents by alterations in diet: what have high-fat and high-calorie diets revealed? *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2018;314(3):E251-65.
168. Simoes ICM, Janikiewicz J, Bauer J, Karkucinska-Wieckowska A, Kalinowski P, Dobrzyń A, et al. Fat and Sugar—A Dangerous Duet. A Comparative Review on Metabolic Remodeling in Rodent Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Nutrients*. 2019;11(12):2871.
169. Martínez R, López-Trinidad LM, Kapravelou G, Arrebola F, Galisteo M, Aranda P, et al. A combined healthy strategy for successful weight loss, weight maintenance

- and improvement of hepatic lipid metabolism. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2020;85:108456.
170. European Union Council. Directional on the protection of animals used for scientific purposes. *Official J Eur Union*. 2010;276:33-79.
 171. Hubrecht, Carter. The 3Rs and Humane Experimental Technique: Implementing Change. *Animals*. 2019;9(10):754.
 172. Prieto PG, Cancelas J, Villanueva-Peñacarrillo ML, Valverde I, Malaisse WJ. Plasma D-Glucose, D-Fructose and Insulin Responses after Oral Administration of D-Glucose, D-Fructose and Sucrose to Normal Rats. *Journal of the American College of Nutrition*. 2004;23(5):414-9.
 173. National Research Council. *Nutrient Requirements of Laboratory Animals*,: Fourth Revised Edition, 1995 [Internet]. Washington, D.C.: National Academies Press; 1995 [citado 11 de septiembre de 2023]. Disponible en: <http://www.nap.edu/catalog/4758>
 174. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *The Journal of Nutrition*. 1993;123(11):1939-51.
 175. Pruessner JC, Kirschbaum C, Meinlschmid G, Hellhammer DH. Two formulas for computation of the area under the curve represent measures of total hormone concentration versus time-dependent change. *Psychoneuroendocrinology*. 2003;28(7):916-31.
 176. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957;226(1):497-509.
 177. Lepage G, Roy CC. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J Lipid Res*. 1986;27(1):114-20.
 178. González-Torres L, Matos C, Vázquez-Velasco M, Santos-López JA, Sánchez-Martínez I, García-Fernández C, et al. Glucomannan- and glucomannan plus spirulina-enriched pork affect liver fatty acid profile, LDL receptor expression and antioxidant status in Zucker fa/fa rats fed atherogenic diets. *Food Nutr Res*. 2017;61(1):1264710.
 179. Krishna M. Anatomía microscópica del hígado: *Clinical Liver Disease*, Vol. 2, No. S1, March 2013 *Recurso de enseñanza oficial de la AASLD*. *Clinical Liver Disease*. 2013;2(S5):109-12.
 180. Kapravelou G, Martínez R, Andrade AM, Nebot E, Camiletti-Moirón D, Aparicio VA, et al. Aerobic interval exercise improves parameters of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and other alterations of metabolic syndrome in obese Zucker rats. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2015;40(12):1242-52.

181. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005;41(6):1313-21.
182. Chen X, Li L, Liu X, Luo R, Liao G, Li L, et al. Oleic acid protects saturated fatty acid mediated lipotoxicity in hepatocytes and rat of non-alcoholic steatohepatitis. *Life Sciences*. 2018;203:291-304.
183. Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. [Internet]. Babraham Bioinformatics. 2010 [citado 16 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
184. Ewels P, Magnusson M, Lundin S, Källér M. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*. 2016;32(19):3047-8.
185. Kim D, Paggi JM, Park C, Bennett C, Salzberg SL. Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nat Biotechnol*. 2019;37(8):907-15.
186. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009;25(16):2078-9.
187. Liao Y, Smyth GK, Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*. 2014;30(7):923-30.
188. Anders S, Huber W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol*. 2010;11(10):R106.
189. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014;15(12):550.
190. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*. 2010;26(1):139-40.
191. Marschall MJM, Ringseis R, Gessner DK, Grundmann SM, Most E, Wen G, et al. Effect of ecdysterone on the hepatic transcriptome and lipid metabolism in lean and obese Zucker rats. *Int J Mol Sci*. 2021;22(10):5241.
192. Gessner DK, Schwarz A, Meyer S, Wen G, Most E, Zorn H, et al. Insect meal as alternative protein source exerts pronounced lipid-lowering effects in hyperlipidemic obese Zucker rats. *J Nutr*. 2019;149(4):566-77.
193. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976;72(1-2):248-54.
194. 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(1):53-6.

195. 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(2):206-9.
196. Lawrence RA, Sunde RA, Schwartz GL, Hoekstra WG. Glutathione peroxidase activity in rat lens and other tissues in relation to dietary selenium intake. *Exp Eye Res.* 1974;18(6):563-9.
197. Smith AD, Morris VC, Levander OA. Rapid Determination of Glutathione Peroxidase and Thioredoxin Reductase Activities Using a 96-well Microplate Format: Comparison to Standard Cuvette-based Assays. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research.* 2001;71(1):87-92.
198. Ernster L. [56] DT diaphorase. En: *Oxidation and Phosphorylation* [Internet]. Academic Press; 1967. p. 309-17. (Methods in Enzymology; vol. 10). Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0076687967100591>
199. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.* 1974;249(22):7130-9.
200. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol.* 2019;37(8):852-7.
201. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods.* 2016;13(7):581-3.
202. Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ.* 2016;4:e2584.
203. Nilsson RH, Larsson KH, Taylor AFS, Bengtsson-Palme J, Jeppesen TS, Schigel D, et al. The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. *Nucleic Acids Research.* 2019;47(D1):D259-64.
204. Mandal S, Van Treuren W, White RA, Eggesbø M, Knight R, Peddada SD. Analysis of composition of microbiomes: a novel method for studying microbial composition. *Microbial Ecology in Health & Disease* [Internet]. 2015 [citado 12 de septiembre de 2023];26(0). Disponible en: <http://www.microbecolhealthdis.net/index.php/mehd/article/view/27663>
205. Miller DD, Schrick BR, Rasmussen RR, Van Campen D. An in vitro method for estimation of iron availability from meals. *The American Journal of Clinical Nutrition.* 1981;34(10):2248-56.
206. Porres JM, Aranda P, López-Jurado M, Urbano G. Nutritional Potential of Raw and Free α -Galactosides Lupin (*Lupinus albus* Var. *multolupa*) Seed Flours. Effect of Phytase Treatment on Nitrogen and Mineral Dialyzability. *J Agric Food Chem.* 2005;53(8):3088-94.

207. Wisløff U, Helgerud J, Kemi OJ, Ellingsen Ø. Intensity-controlled treadmill running in rats: $\dot{V}O_{2\max}$ and cardiac hypertrophy. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2001;280(3):H1301-10.
208. Clemente-Suárez VJ, Martín S, Porres JM, Fuentes S, Aranda P. Efecto de la suplementación de vitamina E en el rendimiento de una prueba incremental de consumo máximo de oxígeno en ratas wistar. *Arch Med Deporte*. 2011;28(143):168-73.
209. Kovner I, Taicher GZ, Mitchell AD. 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(1):17-29.
210. Novelli ELB, Diniz YS, Galhardi CM, Ebaid GMX, Rodrigues HG, Mani F, et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab Anim*. 2007;41(1):111-9.
211. Roy D, Tomo S, Modi A, Purohit P, Sharma P. Optimising total RNA quality and quantity by phenol-chloroform extraction method from human visceral adipose tissue: A standardisation study. *MethodsX*. 2020;7:101113.
212. Terrón-Camero LC, 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(12):2280.
213. Andrews S. Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data [Internet]. 2010 [citado 5 de septiembre de 2023]. Disponible en: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
214. Ewels P, Magnusson M, Lundin S, Käller M. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*. 1 de octubre de 2016;32(19):3047-8.
215. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol*. agosto de 2019;37(8):852-7.
216. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods*. julio de 2016;13(7):581-3.
217. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res*. enero de 2013;41(Database issue):D590-6.
218. Paulson JN, Stine OC, Bravo HC, Pop M. Differential abundance analysis for microbial marker-gene surveys. *Nat Methods*. 2013;10(12):1200-2.
219. Castro RE, Ferreira DMS, Afonso MB, Borralho PM, Machado MV, Cortez-Pinto H, et al. miR-34a/SIRT1/p53 is suppressed by ursodeoxycholic acid in the rat liver and

- activated by disease severity in human non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*. 2013;58(1):119-25.
220. Rodrigues PM, Afonso MB, Simão AL, Islam T, Gaspar MM, O'Rourke CJ, et al. miR - 21-5p promotes NASH -related hepatocarcinogenesis. *Liver International*. 2023;43(10):2256-74.
221. Liu J, Xiao Y, Wu X, Jiang L, Yang S, Ding Z, et al. A circulating microRNA signature as noninvasive diagnostic and prognostic biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis. *BMC Genomics*. 2018;19(1):188.
222. Nandi Jui B, Sarsenbayeva A, Jernow H, Hetty S, Pereira MJ. Evaluation of RNA Isolation Methods in Human Adipose Tissue. *Laboratory Medicine*. 2022;53(5):e129-33.
223. Subichin M, Clanton J, Makuszewski M, Bohon A, Zografakis JG, Dan A. Liver disease in the morbidly obese: a review of 1000 consecutive patients undergoing weight loss surgery. *Surgery for Obesity and Related Diseases*. 2015;11(1):137-41.
224. Hameed S, Imran A, Nisa MU, Arshad MS, Saeed F, Arshad MU, et al. Characterization of extracted phenolics from black cumin (*Nigella sativa* linn), coriander seed (*Coriandrum sativum* L.), and fenugreek seed (*Trigonella foenum-graecum*). *International Journal of Food Properties*. 2019;22(1):714-26.
225. Cicalău G, Babes P, Calniceanu H, Popa A, Ciavoi G, Iova G, et al. Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties of Carvacrol and Magnolol, in Periodontal Disease and Diabetes Mellitus. *Molecules*. 2021;26(22):6899.
226. Lombrea A, Antal D, Ardelean F, Avram S, Pavel IZ, Vlaia L, et al. A Recent Insight Regarding the Phytochemistry and Bioactivity of *Origanum vulgare* L. Essential Oil. *IJMS*. 2020;21(24):9653.
227. Scandar S, Zadra C, Marcotullio MC. Coriander (*Coriandrum sativum*) Polyphenols and Their Nutraceutical Value against Obesity and Metabolic Syndrome. *Molecules*. 2023;28(10):4187.
228. Shoko T, Manhivi VE, Mtlhako M, Sivakumar D. Changes in Functional Compounds, Volatiles, and Antioxidant Properties of Culinary Herb Coriander Leaves (*Coriandrum sativum*) Stored Under Red and Blue LED Light for Different Storage Times. *Front Nutr*. 2022;9:856484.
229. Semwal P, Painuli S, Begum J.P S, Jamloki A, Rauf A, Olatunde A, et al. Exploring the nutritional and health benefits of pulses from the Indian Himalayan region: A glimpse into the region's rich agricultural heritage. *Food Chemistry*. 2023;422:136259.
230. Azman AT, Mohd Isa NS, Mohd Zin Z, Abdullah MAA, Aidat O, Zainol MK. Protein Hydrolysate from Underutilized Legumes: Unleashing the Potential for Future Functional Foods. *Prev Nutr Food Sci*. 2023;28(3):209-23.

231. Wani SA, Kumar P. Fenugreek: A review on its nutraceutical properties and utilization in various food products. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. 2018;17(2):97-106.
232. Mourjane A, Hanine H, El Adnany EM, Ouhammou M, Bitar K, Mahrouz M, et al. Determination of the Relationship between the Granulometry and Release of Polyphenols Using LC-UV, and Their Antioxidant Activity of the Pulp Powder of the Moroccan Argan Tree, “*Argania spinosa* L.” *Separations*. 2023;10(10):542.
233. Shallan MA, Ali MA, Meshrf WA, Marrez DA. In vitro antimicrobial, antioxidant and anticancer activities of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* L.) bracts and receptacles ethanolic extract. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2020;29:101774.
234. Parra C, Muñoz P, Bustos L, Parra F, Simirgiotis MJ, Escobar H. UHPLC-DAD Characterization of *Origanum vulgare* L. from Atacama Desert Andean Region and Antioxidant, Antibacterial and Enzyme Inhibition Activities. *Molecules*. 2021;26(7):2100.
235. Wahid M, Saqib F. Scientific basis for medicinal use of *Citrullus lanatus* (Thunb.) in diarrhea and asthma: In vitro, in vivo and in silico studies. *Phytomedicine*. 2022;98:153978.
236. Jimoh TO, Ademiluyi AO, Oboh G, Boligon AA. Phenolic extracts and amino acids content from *Cucumeropsis mannii* naudin and *Citrullus lanatus* inhibit relevant enzymes of erectile dysfunction in rat’s penile tissue. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 2017;12:5-11.
237. Mustafa AM, Abouelenein D, Acquaticci L, Alessandrini L, Angeloni S, Borsetta G, et al. Polyphenols, Saponins and Phytosterols in Lentils and Their Health Benefits: An Overview. *Pharmaceuticals*. 2022;15(10):1225.
238. Jin Z, Jiang W, Luo Y, Huang H, Yi D, Pang Y. Analyses on Flavonoids and Transcriptome Reveals Key MYB Gene for Proanthocyanidins Regulation in *Onobrychis Viciifolia*. *Front Plant Sci*. 2022;13:941918.
239. Charrouf Z, Hilali M, Jauregui O, Soufiaoui M, Guillaume D. Separation and characterization of phenolic compounds in argan fruit pulp using liquid chromatography–negative electrospray ionization tandem mass spectroscopy. *Food Chemistry*. 2007;100(4):1398-401.
240. Cioni E, Di Stasi M, Iacono E, Lai M, Quaranta P, Luminare AG, et al. Enhancing antimicrobial and antiviral properties of *Cynara scolymus* L. waste through enzymatic pretreatment and lactic fermentation. *Food Bioscience*. 2024;57:103441.
241. Fritsche J, Beindorff C, Dachtler M, Zhang H, Lammers J. Isolation, characterization and determination of minor artichoke (*Cynara scolymus* L.) leaf extract compounds. *European Food Research and Technology*. 2002;215(2):149-57.
242. Oganesyanyan ET, Nersesyanyan ZM, Parkhomenko AY. Chemical composition of the above-ground part of *Coriandrum sativum*. *Pharm Chem J*. 2007;41(3):149-53.

243. Khole S, Chatterjee S, Variyar P, Sharma A, Devasagayam TPA, Ghaskadbi S. Bioactive constituents of germinated fenugreek seeds with strong antioxidant potential. *Journal of Functional Foods*. 2014;6:270-9.
244. Chupeerach C, Temviriyankul P, Thangsiri S, Inthachat W, Sahasakul Y, Aursalung A, et al. Phenolic Profiles and Bioactivities of Ten Original Lineage Beans in Thailand. *Foods*. 2022;11(23):3905.
245. Sura S, Kodikara C, Acharya S, Sabra A, Wijekoon C. Comparative Analysis of Bioactive Phenolic Compounds and Fatty Acids in Seeds and Seedlings of Canadian Alfalfa, Sainfoin, and Fenugreek. *Applied Biosciences*. 2023;2(3):477-92.
246. Navarro Del Hierro J, Reglero G, Martin D. Chemical Characterization and Bioaccessibility of Bioactive Compounds from Saponin-Rich Extracts and Their Acid-Hydrolysates Obtained from Fenugreek and Quinoa. *Foods*. 2020;9(9):1159.
247. Devi KP, Malar DS, Nabavi SF, Sureda A, Xiao J, Nabavi SM, et al. Kaempferol and inflammation: From chemistry to medicine. *Pharmacological Research*. 2015;99:1-10.
248. Wang Z, Zeng M, Wang Z, Qin F, Chen J, He Z. Dietary Luteolin: A Narrative Review Focusing on Its Pharmacokinetic Properties and Effects on Glycolipid Metabolism. *J Agric Food Chem*. 2021;69(5):1441-54.
249. Ali F, Rahul, Naz F, Jyoti S, Siddique YH. Health functionality of apigenin: A review. *International Journal of Food Properties*. 2017;20(6):1197-238.
250. Goh YX, Jalil J, Lam KW, Husain K, Premakumar CM. Genistein: A Review on its Anti-Inflammatory Properties. *Front Pharmacol*. 2022;13:820969.
251. Peng Y, Gan R, Li H, Yang M, McClements DJ, Gao R, et al. Absorption, metabolism, and bioactivity of vitexin: recent advances in understanding the efficacy of an important nutraceutical. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2021;61(6):1049-64.
252. Kim DB, Unenkhuu B, Kim GJ, Kim SW, Kim HS. Cynarin attenuates LPS-induced endothelial inflammation via upregulation of the negative regulator MKP-3. *Animal Cells and Systems*. 2022;26(3):119-28.
253. Mencherini T, Cau A, Bianco G, Loggia RD, Aquino RP, Autore G. An extract of *Apium graveolens* var. dulce leaves: structure of the major constituent, apiin, and its anti-inflammatory properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2010;59(6):891-7.
254. Duan X, Wu T, Liu T, Yang H, Ding X, Chen Y, et al. Vicenin-2 ameliorates oxidative damage and photoaging via modulation of MAPKs and MMPs signaling in UVB radiation exposed human skin cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2019;190:76-85.
255. Lotito S, Frei B. Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: Cause, consequence, or epiphenomenon? *Free Radical Biology and Medicine*. 2006;41(12):1727-46.

256. Pietta PG. Flavonoids as Antioxidants. *J Nat Prod.* 2000;63(7):1035-42.
257. Martínez R, García Beltrán A, Kapravelou G, Guzmán A, Lozano A, Gómez-Villegas P, et al. Nutritional and functional assessment of haloarchaea and microalgae from the Andalusian shoreline: Promising functional foods with a high nutritional value. *Journal of Functional Foods.* 2024;116:106194.
258. Liu W, Chen X, Li H, Zhang J, An J, Liu X. Anti-Inflammatory Function of Plant-Derived Bioactive Peptides: A Review. *Foods.* 2022;11(15):2361.
259. Sufian MdKNB, Hira T, Hara H. Identification of Peptides Derived from Azuki Bean (*Vigna angularis*) which Stimulate Cholecystokinin Secretion from the Enteroendocrine STC-1 Cells. *The FASEB Journal* [Internet]. abril de 2010 [citado 10 de enero de 2024];24(S1). Disponible en: https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1096/fasebj.24.1_supplement.lb265
260. D'Antuono I, Garbetta A, Linsalata V, Minervini F, Cardinali A. Polyphenols from artichoke heads (*Cynara cardunculus* (L.) subsp. *scolymus* Hayek): in vitro bioaccessibility, intestinal uptake and bioavailability. *Food Funct.* 2015;6(4):1268-77.
261. Zhang B, Deng Z, Tang Y, Chen PX, Liu R, Dan Ramdath D, et al. Bioaccessibility, in vitro antioxidant and anti-inflammatory activities of phenolics in cooked green lentil (*Lens culinaris*). *Journal of Functional Foods.* 2017;32:248-55.
262. Tsao R. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients.* 2010;2(12):1231-46.
263. Repin N, Cui SW, Goff HD. Rheological behavior of dietary fibre in simulated small intestinal conditions. *Food Hydrocolloids.* 2018;76:216-25.
264. Miccadei S, Venere DD, Cardinali A, Romano F, Durazzo A, Foddai MS, et al. Antioxidative and Apoptotic Properties of Polyphenolic Extracts from Edible Part of Artichoke (*Cynara scolymus* L.) on Cultured Rat Hepatocytes and on Human Hepatoma Cells. *Nutrition & Cancer.* 2008;60(2):276-83.
265. Garbetta A, Capotorto I, Cardinali A, D'Antuono I, Linsalata V, Pizzi F, et al. Antioxidant activity induced by main polyphenols present in edible artichoke heads: influence of in vitro gastro-intestinal digestion. *Journal of Functional Foods.* 2014;10:456-64.
266. Zapolska-Downar D, Zapolski-Downar A, Naruszewicz M, Siennicka A, Krasnodębska B, Kołodziej B. Protective properties of artichoke (*Cynara scolymus*) against oxidative stress induced in cultured endothelial cells and monocytes. *Life Sciences.* 2002;71(24):2897-908.
267. Pérez-García F, Adzet T, Cañigueral S. Activity of artichoke leaf extract on reactive oxygen species in human leukocytes. *Free Radical Research.* 2000;33(5):661-5.
268. Da Silva RP, Jacociunas LV, De Carli RF, De Abreu BRR, Lehmann M, Da Silva J, et al. Genotoxic and chemopreventive assessment of *Cynara scolymus* L. aqueous extract in a human-derived liver cell line. *Drug and Chemical Toxicology.* 2017;40(4):484-8.

269. Gebhardt R, Fausel M. Antioxidant and hepatoprotective effects of artichoke extracts and constituents in cultured rat hepatocytes. *Toxicology in Vitro*. 1997;11(5):669-72.
270. Gebhardt R. Antioxidative and Protective Properties of Extracts from Leaves of the Artichoke (*Cynara scolymus* L.) against Hydroperoxide-Induced Oxidative Stress in Cultured Rat Hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1997;144(2):279-86.
271. Savini I, Arnone R, Catani MV, Avigliano L. *Origanum Vulgare* Induces Apoptosis in Human Colon Cancer Caco₂ Cells. *Nutrition and Cancer*. 2009;61(3):381-9.
272. Gutiérrez-Grijalva EP, Antunes-Ricardo M, Acosta-Estrada BA, Gutiérrez-Urbe JA, Basilio Heredia J. Cellular antioxidant activity and in vitro inhibition of α -glucosidase, α -amylase and pancreatic lipase of oregano polyphenols under simulated gastrointestinal digestion. *Food Research International*. 2019;116:676-86.
273. Wen C, Zhang J, Feng Y, Duan Y, Ma H, Zhang H. Purification and identification of novel antioxidant peptides from watermelon seed protein hydrolysates and their cytoprotective effects on H₂O₂-induced oxidative stress. *Food Chemistry*. 2020;327:127059.
274. Xu B, Chang SKC. Comparative study on antiproliferation properties and cellular antioxidant activities of commonly consumed food legumes against nine human cancer cell lines. *Food Chemistry*. 2012;134(3):1287-96.
275. Wang S, Meckling KA, Marccone MF, Kakuda Y, Proulx A, Tsao R. *In vitro* antioxidant synergism and antagonism between food extracts can lead to similar activities in H₂O₂-induced cell death, caspase-3 and MMP-2 activities in H9c2 cells. *J Sci Food Agric*. 2012;92(15):2983-93.
276. Rojas Á, Gallego P, Gil-Gómez A, Muñoz-Hernández R, Rojas L, Maldonado R, et al. Natural Extracts Abolished Lipid Accumulation in Cells Harboring non-favourable PNPLA3 genotype. *Annals of Hepatology*. 2018;17(2):242-9.
277. Lee HJ, Kim MJ. Metabolites of oregano (*Origanum vulgare*) seed and their anti-obesity effects on 3T3-L1 adipocytes through down-regulated adipogenesis. *Food Sci Biotechnol*. 2022;31(7):867-78.
278. Kitano-Okada T, Ito A, Koide A, Nakamura Y, Han K, Shimada K, et al. Anti-obesity role of adzuki bean extract containing polyphenols: *in vivo* and *in vitro* effects. *J Sci Food Agric*. 2012;92(13):2644-51.
279. Niu S, Chen S, Chen X, Ren Q, Yue L, Pan X, et al. Semaglutide ameliorates metabolism and hepatic outcomes in an NAFLD mouse model. *Front Endocrinol*. 9 de diciembre de 2022;13:1046130.
280. Woods SC, Seeley RJ, Rushing PA, D'Alessio D, Tso P. A Controlled High-Fat Diet Induces an Obese Syndrome in Rats. *The Journal of Nutrition*. 2003;133(4):1081-7.

281. Merroun I, Sánchez-González C, Martínez R, López-Chaves C, Porres JM, Aranda P, et al. Novel effects of the cannabinoid inverse agonist AM 251 on parameters related to metabolic syndrome in obese Zucker rats. *Metabolism*. 2013;62(11):1641-50.
282. Conte M, Martucci M, Sandri M, Franceschi C, Salvioli S. The Dual Role of the Pervasive “Fattish” Tissue Remodeling With Age. *Front Endocrinol*. 2019;10:114.
283. Lasker S, Rahman MM, Parvez F, Zamila M, Miah P, Nahar K, et al. High-fat diet-induced metabolic syndrome and oxidative stress in obese rats are ameliorated by yogurt supplementation. *Sci Rep*. 2019;9(1):20026.
284. Xie Z, Li H, Wang K, Lin J, Wang Q, Zhao G, et al. Analysis of transcriptome and metabolome profiles alterations in fatty liver induced by high-fat diet in rat. *Metabolism*. 2010;59(4):554-60.
285. Lin YY, Hsieh PS, Cheng YJ, Cheng SM, Chen C nan, Huang CY, et al. Anti-apoptotic and Pro-survival Effects of Food Restriction on High-Fat Diet-Induced Obese Hearts. *Cardiovasc Toxicol*. 2017;17(2):163-74.
286. Cole MA, Murray AJ, Cochlin LE, Heather LC, McAleese S, Knight NS, et al. A high fat diet increases mitochondrial fatty acid oxidation and uncoupling to decrease efficiency in rat heart. *Basic Res Cardiol*. 2011;106(3):447-57.
287. Yang Y, Yu J, Huo J, Yang L, Yan Y. Protective effects of peanut skin extract on high-fat and high-fructose diet-induced kidney injury in rats. *Food Sci Biotechnol*. 2023;32(8):1091-9.
288. De Castro UGM, Dos Santos RASAS, Silva ME, De Lima WG, Campagnole-Santos MJ, Alzamora AC. Age-dependent effect of high-fructose and high-fat diets on lipid metabolism and lipid accumulation in liver and kidney of rats. *Lipids Health Dis*. 2013;12(1):136.
289. Wondmkun YT. Obesity, Insulin Resistance, and Type 2 Diabetes: Associations and Therapeutic Implications. *DMSO*. 2020;Volume 13:3611-6.
290. Utzschneider KM, Kahn SE. The Role of Insulin Resistance in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2006;91(12):4753-61.
291. Apaijai N, Arinno A, Palee S, Pratchayasakul W, Kerdphoo S, Jaiwongkam T, et al. High-Saturated Fat High-Sugar Diet Accelerates Left-Ventricular Dysfunction Faster than High-Saturated Fat Diet Alone via Increasing Oxidative Stress and Apoptosis in Obese-Insulin Resistant Rats. *Molecular Nutrition Food Res*. 2019;63(2):1800729.
292. Kolb H, Kempf K, Martin S. Insulin and aging – a disappointing relationship. *Front Endocrinol*. 2023;14:1261298.
293. Jakobsdottir G, Xu J, Molin G, Ahrné S, Nyman M. High-Fat Diet Reduces the Formation of Butyrate, but Increases Succinate, Inflammation, Liver Fat and

- Cholesterol in Rats, while Dietary Fibre Counteracts These Effects. Bassaganya-Riera J, editor. PLoS ONE. 2013;8(11):e80476.
294. Devi J, Rajkumar J. Effect of Ambrex (A Herbal Formulation) on Hematological Variables in Hyperlipidemic Rats. *Pakistan J of Biological Sciences*. 2014;17(5):740-3.
295. Dworzański W, Sembratowicz I, Cholewińska E, Tutaj K, Fotschki B, Juśkiewicz J, et al. Effects of Different Chromium Compounds on Hematology and Inflammatory Cytokines in Rats Fed High-Fat Diet. *Front Immunol*. 2021;12:614000.
296. Hernández GN, Dabin C, Del C. Gayol M, Rasia ML. Haemorheological Variables in a Rat Model of Hypertriglyceridaemic Obesity and Diabetes. *Veterinary Research Communications*. 2002;26(8):625-35.
297. Vial G, Dubouchaud H, Couturier K, Cottet-Rousselle C, Taleux N, Athias A, et al. Effects of a high-fat diet on energy metabolism and ROS production in rat liver. *Journal of Hepatology*. 2011;54(2):348-56.
298. Zhukova NV, Novgorodtseva TP, Denisenko YK. Effect of the prolonged high-fat diet on the fatty acid metabolism in rat blood and liver. *Lipids Health Dis*. 2014;13(1):49.
299. Kohjima M, Enjoji M, Higuchi N, Kato M, Kotoh K, Yoshimoto T, et al. Re-evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med [Internet]*. 2007 [citado 23 de enero de 2024]; Disponible en: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijmm.20.3.351>
300. Ciapaite J, Van Den Broek NM, Te Brinke H, Nicolay K, Jeneson JA, Houten SM, et al. Differential effects of short- and long-term high-fat diet feeding on hepatic fatty acid metabolism in rats. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2011;1811(7-8):441-51.
301. Ravaut G, Légiot A, Bergeron KF, Mounier C. Monounsaturated Fatty Acids in Obesity-Related Inflammation. *IJMS*. 2020;22(1):330.
302. Kristiansen MNB, Veidal SS, Christoffersen C, Jelsing J, Rigbolt KTG. Molecular Characterization of Microvesicular and Macrovesicular Steatosis Shows Widespread Differences in Metabolic Pathways. *Lipids*. 2019;54(1):109-15.
303. Piazzolla VA, Mangia A. Noninvasive Diagnosis of NAFLD and NASH. *Cells*. 2020;9(4):1005.
304. Idilman IS, Ozdeniz I, Karcaaltincaba M. Hepatic Steatosis: Etiology, Patterns, and Quantification. *Seminars in Ultrasound, CT and MRI*. 2016;37(6):501-10.
305. Orhan Metin N, Karaosmanoglu AD, Metin Y, Karcaaltincaba M. Focal hypersteatosis: a pseudolesion in patients with liver steatosis. *Diagn Interv Radiol*. 2019;25(1):14-20.
306. Unal E, Ozmen MN, Akata D, Karcaaltincaba M. Imaging of aberrant left gastric vein and associated pseudolesions of segments II and III of the liver and mimickers. *Diagn Interv Radiol*. 2015;21(2):105-10.

307. Bandera Merchan B, Tinahones FJ, Macías-González M. Commonalities in the Association between PPARG and Vitamin D Related with Obesity and Carcinogenesis. *PPAR Research*. 2016;2016:1-15.
308. Flamment M, Rieusset J, Vidal H, Simard G, Malthiery Y, Fromenty B, et al. Regulation of hepatic mitochondrial metabolism in response to a high fat diet: a longitudinal study in rats. *J Physiol Biochem*. 2012;68(3):335-44.
309. Trépo E, Romeo S, Zucman-Rossi J, Nahon P. PNPLA3 gene in liver diseases. *Journal of Hepatology*. 2016;65(2):399-412.
310. Eberlé D, Hegarty B, Bossard P, Ferré P, Foufelle F. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie*. 2004;86(11):839-48.
311. Lee YK, Park JE, Lee M, Hardwick JP. Hepatic lipid homeostasis by peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2. *Liver Research*. 2018;2(4):209-15.
312. Takeuchi K, Reue K. Biochemistry, physiology, and genetics of GPAT, AGPAT, and lipin enzymes in triglyceride synthesis. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2009;296(6):E1195-209.
313. Ulla A, Alam MA, Sikder B, Sumi FA, Rahman MM, Habib ZF, et al. Supplementation of *Syzygium cumini* seed powder prevented obesity, glucose intolerance, hyperlipidemia and oxidative stress in high carbohydrate high fat diet induced obese rats. *BMC Complement Altern Med*. 2017;17(1):289.
314. Tomankova V, Anzenbacher P, Anzenbacherova E. Effects of obesity on liver cytochromes P450 in various animal models. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2017;161(2):144-51.
315. Ciapaite J, Bakker SJL, Van Eikenhorst G, Wagner MJ, Teerlink T, Schalkwijk CG, et al. Functioning of oxidative phosphorylation in liver mitochondria of high-fat diet fed rats. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2007;1772(3):307-16.
316. Benard O, Lim J, Apontes P, Jing X, Angeletti RH, Chi Y. Impact of high-fat diet on the proteome of mouse liver. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2016;31:10-9.
317. Longhi R, Almeida RF, Machado L, Duarte MMMF, Souza DG, Machado P, et al. Effect of a trans fatty acid-enriched diet on biochemical and inflammatory parameters in Wistar rats. *Eur J Nutr*. 2017;56(3):1003-16.
318. Cadenas S. Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2018;1859(9):940-50.
319. Penning TM. Aldo-Keto Reductase Regulation by the Nrf2 System: Implications for Stress Response, Chemotherapy Drug Resistance, and Carcinogenesis. *Chem Res Toxicol*. 2017;30(1):162-76.

320. Di Francesco A, Choi Y, Bernier M, Zhang Y, Diaz-Ruiz A, Aon MA, et al. NQO1 protects obese mice through improvements in glucose and lipid metabolism. *npj Aging Mech Dis.* 2020;6(1):13.
321. Li S, Eguchi N, Lau H, Ichii H. The Role of the Nrf2 Signaling in Obesity and Insulin Resistance. *IJMS.* 2020;21(18):6973.
322. Li JW, Fang B, Pang GF, Zhang M, Ren FZ. Age- and diet-specific effects of chronic exposure to chlorpyrifos on hormones, inflammation and gut microbiota in rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* 2019;159:68-79.
323. Pang Y, Zheng Y, Yang N, Zan M, Zhang L, Ding W. Potential novel biomarkers in small intestine for obesity/obesity resistance revealed by multi-omics analysis. *Lipids Health Dis.* 2022;21(1):98.
324. Zhao H, Chen R, Zheng D, Xiong F, Jia F, Liu J, et al. Modified Banxia Xiexin Decoction Ameliorates Polycystic Ovarian Syndrome With Insulin Resistance by Regulating Intestinal Microbiota. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022;12:854796.
325. Pekkala S, Lensu S, Nokia M, Vanhatalo S, Koch LG, Britton SL, et al. Intrinsic aerobic capacity governs the associations between gut microbiota composition and fat metabolism age-dependently in rat siblings. *Physiological Genomics.* 2017;49(12):733-46.
326. Hazell TJ, Islam H, Townsend LK, Schmale MS, Copeland JL. Effects of exercise intensity on plasma concentrations of appetite-regulating hormones: Potential mechanisms. *Appetite.* 2016;98:80-8.
327. Perez-Leighton C, Kerr B, Scherer PE, Baudrand R, Cortés V. The interplay between leptin, glucocorticoids, and GLP1 regulates food intake and feeding behaviour. *Biological Reviews [Internet].* Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/brv.13039>
328. Blundell J, Finlayson G, Axelsen M, Flint A, Gibbons C, Kvist T, et al. Effects of once-weekly semaglutide on appetite, energy intake, control of eating, food preference and body weight in subjects with obesity. *Diabetes Obesity Metabolism.* 2017;19(9):1242-51.
329. Bernardis LL. Prediction of carcass fat, water and lean body mass from Lee's 'nutritive ratio' in rats with hypothalamic obesity. *Experientia.* 1970;26(7):789-90.
330. Bruss MD, Khambatta CF, Ruby MA, Aggarwal I, Hellerstein MK. Calorie restriction increases fatty acid synthesis and whole body fat oxidation rates. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism.* 2010;298(1):E108-16.
331. Yaribeygi H, Maleki M, Butler AE, Jamialahmadi T, Sahebkar A. The Impact of Incretin-Based Medications on Lipid Metabolism. Sasaoka T, editor. *Journal of Diabetes Research.* 2021;2021:1-10.
332. Sabag A, Barr L, Armour M, Armstrong A, Baker CJ, Twigg SM, et al. The Effect of High-intensity Interval Training vs Moderate-intensity Continuous Training on

- Liver Fat: A Systematic Review and Meta-Analysis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2022;107(3):862-81.
333. Kim M, Pichiah PBT, Kim DK, Cha YS. Black adzuki bean (*Vigna angularis*) extract exerts phenotypic effects on white adipose tissue and reverses liver steatosis in diet-induced obese mice: Antiobesity and Antisteatotic Effects of Black Adzuki Beans. *Journal of Food Biochemistry*. 2017;41(2):e12333.
334. Nagamma T, Konuri A, Bhat KMR, Udupa PEG, Nayak Y. *Trigonella foenum-graecum* L. seed extract modulates biochemical and histomorphological changes in therapeutic model of high-fat diet-fed ovariectomized rats. *3 Biotech*. 2023;13(8):285.
335. Mohamed OE, Nabil ZI, Gad El-Hak HN, Abdelrazek HMA. Amelioratory Effect of Aqueous Leaf Extract of *Origanum majorana* on some Liver Function and Histological Alteration of the Liver in Experimentally Obese Rats. *JAVR*. 2024;13(10):2138-41.
336. Deng A, Liu F, Tang X, Wang Y, Xie P, Yang Q, et al. Water extract from artichoke ameliorates high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in rats. *BMC Complement Med Ther*. 2022;22(1):308.
337. Türk Y, Theel W, Kasteleyn MJ, Franssen FME, Hiemstra PS, Rudolphus A, et al. High intensity training in obesity: a Meta-analysis: High intensity training in obesity. *Obesity Science & Practice*. 2017;3(3):258-71.
338. Ingersen A, Schmücker M, Alexandersen C, Graungaard B, Thorngreen T, Borch J, et al. Effects of Aerobic Training and Semaglutide Treatment on Pancreatic β -Cell Secretory Function in Patients With Type 2 Diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2023;108(11):2798-811.
339. Wägner AM, Miranda-Calderín G, Ugarte-Lopetegui MA, Marrero-Santiago H, Suárez-Castellano L, López-Madrado MJ, et al. Effect of liraglutide on physical performance in type 2 diabetes: Results of a randomized, double-blind, controlled trial (LIPER2). *Diabetes & Metabolism*. 2019;45(3):268-75.
340. Scalzo RL, Moreau KL, Ozemek C, Herlache L, McMillin S, Gilligan S, et al. Exenatide improves diastolic function and attenuates arterial stiffness but does not alter exercise capacity in individuals with type 2 diabetes. *Journal of Diabetes and its Complications*. 2017;31(2):449-55.
341. Wu L, Zhou M, Li T, Dong N, Yi L, Zhang Q, et al. GLP-1 regulates exercise endurance and skeletal muscle remodeling via GLP-1R/AMPK pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2022;1869(9):119300.
342. Ramos-Jiménez A, Hernández-Torres RP, Torres-Durán PV, Romero-Gonzalez J, Mascher D, Posadas-Romero C, et al. The Respiratory Exchange Ratio is Associated with Fitness Indicators Both in Trained and Untrained Men: A Possible Application for People with Reduced Exercise Tolerance. *Clinical medicine Circulatory, respiratory and pulmonary medicine*. 2008;2:CCRPM.S449.

343. Kim C, Kim MB, Hwang JK. Red Bean Extract Inhibits Immobilization-Induced Muscle Atrophy in C57BL/6N Mice. *Journal of Medicinal Food*. 2020;23(1):29-36.
344. Ikeuchi M, Yamaguchi K, Koyama T, Sono Y, Yazawa K. Effects of Fenugreek Seeds (*Trigonella foenum graecum*) Extract on Endurance Capacity in Mice. *J Nutr Sci Vitaminol*. 2006;52(4):287-92.
345. Ruby BC, Gaskill SE, Slivka D, Harger SG. The addition of fenugreek extract (*Trigonella foenum-graecum*) to glucose feeding increases muscle glycogen resynthesis after exercise. *Amino Acids*. 2005;28(1):71-6.
346. Pinto C, Ninfolo E, Gaggiano L, Benedetti A, Marzioni M, Maroni L. Aging and the Biological Response to Liver Injury. *Semin Liver Dis*. 2020;40(03):225-32.
347. Aguiar LM, Moura CSD, Ballard CR, Roquette AR, Silva Maia JKD, Duarte GHB, et al. Metabolic dysfunctions promoted by AIN-93G standard diet compared with three obesity-inducing diets in C57BL/6J mice. *Current Research in Physiology*. 2022;5:436-44.
348. Farias Santos J, Suruagy Amaral M, Lima Oliveira S, Porto Barbosa J, Rego Cabral CJ, Sofia Melo I, et al. Dietary intake of ain-93 standard diet induces Fatty liver with altered hepatic fatty acid profile in Wistar rats. *Nutr Hosp*. 2015;31(5):2140-6.
349. Yan S, Liu S, Qu J, Li X, Hu J, Zhang L, et al. A Lard and Soybean Oil Mixture Alleviates Low-Fat-High-Carbohydrate Diet-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Mice. *Nutrients*. 2022;14(3):560.
350. Tamer F, Ulug E, Akyol A, Nergiz-Unal R. The potential efficacy of dietary fatty acids and fructose induced inflammation and oxidative stress on the insulin signaling and fat accumulation in mice. *Food and Chemical Toxicology*. 2020;135:110914.
351. Vizuite J, Camero A, Malakouti M, Garapati K, Gutierrez J. Perspectives on Nonalcoholic Fatty Liver Disease: An Overview of Present and Future Therapies. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*. 2017;5(1):67-75.
352. Gonçalves IO, Passos E, Rocha-Rodrigues S, Diogo CV, Torrella JR, Rizo D, et al. Physical exercise prevents and mitigates non-alcoholic steatohepatitis-induced liver mitochondrial structural and bioenergetics impairments. *Mitochondrion*. 2014;15:40-51.
353. Zhou T, Niu M, Liu R, Li L. Effect of Aerobic Exercise on Lipid Metabolism in Rats With NAFLD. *Front Genet*. 16 de junio de 2022;13:901827.
354. Kistler KD, Brunt EM, Clark JM, Diehl AM, Sallis JF, Schwimmer JB. Physical Activity Recommendations, Exercise Intensity, and Histological Severity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *American Journal of Gastroenterology*. 2011;106(3):460-8.
355. Bayram HM, Majoo FM, Ozturkcan A. Polyphenols in the prevention and treatment of non-alcoholic fatty liver disease: An update of preclinical and clinical studies. *Clinical Nutrition ESPEN*. 2021;44:1-14.

356. Guo F, Chen D, Tsao R, Shahidi F, Xiong H, Zhang H, et al. Effects of dietary supplementation with green lentil (*Lens culinaris*) hulls on NAFLD: Focus on intestinal and hepatic metabolism. *Food Bioscience*. 2024;59:103851.
357. Ben Salem M, Affes H, Dhouibi R, Charfi S, Turki M, Hammami S, et al. Effect of Artichoke (*cynara scolymus*) on cardiac markers, lipid profile and antioxidants levels in tissue of HFD-induced obesity. *Archives of Physiology and Biochemistry*. 2022;128(1):184-94.
358. Raju J, Bird RP. Alleviation of hepatic steatosis accompanied by modulation of plasma and liver TNF- α levels by *Trigonella foenum graecum* (fenugreek) seeds in Zucker obese (fa/fa) rats. *Int J Obes*. 2006;30(8):1298-307.
359. Mohamed WS, Mostafa AM, Mohamed KM, Serwah AH. Effects of fenugreek, *Nigella*, and *termis* seeds in nonalcoholic fatty liver in obese diabetic albino rats. *Arab Journal of Gastroenterology*. 2015;16(1):1-9.
360. Lee H, Bae J, Park KW, Kim M. Ethyl acetate fraction of oregano seed protects non-alcoholic fatty liver in high-fat diet-induced obese mice through modulation of *Srebp-1c*. *Food Science & Nutrition*. 2024;fsn3.3939.
361. Pandey A, Bigoniya P, Raj V, Patel K. Pharmacological screening of *Coriandrum sativum* Linn. for hepatoprotective activity. *J Pharm Bioall Sci*. 2011;3(3):435.
362. Jibril MM, Haji-Hamid A, Abas F, Karrupan J, Mohammed AS, Jaafar AH, et al. Watermelon (*Citrullus lanatus*) leaf extract attenuates biochemical and histological parameters in high-fat diet/streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Food Biochemistry* [Internet]. 2022 [citado 12 de abril de 2024];46(2). Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jfbc.14058>
363. Saad ZA, Khodeer DM, Zaitone SA, Ahmed AAM, Moustafa YM. Exenatide ameliorates experimental non-alcoholic fatty liver in rats via suppression of toll-like receptor 4/NF κ B signaling: Comparison to metformin. *Life Sciences*. 2020;253:117725.
364. Zhou R, Lin C, Cheng Y, Zhuo X, Li Q, Xu W, et al. Liraglutide Alleviates Hepatic Steatosis and Liver Injury in T2MD Rats via a GLP-1R Dependent AMPK Pathway. *Front Pharmacol*. 2021;11:600175.
365. Li R, Ye Z, She D, Fang P, Zong G, Hu K, et al. Semaglutide May Alleviate Hepatic Steatosis in T2DM Combined with NFALD Mice via miR-5120/ABHD6. *DDDT*. 2022;Volume 16:3557-72.
366. Barakat H, Alshimali SI, Almutairi AS, Alkhurayji RI, Almutiri SM, Aljutaily T, et al. Antioxidative potential and ameliorative effects of green lentil (*Lens culinaris* M.) sprouts against CCl₄-induced oxidative stress in rats. *Front Nutr*. 2022;9:1029793.
367. Meenu M, Chen P, Mradula M, Chang SKC, Xu B. New insights into chemical compositions and health-promoting effects of black beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Frontiers*. 2023;4(3):1019-38.

368. Ozbek H, Acikara OB, Oz BE, Ozbilgin S, Kirmizi NI, Ozrenk BC, et al. Antidiabetic activity evaluation of *Onobrychis* species on alloxan-induced diabetic mice. *Braz J Pharm Sci.* 2019;55:e18157.
369. Hebi M, Eddouks M. Leaf Aqueous Extract of *Argania spinosa* Exhibits Antihyperglycemic Effect in Diabetic Rats. *CHAMC.* 2019;17(1):64-71.
370. Yu H, Zhang P, Liu H, Sun X, Liang J, Sun L, et al. Hypoglycemic activity of *Origanum vulgare* L. and its main chemical constituents identified with HPLC-ESI-QTOF-MS. *Food Funct.* 2021;12(6):2580-90.
371. Aissaoui A, Zizi S, Israili ZH, Lyoussi B. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of *Coriandrum sativum* L. in *Meriones shawi* rats. *Journal of Ethnopharmacology.* 2011;137(1):652-61.
372. Biswas R, Chattopadhyay A, Datta De S. Hypoglycemic and Hypolipidemic effects of Watermelon (*Citrullus vulgaris*) Seed Kernels on Male Albino Rats. *Curr Res Nutr Food Sci.* 2017;5(3):368-73.
373. Fantini N, Colombo G, Giori A, Riva A, Morazzoni P, Bombardelli E, et al. Evidence of glycemia-lowering effect by a *Cynara scolymus* L. extract in normal and obese rats. *Phytotherapy Research.* 2011;25(3):463-6.
374. Xiang J, Qin L, Zhong J, Xia N, Liang Y. GLP-1RA Liraglutide and Semaglutide Improves Obesity-Induced Muscle Atrophy via SIRT1 Pathway. *DMSO.* 2023;Volume 16:2433-46.
375. Qian P, Tian H, Wang Y, Lu W, Li Y, Ma T, et al. A novel oral glucagon-like peptide 1 receptor agonist protects against diabetic cardiomyopathy via alleviating cardiac lipotoxicity induced mitochondria dysfunction. *Biochemical Pharmacology.* 2020;182:114209.
376. Ye Q, Liu Y, Zhang G, Deng H, Wang X, Tuo L, et al. Deficiency of gluconeogenic enzyme PCK1 promotes metabolic-associated fatty liver disease through PI3K/AKT/PDGF axis activation in male mice. *Nat Commun.* 2023;14(1):1402.
377. Shimobayashi M, Thomas A, Shetty S, Frei IC, Wölnerhanssen BK, Weissenberger D, et al. Diet-induced loss of adipose hexokinase 2 correlates with hyperglycemia. *eLife.* 2023;12:e85103.
378. Sharma M, Aggarwal S, Nayar U, Vikram NK, Misra A, Luthra K. Differential expression of insulin receptor substrate-1(IRS-1) in visceral and subcutaneous adipose depots of morbidly obese subjects undergoing bariatric surgery in a tertiary care center in north India; SNP analysis and correlation with metabolic profile. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews.* 2021;15(3):981-6.
379. Peter A, Stefan N, Cegan A, Walenta M, Wagner S, Königsrainer A, et al. Hepatic Glucokinase Expression Is Associated with Lipogenesis and Fatty Liver in Humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2011;96(7):E1126-30.

380. Iynedjian PB. Molecular Physiology of Mammalian Glucokinase. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66(1):27.
381. Chen J, Deng LL, Xiao XL, Long SY, Deng Y, Peng T, et al. An Association between Decreased Small Intestinal RNA Modification and Disturbed Glucagon-like Peptide-1 Secretion under High-Fat Diet Stress. *Nutrients.* 2023;15(17):3707.
382. Kim S, Hong J, Jeon R, Kim HS. Adzuki bean ameliorates hepatic lipogenesis and proinflammatory mediator expression in mice fed a high-cholesterol and high-fat diet to induce nonalcoholic fatty liver disease. *Nutrition Research.* 2016;36(1):90-100.
383. Hong MY, Beidler J, Hooshmand S, Figueroa A, Kern M. Watermelon and l-arginine consumption improve serum lipid profile and reduce inflammation and oxidative stress by altering gene expression in rats fed an atherogenic diet. *Nutrition Research.* 2018;58:46-54.
384. Park CY, Park S, Kim MS, Kim HK, Han SN. Effects of mild calorie restriction on lipid metabolism and inflammation in liver and adipose tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2017;490(3):636-42.
385. Takahashi TM, Sunagawa GA, Soya S, Abe M, Sakurai K, Ishikawa K, et al. A discrete neuronal circuit induces a hibernation-like state in rodents. *Nature.* 2020;583(7814):109-14.
386. Calderon-Dominguez M, Sebastián D, Fucho R, Weber M, Mir JF, García-Casarrubios E, et al. Carnitine Palmitoyltransferase 1 Increases Lipolysis, UCP1 Protein Expression and Mitochondrial Activity in Brown Adipocytes. López M, editor. *PLoS ONE.* 2016;11(7):e0159399.
387. Phinney S, Tang A, Waggoner C, Tezanos-Pinto R, Davis P. The transient hypercholesterolemia of major weight loss. *The American Journal of Clinical Nutrition.* 1991;53(6):1404-10.
388. Goedeke L, Fernández-Hernando C. Regulation of cholesterol homeostasis. *Cell Mol Life Sci.* 2012;69(6):915-30.
389. Lu J, Shang X, Yao B, Sun D, Liu J, Zhang Y, et al. The role of CYP1A1/2 in cholesterol ester accumulation provides a new perspective for the treatment of hypercholesterolemia. *Acta Pharmaceutica Sinica B.* 2023;13(2):648-61.
390. Di Paolo NC, Shayakhmetov DM. Interleukin 1 α and the inflammatory process. *Nat Immunol.* 2016;17(8):906-13.
391. Ihim SA, Abubakar SD, Zian Z, Sasaki T, Saffarioun M, Maleknia S, et al. Interleukin-18 cytokine in immunity, inflammation, and autoimmunity: Biological role in induction, regulation, and treatment. *Front Immunol.* 2022;13:919973.
392. Molla MD, Akalu Y, Geto Z, Dagnew B, Ayelign B, Shibabaw T. Role of Caspase-1 in the Pathogenesis of Inflammatory-Associated Chronic Noncommunicable Diseases. *JIR.* 2020;Volume 13:749-64.

393. Kuzmich N, Sivak K, Chubarev V, Porozov Y, Savateeva-Lyubimova T, Peri F. TLR4 Signaling Pathway Modulators as Potential Therapeutics in Inflammation and Sepsis. *Vaccines*. 2017;5(4):34.
394. El Kamouni S, El Kebbaj R, Andreoletti P, El Ktaibi A, Rharrassi I, Essamadi A, et al. Protective Effect of Argan and Olive Oils against LPS-Induced Oxidative Stress and Inflammation in Mice Livers. *IJMS*. 2017;18(10):2181.
395. Ahmadi A, Heidarian E, Ghatreh-Samani K. Modulatory effects of artichoke (*Cynara scolymus* L.) leaf extract against oxidative stress and hepatic TNF- α gene expression in acute diazinon-induced liver injury in rats. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*. 2019;30(5):20180180.
396. Wang Y, Parlevliet ET, Geerling JJ, Van Der Tuin SJL, Zhang H, Bieghs V, et al. Exendin-4 decreases liver inflammation and atherosclerosis development simultaneously by reducing macrophage infiltration. *British J Pharmacology*. 2014;171(3):723-34.
397. Bang-Berthelsen CH, Holm TL, Pyke C, Simonsen L, Søkilde R, Pociot F, et al. GLP-1 Induces Barrier Protective Expression in Brunner's Glands and Regulates Colonic Inflammation: Inflammatory Bowel Diseases. 2016;22(9):2078-97.
398. Atic AI, Thiele M, Munk A, Dalgaard LT. Circulating miRNAs associated with nonalcoholic fatty liver disease. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2023;324(2):C588-602.
399. Pirola CJ, Fernández Gianotti T, Castaño GO, Mallardi P, San Martino J, Mora Gonzalez Lopez Ledesma M, et al. Circulating microRNA signature in non-alcoholic fatty liver disease: from serum non-coding RNAs to liver histology and disease pathogenesis. *Gut*. 2015;64(5):800-12.
400. Auguet T, Aragonès G, Berlanga A, Guiu-Jurado E, Martí A, Martínez S, et al. miR33a/miR33b* and miR122 as Possible Contributors to Hepatic Lipid Metabolism in Obese Women with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *IJMS*. 2016;17(10):1620.
401. Baselga-Escudero L, Pascual-Serrano A, Ribas-Latre A, Casanova E, Salvadó MJ, Arola L, et al. Long-term supplementation with a low dose of proanthocyanidins normalized liver miR-33a and miR-122 levels in high-fat diet-induced obese rats. *Nutrition Research*. 2015;35(4):337-45.
402. Seeger T, Fischer A, Muhly-Reinholz M, Zeiher AM, Dimmeler S. Long-term inhibition of miR-21 leads to reduction of obesity in db/db mice: Long-Term Inhibition of miR-21. *Obesity*. 2014;22(11):2352-60.
403. Zhang T, Yang Z, Kusumanchi P, Han S, Liangpunsakul S. Critical Role of microRNA-21 in the Pathogenesis of Liver Diseases. *Front Med*. 2020;7:7.
404. López-Sánchez GN, Domínguez-Pérez M, Uribe M, Chávez-Tapia NC, Nuño-Lámbardi N. Non-alcoholic fatty liver disease and microRNAs expression, how it affects the development and progression of the disease. *Annals of Hepatology*. 2021;21:100212.

405. Wang Z, Zhu Y, Xia L, Li J, Song M, Yang C. Exercise-Induced ADAR2 Protects against Nonalcoholic Fatty Liver Disease through miR-34a. *Nutrients*. 2022;15(1):121.
406. De Gonzalo-Calvo D, Dávalos A, Fernández-Sanjurjo M, Amado-Rodríguez L, Díaz-Coto S, Tomás-Zapico C, et al. Circulating microRNAs as emerging cardiac biomarkers responsive to acute exercise. *International Journal of Cardiology*. 2018;264:130-6.
407. De La Fuente-Muñoz M, De La Fuente-Fernández M, Román-Carmena M, Amor S, Iglesias-de La Cruz MC, García-Laínez G, 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. *IJMS*. 2023;24(10):8521.
408. Liu Y, Beyer A, Aebersold R. On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. *Cell*. 2016;165(3):535-50.
409. Martínez R, Guzmán A, Kapravelou G, Melguizo C, Bermúdez F, Prados J, et al. Argan pulp as a novel functional ingredient with beneficial effects on multiple metabolism biomarkers. *Journal of Functional Foods*. 2023;110:105864.
410. Jung YS, Lee SH, Chun SY, Kim DH, Jang BI, Han MH, et al. In Vitro and In Vivo Protective Effects of Lentil (*Lens culinaris*) Extract against Oxidative Stress-Induced Hepatotoxicity. *Molecules*. 2021;27(1):59.
411. Essadek S, Bouchab H, El Kebbaj R, Gondcaille C, El Kamouni S, Savary S, et al. Effects of a Short-Term Lipopolysaccharides Challenge on Mouse Brain and Liver Peroxisomal Antioxidant and β -oxidative Functions: Protective Action of Argan Oil. *Pharmaceuticals*. 12 de abril de 2022;15(4):465.
412. Machado IF, Miranda RG, Dorta DJ, Rolo AP, Palmeira CM. Targeting Oxidative Stress with Polyphenols to Fight Liver Diseases. *Antioxidants*. 2023;12(6):1212.
413. Sharifi-Rigi A, Heidarian E, Amini SA. Protective and anti-inflammatory effects of hydroalcoholic leaf extract of *Origanum vulgare* on oxidative stress, TNF- α gene expression and liver histological changes in paraquat-induced hepatotoxicity in rats. *Archives of Physiology and Biochemistry*. 2019;125(1):56-63.
414. Kajal A, Singh R. *Coriandrum sativum* improve neuronal function via inhibition of oxidative/nitrosative stress and TNF- α in diabetic neuropathic rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2020;263:112959.
415. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione Transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005;45(1):51-88.
416. Soto-Catalán M, Opazo-Ríos L, Quiceno H, Lázaro I, Moreno JA, Gómez-Guerrero C, et al. Semaglutide Improves Liver Steatosis and De Novo Lipogenesis Markers in Obese and Type-2-Diabetic Mice with Metabolic-Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease. *IJMS*. 2024;25(5):2961.

417. Lyu X, Yan K, Wang X, Xu H, Guo X, Zhu H, et al. A novel anti-obesity mechanism for liraglutide by improving adipose tissue leptin resistance in high-fat diet-fed obese mice. *Endocr J.* 2022;69(10):1233-44.
418. Shu Y, He X, Wu P, Liu Y, Ding Y, Zhang Q. Gastrointestinal adverse events associated with semaglutide: A pharmacovigilance study based on FDA adverse event reporting system. *Front Public Health.* 2022;10:996179.
419. Ye Y, Xu H, Xie Z, Wang L, Sun Y, Yang H, et al. Time-Restricted Feeding Reduces the Detrimental Effects of a High-Fat Diet, Possibly by Modulating the Circadian Rhythm of Hepatic Lipid Metabolism and Gut Microbiota. *Front Nutr.* 2020;7:596285.
420. Niwano Y, Kohzaki H, Shirato M, Shishido S, Nakamura K. Putative Mechanisms Underlying the Beneficial Effects of Polyphenols in Murine Models of Metabolic Disorders in Relation to Gut Microbiota. *CIMB.* 2022;44(3):1353-75.
421. Lutsiv T, Weir TL, McGinley JN, Neil ES, Wei Y, Thompson HJ. Compositional Changes of the High-Fat Diet-Induced Gut Microbiota upon Consumption of Common Pulses. *Nutrients.* 2021;13(11):3992.
422. Zhao Q, Hou D, Fu Y, Xue Y, Guan X, Shen Q. Adzuki Bean Alleviates Obesity and Insulin Resistance Induced by a High-Fat Diet and Modulates Gut Microbiota in Mice. *Nutrients.* 2021;13(9):3240.
423. Wang X, Liu Y, Wang Y, Dong X, Wang Y, Yang X, et al. Protective Effect of Coriander (*Coriandrum sativum* L.) on High-Fructose and High-Salt Diet-Induced Hypertension: Relevant to Improvement of Renal and Intestinal Function. *J Agric Food Chem.* 2022;70(12):3730-44.
424. Yang W, Liu Y, Yang G, Meng B, Yi Z, Yang G, et al. Moderate-Intensity Physical Exercise Affects the Exercise Performance and Gut Microbiota of Mice. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;11:712381.
425. Monda V, Villano I, Messina A, Valenzano A, Esposito T, Moscatelli F, et al. Exercise Modifies the Gut Microbiota with Positive Health Effects. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2017;2017:1-8.
426. Boytar AN, Skinner TL, Wallen RE, Jenkins DG, Dekker Nitert M. The Effect of Exercise Prescription on the Human Gut Microbiota and Comparison between Clinical and Apparently Healthy Populations: A Systematic Review. *Nutrients.* 2023;15(6):1534.
427. Liang C, Zhou X, Jiao Y, Guo M, Meng L, Gong P, et al. *Ligilactobacillus Salivarius* LCK11 Prevents Obesity by Promoting PYY Secretion to Inhibit Appetite and Regulating Gut Microbiota in C57BL/6J Mice. *Molecular Nutrition Food Res.* 2021;65(17):2100136.
428. Lee JY, Bae E, Kim HY, Lee KM, Yoon SS, Lee DC. High-Fat-Diet-Induced Oxidative Stress Linked to the Increased Colonization of *Lactobacillus sakei* in an Obese

Population. Cuomo CA, editor. *Microbiol Spectr.* 3 de septiembre de 2021;9(1):e00074-21.

429. Wang M, Zhang B, Hu J, Nie S, Xiong T, Xie M. Intervention of five strains of *Lactobacillus* on obesity in mice induced by high-fat diet. *Journal of Functional Foods.* 2020;72:104078.
430. Wolf G, Strahl A, Meisel J, Hammes WP. Heme-dependent catalase activity of lactobacilli. *International Journal of Food Microbiology.* 1991;12(2-3):133-40.
431. Guilbaud M, Zagorec M, Chaillou S, Champomier-Vergès MC. Intraspecies diversity of *Lactobacillus sakei* response to oxidative stress and variability of strain performance in mixed strains challenges. *Food Microbiology.* 2012;29(2):197-204.

ANEXO

Tabla 40. Distribución de los genes incluidos en el *OpenArray* en categorías según su función celular para el estudio de la expresión.

Gen	Proteína	Assay ID	Función
Akr7a3	<i>Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 3</i>	Rn00682418_m1	Estrés oxidativo
Dhcr24	<i>Delta(24)-sterol reductase</i> <i>Dimethylaniline</i>	Rn01417370_m1	Estrés oxidativo
Fmo2	<i>monooxygenase [N-oxide-forming] 2</i>	Rn00595179_m1	Estrés oxidativo
Gpx1	<i>Glutathione peroxidase 1</i>	Rn00577994_g1	Estrés oxidativo
Gpx2	<i>Glutathione peroxidase 2</i>	Rn07318608_g1	Estrés oxidativo
Gpx3	<i>Glutathione peroxidase 3</i>	Rn00574703_m1	Estrés oxidativo
Gstk1	<i>Glutathione S-transferase kappa 1</i>	Rn00710510_g1	Estrés oxidativo
HmoX1	<i>Heme oxygenase 1</i>	Rn00561387_m1	Estrés oxidativo
Nfe2l2	<i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>	Rn00582415_m1	Estrés oxidativo
Nos3	<i>Nitric oxide synthase 3</i>	Rn07312037_g1	Estrés oxidativo
Nqo1	<i>NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1</i>	Rn00566528_m1	Estrés oxidativo
Park7	<i>Parkinson disease protein 7 homolog</i>	Rn01516679_m1	Estrés oxidativo
Sirt3	<i>Sirtuin 3</i>	Rn01501410_m1	Estrés oxidativo
Sod1	<i>Superoxide dismutase [Cu-Zn]</i>	Rn00566938_m1	Estrés oxidativo
Txnip	<i>Thioredoxin-interacting protein</i>	Rn01533891_g1	Estrés oxidativo
Ucp2	<i>Uncoupling protein 2</i>	Rn01754856_m1	Estrés oxidativo
Casp1	<i>Caspase-1</i>	Rn00562724_m1	Inflamación
Ccl5	<i>C-C motif chemokine 5</i>	Rn00579590_m1	Inflamación
Ccr3	<i>C-C chemokine receptor type 3</i>	Rn00588614_m1	Inflamación
Ccr5	<i>C-C chemokine receptor type 5</i>	Rn00588629_m1	Inflamación

Cd40lg	CD40 ligand	Rn00584362_m1	Inflamación
Cx3cl1	Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	Rn00593186_m1	Inflamación
Cxcl10	C-X-C motif chemokine 10	Rn00594648_m1	Inflamación
Cxcr3	C-X-C chemokine receptor type 3	Rn00584689_m1	Inflamación
Cxcr4	C-X-C chemokine receptor type 4	Rn01483207_m1	Inflamación
Icam1	Intercellular adhesion molecule 1	Rn00564227_m1	Inflamación
Il10	Interleukin-10	Rn00563409_m1	Inflamación
Sell	L-selectin	Rn00569845_m1	Inflamación
Tlr4	Toll-like receptor 4	Rn01458370_m1	Inflamación
Il18	Interleukin-18	Rn01422083_m1	Inflamación
Il1a	Interleukin-1 alpha	Rn00566700_m1	Inflamación
Il1b	Interleukin-1 beta	Rn00580432_m1	Inflamación
Il33	Interleukin-33	Rn01759835_m1	Inflamación
Olr1	Oxidized low-density lipoprotein receptor 1	Rn00591116_m1	Inflamación
Ptgs1	Prostaglandin G/H synthase 1	Rn00566881_m1	Inflamación/Estrés oxidativo
Ptgs2	Prostaglandin G/H synthase 2	Rn01483828_m1	Inflamación/Lipogénesis
Tnfrsf1b	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B	Rn00709830_m1	Inflamación
Nfkbia	NF-kappa-B inhibitor alpha	Rn01473657_g1	Inflamación
Acaca	Acetyl-CoA carboxylase 1	Rn00573474_m1	Lipogénesis
Acacb	Acetyl-CoA carboxylase 2	Rn00588290_m1	Lipogénesis
Acly	ATP-citrate synthase	Rn00566411_m1	Lipogénesis
Acs13	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 3	Rn00589037_m1	Lipogénesis/Lipolisis
Acs14	Acyl-CoA synthetase long-	Rn00586179_m1	Lipogénesis/Lipolisis

	<i>chain family member 4</i>		/Inflamación
Acs15	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 5	Rn00586013_m1	Lipogénesis/Lipolisis
Acs16	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 6	Rn00590587_m1	Lipogénesis/Lipolisis
Agpat3	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 3	Rn01428230_m1	Lipogénesis
Cnr1	Cannabinoid receptor 1	Rn00562880_m1	Lipogénesis
Fabp4	Fatty acid binding protein 4	Rn00670361_m1	Lipogénesis
Fabp5	Fatty acid binding protein 5	Rn01461858_g1	Lipogénesis
Fasn	Fatty acid synthase 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase Patatin-like	Rn00569117_m1	Lipogénesis
Hmgcr	phospholipase domain containing 3	Rn00565598_m1	Lipogénesis
Pnpla3	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	Rn01502361_m1	Lipogénesis
Pparg	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha	Rn00440945_m1	Lipogénesis
Ppargc1a		Rn00580241_m1	Lipogénesis/Metabolismo glucídico
Scd1	Stearoyl-CoA desaturase 1	Rn00594894_g1	Lipogénesis
Srebf1	Sterol regulatory element-binding protein 1	Rn01495769_m1	Lipogénesis
Srebf2	Sterol regulatory element-binding protein 2	Rn01502638_m1	Lipogénesis
Acaa2	Acetyl-CoA acetyltransferase	Rn00590503_m1	Lipolisis
Acot12	Acyl-CoA thioesterase 12	Rn00679785_m1	Lipolisis
Acox1	Acyl-CoA oxidase 1	Rn01460628_m1	Lipolisis
Acsm5	Acyl-CoA synthetase	Rn01510064_m1	Lipolisis

	<i>medium-chain family</i>		
	<i>member 5</i>		
Cpt1a	Carnitine palmitoyltransferase 1A	Rn00580702_m1	Lipolisis
Cpt2	Carnitine palmitoyltransferase 2	Rn00563995_m1	Lipolisis
Crat	Carnitine O- acetyltransferase	Rn01758585_m1	Lipolisis
Crot	Carnitine O- octanoyltransferase	Rn01526940_m1	Lipolisis
Echs1	Enoyl-CoA hydratase, short chain 1	Rn00589588_m1	Lipolisis
Ehhadh	Enoyl-CoA hydratase and 3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase	Rn00592368_m1	Lipolisis
Hadha	Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase trifunctional multienzym complex subunit alpha	Rn00590828_m1	Lipolisis
Lipe	Lipase E, hormone sensitive type	Rn00563444_m1	Lipolisis
Lpl	Lipoprotein lipase	Rn00561482_m1	Lipolisis
Ppara	Peroxisome proliferator- activated receptor alpha	Rn00566193_m1	Lipolisis
Ppard	Peroxisome proliferator- activated receptor delta	Rn00565707_m1	Lipolisis
Ppargc1b	Peroxisome proliferator- activated receptor gamma coactivator 1-beta	Rn00598552_m1	Lipolisis
Prkaa1	Protein kinase AMP- activated catalytic subunit alpha 1	Rn00665045_m1	Lipolisis/Metabolismo glucídico
Prkaa2	Protein kinase AMP- activated catalytic subunit alpha 2	Rn00576935_m1	Lipolisis/Metabolismo glucídico

Rxra	<i>Retinoid X receptor alpha</i>	Rn00441185_m1	Lipolisis
Adipor2	<i>Adiponectin receptor 2</i>	Rn01463173_m1	Metabolismo glucídico y lipídico
Gcgr	<i>Glucagon receptor</i>	Rn00597158_m1	Metabolismo glucídico
Gck	<i>Glucokinase</i>	Rn00561265_m1	Metabolismo glucídico
Hk2	<i>Hexokinase 2</i>	Rn00562457_m1	Metabolismo glucídico
Gcg	<i>Glucagon</i>	Rn00562293_m1	Metabolismo glucídico
Akt2	<i>AKT serine/threonine kinase 2</i>	Rn00690900_m1	Metabolismo glucídico
Insr	<i>Insulin receptor</i>	Rn00690703_m1	Metabolismo glucídico
Irs1	<i>Insulin receptor substrate 1</i>	Rn02132493_s1	Metabolismo glucídico
Irs2	<i>Insulin receptor substrate 2</i>	Rn01482270_s1	Metabolismo glucídico
Pck1	<i>Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1</i>	Rn01529014_m1	Metabolismo glucídico/Lipogénesis
Pik3r1	<i>Phosphoinositide-3- kinase regulatory subunit 1</i>	Rn01644964_m1	Metabolismo glucídico
Slc2a4	<i>Solute carrier family 2 member 4</i>	Rn00562597_m1	Metabolismo glucídico
Sort1	<i>Sortilin 1</i>	Rn01521847_m1	Metabolismo glucídico y lipídico
Col26a1	<i>Collagen type XXVI alpha 1 chain</i>	Rn01499405_m1	Adhesión celular
Cdkn1a	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A</i>	Rn00589996_m1	Daño celular
Gadd45a	<i>Growth arrest and DNA- damage-inducible, alpha</i>	Rn00577049_m1	Daño celular
Mmp15	<i>Matrix metalloproteinase 15</i>	Rn01536925_m1	Estructura celular anatómica
Psmb9	<i>Proteasome 20S subunit beta 9</i>	Rn00562296_m1	Estructura celular anatómica
Cyp1a1	<i>Cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide</i>	Rn00487218_m1	Metabolismo colesterol

	1		
Cyp1a2	Cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide	Rn00561082_m1	Metabolismo colesterol
	2		
Cyp7a1	Cytochrome P450 family 7 subfamily A member 1	Rn00564065_m1	Metabolismo colesterol
Gdf15	Growth differentiation factor 15	Rn00570083_m1	Proliferación celular
Myc	MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor	Rn07310910_m1	Proliferación celular
Abcg5	ATP binding cassette subfamily G member 5	Rn01499073_m1	Transporte solutos
Rbp4	Retinol binding protein 4	Rn01451318_m1	Transporte solutos
Slc27a2	Solute carrier family 27 member 2	Rn00581971_m1	Transporte solutos
Slc27a5	Solute carrier family 27 member 5	Rn00577177_m1	Transporte solutos
Slc2a2	Solute carrier family 2 member 2	Rn00563565_m1	Transporte solutos
Slc34a2	Solute carrier family 34 member 2	Rn00584515_m1	Transporte solutos
Ywhaz	Tyrosine 3- monooxygenase/tryptoph an 5-monooxygenase activation protein, zeta	Rn00755072_m1	Control endógeno
B2m	Beta-2 microglobulin	Rn00560865_m1	Control endógeno
Gapdh	Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase	Rn01775763_g1	Control endógeno
Actb	Actin, beta	Rn00667869_m1	Control endógeno
Tbp	TATA box binding protein	Rn01455646_m1	Control endógeno
Hprt1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase	Rn01527840_m1	Control endógeno
	1		
Ppia	Peptidylprolyl isomerase A	Rn00690933_m1	Control endógeno

