



ugr

Universidad
de Granada

**Título: Ensayo de un ingrediente multifuncional
procedente de leguminosas, en combinación con
ejercicio físico para el control de parámetros
cardiovasculares y renales relacionados con el
Síndrome Metabólico**

Programa de doctorado: Nutrición y Ciencia de los alimentos

Departamento de Fisiología

Facultad de Farmacia

Universidad de Granada

Doctoranda: Janin Constantino Tapia

Directores:

María López – Jurado Romero de la Cruz

Jesús María Porres Foulquie

MEMORIA QUE PRESENTA PARA ASPIRAR AL GRADO DE DOCTOR EN
NUTRICIÓN HUMANA POR LA UNIVERSIDAD DE GRANADA LA LICENCIADA D^{ca}
JANIN ARITZI CONSTANTINO TAPIA

ESTA TESIS DOCTORAL HA SIDO REALIZADA BAJO LA DIRECCIÓN DE:

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

Prof. Dr. Jesús María Porres Foulquie

Lda. Janin Constantino Tapia

Aspirante al Grado de Doctor

Granada, febrero 2020

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Janin Aritzi Constantino Tapia
ISBN: 978-84-1306-586-1
URI: <http://hdl.handle.net/10481/63491>

ESTA TESIS DOCTORAL ESTA DENTRO DEL PROYECTO DEL PLAN NACIONAL DE I+D (PRODUCCIÓN Y VALIDACIÓN DE NUEVOS INGREDIENTES MULTIFUNCIONALES EN COMBINACIÓN CON EJERCICIO FÍSICO PARA EL CONTROL DEL SÍNDROME METABÓLICO)
REF. AGL2013.43247.R

ÍNDICE

1.- Introducción, objetivos y principales resultados	1
2.- Revisión Bibliográfica	10
2.1.- Síndrome Metabólico	11
2.1.1.- Definición.....	11
2.1.2.- Prevalencia a nivel mundial.....	13
2.1.3.- Fisiopatología cardiovascular y renal.....	15
2.1.4.- Tratamientos farmacológicos y no farmacológicos	23
2.1.4.1.- Tratamientos farmacológicos	23
2.1.4.2.- Tratamientos no farmacológicos y estilos de vida	24
2.1.4.2.1.- Recomendaciones dietéticas	25
2.1.4.2.2.- Alimentos Funcionales: origen, clasificación y efecto beneficioso	25
2.1.4.2.2.1.- Compuestos bioactivos.....	27
2.1.4.2.2.1.1.- Compuestos fenólicos	29
2.1.4.2.3.- Ejercicio Físico	30
2.1.4.2.3.1.- Efectos generales del ejercicio sobre parámetros de Síndrome Metabólico.....	30
2.1.4.2.3.2.- Principales tipos de ejercicio en el Síndrome Metabólico.....	32
2.1.4.2.3.3.- Mecanismos de acción del ejercicio a nivel celular y molecular.....	33
2.2.- Marcadores de funcionalidad cardiovascular y renal	36
2.2.1.- Marcadores de funcionalidad cardiovascular	36
2.2.1.1 Marcadores de obesidad	36
2.2.1.2.- Electrocardiograma como marcador de riesgo cardiovascular.....	38
2.2.1.3.- Marcadores de aterogénesis y proceso inflamatorio	39
2.2.2.- Marcadores de funcionalidad renal.....	40
2.2.2.1.- Filtración glomerular y aclaramiento renal de creatinina.....	40
2.2.2.2.- Albuminuria	42
2.2.2.3.- Minerales y pH en relaciona a formación de cálculos renales	43
2.3.- Leguminosas	44
2.3.1.- Clasificación, composición química y valor nutricional.....	44
2.3.2.- <i>Lens Culinaris</i> : valor funcional y efectos beneficiosos para la salud.....	47
2.3.3.- Efecto de algunos tipos de procesado	48
2.3.3.1.- Germinación y fermentación	48
2.3.3.2.- Tratamiento con proteasas exógenas	49
2.4.- La rata Zucker como modelo experimental de Síndrome Metabólico ...	50
3.- Material y métodos	52
3.1.-Material vegetal e hidrolizado proteico	53
3.1.1.- Leguminosa " <i>Lens Culinaris</i> "	53
3.1.2.- Caracterización del hidrolizado proteico.....	53
3.1.3.- Extracción de polifenoles de <i>Lens Culinaris</i>	54
3.1.4.- Caracterización de polifenoles y péptidos del extracto de <i>Lens Culinaris</i>	55
3.2.- Experimentos con animales	56
3.2.1.- Animales y diseño experimental.....	57
3.2.2.- Protocolo de ejercicio	59

3.2.3.- Metabolismo basal y capacidad aeróbica.....	61
3.2.4.- Composición corporal.....	63
3.2.5.- Parámetros plasmáticos.....	63
3.2.6.- Bioquímica plasmática.....	64
3.2.7.-Determinación plasmática.....	64
3.2.8.- Electrocardiograma.....	65
3.2.9.-Presión arterial.....	66
3.2.10.- Expresión génica por PCR-RT cuantitativa de transcritos de arteria y aorta.	67
3.2.11.- Bioquímica Urinaria.....	69
3.2.12.- Actividad antioxidante en riñón.....	70
3.2.12.1.-Homogeneización de tejidos.....	70
3.2.12.2.-Determinación de la concentración de proteína.....	70
3.2.12.3.- Actividad enzimática de Superóxido Dismutasa.....	71
3.2.12.4.- Actividad enzimática de Catalasa.....	72
3.2.12.5.- Actividad enzimática de Glutati6n Peroxidasa.....	73
3.2.12.6.- Determinación de especies reactivas de 6cido tiobarbitúrico.....	75
3.3.- Estadística.....	75
4.-Resultados.....	77
4.1.- Caracterización del contenido proteico, perfil peptídico, ácidos grasos y de compuestos bioactivos del hidrolizado proteico de lenteja.....	78
4.2.- Ingesta de alimento, cambios ponderales, composición corporal y gasto metabólico.....	82
4.3.- Capacidad aeróbica y estado físico.....	89
4.4.-Parámetros hemáticos.....	91
4.5.- Parámetros de metabolismo glucídico y lipídico.....	93
4.6.-Parámetros cardiacos y electrocardiográficos.....	99
4.7.- Parámetros de riesgo cardiovascular.....	102
4.8.- Parámetros plasmáticos y urinarios de la funcionalidad renal.....	104
4.9.- Actividad antioxidante y peroxidación lipídica en riñón.....	108
5.- Discusi6n.....	110
5.1.- Caracterización del contenido proteico, perfil de ácidos grasos, y perfil peptídico y de compuestos bioactivos del hidrolizado proteico de lenteja.....	111
5.2.- Ingesta de alimento, cambios ponderales, composición corporal y gasto metabólico.....	113
5.3.- Capacidad aeróbica y condici6n física.....	114
5.4.- Parámetros hemáticos.....	115
5.5.- Parámetros del metabolismo glucídico y lipídico.....	117
5.6.- Parámetros cardiacos y electrocardiográficos.....	118
5.7.- Parámetros de riesgo cardiovascular.....	121

5.8.-Parámetros plasmáticos y urinarios de la funcionalidad renal	122
5.9.- Actividad antioxidante y peroxidación lipídica en riñón	124
6.- Conclusión	126
7.- Bibliografía	129

Abreviaturas

AACE: Asociación Americana de Endocrinología Clínica

AHA/NHLBI: Asociación Americana del Corazón/Corazón Nacional,
Pulmón y el Instituto de la Sangre

AMPK: Proteína quinasa activada por 5 ' AMP

ASCVD: Enfermedad Cardiovascular Aterosclerótica

ATP: Adenosín Trifosfato

BHE: Barrera Hematoencefálica

CMA: Compuestos Bioactivos

CMM: Células Madre Mesenquimales

CK- MB: Creatin Kinasa MB

Cr: Creatinina

CRP: C-reactive protein

DHA: ácido docosahexaenoico

DMT2: Diabetes Mellitus Tipo 2

ECA: Enzima Convertidora de Angiotensina

ECV: Enfermedad Cardiovascular

EGCG: Epigallocatequina

EGIR: Grupo Europeo del estudio de Resistencia a la Insulina

ENSA: Sistema de Encuestas Nacionales de Salud

ENT: Enfermedades no Transmisibles o Enfermedades Crónicas

ER: Enfermedad Renal

FAO: Food and Agriculture Organization

FG: Filtración Glomerular

FGe: Filtrado Glomerular estimado

FNDC: Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro

FUFOSE: Functional Food Science in Europe

ICC: índice de cintura cadera

IFD: Federación Internacional de Diabetes

IgE: Inmunoglobulina E

IL-15: Interleucina – 15

IL-1RA: Antagonista del Receptor de Interleucina 1

IL-6: interleucina-6

ILSI: International Life Science Institute

IMC: Índice de Masa Corporal

KDIGO: Kindey Disease Improving Global

NAD: Neuropatía Autonómica Diabética

NCEPATPIII: Programa Nacional del Colesterol Panel de Tratamiento de Adultos III

NIH: National Institute of Health

NO: óxido nítrico

OMS: Organización Mundial de la Salud

PAI-1: Plasminógeno 1

PCr: Fosfocreatinina

PCR: Proteína C Reactiva

QRSf: QRS fragmentado

QTc: QT corregido

RAAS: Activación del Sistema Angiotensina Aldosterona

RI: Resistencia a la Insulina

ROS: especies reactivas de oxígeno

SEEDO: Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad

SMet: Síndrome Metabólico

SMP: Síndrome Metabólico Premórbido

TFG: Tasa de Filtración Glomerular

TG: Triglicéridos

TNF- α : Factor de Necrosis alfa-tumoral

U: Urea

1.- Introducción, objetivos y principales resultados

El síndrome metabólico (SMet) se define como un conjunto de alteraciones interconectadas, entre las que tienen especial relevancia la obesidad, la hiperglucemia, la resistencia a la insulina, la hiperlipidemia, la presión arterial alta y un estado pro-trombótico y pro-inflamatorio (Grundy, 2016). Su importancia radica en que está asociado como un factor de riesgo múltiple para desarrollar enfermedades cardiovasculares y enfermedad renal crónica (Tune y col., 2017; Zhang y Lerman, 2017). Además, la Organización Mundial de la Salud revela que las enfermedades no transmisibles como infartos de miocardio, insuficiencia renal, neuropatías y dislipidemias son la primera causa de muerte a nivel mundial (OMS., 2018).

Bajo este panorama y en vista de la creciente prevalencia del SMet y sus alteraciones metabólicas/funcionales, se necesitan nuevas estrategias para reducir su impacto en la salud y contribuir a una mejora en la funcionalidad cardiovascular y renal.

Entre los enfoques más utilizados para el tratamiento del SMet se encuentran las intervenciones farmacológicas en combinación con estilos de vida saludables; este último caso, se relaciona principalmente con una mejora en los hábitos alimenticios y una forma de vida más activa.

Dentro de las intervenciones dietéticas, los ejes centrales para el tratamiento son, por un lado, una restricción calórica modificando la cantidad y tipo de alimento consumido, haciendo especial énfasis en el consumo de carbohidratos complejos ricos en fibra y por otro lado, en la disminución del consumo de carbohidratos simples procedentes de azúcares refinados y del porcentaje de grasas en la dieta (entre las que deben predominar las polinsaturadas minimizando el consumo de grasas saturadas o hidrolizadas). Además, como estrategia novedosa de tratamiento dietético se recomienda la introducción de diferentes alimentos funcionales en la dieta habitual.

En particular, se ha descrito tanto en modelos experimentales animales como en estudios realizados en humanos que las formulaciones a base de plantas inducen una serie de beneficios en el metabolismo glucídico y lipídico.

En este sentido, las legumbres, y específicamente las lentejas, contienen nutrientes esenciales como proteínas, carbohidratos complejos, fibra, vitaminas y minerales. Además, exhiben una composición interesante en compuestos bioactivos como, polifenoles entre ellos isoflavonas o inhibidores de la enzima tripsina, todos ellos relacionados con efectos positivos para la salud (Martínez y col., 2016). Los beneficios de esta leguminosa en el estado general metabólico han sido ampliamente estudiados (Becerra-Tomás y col., 2018), pero sus efectos específicos, así como sus mecanismos de acción sobre la función cardíaca o renal no son tan conocidos.

Los efectos sobre la utilización nutritiva y su potencial bioactivo derivados de su composición se pueden potenciar aún más mediante algunos tratamientos biotecnológicos como la fermentación, la germinación o la hidrólisis de proteínas por proteasas recombinantes. Estos tratamientos no solo mejoran su valor nutricional, sino que también mejoran las acciones beneficiosas relacionadas con la salud, específicamente sobre la resistencia a la insulina, el metabolismo lipídico o los factores de riesgo asociados a la enfermedad cardiovascular como la alta actividad de la enzima convertidora de angiotensina (Bautista-Expósito y col., 2018; Kapravelou y col., 2015). La generación de hidrolizados proteicos procedentes de leguminosas pueden ser una fuente de nutracéuticos solubles en agua con un alto contenido de componentes bioactivos que pueden administrarse fácilmente como agentes terapéuticos efectivos para la prevención y el tratamiento dietético del SMet con menor costo y con efectos secundarios mínimos.

Por otra parte, el ejercicio físico aeróbico moderado se encuentra entre las intervenciones de estilo de vida más efectivas para el tratamiento y/o la prevención de la obesidad y sus comorbilidades relacionadas. La Organización Mundial de la Salud recomienda al menos 150 minutos a la semana de actividad aeróbica de intensidad moderada o 75 minutos de actividad física de alta intensidad durante la edad adulta (18-64 años) (OMS., 2020).

El ejercicio induce sus beneficios mediante diferentes mecanismos moleculares, los cuales participan en vías intracelulares relacionadas con el metabolismo de la glucosa y los lípidos, así como en la activación de mecanismos antiinflamatorios y antioxidantes. Dichos mecanismos pueden verse afectados de manera diferencial dependiendo del protocolo y la intensidad del entrenamiento específico ensayado.

Para este estudio combinado de tratamiento dietético y ejercicio físico se ha utilizado el modelo experimental animal de la rata Zucker obesa. Se trata de un modelo de SMet ampliamente utilizado debido a su alteración genética en el receptor de la leptina que, como resultado, desarrolla hiperfagia, obesidad, resistencia a la insulina, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, hipertensión leve y enfermedad renal crónica (Martínez y col., 2019). También se han informado alteraciones electrocardiográficas significativas en la amplitud de la onda R, la variabilidad de la frecuencia cardíaca y el intervalo QTc como resultado de la instauración de la neuropatía diabética autonómica (VanHoose y col., 2010). Por lo tanto, parece ser un modelo adecuado para estudiar intervenciones dietéticas y de actividad física.

Basándonos en los resultados descritos en la bibliografía sobre el potencial beneficio de la ingesta de compuestos funcionales presentes en leguminosas, por una parte, y del ejercicio físico, por otra, se planteó el objetivo del presente trabajo.

Objetivo

Se estudió el potencial de las intervenciones individuales o combinadas de la administración de un hidrolizado proteico de lenteja y de un protocolo de entrenamiento mixto para prevenir o tratar eficazmente el daño en la funcionalidad cardiovascular y renal a través de la mejora de la resistencia a la insulina y sus alteraciones metabólicas asociadas.

Material y métodos

Para llevar acabo el diseño experimental se utilizaron 64 ratas macho Zucker. De las cuales 32 tenían un fenotipo obeso (fa/fa) (OB) y los 32 restantes tenían un fenotipo delgado (fa/+) (DE). Los animales se subdividieron en 4 subgrupos experimentales (n=16) de acuerdo al protocolo de ejercicio que realizarían: sedentario (S) o ejercicio (E), se realizó una última subdivisión (n=8) donde se aplicó una intervención dietética con el hidrolizado proteico procedente de lenteja y los correspondientes controles. El periodo experimental fue de 8 semanas.

Con respecto al hidrolizado proteico que se utilizó, se realizó una fermentación seguida de un tratamiento con proteasa para potenciar su función nutraceutica. Se realizó una caracterización del contenido proteico, perfil peptídico, ácidos grasos y de compuestos bioactivos del hidrolizado proteico de lenteja

Se determinó la ingesta de alimentos, cambios ponderales, composición corporal y gasto metabólico. La capacidad aeróbica y estado físico se determinaron en función de la velocidad máxima y distancia recorrida en el test incremental.

Al final del período experimental, se midieron parámetros hemáticos, parámetros de metabolismo glucídico y lipídico relacionados con la resistencia a la insulina y parámetros electrocardiográficos y de riesgo cardiovascular. Finalmente, se determinaron parámetros

plasmáticos y urinarios de la funcionalidad renal y de la actividad antioxidante y peroxidación lipídica en riñón.

Resultados

Inicialmente se evaluó la composición del hidrolizado proteico, caracterizando los compuestos fenólicos, péptidos y ácidos grasos.

Posteriormente, en los experimentos llevados a cabo *in vivo*, se observaron los efectos promovidos por las intervenciones individuales o combinadas. Específicamente el hidrolizado proteico disminuyó la hiperfagia, siendo más marcada en el fenotipo delgado, también generó un descenso en los niveles de glucemia principalmente en los animales obesos. En cuanto al perfil lipídico, es de relevancia destacar su efecto sobre los niveles de TG donde se observó una disminución de este parámetro más consistente en el fenotipo obeso y a su vez un aumento sobre los niveles de HDL-C. Además, el hidrolizado proteico también generó una menor actividad plasmática de la ECA, así como una menor expresión en la aorta de selectina E. En cuanto a parámetros de riesgo cardiovascular el protocolo de entrenamiento ensayado y el hidrolizado proteico mostró una disminución significativa sobre el índice aterogénico, calculado a partir de los niveles plasmáticos de colesterol total y HDL. En relación con los parámetros plasmáticos y urinarios, se observó un aumento en los niveles de ácido úrico y pH urinario y un descenso en los niveles de urea como consecuencia de la administración del ingrediente funcional ensayado

Por otra parte, el protocolo de entrenamiento por si solo o en combinación con el ingrediente multifuncional administrado demostró efectos beneficiosos en todos los parámetros estudiados del metabolismo lipídico y glucídico mostrando una mejora significativa sobre el índice HOMA-IR principalmente en ratas obesas y un aumento en los niveles de adiponectina principalmente en animales obesos sedentarios. Con

respecto a los marcadores electrocardiográficos, el intervalo QTc tendió a disminuir por efecto del ejercicio y se observó un efecto significativo de la intervención combinada en el descenso de la amplitud de la onda P, T y del complejo QRS más marcado en animales obesos frente a sus controles delgados. El ejercicio físico también tendió a disminuir el peso del riñón, el volumen urinario y la actividad de Mn-SOD en el fenotipo obeso. Cabe destacar que la mayoría de los beneficios mencionados del ejercicio fueron más consistentes cuando también se administró hidrolizado de proteínas de lenteja.

Discusión

Nuestro modelo experimental se caracterizó por hiperfagia y sobrepeso, hiperinsulinemia y resistencia a la insulina, hiperleptinemia y niveles bajos de adiponectina en plasma, exhibió hipertrofia cardíaca asociado con parámetros alterados en el electrocardiograma, funcionalidad renal atrofiada, resultando en microalbuminuria, pero no cambios en la depuración de creatinina.

En este sentido las intervenciones individuales o combinadas con el hidrolizado de proteína de lenteja y el protocolo de entrenamiento mixto fueron eficaces para contrarrestar algunas patologías que caracterizan a la rata Zucker obesa.

Los beneficios sobre la ingesta de alimentos se observaron a las 3 semanas, donde la hiperfagia tendió a disminuir, sin embargo, tal efecto no fue lo suficientemente fuerte como para causar una reducción sostenida en el peso, probablemente esta disminución en la ingesta se debe a los efectos fisiológicos de algunos compuestos bioactivos y probablemente a el efecto anorexigénico del ejercicio físico

Sobre los parámetros hemáticos el hidrolizado causó una disminución en todos los marcadores relacionados con el metabolismo del Fe, probablemente relacionada con la inflamación crónica derivada del exceso de tejido adiposo, además el compuesto ensayado también

contiene agentes anti-nutricionales como el ácido fítico que pueden interferir con el metabolismo del Fe. Por otra parte, el ejercicio físico mostró efectos beneficiosos sobre el metabolismo de este elemento.

La intervención combinada ejercicio hidrolizado disminuyó significativamente el área bajo la curva después de una sobre carga oral de glucosa, generando un claro signo de restauración del metabolismo glucídico y funcionalidad de la insulina. Por otra parte, el hidrolizado proteico reportó un aumento en los niveles plasmáticos de adiponectina, una adipocina sensibilizante a la insulina, pero no se encontraron efectos significativos sobre los niveles de leptina. Esto podría justificarse por la alteración genética en el receptor de la leptina inherente a la raza Zucker obesa.

Se apreció un aumento en el tamaño del corazón, pero dicho efecto no pareció causar daño según los resultados de la actividad plasmática de CK-MB, donde no se observó una variación significativa entre el fenotipo obeso y el delgado.

Modificaciones en el electrocardiograma son signos de progresión en enfermedad cardiovascular, las alteraciones en el complejo QRS y amplitudes de la onda P o T pueden estar relacionadas con el desarrollo de Neuropatía Autonómica Diabética. La administración del hidrolizado provocó efectos positivos sobre estos parámetros, como disminución de la onda R o T, el ejercicio físico también mostro una mejora en la amplitud de la onda P o R, una disminución de la frecuencia cardíaca, la amplitud QRS y el intervalo QTc lo que demostró una sinergia del tratamiento aplicado.

Se ha descrito que el modelo rata Zucker desarrolla hipertensión con la edad, bajo nuestro periodo experimental no se observó dicha alteración. Sin embargo, el compuesto funcional ensayado y el protocolo de entrenamiento evidenciaron una acción preventiva sobre la expresión aórtica de la proteína de adhesión Selectina E y también una inhibición

en la actividad plasmática de la ECA, esto podría tener un valor protector en el desarrollo de disfunción endotelial y enfermedad cardiovascular.

Otro hallazgo interesante observado es el equilibrio plasmático de urea, niveles altos de este metabolito se relacionan con insuficiencia renal crónica, en nuestro estudio observamos que el hidrolizado generó mayor excreción fecal de N causada por los carbohidratos fermentables presentes en el ingrediente funcional y esto a su vez disminuyó la concentración de urea en plasma y su excreción urinaria. Se sabe que la ingesta de alimentos ricos en citratos y potasio como las legumbres ejercen un efecto alcalinizante sobre la orina, esto se correlaciona con los observado en nuestro modelo que aumento el volumen y el pH urinario.

Con respecto a la actividad antioxidante se evidencio el deterioro en el estado de defensa antioxidante renal, a pesar de que los efectos fueron diversos y complejos es de especial énfasis mencionar la inducción de la catalasa y la reducción de GPX y SOD-Cu/Zn mediante la administración del hidrolizado, mientras que el ejercicio revirtió la actividad de catalasa y GPX.

Conclusión

La intervención combinada del hidrolizado proteico de lenteja y un protocolo de entrenamiento mixto fue eficiente para revertir las alteraciones metabólicas, cardiovasculares y renales propias del modelo experimental de rata Zucker obesa. Es de especial relevancia la acción protectora a nivel cardiovascular que demostró el tratamiento dietético por si solo o en conjunto con el protocolo de entrenamiento ensayado sobre los parámetros cardiacos y electrocardiográficos relacionados con la hipertrofia ventricular, (descenso en la amplitud de la onda P R y T, complejo QRS intervalo QTc y frecuencia cardiaca) y el efecto inhibitor preventivo sobre la actividad de la ECA plasmática, así como una baja expresión génica de la molécula selectina E y los efectos claros sobre la

mejora en la función renal. (disminución urinaria de albumina, equilibrio de urea plasmática y el aumento del pH urinario).

El enfoque experimental que combina la administración de nutracéuticos derivados de las leguminosas junto con la implementación de programas de ejercicio protocolizados muestra un gran potencial como nuevas estrategias terapéuticas y alternativas para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares y renales asociadas al SMet.

2.- Revisión Bibliográfica

2.1.- Síndrome Metabólico

2.1.1.- Definición

El Síndrome Metabólico (SMet) es un estado fisiopatológico crónico y progresivo. Se define como la acumulación y alteración de factores de riesgo cardiometabólico, entre ellos destacan la dislipidemia aterogénica, presión arterial elevada, disglucemia y obesidad abdominal (Grundy, 2016). La alteración de todos estos factores representa un riesgo múltiple para desarrollar diabetes tipo 2 (DMT2) (Bonomini y col., 2015), enfermedad cardiovascular (ECV) (Tune y col., 2017) y enfermedad crónica renal (ER) (Zhang y Lerman, 2017).

Se proponen dos tipos de pacientes, los que ya padecen DMT2 o ECV, donde los factores de riesgo condicionan negativamente el pronóstico, su tratamiento médico, farmacológico y nutricional debe ser intenso. Por otra parte, están los pacientes que no padecen DMT2 y ECV, se llaman pacientes con Síndrome Metabólico Premórbido (SMP) un claro centro de la prevención primaria, educando y modificando estilos de vida y si es necesario tratamiento farmacológico (Guallar-Castillón y coll., 2014).

Sin embargo, no existe una clara patogenia del SMet, por lo tanto, los criterios de diagnóstico se han modificado varias veces por entidades representantes de la salud, teniendo como punto de partida la resistencia a la insulina (RI).

Históricamente Reaven en 1988 fue el primero en dar un concepto, definiéndolo como el Síndrome "X" y describió como característica central el riesgo aumentado de ECV y de DMT2 principalmente relacionado con la resistencia de los tejidos a la acción de la insulina (Reaven, 1988).

Desde entonces diversas organizaciones internacionales y grupos de expertos como la Organización Mundial de la Salud (OMS), Grupo Europeo del estudio de Resistencia a la Insulina (EGIR), El Programa

Nacional del Colesterol Panel de Tratamiento de Adultos III (NCEP:ATPIII), la Asociación Americana de Endocrinología Clínica (AAEC), la Federación Internacional de Diabetes (IFD), la Asociación Americana del Corazón/Corazón Nacional, Pulmón y el Instituto de la Sangre (AHA/NHLBI) han intentado incluir todos los parámetros de diagnóstico para poder definir el SMet de forma clara y precisa.

En 1998 por la Organización Mundial de la Salud. Considerando que los factores esenciales o principales para diagnosticar el SMet eran: resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa y DMT2 además de 2 de los siguientes: hipertensión, hipertrigliceridemia y /o colesterol HDL bajo, obesidad (medida por el Índice de Masa Corporal (IMC)) y microalbuminuria (Alberti y Zimmet, 1998).

En 2001 la NCEP:ATPIII publicó una nueva propuesta de criterios diagnósticos, incluyendo circunferencia de cintura, perfil lipídico, presión arterial y glucosa en ayunas (Expert Panel on Detection, 2001). A diferencia de la OMS y la EGIR no consideraba como criterio diagnóstico la resistencia a la insulina (RI).

En 2005 la Federación Internacional de Diabetes (IDF) publicó nuevos criterios de diagnóstico en el objetivo de ser más predictor en el riesgo de enfermedades cardiovasculares y DMT2 (Alberti y col., 2005).

La definición más aceptada es un consenso reciente (Alberti y col., 2009) que incluye obesidad abdominal, triglicéridos y glucosa elevados, presión arterial elevada y niveles bajos de colesterol HDL. Tres de los anteriores parámetros representan un criterio diagnóstico de SMet (Tabla 1).

Tabla 1.- Criterios de diagnóstico para el Síndrome Metabólico	Puntos de corte
Circunferencia de cintura ^(A)	≥102 cm en hombres ≥ 88 cm en mujeres
Triglicéridos elevados (el tratamiento farmacológico para hipertrigliceridemia es un indicador alternativo ^(B))	≥150mg/dL (1.7mmol/L)
Colesterol - HDL bajo (el tratamiento farmacológico para hipertrigliceridemia es un indicador alternativo ^(C))	<40mg/dL (1.0mmol/L) hombres <50 mg/dL (1.3mmol/L) mujeres
Presión arterial elevada (el tratamiento farmacológico antihipertensivo es un indicador alternativo)	≥130mmHg Sistólica ≥85mmHg Diastólica
Glucosa en ayuno (el tratamiento farmacológico de glucosa elevada es un indicador alternativo)	≥100mg/dL

(A): Son los puntos de corte utilizados para EE.U. La Federación Internacional de Diabetes propone cortes más específicos con respecto a la definición de obesidad central los clasifica por país o grupo étnico.

(B): Los fármacos más utilizados son los fibratos y ácido nicotínico

(C): La mayoría de los pacientes con DMT2 tendrá SMet según los criterios actuales.

2.1.2.- Prevalencia a nivel mundial

La prevalencia del Síndrome Metabólico ha aumentado significativamente en los últimos años según criterios de la OMS. Los datos son variables dependiendo del origen y la edad de la población de estudio, así como la definición que se utilice para su diagnóstico (Swinburn y col., 2011).

La epidemia del síndrome metabólico pareció comenzar con el aumento de la obesidad, las primeras estadísticas en 2008 revelaban que 502 millones de personas en el mundo tenían obesidad (IMC>30kg/m²)(Finucane y col., 2011). Estudios epidemiológicos revelan que la prevalencia del síndrome metabólico a nivel mundial varía entre

un 20 y 45% de la población, el componente más frecuente en el SMet es la obesidad abdominal. Se estima que para 2035 el 53% de la población desarrolle síndrome metabólico (Gierach y col., 2014). El incremento en la prevalencia de la obesidad es un problema de salud mundial ya que el aumento de peso excesivo provoca un mayor riesgo para desarrollar varias enfermedades, especialmente de tipo cardiovascular, renal, diabetes, etc. A este conjunto de enfermedades se les conoce como Enfermedades no Transmisibles o Enfermedades Crónicas (ENT).

Los datos estadísticos que refleja la OMS declaran que las enfermedades no transmisibles matan a 41 millones de personas cada año, lo que equivale al 71% de las muertes que se producen en el mundo. Las principales ENT son las cardiovasculares como ataques cardíacos o cerebrovasculares que provocan 17.9 millones de muertes cada año (OMS., 2018).

La OMS prevé que las muertes por diabetes se multipliquen por dos entre 2005 y 2030. Padecer esta enfermedad implica un aumento en el riesgo de cardiopatía, accidente cerebrovascular, y es una de las causas principales de insuficiencia renal. Entre un 10 -20% de los pacientes con diabetes mueren por fallo renal y se estima que un 50% mueren de enfermedad cardiovascular (OMS., 2016).

Los principales factores de riesgo son la inactividad física, hábitos de alimentación poco saludables, consumo de alcohol y tabaco, aumento de glucosa y lípidos, tensión arterial elevada y obesidad. Otros factores como la industria alimentaria también están implicados en su desarrollo (Forouzanfar y col., 2016).

En España, según estudios y análisis (Fernández-Bergés y col., 2012; Guallar-Castillón y col., 2014) entre un 22.7% y un 32% de la población española padece Síndrome Metabólico con mayor prevalencia en hombres hasta 65 años, después de esta edad la prevalencia es mayor en mujeres. La presión arterial y la circunferencia de cintura fueron los

factores de mayor peso para el diagnóstico, debido a la alta prevalencia de obesidad abdominal e hipertensión arterial en España (Fernández-Bergés y col., 2012). El estudio Global Burden of Disease reveló que en España la enfermedad renal crónica es la octava causa de muerte (Ortiz y col., 2019).

En México el Sistema de Encuestas Nacionales de Salud (ENSA) es el principal eje epidemiológico para generar información del país. La última actualización de resultados se realizó en 2016 a través de la encuesta ENSANUT-2016 (n=11,759) (Ávila y col., 2016) y permitió conocer la situación nutricional actual de México. El 72.5% (48.6 millones de personas) de la población adulta padece sobrepeso u obesidad una tendencia en aumento respecto a la ENSANUT 2012 y con una mayor prevalencia en el género femenino, Es preocupante los índices de prevalencia en la población pediátrica, 3 de cada 10 niños presentan sobrepeso y obesidad.

2.1.3.- Fisiopatología cardiovascular y renal

Para entender la fisiopatología cardiovascular y renal es necesario comprender los mecanismos celulares que vinculan las alteraciones metabólicas con alteraciones de funciones fisiológicas y terminan manifestándose en enfermedades crónicas. Está claro que dentro de los factores de riesgo del Síndrome Metabólico existe una clara tendencia y correlación para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y renales (Tune y col., 2017).

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

Los principales factores de riesgo para desarrollar ECV son: SMet, obesidad abdominal, circunferencia de cintura incremento de adipocinas en el tejido graso visceral, resistencia a la insulina, y presión arterial elevada (Ritchie y Connell, 2007).

El tejido adiposo es el órgano endocrino más grande del cuerpo, secreta principalmente adipocinas (adiponectina, leptina y resistina) y citoquinas (factor de necrosis alfa-tumoral (TNF- α), interleucina-6,(IL-6))(Hutley y Prins, 2005).

Se considera que una inflamación sistémica de bajo grado comienza en la obesidad con el incremento del marcador inflamatorio; proteína C- Reactiva (C-reactive protein (CRP) (Johnson y col., 2012), en conjunto existe una actividad mayor por parte de los macrófagos, que rodean el tejido adiposo excedente, resultando una mayor liberación de citoquinas y manteniendo un estado de inflamación sistémica.

Esta liberación de citoquinas también induce una resistencia a la insulina en el músculo esquelético (Wieser y col., 2013) altera el eje pituitario -suprarrenal, acelera la pérdida de células beta pancreáticas (Oh y col., 2011) y activa el sistema nervioso simpático contribuyendo al aumento de la frecuencia cardiaca, retención de sodio y el desarrollo de daño cardiovascular (Hutley y Prins, 2005).

Los mecanismos celulares y moleculares entre obesidad, SMet y mayor riesgo cardiovascular se centran en la función del tejido adiposo (Figura 1).

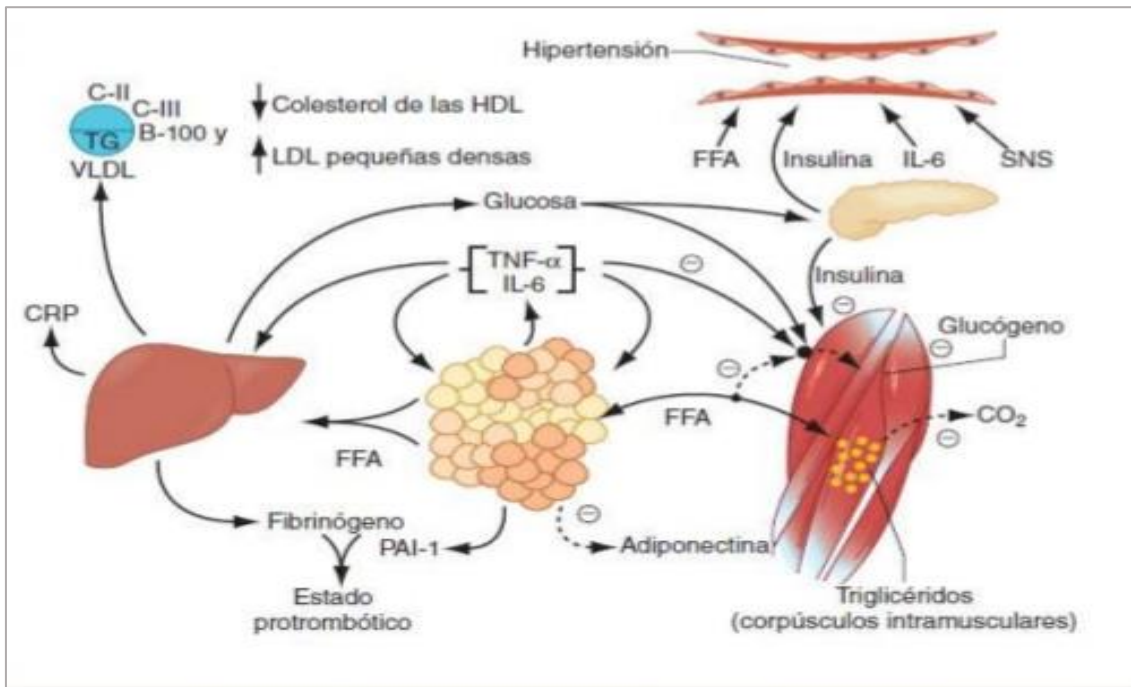


Figura 1.- Mecanismo celulares y moleculares asociados a riesgo cardiovascular

La obesidad y la aterosclerosis tienen una etiología inflamatoria (Izaola, 2015; Taleb, 2016). La atrofia cardíaca generada por la inflamación sistémica y otros factores de riesgo antes mencionados se ha descrito como “cardiomiopatía de la obesidad” (Turkbey y col., 2010).

La resistencia a la insulina genera vasoconstricción, disminuyendo la actividad del óxido nítrico (NO) y su función antiaterogénica. El estrés oxidativo las especies reactivas de oxígeno (ROS) aumentan generando más inflamación lo que resulta en una disfunción endotelial (Hansson, 2005). Las personas con SMet padecen múltiples alteraciones a nivel hemostático que los predisponen a ECV, entre ellos destacan: fibrinólisis y disfunción plaquetaria (S. Kostapanos y col., 2013).

En el proceso aterosclerótico las células inmunes crean una interacción con el endotelio, generando una formación temprana de ateroma (Taleb, 2016), disminuyendo la homeostasis endotelial como consecuencia de la reducción de NO y la secreción del vasoconstrictor angiotensinógeno (angiotensina II) que contribuye a una hipertensión sistémica.

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

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

Los macrófagos se adhieren donde la capa es más inestable, provocando una ruptura y generalmente una trombosis. (Tabas Ira y col, 2007). En conjunto los niveles elevados de inhibidor del activador de plasminógeno 1 (PAI-1) pueden generar un estado protrombótico (León-Pedroza y col., 2015) (Berg Anders H. y Scherer Philipp E., 2005). Los estados inflamatorios en el SMet, aceleran este proceso, cuando esta placa se rompe generalmente se produce un evento cardiovascular (infarto al miocardio o accidente cerebrovascular) (Figura 2).

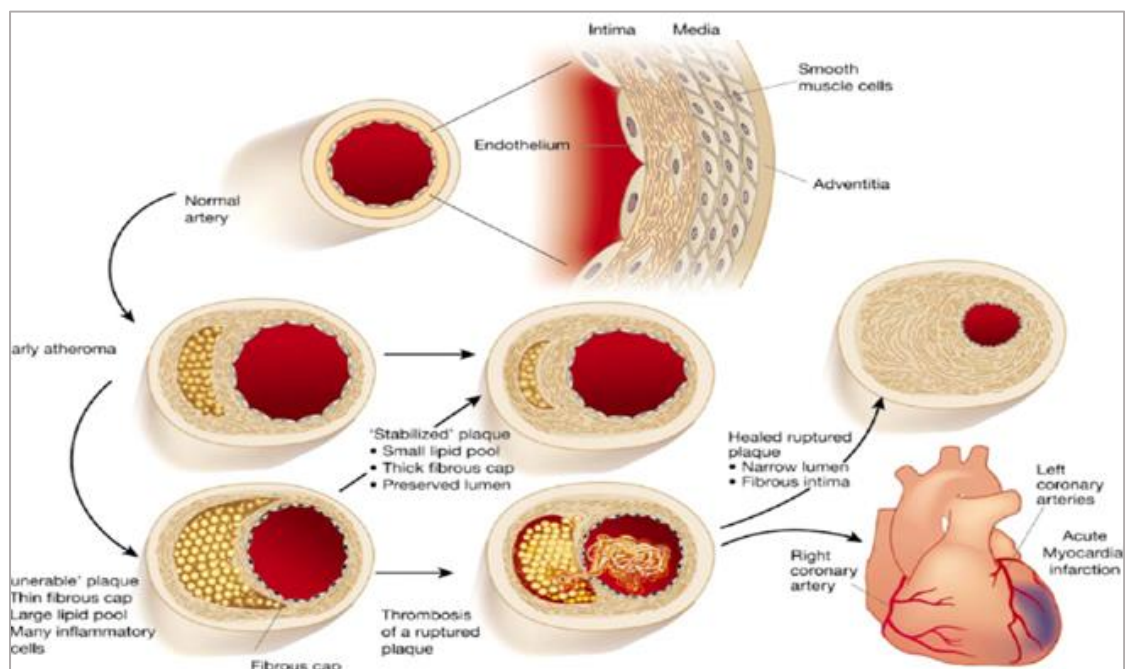


Figura 2.- Proceso aterosclerótico y trombótico

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

La enfermedad renal crónica se define como la presencia de lesión renal, que abarca alteraciones histológicas en la biopsia renal o presencia de albuminuria y alteración del sedimento urinario (Castelao M., y col., 2014), o al menos 3 meses de FGe (filtrado glomerular estimado) inferior a 60 ml/min/1.73 m².

Las personas que presentan SMet desarrollan ERC reflejada por microalbuminuria (Locatelli y col., 2006). Múltiples estudios demuestran que un mayor IMC se asocia con presencia de proteinuria o disminución de la tasa de filtración glomerular (Chang y col., 2013; Pinto-Sietsma y col., 2003). El aumento de la grasa visceral se asocia con resistencia a la insulina principalmente en el músculo y con una mayor prevalencia de albuminuria en hombres (Foster y col., 2011; Shulman, 2014). La obesidad se asocia con mayor incidencia de nefrolitiasis (Taylor y coll., 2005), se ha estimado que entre un 17% y 26% de todos los cánceres renales en hombres y mujeres son atribuibles al exceso de peso (Arnold y col., 2015).

Los mecanismos exactos a través de los cuales el SMet puede inducir o empeorar la ERC son poco claros. Presentar diabetes mellitus tipo 2 o hipertensión son un condicionante, una inflamación crónica, alteración en el sistema renina – angiotensina, el estrés oxidativo

(Lerman., 2011) y la obesidad son factores de riesgo (Kovesdy y col., 2017).

El exceso de tejido adiposo observado en el SMet puede expresar muchas moléculas proinflamatorias (citoquinas) (Xu y col., 2003). El tamaño de los adipocitos se correlaciona con los niveles de IL-6, TNF- α y la proteína C-reactiva (Bahceci y col., 2007). Su aumento genera una inflamación sistémica y una resistencia a la insulina (Grundy, 2016). En estudios experimentales con animales se observó que el aumento de citoquinas proinflamatorias provocó una mayor filtración en el riñón generando un daño en la función renal (Ma Shuangtao y col., 2016).

Así mismo, el tejido adiposo presenta una actividad endocrina de adipocinas (Lehr y col., 2012). Estas adipocinas se describen como leptina, resistina y adiponectina, esta última tiene la función de ayudar en el metabolismo de la glucosa y los ácidos grasos, se ha observado que en procesos obesogénicos, sus niveles se ven disminuidos y se relaciona con resistencia a la insulina (Sharma, 2009). Su principal receptor son los podocitos en el riñón y su actividad probablemente este mediada por la proteína quinasa activada por 5'AMP (AMPK). Algunos estudios en ratones reflejan que una expresión reducida exhibe lesión en los podocitos, albuminuria y fibrosis renal (Sharma y col., 2008).

Por el contrario, la leptina, es una hormona que regula el apetito, su mecanismo de acción es inhibiendo el Neuropeptido Y (NPY – aumenta la ingesta y disminuye la termogénesis), en personas con obesidad se ha observado que su función se ve alterada, se presenta una resistencia a la leptina, la razón puede estar relacionada con altos niveles de triglicéridos que afectan su transporte a través de la barrera hematoencefálica (BHE) o que su transportador se encuentra saturado (Berg Anders H. y Scherer Philipp E., 2005). Se ha observado in vitro que la leptina provoca hipertrofia de las células mesangiales glomerulares, generando mayor filtración de albumina y proteína (Lee y col., 2005).

En la obesidad los podocitos se agrandan para cubrir un área de superficie mayor en el glomérulo (Glomerulopatía) con el tiempo se atrofian y se genera un desprendimiento ya que su tamaño ya no es proporcional a la hipertrofia glomerular resultando en una glomeruloesclerosis segmentaria focal que conduce a una enfermedad renal en etapa terminal (Fukuda y col., 2012).

El vínculo entre la resistencia a la insulina y la enfermedad renal podría entenderse en la dependencia de los podocitos glomerulares que componen la barrera de filtración glomerular a la insulina (Tao y col., 2012). Esta última controla la contractibilidad de los podocitos asociada con la permeabilidad glomerular (Kim y col., 2011).

La insulina tiene la capacidad de regular la Tasa de Filtración Glomerular (TFG) a través de vasodilatación renal local, utiliza la indometacina para disminuirla y por medio de la síntesis de NO endotelial la aumenta (Hayashi y col., 1997). Sin embargo, este efecto de la insulina puede alterarse cuando existe una RI, en consecuencia la hiperinsulinemia puede producir hiperfiltración glomerular y aumento de la permeabilidad vascular desencadenando una albuminuria urinaria y la progresión de lesión renal (Chade y Hall, 2016).

La hipertensión es una característica importante del SMet y una causa común de enfermedad renal (Zhang y Lerman, 2017). Se han descrito diversos mecanismos por los cuales la presión arterial se puede elevar y su relación con la obesidad (Alberti y col., 2009). Una dieta alta en lípidos puede provocar un desequilibrio en la reabsorción de sodio. La alteración del sistema renina-angiotensina-aldosterona y el aumento de la actividad del sistema parasimpático, así como la liberación de angiotensinógeno y aldosterona contribuyen para desarrollar hipertensión (Briones Ana M. y col., 2012).

El estrés oxidativo juega un papel importante en el SMet. (Bonomini y col., 2015). La mitocondria es un orgánulo fundamental para generar

energía (Nunnari y Suomalainen, 2012) y manejo de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Las células renales son ricas en mitocondrias y tienen una alta demanda de energía, por lo tanto la fisiopatología de las enfermedades renales afecta a casi todas sus células (Eirin y col., 2017).

La hiperuricemia tiene una fuerte asociación con el SMet y se correlaciona con hiperinsulinemia posiblemente por el efecto inflamatorio que genera en los adipocitos, además los niveles séricos de ácido úrico se relacionan con un mayor riesgo de desarrollar disfunción renal crónica (Li y col., 2014). Claramente la fisiopatología de la enfermedad renal, se relaciona con el SMet, ya que el riñón es un órgano diana susceptible a todos los factores de riesgo del Síndrome Metabólico (Figura 3).

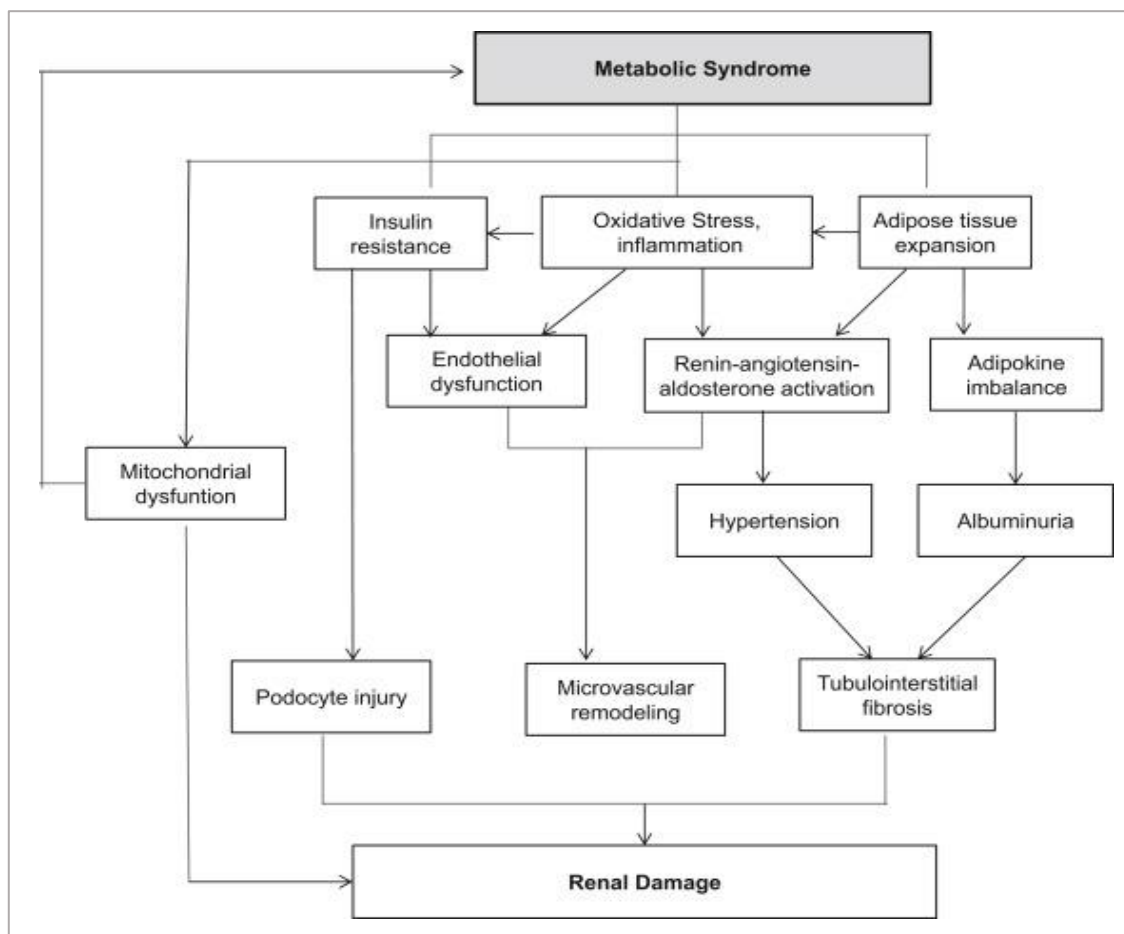


Figura 3.- Factores de riesgo del SMet que promueven daño renal

2.1.4.- Tratamientos farmacológicos y no farmacológicos

2.1.4.1.- Tratamientos farmacológicos

El manejo del Síndrome Metabólico involucra un tratamiento combinado en cambios de estilo de vida con una adecuada intervención farmacológica. Dentro de estas intervenciones destacan las que incluyen el manejo de la dislipidemia aterogénica mediante el uso de estatinas (atorvastatina, simvastatina ezetimiba). En los pacientes intolerantes a las estatinas se ha utilizado un anticuerpo monogénico contra PCSK9; una proteína que facilita la degradación de los receptores de LDL (Sabatine y col., 2015) (Robinson y col., 2015).

Para la reducción de triglicéridos se han utilizado niacina y fibratos, sin embargo, el beneficio es menor en comparación con el tratamiento de estatinas. (The HPS2-THRIVE Collaborative Group, 2014) (The AIM-HIGH Investigators, 2011) En la actualidad se agrega fenofibrato a la terapia con estatinas y parece tener un efecto favorable sobre la enfermedad microvascular (Rajamani y col., 2009). Para disminuir el riesgo protrombótico se utilizan fármacos antiplaquetarios como el ácido acetilsalicílico (AAS aspirina) (Goldstein Larry B. y col., 2011).

El tratamiento farmacológico de primera línea para la hipertensión son los diuréticos, entre ellos existen los inhibidores de la ECA (Zreikat y col., 2014), los tiazídicos, que además mejoran la resistencia a la insulina. (Dronavalli Suma y Bakris George L., 2008) los antagonistas del receptor de angiotensina II (ARAII- telmisartán) (Benson Stephen C. y col., 2004), los bloqueantes de los receptores beta/alfa – 1 no selectivos, como el carvediol que no presentan efectos adversos para resistencia a la insulina (Bakris y col., 2004) y los bloqueantes de los receptores beta – 1 como el atenolol y metoprolol, que mejoran la hipertensión pero presentan un aumento de resistencia a la insulina (Standl y col., 2012). También se utilizan los antagonistas del calcio que parecen ser metabólicamente neutros y generar una leve mejoría en la RI (Farah y col., 2013).

La reducción de la grasa visceral a nivel farmacológico se ha tratado con orlistat y sibutramina, sin embargo, se ha observado que la sibutramina puede tener efectos secundarios en la presión arterial (Filippatos y col., 2005). En pacientes con DMT2 el tratamiento farmacológico más utilizado es la metformina o insulina.

Una alternativa a la terapia farmacológica es la cirugía bariátrica (Buchwald y col., 2009), efectivas para la obesidad y todas sus comorbilidades (Carlsson y col., 2012). Sin embargo, se debe hacer un seguimiento nutricional adecuado postoperatorio para evitar nuevamente un aumento de peso.

Actualmente no existe una farmacología única para el manejo del SMet y las ENT. La farmacoterapia requiere el uso prolongado de múltiples medicamentos y un gran desafío en muchos de los pacientes. Por lo tanto, existe un interés creciente en los tratamientos no farmacológicos que se centran en una intervención primaria enfocados en los cambios de estilo de vida y mayor actividad física, así como el uso de ingredientes multifuncionales que ayuden a reducir la dosis de fármacos cuando ya existe una patología y también ayuden a reducir el riesgo y la progresión del Síndrome Metabólico.

2.1.4.2.- Tratamientos no farmacológicos y estilos de vida

Los estilos de vida sedentarios, la urbanización y el acceso a alimentos industrializados y precocinados están creando una pandemia del SMet (Grundy Scott M., 2008). Un cambio en los estilos de vida sedentarios y una reducción del exceso de peso es imprescindible para mejorar los signos y síntomas de enfermedades cardiovasculares y renales.

El uso de ingredientes multifuncionales que tienen un beneficio demostrable en el tratamiento de pacientes con síndrome metabólico aún está bajo investigación y se sugieren como terapias de acompañamiento del tratamiento farmacológico (Rochlani y col., 2017).

2.1.4.2.1.- Recomendaciones dietéticas

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

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

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

2.1.4.2.2.- Alimentos Funcionales: origen, clasificación y efecto beneficioso

La definición de alimentos funcionales se ha utilizado de forma muy amplia en estrategias de marketing y no existe una definición científica aceptada, sin embargo la International Life Science Institute (ILSI) emitió en el consenso Functional Food Science in Europe (FUFOSE) un concepto que hasta hoy en día es el más aceptado. Establece que un alimento puede ser considerado funcional si se ha demostrado de manera

satisfactoria que posee un efecto beneficioso sobre una o varias funciones específicas en el organismo, más allá de los efectos nutricionales que ya tiene, pero es importante destacar que los alimentos funcionales han de seguir siendo un alimento (Hernandez, 2010), no se consumirán en forma de píldoras, cápsulas o polvos. Deben demostrar sus efectos en cantidades que se puedan consumir normalmente en la dieta formando parte de un patrón normal de alimentación y su consumo debe gozar de total seguridad (Hernandez, 2010).

La comisión europea considera la alimentación un sector estratégico en el ámbito de salud pública y por lo tanto su importancia en la regulación de los diferentes productos alimenticios. Existe en este marco grupos de alimentos bien definidos que establecen diferencias claras con los alimentos funcionales (Tabla 2).

Tabla 2: Categorías de alimentos e ingredientes alimentarios

Término	Legislado por la comunidad europea
Complementos alimenticios	Directiva 2006/37/CE Reglamento (CE) nº1925/2006
Alimentos dietéticos	Directiva 2009/39/CE Reglamento (UE) nº609/2013
Nuevos alimentos	Reglamento (CE)nº2015/2283
Alimentos funcionales	En materia de alegaciones: Reglamento (CE)nº109/2008 Reglamento (UE)nº907/2013
Nutraceuticos	No hay legislación específica, son aplicables las anteriores cuando corresponda y en materia de alegaciones la de alimentos funcionales.

Los alimentos funcionales no curan ni previenen por sí solos y no son indispensables en la dieta, una persona sana que sigue una dieta equilibrada ya ingiere todos los nutrientes que necesita y no necesitaría recurrir a esta nueva categoría de alimentos(Luengo, 2007).Sin embargo

introducirlas en nuestra dieta puede ayudar a prevenir determinadas enfermedades.

Los componentes alimentarios que confieren funcionalidad al alimento se pueden clasificar en 5 grupos (Tabla 3).

Tabla 3.- Componentes alimentarios con funcionalidad en los alimentos

Componente alimentario	Efectos biológicos	Fuentes alimentarias
Probióticos	Mejoría de la digestibilidad Regulación de la flora intestinal Modulación del sistema inmunitario	Productos fermentados de lactobacilos y bifidobacterias
Prebióticos	Mantenimiento y desarrollo de la biota intestinal Aumento de la absorción de minerales (calcio, magnesio y hierro)	Hidratos de carbono de cadena corta (Inulina y transgalactoligosacáridos)
Simbióticos	Intervención en enfermedades gastrointestinales inflamatorias agudas	Mezcla de prebióticos y probióticos
Nutrientes	Necesarios para evitar caer en malnutrición. Efecto preventivo sobre algunas enfermedades crónicas	Los más estudiados: folatos, algunos ácidos grasos, vitaminas antioxidantes C y E,
Compuestos bioactivos	Efecto antioxidante	Polifenoles, flavonoides, carotenoides, fitoesteroles etc.

2.1.4.2.2.1.- Compuestos bioactivos

Los compuestos bioactivos (CBA) son los componentes de los alimentos funcionales justificando así su efecto beneficioso sobre la salud. Estos compuestos son derivados de azúcares, lípidos, y aminoácidos, son principalmente metabolitos secundarios de las plantas denominados

fitoquímicos, pero también se pueden encontrar en alimentos de origen animal, al igual que en bacterias y hongos, muchos de ellos han sido aislados y caracterizados químicamente, se encuentran de forma natural en la dieta y a diferencia de las vitaminas y minerales no son necesarios para el crecimiento y desarrollo.

Estos compuestos pueden afectar procesos biológicos generando un impacto sobre las funciones del organismo, se han asociado con la prevención en el desarrollo de enfermedades. Estudiar los mecanismos de acción de los compuestos bioactivos es fundamental, sin embargo, su biodisponibilidad cambia cuando se ingieren puros o cuando se ingieren dentro del alimento funcional, es importante tener en cuenta que en un solo alimento puede contener diferentes compuestos bioactivos que pueden interactuar entre ellos y generar sinergia. Al inicio estas investigaciones se centraban en su capacidad antioxidante, en la actualidad se investigan sus efectos sobre señalización celular y los procesos apoptóticos, angiogénesis y metástasis (Hernandez, 2010).

Los compuestos bioactivos están relacionados con diferentes funciones en la señalización celular, en los procesos apoptóticos, la evidencia sugiere que estos compuestos pueden inducir la apoptosis en células preneoplásicas a través de varios mecanismos como el citocromo-C y caspasas, resultando en la inhibición y progresión de procesos tumorales.

Durante los ciclos celulares se ha observado que los CBA pueden detener alguna de las 4 fases (G₁: crecimiento, S: diferenciación, G₂: proliferación y M: muerte celular), regulando la interacción de quinasas dependientes de ciclinas (CDK). El B-sitosterol y la curcumina detienen la fase G₂ y M relacionándolo con una disminución del complejo de formación CDK-1 controlando la progresión del proceso celular en procesos cancerígenos (Kuttan y col., 2007).

El proceso carcinogénico lo constituyen la progresión la angiogénesis y la metástasis y estos procesos se han relacionado con el estrés oxidativo y la inflamación crónica, signos claros en el SMet. Los CBA tiene la capacidad de modular la progresión y señalización de vías inflamatorias como COX2, iNOS y NF- κ B, debido a ello se les atribuyen efectos antiinflamatorios y anticancerígenos (Hernandez, 2010).

2.1.4.2.2.1.1.- Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son compuestos que resultan del metabolismo de las plantas y en general son los responsables del color, sabor y aroma de los alimentos. Su estructura química tiene un anillo aromático (C6) en común con uno o más grupos hidroxilo. El interés en los compuestos fenólicos surge de estudios nutricionales sobre su consumo y sus efectos sobre el tratamiento y la prevención de varias enfermedades, entre ellas obesidad, cáncer, ECV y las neurodegenerativas.

Los compuestos fenólicos más comunes son los derivados del ácido hidroxibenzoico y el ácido hidroxicinámico. Se dividen en dos grupos, de acuerdo a su naturaleza química en compuestos fenólicos simples y polifenoles (Tabla 4).

Tabla 4.- Clasificación de compuestos fenólicos

Compuestos fenólicos simples	Polifenoles
Hidroxitirosol	Flavonoides
Ácido orto- cumárico	Estilbenos
Ácido gálico	Curcuminoides
Ácidos clorogénicos	Lignanós

El hidroxitirosol, por ejemplo, se encuentra principalmente en los residuos generados de la producción de aceite de oliva, se considera un compuesto anticancerígeno por su capacidad para frenar el ciclo celular o induciendo la apoptosis, también ha mostrado beneficios en la prevención del síndrome metabólico (Peyrol y col., 2017).

Los flavonoles como la epigallocatequina (EGCG) se encuentran principalmente en el té verde y las lentejas y destaca su capacidad antioxidante, antidiabética y antiaterogénica. Los mecanismos de acción no están del todo claros, sin embargo, estudios sugieren que puede estar relacionado con la vía de señalización de Notch encargada de regular procesos como proliferación, diferenciación y muerte celular (Wang y col., 2017).

Dentro de los polifenoles, las isoflavonas se encuentran principalmente en las leguminosas ligadas a los hidratos de carbono, durante la hidrólisis, dan lugar a las agliconas como genisteína, daidzeína y gliciteína. Diferentes estudios han demostrado beneficios en el perfil lipídico, cáncer de mama, obesidad, diabetes, ECV y osteoporosis (Křížová y col., 2019). Sin embargo, las isoflavonas también pueden comportarse como disruptores endocrinos y mostrar resultados contradictorios, la causa parece ser la dosis usada, tamaño de la muestra y duración de los estudios.

Los efectos más estudiados de las isoflavonas son sobre los lípidos plasmáticos y la concentración de lipoproteínas, donde se han observado reducciones de LDL y aumento de la HDL, los efectos se asocian a una mejora en el flujo vascular y una dilatación arterial sistémica (González Cañete y Durán Agüero, 2014).

La mayoría de la evidencia científica sobre este tema ha demostrado efecto beneficioso *in vitro* o *in vivo* en animales, los estudios en humanos aún son escasos.

2.1.4.2.3.- Ejercicio Físico

2.1.4.2.3.1.- Efectos generales del ejercicio sobre parámetros de Síndrome Metabólico

Comprender la fisiología del ejercicio ayuda a mejorar las enfermedades crónicas, el ejercicio regular y una dieta saludable son

probablemente la intervención en el estilo de vida con mayor efecto benéfico para la salud.

Se ha demostrado que la actividad física tiene múltiples efectos beneficiosos sobre el SMet comenzando por una pérdida de peso que mejora la resistencia a la insulina, disminuye la inflamación sistémica y reduce el riesgo de enfermedad cardiovascular (Grundy y col., 2012). En diferentes estudios y metaanálisis se ha observado la eficacia del ejercicio físico en personas con síndrome metabólico, parámetros como el IMC, la circunferencia de cintura, la presión arterial y la glucemia se redujeron significativamente, los parámetros lípidos también mostraron mejora. Se concluyó que el entrenamiento físico mejora la composición corporal, los parámetros cardiovasculares y metabólicos (Ostman y col., 2017). Los principales beneficios de la práctica de ejercicio se describen a continuación en la Tabla 5 (Chicharro y Vaquero, 2006).

Tabla 5.- Beneficios del ejercicio físico

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

El ejercicio físico a largo plazo estimula una remodelación del corazón induciendo un crecimiento y una reprogramación molecular y celular. Estudios sugieren que el ejercicio crónico genera hipertrofia de los miocitos y con ello vías antagonistas a las rutas patológicas mejorando la

capacidad cardiaca y proporcionando cardioprotección (Vega y col., 2017).

2.1.4.2.3.2.- Principales tipos de ejercicio en el Síndrome Metabólico

Un programa de actividad física es primordial para el manejo clínico del SMet. Se ha estudiado que un entrenamiento en intervalos aeróbicos de alta intensidad es más efectivo que un entrenamiento continuo de intensidad moderada (Haram y col., 2008). Con respecto a las alteraciones presentes en el SMet, se ha observado en estudios con animales que la frecuencia y duración del ejercicio son los principales factores que alteran los parámetros antropométricos y metabólicos, así como la densidad microvascular en el corazón (Machado y col., 2017).

En otro estudio el entrenamiento aeróbico interválico demostró, además de los múltiples beneficios para el control del peso corporal un efecto reductor de la glomeruloesclerosis y redujo los niveles de albumina urinaria, además de una acción beneficiosa significativa sobre el metabolismo de lípidos. Los autores concluyen que el entrenamiento aeróbico interválico es una buena estrategia para prevenir alteraciones en la estructura renal y parámetros urinarios causados por la obesidad (Martínez y col., 2019).

En mujeres con obesidad, se realizó un estudio aplicando diferentes protocolos de entrenamiento, el primer grupo realizaba una sola sesión de 30 minutos al día, el segundo grupo realizaba 3 sesiones de 10 minutos 3 veces al día, ambos grupos realizaban el protocolo 3 veces a la semana durante un periodo de 12 semanas, el grupo control no realizaba ningún ejercicio. Se demostró que el ejercicio prolongado es superior a múltiples sesiones cortas para mejorar los riesgos del síndrome metabólico y el índice aterogénico en mujeres obesas ya que se observó una mejora en todos los parámetros antropométricos como el IMC, circunferencia de cintura, porcentaje de grasa, además de una mejora en la presión arterial y los niveles de glucosa en sangre (Chung y col., 2017).

Otros autores estudiaron los efectos beneficiosos de una intervención mixta con dieta a base de un germinado de *V. radiata* (soja) vs leguminosa cruda y un protocolo de entrenamiento de intervalos aeróbicos sobre parámetros plasmáticos y de funcionalidad hepática en ratas Zucker y observaron una mejora significativa de los parámetros antes mencionados en el grupo que consumió el germinado de *V. radiata* y realizó el protocolo de entrenamiento en comparación con el que grupo que consumió la leguminosa cruda. El rendimiento físico siempre fue menor en ratas obesas en comparación con ratas delgadas, esto se relaciona con las graves alteraciones metabólicas que padecían las ratas obesas como el deterioro en la perfusión del músculo esquelético. El resultado del protocolo de entrenamiento de intervalos aeróbicos mostró una clara mejora en la capacidad aeróbica en ratas delgadas y obesas, lo que se correlaciono en estas condiciones experimentales en cambios significativos en el metabolismo de la glucosa, perfil lipídico y mejora en la histología hepática (Kapraavelou y col., 2017).

2.1.4.2.3.3.- Mecanismos de acción del ejercicio a nivel celular y molecular

La fisiología del ejercicio es una disciplina científica relativamente reciente. Sin embargo, desde 1927 se creó en Estados Unidos el denominado "Laboratorio de la Fatiga de Harvard" a cargo del bioquímico Henderson. Años después el doctor Johannes Lindhard creó el laboratorio de teoría de la educación física en Copenhague, ambos tuvieron un impacto significativo para los primeros estudios en fisiología del deporte y para comprender los mecanismos que regulan las respuestas fisiológicas del cuerpo, las rutinas de ejercicio agudo, las adaptaciones al entrenamiento y el desentrenamiento.

El músculo esquelético satisface sus necesidades energéticas a partir de los nutrientes de la dieta, principalmente de hidratos de carbono y grasas, estos sustratos se transforman en adenosina trifosfato (ATP) a

partir de esta molécula se obtiene la energía necesaria para realizar cualquier movimiento o entrenamiento. La célula tiene tres rutas metabólicas para sintetizar ATP; a partir de fosfocreatina (PCr), la glucólisis anaeróbica con la transformación del glucógeno muscular en lactato y la fosforilación oxidativa (Chicharro y Mojares, 2008).

El ejercicio físico puede estimular la secreción dentro del músculo esquelético de cientos de sustancias como proteínas, factores de crecimiento, citocinas, metalopeptidasas y provocar la miogénesis (Henningesen y col., 2010; Roca-Rivada y col., 2012). Las moléculas derivadas de los músculos que ejercen un efecto endocrino o paracrino en el cuerpo se denominan "mioquinas" (Figura 4) y son las responsables y mediadoras de los efectos del ejercicio físico en la salud (Fiuza-Luces y col., 2013; Pedersen y col., 2007).

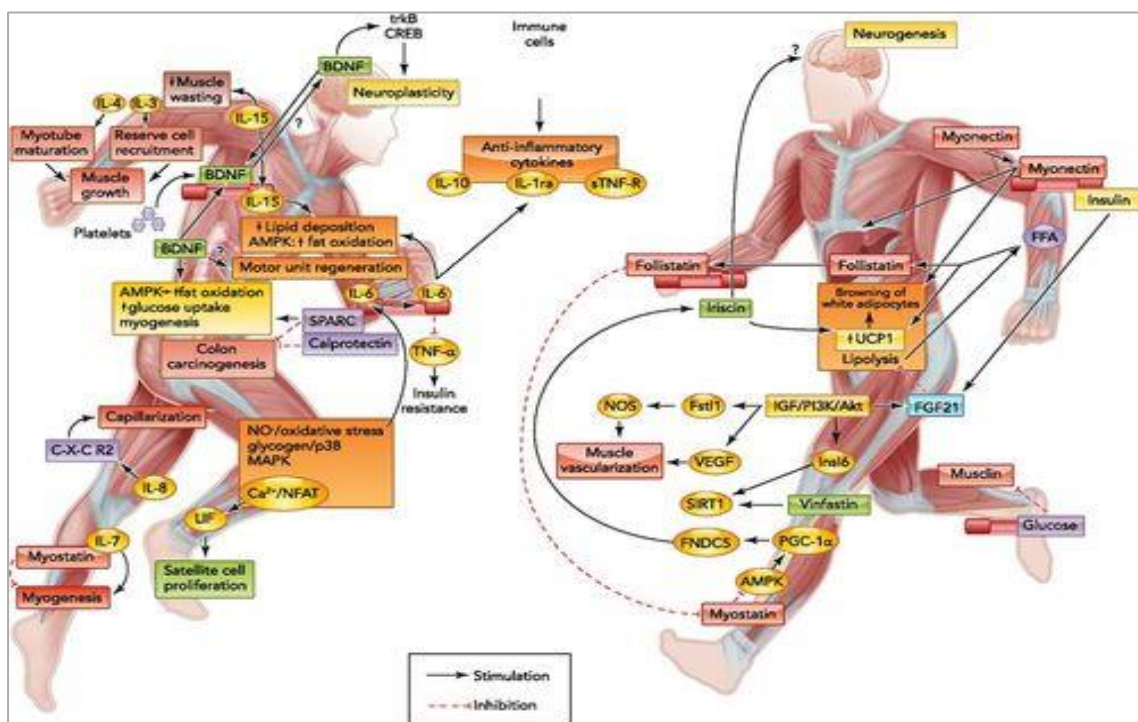


Figura 4.- Moléculas secretadas por los músculos como respuesta del ejercicio físico "mioquinas"

Una de las primeras mioquinas en ser descrita fue la miostatina, esta es un potente inhibidor del crecimiento muscular, según lo descrito, los ejercicios de resistencia crónica reducen su expresión (Hittel y col., 2010). Su aumento puede contribuir a la resistencia a la insulina y obesidad (Hittel y col., 2009).

La IL-6 es otra mioquina que aumenta con la intensidad y duración del ejercicio, pero disminuye con el daño muscular y la ingestión de carbohidratos. Los efectos del ejercicio crónico aún son controvertidos (Croft y col., 2009; Fischer y col., 2004), sin embargo, reflejan que el entrenamiento aumenta la sensibilidad del receptor de IL-6 en los músculos ejerciendo una acción local en ellos o de manera periférica similar a la hormonas, mediando efectos metabólicos, antiinflamatorios o inmunomoduladores. La IL-6 tiene acciones similares a la leptina, tanto en el músculo esquelético como en el tejido adiposo aumenta la absorción de glucosa y mejora la oxidación de lípidos (Bruce y Dyck, 2004). En las enfermedades cardiometabólicas los efectos del ejercicio pueden liberar mioquinas como la IL-6 creando un entorno saludable para inducir la liberación de otras citoquinas antiinflamatorias como el antagonista del receptor de Interleucina 1 (IL-1RA) e inhibir la citoquina proinflamatoria TNF-alfa (Ostrowski y col., 2000). Otro tipo de mioquina inducida por la contracción muscular es la Interleucina – 15 (IL-15), sus efectos principales son anabólicos y anticatabólicos locales, esta mioquina tiene un efecto antiobesogénico, por lo tanto se considera un mediador de los efectos del ejercicio contra la obesidad (Quinn y Anderson, 2011).

El Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (FNDC) es uno de los factores neurotróficos necesarios para la supervivencia neuronal, aumenta principalmente con el ejercicio de alta intensidad (Schmidt-Kassow y col., 2012), podría actuar localmente mejorando la oxidación de lípidos a través de la activación de AMPK (Matthews y col., 2009).

Las células madre mesenquimales (CMM) podrían ser otro factor terapéutico ya que el ejercicio es un estímulo para la liberación de CMM al torrente sanguíneo y junto con las células madre pluripotenciales tiene la capacidad de reparar el miocardio dañado (Wu y col., 2011).

2.2.- Marcadores de funcionalidad cardiovascular y renal

2.2.1.- Marcadores de funcionalidad cardiovascular

2.2.1.1 Marcadores de obesidad

La obesidad es el factor de riesgo más prevalente en la enfermedad cardiovascular, los marcadores de diagnóstico para la obesidad son principalmente el Índice de Masa Corporal (IMC), que se obtiene a partir de la fórmula peso(kg)/talla(m²). Los rangos de corte para el diagnóstico de sobrepeso y obesidad se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6.- Índice de Masa Corporal

IMC	Clasificación
<18.5	Bajo peso
18.5 – 24.9	Normo peso
25 – 29.9	Sobrepeso
30 – 34.9	Obesidad tipo I
35 – 39.9	Obesidad tipo II
>40	Obesidad Mórbida

La evidencia indica que lo más apropiado sería medir la grasa corporal total y la circunferencia de cintura/cadera y no solo el IMC ya que puede subestimar o sobreestimar el diagnóstico de la obesidad debido a que utiliza el peso total como denominador, por lo tanto, sujetos con mayor masa muscular y poca grasa serán diagnosticados como obesos o con sobrepeso (IMC \geq 30= obesidad). Y por otra parte los individuos que presentan IMC normal (IMC=18.5 – 24.9) o sobrepeso (IMC \geq 25-29.9), pero con una distribución anormal de la grasa corporal podrían estar en riesgo elevado de eventos cardiovasculares (Okorodudu y col., 2010).

El índice de circunferencia abdominal y la índice cintura/cadera se utilizan como medidas sustitutivas y complementarias para la evaluación corporal, ya que la obesidad central se relaciona con resistencia a la insulina, dislipidemias y riesgo cardiovascular. Los rangos son variables dependiendo la población. En las siguientes tablas (7,8,9,10) se describen los rangos para hombres y mujeres basados en la evidencia científica.

Tabla 7.- Circunferencia de cintura

Sexo	Aumentado	Muy aumentado
Hombres	94cm	102cm
Mujeres	80cm	88cm

*Puntos de corte: Guías clínicas para la Obesidad del Instituto Nacional de Salud de los EE.UU. National Institutes of Health (NIH).
 *Actualmente diversos estudios recomiendan usar solo la circunferencia de cadera como predictor de riesgo para complicaciones metabólicas.

Moreno M. Definición y clasificación de la obesidad. Rev Med Clin CONDES. 2012;23(2): 124-128 Rosales Ricardo. Antropometría en el diagnóstico de pacientes obesos; una revisión. Nutr Hosp 2012; 27(6): 1803-1809.

Tabla 8.- Interpretación de circunferencia de cintura asociada con el riesgo de enfermedad cardiovascular

Género	Riesgo alto	Riesgo muy alto
Hombres	≥ 94cm	≥ 102cm
Mujeres	≥ 80cm	≥ 88cm

La medida de la cintura debe tener como valor máximo la mitad de la talla en cm.

Hellerstein M. Waist circumference. Auselful indexin clinical care and health promotion. Nutrition Reviews. 1998.

Tabla9.- Relación cintura/cadera

Hombres	> 0.95
Mujeres	> 0.85

Tabla 10.- Relación cintura/cadera (distribución de grasa)

Valores de riesgo basados en datos antropométricos	Hombres	Mujeres	Riesgo
Índice cintura/ cadera	≥ 1 0.90 – 1 <0.90	≥ 0.85 0.80 – 0.85 <0.80	Muy elevado* Elevado Muy bajo
Circunferencia de cintura (SEEDO)	>95cm >102cm	>82cm >90cm	Elevado Muy elevado
National Institute of Health (NIH)	>94cm >102cm	>80cm >88cm	Elevado Muy elevado

*Indica obesidad androide, abdominal o central y está asociada a mayor riesgo cardiovascular

2.2.1.2.- Electrocardiograma como marcador de riesgo cardiovascular

La Sociedad Europea de Hipertensión recomienda que el electrocardiograma debería formar parte de las técnicas de diagnóstico en todos los pacientes con alteraciones metabólicas (Ruiz, 2009).

En la práctica clínica el estudio electrocardiográfico es una herramienta confiable y un marcador importante para monitorizar la correcta función del corazón. Diferentes estudios han demostrado una relación entre pacientes con SMet y el desarrollo de fibrosis miocárdica (Kosmala y col., 2012)(Oner y col., 2015). El complejo QRS fragmentado (QRSf) también se asocia con fibrosis miocárdica y se relaciona con muerte súbita cardíaca en pacientes con insuficiencia cardíaca (Oner y col., 2015), (Sha y col., 2011).

Estudios en animales reportan que la neuropatía autonómica diabética (NAD) muestra alteraciones en el estudio electrocardiográfico en la amplitud de la onda R y ensanchamiento del intervalo QTc (VanHoose y col., 2010), la alteración de estos intervalos es signo de progresión de enfermedad cardiovascular y arritmias ventriculares

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

correlaciona positivamente con una alteración del intervalo QT y QT corregido (QTc). Según Delhey y col., (2019) este índice se puede utilizar como un marcador de efectivo de riesgo cardiovascular.

2.2.1.3.- Marcadores de aterogénesis y proceso inflamatorio

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

Uno de los marcadores más utilizados para diagnosticar el riesgo de aterogénesis es el índice aterogénico, que resulta de la proporción entre los niveles de colesterol total y colesterol HDL. Se calcula de acuerdo con la siguiente fórmula y el resultado expone el riesgo del paciente (Tabla 11).

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

Tabla 11.- Relación entre el Índice aterogénico y el riesgo de enfermedad cardiovascular (ECV)

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

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

La tasa de sedimentación de eritrocitos/ velocidad de sedimentación globular (VSG) se considera otro marcador para analizar los procesos inflamatorios. Esta prueba mide la velocidad de caída de los eritrocitos en el tubo de ensayo. En un proceso inflamatorio diversas sustancias como citoquinas, interleucinas, fibrinógeno, alfa-macroglobulinas e inmunoglobulinas se secretan en la sangre lo que genera un aumento de la agregación eritrocitaria formando complejos más densos y como consecuencia un descenso más rápido en comparación con una célula individual.(Provan y col., 2017). Determina si el nivel de inflamación aumenta o disminuye. Los valores normales en adultos son los siguientes: Tabla12.

Tabla 12: Tasa de sedimentación de eritrocitos/velocidad de sedimentación globular

Edad	VSG (mm/hr)
Niños	0 a 10
Hombres	
<50 años	0 a 15
>50 años	0 a 20
Mujeres	
<50 años	0 a 20
>50 años	0 a 30

2.2.2.- Marcadores de funcionalidad renal

2.2.2.1.- Filtración glomerular y aclaramiento renal de creatinina

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

- Medida de filtración glomerular (FG) y la concentración plasmática de creatinina (Cr) y de urea (U)
- Determinación de la concentración de iones en plasma y en orina

- Análisis de la osmolaridad plasmática y urinaria
- Valoración del equilibrio ácido - base plasmático
- Proteinograma plasmático y proteinuria
- Hemograma, calcemia, fosforemia y fosfatasa alcalina
- Uroanálisis, sedimento y cultivo de orina

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

La función renal se evalúa estimando la tasa de filtración glomerular (TGF) mediante fórmulas basadas en marcadores endógenos como la creatinina sérica, urea o la Cistatina C y otras variables como peso, edad y género (Luis-Lima y col., 2019). La filtración glomerular (FG) se puede medir por diferentes pruebas prácticas (tabla 13).

Tabla 13: Pruebas clínicas de valoración de FG

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

La creatinina se produce por la conversión de la creatina muscular en el hígado y se filtra libremente por el glomérulo, su excreción la regulan

las células del túbulo proximal, por lo que el aclaramiento de creatinina excede la filtración glomerular y los valores se elevan proporcionalmente menos de lo que empeoran la funcionalidad renal (Chen, 2013).

Además de la secreción tubular, la creatinina sérica tiene otras formas de degradación que pueden alterar su interpretación, la masa muscular y la ingesta dietética son los principales componentes de su formación y probablemente estén relacionados con una mayor variación en los resultados de las pruebas clínicas. Otras maneras de degradación son la eliminación extrarrenal por bacterias intestinales y también algunos fármacos pueden elevar los niveles de creatinina sérica sin que descienda de forma real el filtrado glomerular (Avendaño y Hernando, 2009).

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

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

Donde:

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

2.2.2.2.- Albuminuria

La albumina es la principal proteína sérica, tiene un peso molecular de 69.000 y esta negativamente cargada, por estas características no se filtra normalmente, es un biomarcador de disfunción glomerular. La microalbuminuria es un marcador precoz para nefropatía diabética y mortalidad cardiovascular. (Avendaño y Hernando, 2009) Se identifica como un factor de riesgo significativo en ER según lo que determina la TFG reducida (Wada y col., 2014). La albuminuria se asocia con la progresión de enfermedad renal crónica y la aparición de eventos

cardiovasculares (Souweine y col., 2019). El aumento de albuminuria basal y los niveles elevados de albuminuria se asocian significativamente con el tiempo para enfermedad renal terminal (Berhane y col., 2011).

La albuminuria se clasifica por el sistema KDIGO (EUA) y la Sociedad española de Nefrología lo valida (tabla 14) Se define como la presencia de valores entre 30-300mg/24horas confirmados en 2 o 3 determinaciones (Skorecki et al., 2018)

Tabla 14. Escala KDIGO. Categorías, descripción y rangos de albuminuria

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

2.2.2.3.- Minerales y pH en relaciona a formación de cálculos renales

En la enfermedad renal crónica existen alteraciones comunes en el metabolismo óseo caracterizados por hiperfosfatemia, hiperparatiroidismo secundario y riesgo de fractura (Newman y col., 2014). Los principales minerales que se ven alterados son el calcio y el fosforo además de la vitamina D. El desequilibrio de estos compuestos se diagnostica mediante pruebas analíticas donde se evalúan los niveles en sangre y orina de calcio, fósforo y calcifediol.

Los niveles de calcio en suero deben mantenerse entre 8 y 10.5mg/dL y su equilibrio depende de la parathormona (PTH) la vitamina D y la calcitonina. Los niveles normales de fósforo en suero oscilan entre

2.5 y 4.5mg/dL y para medir el fosfato en orina, es necesario recogerlo durante 24 horas por su amplia variación diurna.

La litiasis renal o cálculos renales se pueden formar en los cálculos y en la pelvis renal, los uréteres y la vejiga, su tamaño puede ser variable, apenas visibles o los llamados “asta de ciervo” por su forma. Su eliminación dependerá de su tamaño, los más pequeños pueden ser expulsados por orina, sin embargo, este tratamiento es sumamente doloroso para el paciente. Los más grandes requieren de ondas ultrasónicas (litotricia) para romper los más pequeños y poder ser eliminados por la orina. En casos muy severos se puede emplear la extirpación quirúrgica (Strasinger y Lorenzo, 2010) .

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

La evaluación del pH urinario y un análisis de orina de 24 horas proporcionan información sobre los factores que forman el cálculo y pueden guiar el tratamiento y prevención. El pH urinario es el factor más destacado que precede a la formación de cálculos renales (Xu y col., 2017). En condiciones de normalidad el pH de la orina es superior a 7.

La prevención de litiasis renal por oxalatos de calcio, cistina y ácido úrico, está relacionado con alcalinizar la orina por medio de una dieta rica en frutas y verduras alcalinas y un adecuado tratamiento farmacológico (Frassetto y Kohlstadt, 2011).

2.3.- Leguminosas

2.3.1.- Clasificación, composición química y valor nutricional

Las legumbres o leguminosas pertenecen a la familia *Leguminosae*, se consumen generalmente en forma de semillas secas maduras, pero también pueden consumirse en vainas o semillas verdes. La legislación española establece que las legumbres frescas deben comercializarse

como verduras u hortalizas. Las semillas maduras tienen tres componentes principales: la testa, la piel o cáscara los cotiledones y el eje embrional. La FAO sugiere la siguiente clasificación basada en su composición química (Tabla 15)).

Tabla 15.- Clasificación química de leguminosas

Leguminosas de grano o legumbres	Leguminosas Oleaginosas
Proteína 20 -30%	Proteínas 28-42%
Hidratos de carbono complejos 30-60%	Hidratos de carbono: poco o nulo
Fibra alimentaria 11-25%	Fibra alimentaria: 3-40%
Grasa 1-5%	Grasa 8-52%
Judías secas	Soja
Lentejas	Cacahuete
Garbanzos	Algarroba
guisantes secos	Garrofa
Haba seca	Altramuz

Las leguminosas son en general una buena fuente de hidratos de carbono complejos, fibra, proteínas, vitaminas, minerales y compuestos bioactivos. Su valor nutricional se describe a continuación:

- Proteínas: Oscila entre el 20-30% en las legumbres secas y entre el 40-45% en legumbres oleaginosas como el altramuz y la soja, sin embargo, el contenido de proteínas presenta limitaciones nutricionales, como el bajo contenido de aminoácidos azufrados y triptófano. Casi todas las proteínas de las leguminosas contienen globulina, albumina y glutelina. La digestibilidad es menor en comparación con proteínas de origen animal como la caseína debido a la presencia de compuestos no nutricionales como los inhibidores de tripsina y quimotripsina, ácido fítico, nitrógeno no

proteico, entre otros, su estructura cuaternaria también dificulta su digestibilidad y la acción de las enzimas. Estas limitaciones pueden afectar la utilización metabólica pero la cocción puede mejorar su valor nutricional porque facilita la accesibilidad de las enzimas digestivas favoreciendo la proteólisis a nivel intestinal. La utilización nutritiva de la proteína de las leguminosas puede mejorar complementándolas con proteínas de cereales (Hernandez, 2010).

- Hidratos de carbono: el almidón es el hidrato de carbono más abundante de las legumbres con excepción de las oleoleguminosas, predominan los oligosacáridos como rafinosa, estaquinosa y verbascosa responsables en parte de producir las flatulencias. En los últimos años se ha potenciado su consumo debido a su alto contenido de fibra (almidón y celulosa) y las características que representa en el tratamiento alterno a patologías metabólicas como la diabetes o dislipidemias, incluso como una alternativa de harinas en las pacientes celiacos (Foschia y col., 2017).
- Lípidos: generalmente el contenido de grasas en las leguminosas secas es muy bajo y se compone principalmente de ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados, sin embargo, por el bajo contenido que tienen no representan una fuente dietética de estos ácidos grasos. Las oleoleguminosas pueden presentar valores de entre 18% y 50% principalmente ácido oleico y linoleico.

La actividad biológica de algunos componentes no nutricionales presentes en las legumbres se está revalorizando en los últimos años. El consumo de leguminosas resulta beneficioso en situaciones fisiológicas y patológicas, por ejemplo, el papel de los inhibidores de proteasas en el tratamiento para el cáncer, el de los polifenoles como antioxidantes en el tratamiento del síndrome metabólico y el ácido fítico para el

tratamiento nutricional de diabetes o cálculos renales. Su composición aminoacídica alta en arginina/lisina y baja en metionina/glicina les confiere una acción antiaterogénica. Su consumo se asocia con una ingesta importante de potasio que ejercen un beneficio sobre el metabolismo ácido-base del organismo. Los péptidos de bajo peso molecular derivados de la hidrólisis de las proteínas se han relacionado con beneficios en la presión arterial por su efecto inhibitor sobre la ECA.

2.3.2.- *Lens Culinaris*: valor funcional y efectos beneficiosos para la salud

La lenteja (*Lens culinaris*; Familia *Fabaceae*) es un alimento dietético tradicional con un gran valor nutricional, fuente de proteína, proporcionando aminoácidos esenciales y no esenciales, las proteínas más abundantes en las lentejas son las globulinas y albumina, contienen un 47% de almidón y fibra dietética insoluble, son una buena fuente de prebióticos, lo que ayuda a mantener saludable la microbiota intestinal y prevenir enfermedades asociadas al intestino. El contenido de grasas es relativamente bajo pero alto contenido de potasio y excelente fuente vegetal de hierro. Proporciona una variedad de compuestos bioactivos principalmente de carácter fenólico, los cuales se ha demostrado tienen un efecto potencial sobre la salud humana como efectos antioxidantes, antidiabéticos, antiobesidad, antihiperlipidémicos, antiinflamatorios etc (Ganesan y Xu, 2017).

Se sabe que los compuestos bioactivos de lentejas se unen a objetivos fisiológicos para afectar varios procesos de señalización o funciones reguladoras que pueden conducir a beneficios para la salud. Por ejemplo, los compuestos fenólicos de lentejas han demostrado un beneficio potencial para la salud en el metabolismo de lípidos y glucosa, ya que estos compuestos pueden inhibir las enzimas gastrointestinales involucradas en la digestión de carbohidratos (alfa-glucosidasa) y lípidos (lipasa pancreática), además de su alto contenido de polifenoles que desempeña un papel importante en la motilidad intestinal (Zhang y col., 2015). Por lo contrario, los péptidos de lentejas derivados de las globulinas

11S y 7S pueden unirse a la enzima convertidora de angiotensina y eliminar las especies reactivas de oxígeno (ROS) *in vitro* (García-Mora y col., 2017).

En relación con la obesidad, múltiples estudios han informado que la ingesta de lentejas está inversamente relacionada con la incidencia de obesidad y diabetes, se ha observado que el contenido de flavonoides y fibra mejoran la saciedad y por lo tanto disminuye la ingesta de alimentos, lo que resulta en un mantenimiento del peso corporal. El contenido de polifenoles de las lentejas tiene el potencial de reducir la presión arterial por medio de la actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina I (ACE) generando un efecto cardioprotector (Ganesan y Xu, 2017).

2.3.3.- Efecto de algunos tipos de procesado

2.3.3.1.- Germinación y fermentación

El proceso de germinación en las lentejas puede tener un efecto positivo sobre el contenido de aminoácidos esenciales, ya que durante el proceso de germinación se liberan diversas proteasas endógenas que mejoran la digestibilidad proteica a nivel intestinal. El contenido de hidratos de carbono también se modifica durante el proceso germinativo, se utilizan como primera fuente de energía en la planta siendo los primeros los alfa-galactosidos, lo que resulta en una disminución de las flatulencias asociadas al consumo de lentejas, el contenido mineral también se ve aumentado debido a la degradación de los componentes no nutricionales como el ácido fítico. También se ha observado que durante la germinación el contenido de vitaminas y fenólico aumenta, por lo tanto su capacidad antioxidante también se ve aumentada (Fouad y Rehab, 2015). Es importante vigilar las condiciones higiénicas y sobre todo la duración del proceso germinativo, se ha observado que los periodos cortos mejoran la ingesta del producto y los periodos largos generan el efecto opuesto (olores y sabores desagradables).

La fermentación es un proceso biotecnológico bien diseñado para la fabricación y desarrollo de alimentos funcionales dirigidos al síndrome metabólico, se ha demostrado tener efectos variables sobre la capacidad antioxidante y mejorar el contenido fenólico total, se atribuye este beneficio a la acción de los microorganismos involucrados en el proceso de fermentación sobre los taninos y las agliconas, lo que da lugar a la aparición de compuestos fenólicos como distintos ácidos fenólicos y flavonoides (Gan y col., 2016). La fermentación con *Lactobacillus plantarum* afectó positivamente la composición fenólica y actividades inhibitoras de la alfa-glucosidasa y la lipasa. La *Savinasa* contribuyó a la liberación de péptidos y actividades inhibitoras de la ECA. En conjunto la fermentación de lenteja mejoro la digestibilidad gastrointestinal y mejoró el contenido de péptidos bioactivos, compuestos fenólicos y actividad antioxidante (Bautista-Expósito y col., 2018).

2.3.3.2.- Tratamiento con proteasas exógenas

Los hidrolizados multifuncionales podrían fomentar la utilización de proteínas de lentejas como un valor agregado para la formulación de alimentos funcionales y nutraceuticos. En particular, la hidrólisis enzimática con *Alcalasa* y *Savinasa* muestra mayor efectividad proteolítica, lo que resultó en mayor rendimiento de péptidos. *Savinasa* también mostro mayor actividad inhibitora de la ECA y actividad antioxidante (García-Mora y col., 2014) los péptidos inhibidores y antioxidantes de la enzima convertidora de angiotensina están siendo estudiados con mayor atención debido a sus efectos beneficiosos en la prevención y tratamiento de la hipertensión.

Se ha utilizado el efecto de la alta presión hidrostática en combinación con diferentes proteasas para la proteólisis de péptidos bioactivos de las proteínas de lentejas. Estudios demuestran que la proteólisis a 300mpa con *Savinasa* dio lugar a hidrolizados de lenteja con actividades más altas de la enzima inhibitora de la ECA y de

antioxidantes que se retuvieron más tiempo en la digestión gastrointestinal in vitro (García-Mora y col., 2015).

Otros usos de la hidrólisis enzimática son para el estudio y producción de alimentos dietéticos hipoalergénicos. Las lentejas parecen ser una causa de hipersensibilidad mediada por IgE, la destrucción proteolítica de epítomos de unión a IgE podrían ayudar a mejorar estas alergias, sin embargo aún faltan más estudios concluyentes (Cabanillas y col., 2010).

2.4.- La rata Zucker como modelo experimental de Síndrome Metabólico

Los modelos experimentales constituyen una valiosa herramienta en el campo de la investigación, ayudan a comprender los procesos fisiológicos asociados a enfermedades, una gran parte de estudios se desarrollan en roedores dada la similitud biológica con el humano (Ayala y coll., 2008)

Las ratas Zucker obesas son el modelo animal experimental mejor conocido de obesidad genética, presentan una mutación recesiva en el gen del receptor de la leptina. Esta hormona es importante en la regulación del balance energético (Aleixandre y Miguel, 2008) se libera en el torrente sanguíneo y actúa sobre el cerebro generando una disminución de la ingesta de alimentos. La ausencia de esta hormona es causa de hiperfagia y obesidad por ello su utilización para el estudio de alteraciones metabólicas.

La obesidad en estos animales aparece de manera precoz a las pocas semanas (durante las primeras 16 semanas de vida) y está asociada con hiperfagia y como consecuencia se genera una hiperplasia e hipertrofia de adipocitos y un incremento del tejido adiposo (Zhang y col., 1994). Su perfil lipídico también se ve alterado, aumentan las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Sin embargo, no se

considera una modelo de hipertensión, aunque puede desarrollarla con la edad. (Aleixandre y Miguel, 2008)

Además de las anteriores alteraciones también se generan anormalidades a nivel endocrino, un ejemplo claro y el más estudiado es la resistencia a la insulina, que presenta alteraciones semejantes a las que aparecen en el síndrome metabólico en humanos.

La alteración en el receptor de la leptina a corto plazo también desarrolla hiperinsulinemia (Stern y col., 1972) y persiste toda la vida de los animales. Otros estudios que pueden desarrollarse en este modelo experimental son los relacionados con alteraciones lipídicas. Actualmente la asociación entre obesidad e inflamación está ayudando a comprender mejor las características de este modelo experimental.

Su utilidad como modelo de diabetes mellitus tipo 2 es cuestionable porque se ha observado que presentan solo ligera intolerancia a la glucosa.

3.- Material y métodos

3.1.-Material vegetal e hidrolizado proteico

3.1.1.- Leguminosa “Lens Culinaris”

Se utilizaron semillas de lentejas (*Lens culinaris* Medik. Var. Castellana), las cuales se obtuvieron de Semillas Iglesias SA (Salamanca, España), se realizó un molido fino en las semillas de lenteja y posteriormente se pasaron a través de un tamiz con un tamaño de poro de 0,5 mm y finalmente la harina de lenteja se almacenó a 4 ° C. Se utilizó una proteasa de grado alimenticio *Savinasa*® 16 L (16 KNPU / g) proporcionada por Novozyme (Bagsvaerd, Dinamarca). Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Valencia, España) y se suministro *L. plantarum* CECT 748.

3.1.2.- Caracterización del hidrolizado proteico

Con el fin de obtener un producto final con una buena fuente de compuestos fenólicos y al mismo tiempo preservar la actividad biológica de la lenteja fermentada se siguió el siguiente método:

La harina de lentejas se suspendió en 1.5L de agua estéril en autoclave (concentración final de 142.7g/L) en un fermentador. Se ajustó la temperatura a 37°C y pH a 8.0 utilizando KOH al 20%, las condiciones de agitación fueron de 300rpm y los niveles de aireación de 0vvm. Se inoculó la suspensión de harina de lentejas con *Lactobacillus plantarum* CECT 748 (2×10^8 cfu/L de densidad celular final) y paralelamente se trató con proteasa - *Savinasa* 16L (361 mg/L suspensión harina de lenteja). Después de 15 horas de fermentación, el cultivo se centrifugó durante 15 minutos. El sobrenadante se estabilizó calentando a 70°C durante 10 minutos para evitar activación microbiana y enzimática. Finalmente, las muestras se liofilizaron y almacenaron a -80°C. Se utilizó el método de Kjeldahl para el análisis del contenido proteico del hidrolizado de lenteja.

Gran parte de la preparación del hidrolizado proteico de lenteja se realizó en una planta piloto por Biopolis, S. L. (Valencia, España).

El presente estudio utilizó referencias previas (García-Mora y col., 2017) para establecer los tiempos de fermentación (5.5 – 30hrs.) y pH específicos (6.5 – 8.5). Con el objetivo de probar y optimizar las características y propiedades del producto final.

La actividad óptima de la proteasa *Savinasa* se encuentra en un pH alcalino de 8, lo cual aumenta su eficacia proteolítica (García-Mora y col., 2014). La bacteria láctica *Lactobacillus plantarum* demuestra una actividad enzimática definida sobre: esterasa, β -glucosidasa, descarboxilasa, reductasa y se ha demostrado el incremento de fenoles libres en procesos de fermentación en leguminosas (Gan y col., 2016) y mejorar la capacidad antioxidante, hipolipidémica y disminuye actividad hipertensiva del producto fermentado (Kapraivelou y col., 2015; Torino y col., 2013).

3.1.3.- Extracción de polifenoles de *Lens Culinaris*

El análisis de polifenoles se realizó utilizando 5 gramos de muestra del hidrolizado proteico. En un vaso de precipitados se vertió la muestra y sucesivamente se añadió una mezcla de (15mL): metanol; agua; HCL (70:30:0.1 respectivamente), el pH se midió y se ajustó hasta 2 utilizando HCL 6N.

La extracción de polifenoles se realizó a una temperatura de 4°C durante un periodo de 30 minutos y bajo una atmósfera de nitrógeno para evitar la oxidación potencial de las muestras (Kapraivelou y col., 2015). Finalizados el periodo de los 30 minutos las muestras se centrifugaron a 3000rpm durante 15 minutos a una temperatura de 4°C.

Al finalizar el proceso de centrifugado, el sobrenadante de la primera extracción fue separado y con el precipitado se volvió a realizar una extracción. En esta ocasión con una mezcla de (10mL): acetona; agua; HCL (70:30:0.1 respectivamente) el pH se ajustó nuevamente a 2 y la extracción se realizó en un periodo de 30 minutos, lo que permitió una

adecuada división de los polifenoles. Las muestras se volvieron a pasar por centrifuga y el sobrenadante fue recogido y almacenado a -20°C.

3.1.4.- Caracterización de polifenoles y péptidos del extracto de *Lens Culinaris*

El análisis y determinación de péptidos y polifenoles se realizó utilizando un cromatógrafo de alta resolución UPLC) (ACQUITY H – Class Waters) en combinación con una Espectrometría de Masas de Alta Resolución de QTOF (Synap G2, Waters). Se realizó una filtración a los hidrolizados de lenteja a través de discos nylon con tamaño de poro de 0.22µm (MerckMillipore, Darmstadt, Alemania), de la solución final obtenida del hidrolizado de lenteja se utilizaron 10 µl para inyectar en el cromatógrafo.

Para la separación y análisis de polifenoles se utilizó una columna analítica Acquity HSST33 (100mm x 2.1mm de diámetro interno, 1.8 µm.) Como solvente A se utilizó: agua desionizada con 0.5% de ácido acético y como solvente B se utilizó: acetonitrilo con 0.5% de ácido acético. El programa de gradiente se estableció en fase móvil y las condiciones iniciales fueron de: 95% A y 5% B (v/v). Se fijó un gradiente lineal para A hasta que B alcanzara el 95% (v/v) en un tiempo de 18 minutos con un tiempo de retraso de 5 minutos. La velocidad de flujo de la fase móvil se estableció en 0.4mL min⁻¹. Después de la separación cromatográfica, se realizó un análisis de espectrometría de masas de alta resolución en ionización electro negativa (ESI-ve) y se utilizó nitrógeno de alta pureza para desolvatación (600LH-1). Finalmente, los espectros fueron registrados en función de su masa/carga (m/z) en un rango de 50 – 1500.

Para realizar la separación de péptidos y proteínas se utilizó una columna analítica Acquity BEH300C4 (100mm x 2.1mm de diámetro interno, 1.7µm). Como solvente A se utilizó: agua desionizada con 0.1% de ácido fórmico. Como solvente B se utilizó: acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico. El programa de gradiente se estableció en fase móvil y las

condiciones analíticas de inicio fueron; 95% de solvente A y 5% de solvente B. El gradiente lineal se fijó para A hasta que B alcanzara un 95% (v/v) en un tiempo de 15 minutos. El tiempo total ejecutado se definió en 25 minutos con un tiempo de retaso de 5 minutos. La velocidad de flujo de la fase móvil se estableció 0.4mL min⁻¹.

Después de la separación cromatográfica. Se realizó el análisis por espectrometría de masas de alta resolución en ionización electro – positiva (ESI+ve). El gas utilizado para la desolvatación fue nitrógeno de alta pureza (800Lh-1). Los espectros fueron registrados en función de su masa/carga (m/z) en un rango de 50 – 1500.

Todos los compuestos se identificaron en función de sus fragmentos de masa (MS) y sus tiempos de retención (RT). En base a los datos obtenidos, los compuestos fueron identificados utilizando la base de datos ChemSpider. <http://www.chemspider.com/>

3.2.- Experimentos con animales

Para llevar acabo el presente diseño experimental fue elegido el modelo de rata Zucker, este modelo es considerado adecuado para los estudios de Síndrome Metabólico. Se usaron machos obesos homocigotos (fa/fa) (OB) y machos delgados homocigotos (fa/+) (DE) con un peso inicial de 160± 5g. Los animales fueron alojados en jaulas grupales en una habitación bien ventilada y termostáticamente controlada (21±2°C), con una humedad relativa del 40-60% y un ciclo de luz – oscuridad revertido de 12 horas. Durante el periodo de oscuridad, se utilizó una luz roja para evitar alteraciones en el periodo de luz y prevenir algún estrés adicional en los animales.

Los animales fueron distribuidos en dos grupos: a) ejercicio y b) sedentarios, recibiendo *ad libitum* agua destilada tipo 2 y una dieta estándar de rata con un perfil nutricional promedio de 14.3% de proteína, 4% de grasa, 18.0% fibra neutra detergente (FND) y 2.9 kcal/gr. (Teklad Global Diet 2014). Esta dieta está diseñada específicamente para cubrir

las necesidades calóricas de la rata de laboratorio. Las ratas son animales nocturnos y presentan una alta actividad durante la noche, por lo tanto, se estableció que el comienzo del periodo de oscuridad sería a las 12 p.m. periodo en el cual las ratas desarrollarían el protocolo de ejercicio.

3.2.1.- Animales y diseño experimental

Para llevar a cabo este diseño experimental realizar se utilizaron 64 ratas macho Zucker. 32 de las ratas tenían un fenotipo obeso (fa/fa) (OB) y las 32 restantes tenían un fenotipo delgado (fa/+) (DE), los animales se subdividieron en 4 subgrupos experimentales (n=16) de acuerdo al protocolo de ejercicio que realizarían: sedentario (S) o ejercicio (E), se realizó una última subdivisión (n=8) donde se aplicó una intervención dietética con el hidrolizado proteico procedente de lenteja y los correspondientes controles (figura 1). Finalmente, los grupos quedaron de la siguiente manera:

SCTOB: Grupo Control Sedentario Obeso

SCTDE: Grupo Control Sedentario Delgado

ECTO: Grupo Control Ejercicio Obeso

ECTDE: Grupo Control Ejercicio Delgado

SHOB: Grupo Hidrolizado Sedentario Obeso

SHDE: Grupo Hidrolizado Sedentario Delgado

EHOB: Grupo Hidrolizado Ejercicio Obeso

EHDE: Grupo Hidrolizado Ejercicio Delgado

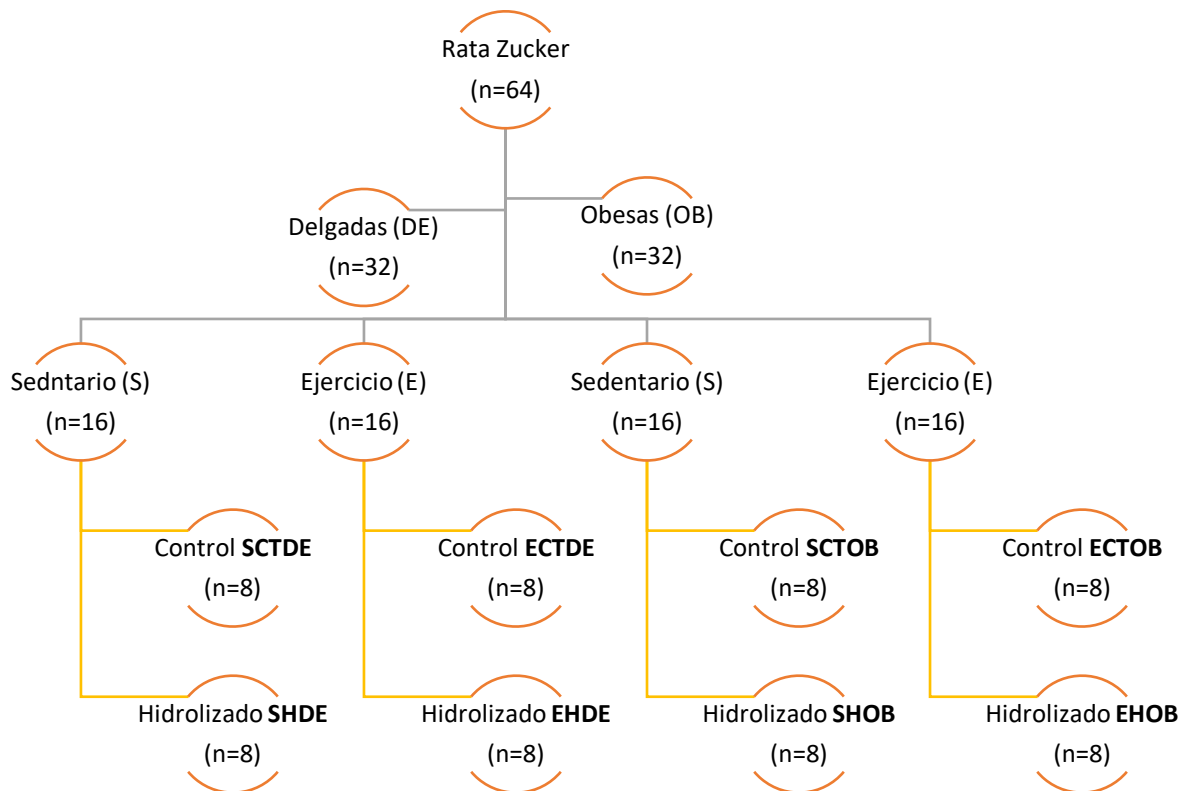


Figura 1.- Diseño experimental

Antes de comenzar el periodo experimental, los animales pasaron por un periodo de adaptación de 4 días con el objetivo de que se acoplaran a las condiciones de entrenamiento y de la dieta experimental.

El período experimental fue de 8 semanas. Los animales que realizaron ejercicio ejecutaron el protocolo de entrenamiento durante 5 días a la semana, la ingesta de alimento se registró diariamente y el peso corporal se registró semanalmente después de un periodo de 12 horas de ayuno. Al inicio y al final del periodo experimental, se realizó una prueba de composición de oxígeno de 24 horas para evaluar la tasa metabólica en reposo. De forma complementaria se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa por sobrecarga oral, esta prueba se realizó 48 horas después de la última sesión de entrenamiento con el objetivo de analizar el área bajo la curva glucémica. La administración del hidrolizado proteico de lenteja se realizó por medio de una sonda gástrica, se usó una dosis de 1g/kg de peso corporal con una frecuencia de administración de 5 días

a la semana (lunes a viernes). Los grupos control utilizaron los mismos volúmenes, frecuencia y sonda gástrica, pero administrando agua. Al finalizar el período experimental los animales pasaron por una fase de recuperación de 48 horas para estabilizar su estado basal.

Previamente al sacrificio se mantuvo a los animales en un periodo de ayuno de 8 horas y a continuación fueron anestesiados con un mix de Ketamina (75mg/kg) y xilacina (10mg/kg). La sangre se extrajo mediante punción de la aorta abdominal utilizando heparina para su recogida como agente anticoagulante. El plasma fue obtenido mediante centrifugación de las muestras de sangre a 3000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Las muestras de plasma fueron alícuotadas y congeladas inmediatamente con nitrógeno líquido y almacenadas a – 80°C hasta su análisis. El riñón, corazón, aorta y otros tejidos y órganos fueron extraídos y enjuagados rápidamente con NaCl al 9%. Todos los órganos y tejidos fueron pesados, divididos en porciones y procesados para su correspondiente análisis histológico. A continuación, las muestras obtenidas fueron congelados inmediatamente con nitrógeno líquido y almacenados a – 80°C hasta su uso.

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo a las Guías Direccionales Relacionadas con el Alojamiento y Cuidado de Animales ([CSL STYLE ERROR: reference with no printed form.])y todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética de Experimentación Animal de la Universidad de Granada. (*Referencia de Proyecto AGL2013-43247-R*)

3.2.2.- Protocolo de ejercicio

Los grupos experimentales fueron entrenados durante 8 semanas según el protocolo descrito por Coll-Risco y col., (2016), el cual consistió en un calentamiento y ejercicio de fuerza incremental y resistencia, en combinación con un entrenamiento aeróbico interválico. Todo el protocolo se realizó en la misma sesión de entrenamiento. La frecuencia

de entrenamiento fue de 5 días a la semana, el entrenamiento se llevó a cabo en un tapiz rodante de cinco calles adecuado para los animales de experimentación (Panlab, LE 8710R).

Las sesiones de entrenamiento se planificaron durante el ciclo de oscuridad de los animales (periodo activo). Una semana antes del periodo experimental, los animales realizaron un entrenamiento de adaptación el cual consistió en una carrera de baja intensidad durante 10 minutos en el tapiz rodante a una velocidad de 20 -25 cm/seg. Al inicio del protocolo de entrenamiento se realizó una prueba incremental del consumo máximo de oxígeno (VO_{2max}) para determinar la velocidad que correspondería para cada animal.

El protocolo de entrenamiento fue adaptado a partir de lo publicado por Haram y col., (2008); y Kemi y col., (2005). Este protocolo se ha diseñado en base a los efectos beneficiosos que el ejercicio aeróbico interválico de alta intensidad promueve sobre la obesidad Kemi y col., (2005). Por otra parte, el entrenamiento de resistencia ha sido postulado también como una buena estrategia para mejorar el perfil lipídico (Donnelly y col., 2009) y es por ello que se han combinado ambos tipos de entrenamiento para este diseño experimental.

Todas las sesiones de entrenamiento consistieron en 60 minutos de trabajo efectivo. Se comenzó con un calentamiento de 10 minutos al 35–50% de VO_{2max} seguido de un entrenamiento de fuerza de 2 minutos y 1 minuto de descanso en 8 repeticiones, el ejercicio consistió en que los animales corrieran con una inclinación que fue aumentando gradualmente de 10% a 20% cada tres semanas a una velocidad constante (20-25cm/s equivalente al 30 – 40% VO_{2max}). El ejercicio aeróbico interválico se realizó en los 30 minutos siguientes del ejercicio de fuerza, alternando 4 minutos en 50 – 65% VO_{2max} con 3 minutos de intensidad submáxima de 65 – 75% VO_{2max} . El protocolo anteriormente descrito se detalla en la tabla 1.

Tabla 1.- Protocolo de entrenamiento

	Semana1	Semana2	Semana3	Semana4	Semana5	Semana6	Semana7	Semana8
Calentamiento (10 minutos)	35% VO2max	35% VO2max	40% VO2max	40% VO2max	45% VO2max	45% VO2max	50% VO2max	50% VO2max
Entrenamiento de Fuerza basado en inclinación del tapiz. (2' trabajo 1' descanso)	Pendiente	10%	10%	15%	15%	15%	20%	20%
	Velocidad	20cm/s	25cm/s	20cm/s	23cm/s	26cm/s	20cm/s	23cm/s
Entrenamiento Aeróbico Interválico (30')	4' 50% VO2max-	4' 50% VO2max	4' 55% VO2max-	4' 55% VO2max-	4' 60% VO2max-	4' 60% VO2max-	4' 65% VO2max-	4' 65% VO2max-
	3' 60%	3' 65%	3' 65%	3' 70%	3' 70%	3' 70%	3' 75%	3' 75%
	VO2max	VO2max	VO2max	VO2max	VO2max	VO2max	VO2max	VO2max

3.2.3.- Metabolismo basal y capacidad aeróbica

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

El procedimiento consistió en utilizar un analizador de gases Panlab Oxylet System, que dispone de un tapiz rodante y jaulas metabólicas individuales. Este sistema utiliza una calorimetría indirecta, que se basa en determinar el consumo de O₂ y producción de CO₂. Se establece un flujo de aire dentro de cada jaula. La velocidad del tapiz rodante se mantiene a una velocidad de 0.5 – 0.8L/min cuando las ratas se encuentran en reposo y de 0.7 – 1.2 L/min cuando están en movimiento (test incremental). Los gases son detectados por medio de sensores específicos de O₂ y CO₂, estos sensores están asociados a un equipo que registra los valores obtenidos. Este sistema utiliza un "Laser Absorption O₂ Sensor" que atraviesa la cavidad donde se realiza la determinación y es importante para disminuir la influencia de humedad ambiental en las determinaciones de parámetros metabólicos en animales dentro de

jaulas (Dominguez y col., 2009). El gasto metabólico basal ($\text{kcal}/\text{min}/\text{kg}^{0.75}$) se obtuvo realizando una media con los valores obtenidos de los periodos de luz y oscuridad. Los datos se registraron en el Software (METABOLISM V2.2.00) instalado previamente en el procesador informático.

La capacidad aeróbica se determinó mediante un analizador de gases Panlab Oxylet System conectado a un tapiz rodante diseñado específicamente para animales de experimentación. Se utilizó el protocolo propuesto por Wisløff y col., (2001) con mínimas modificaciones (Clemente y col., 2011). La metodología de esta técnica se basa en determinar los valores de O_2 y CO_2 por calorimetría indirecta a través de un circuito abierto. Se inicio registrando los valores de O_2 y CO_2 del aire ambiental durante 5 minutos. Los animales comenzaron realizando un calentamiento de 5 minutos a una velocidad entre 25 y 30cm/seg para su adaptación al tapiz rodante y posteriormente comenzó el test incremental. Los animales fueron pesados al inicio y al final de la prueba.

El test inicio con un incremento de 3cm/min cada minuto y se dio por finalizado cuando el animal estaba visiblemente exhausto (era incapaz de seguir corriendo). Se paró el tapiz rodante y los datos se guardaron en el procesador informático. En la tabla 2 se describe el aumento progresivo de la intensidad del test incremental.

Tabla 2.- Valores de intensidad del test incremental

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

La medición de lactato (mmol/L) se determinó al finalizar el test incremental utilizando un analizador Lactate Pro Test Strip. Se realizó una pequeña incisión en la parte distal de la cola para obtener una gota de sangre que se colocó en una tira reactiva para medir el lactato.

3.2.4.- Composición corporal

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

3.2.5.- Parámetros plasmáticos

Se realizó un test de tolerancia oral a la glucosa (Prieto y col., 2004) con pequeñas modificaciones. Los animales se sometieron a un periodo de ayuno de 8 horas y posteriormente se les suministró por sonda gástrica una sobrecarga oral de glucosa con una dosis de 6.9µmol glucosa/g de peso corporal, la carga de glucosa se disolvió en solución salina (NaCl 9%). La determinación sanguínea se realizó antes de la sobrecarga oral y

a continuación se realizó la medición de valores a los 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos, hasta que los animales alcanzaran nuevamente sus niveles glucémicos basales.

Para la determinación de concentración de glucosa se realizó una pequeña incisión en la parte distal de la cola para la extracción de sangre y se utilizó un glucómetro Accu – Chek aviva (Roche). La curva de glucemia se calculó usando el modelo de trapezoides con el programa Microsoft Excel. Los resultados se representaron utilizando las medias de cada grupo y el error estándar de la media.

3.2.6.- Bioquímica plasmática

Las determinaciones bioquímicas que se realizaron en plasma fueron las siguientes: Fosfolípidos, triglicéridos, colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL y actividades de las enzimas Creatina Kinasa MB y enzima convertidora de angiotensina. Estos parámetros fueron determinados mediante un Analizador Químico (ShenzhenMidray 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). El Índice Aterogénico se calculó mediante la siguiente fórmula:

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

Para calcular el Índice Triglicéridos – Glucosa (Tr-GI) se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Tr-GI} = \text{Ln} [\text{triglicéridos en ayunas en plasma (mg/dL)} \times \text{glucosa en ayunas (mg/dL)} / 2]$$

3.2.7.-Determinación plasmática

Se utilizaron kits analíticos (Spin React, España) para medir los siguientes parámetros en plasma: ácido úrico, urea, creatinina, proteínas totales, albúmina, Ca, P y la actividad de la enzimática convertidora de

angiotensina, creatina Kinasa y perfil lipídico (fosfolípidos, triglicéridos, colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL).

La determinación de insulina, leptina y adiponectina en plasma se midió respectivamente utilizando la técnica de inmunoensayo con el sistema Luminex®. Los kits utilizados para el estudio de insulina y leptina fueron Milliplex Ref. RBN1MAG-31K-02. Y para adiponectina Milliplex Ref. RV2MAG-26K-01. Los datos fueron analizados por el programa Master Plex™. Esta técnica se basa en usar unas “microesferas” con tonalidades de rojo hasta verde. Cada una de ellas contiene un anticuerpo específico para un analito. Cuando la muestra contiene uno de los analitos a estudiar se une a la microesfera y presenta una reacción de fluorescencia. Las concentraciones hormonales se determinaron mediante un láser que se encarga de medir el color y la fluorescencia media (MFI) y que será igual a la concentración de la hormona.

El índice HOMA (Homeostasis Model Assessment) permite estimar la resistencia a la insulina, así como la funcionalidad de las células beta. Lo hace midiendo las concentraciones de insulina y glucosa plasmática en ayunas (Matthews y col., 1985). Se calculó el índice de resistencia a la insulina utilizando la siguiente fórmula:

$$HOMA - IR = (Insulina \times Glucosa) / 22.5$$

- *Insulina se expresa en μ U/mL*
- *Glucosa se expresa en mmol/L*

Un valor incrementado de índice HOMA – IR indica una baja sensibilidad a la insulina.

3.2.8.- Electrocardiograma

El estudio del electrocardiograma (ECG) en ratas se llevó a cabo utilizando el sistema de adquisición de datos Power Lab (ADInstruments) asociado al módulo BIO - AMP y el software Labchart Pro diseñado para la adquisición y el análisis/interpretación de los datos obtenidos. El ECG se realizó en animales previamente tratados con ketamina (75mg /kg) y

xilacina (10mg/kg). La derivación II se utilizó para las distintas medidas realizadas y el valor medio para cada rata se obtuvo mediante 10 medidas en ciclos cardiacos consecutivos durante los periodos 10-20seg, 30-40seg, 50-60seg, a lo largo de un intervalo de 1 min. Las medidas que se determinaron en el estudio del ECG fueron las siguientes: Intervalo RR, Frecuencia Cardiaca, duración y amplitud de la onda P, amplitud de complejo QRS, duración y amplitud de la onda T, duración intervalo PR, duración intervalo QT, QTc calculado según la fórmula de Bazett ($QTc = \text{Intervalo QT} / \sqrt{\text{Intervalo RR}}$) y variabilidad de la frecuencia cardiaca (desviación estándar de los intervalos RR).

3.2.9.-Presión arterial

La presión arterial se determinó semanalmente por el método indirecto no invasivo. La técnica esfigmomanométrica es similar a la utilizada en humanos. El equipo (Panlab, LE 5007) está constituido por un esfigmomanómetro (maguito) que ocluye el flujo sanguíneo y un transductor que sigue la evolución del pulso a través de todo el proceso. Posee una cabina de termorregulación (LE 5650/6 Heater Scanner) que contiene 6 raíles para unir a microprocesadores.

Para llevar a cabo esta determinación, los animales se introdujeron en cabinas inmovilizadoras especiales (acorde a su peso) se mantuvieron ahí durante 15 minutos para su adaptación a una temperatura de 37°C. El esfigmomanómetro comenzó a inflarse haciendo presión y bloqueando la vena, en consecuencia, se produjo un descenso del pulso constante. Una vez que el pulso desaparece, el esfigmomanómetro se desinflató automáticamente y el sistema detectó el momento en el que el pulso apareció nuevamente (presión sistólica). Cuando el pulso recuperó su valor inicial, se midió la presión diastólica (la presión media se calculó automáticamente). La determinación de los datos de la presión arterial se realizó durante 8 semanas tomando seis medidas por cada animal. Se descartaron todas las medidas en que la frecuencia cardiaca superó 350 latidos por minuto. Los resultados se representaron determinando el área

bajo la curva por cada animal. Se usó el programa Excel por el método de trapezoide con la siguiente fórmula (Pruessner y col., 2003).

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

- t_i : distancia de tiempo individual entre mediciones
- m_i : medición individual
- n : numero total de medidas

3.2.10.- Expresión génica por PCR-RT cuantitativa de transcritos de arteria y aorta.

La expresión génica de aorta se determinó por medio del receptor del péptido similar al glucagón 1 (glp1-r). El ARN total se aisló del tejido. Aproximadamente 100 mg de tejido fueron introducidos en tubos especiales con una matriz de lisis (Lysing Matrix SS – 116921100, MP BIOMEDICALS) donde se añadió 1 mL de Tri-Reagent® (Sigma, Aldrich), que contenía guanidina isotiocianato, fenol y un agente solubilizante para disolver el ADN, ARN y las proteínas de las muestras lisadas. Los tejidos fueron homogeneizados utilizando un homogeneizador FastPrep®-24 (Modelo 116004500 MP Biomedicals, EEUU). La muestra anteriormente homogenizada fue transferida a un tubo libre de ribonucleasas (RNasas) y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 5 min para asegurar la completa disociación de los complejos nucleoproteicos. Posteriormente se añadió a cada muestra 200 μ L de cloroformo y se agitaron vigorosamente durante 15 segundos. Las muestras se volvieron a incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos y se centrifugaron a 15.000 a 4 °C. La mezcla se separó en tres fases: una fase acuosa superior que contenía el ARN, otra interfase que contenía el ADN y por último una fase orgánica que contenía las proteínas. La parte acuosa fue transferida a un tubo nuevo y se le añadió 500 μ L de isopropanol, las muestras se

mezclaron y se mantuvieron a temperatura ambiente de 5–10 minutos centrifugándose después a 15.000 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante fue descartado y el pellet formado se disolvió en un volumen de 50 - 200 µL con agua libre de RNAsas (Sigma, Aldrich) dependiendo del tamaño del pellet formado y por tanto del material genético extraído.

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

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

A partir del cADN obtenido, la PCR cuantitativa se llevó a cabo en el sistema 7900 HT Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems), usando cebadores/sondas (Life Technologies™) para: glp-1r (Rn00562406_m1). A

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

3.2.11.- Bioquímica Urinaria

Los parámetros urinarios fueron determinados mediante un Analizador de Química Shenzhen Midray BS-200 (Electrónica Biomédica) en la Unidad de Bioanálisis del Centro de Instrumentación Científica, de la Universidad de Granada. Se realizó una recogida de orina de 12 horas y se utilizaron los siguientes kits analíticos (Spin React, España) para medir los siguientes parámetros en orina: pH, urea, creatinina, proteínas totales, albúmina, Ca y P.

La funcionalidad renal se analizó por diferentes parámetros, algunos de los marcadores utilizados fueron: El índice albumina – creatinina y aclaramiento de creatinina indicadores de daño renal.

En la bioquímica urinaria la tasa de depuración de creatinina como índice de tasa de filtración glomerular se calculó utilizando la fórmula estándar:

$$C = U \times V / P$$

- U= concentración en orina (mg/dL)
- V= flujo en orina (ml / min)
- P= concentración en plasma (mg/dL)

3.2.12.- Actividad antioxidante en riñón

3.2.12.1.-Homogeneización de tejidos.

Para realizar el homogeneizado de los tejidos se siguió el método descrito por Oboh y Rocha,(2007) con mínimas modificaciones descritas a continuación. Se homogeneizó una alícuota de riñón (1g:10mL respectivamente) en tampón fosfato 50 mM (pH 7,8), compuesto por Triton X-100 al 0,1% y 1.34 mM de DETAPAC. Se utilizó un homogeneizador Micra D-1 (ART moderne labortechnik) a 18,000 rpm por 30 segundos, consecutivamente se realizó un tratamiento con homogeneizador ultrasónico Sonoplus HD 2070 (Bandelin) por tres veces (10 seg.) al 50% de su potencia. Los homogeneizados renales se centrifugaron a 16.000rpm, 4°C durante 45 minutos (BECKMAN, Allegra 64R) y el sobrenadante se usó para determinar la actividad de las enzimas antioxidantes y peroxidación lipídica.

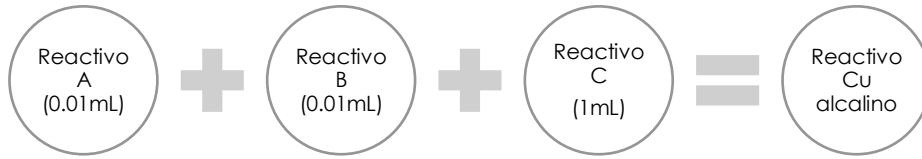
3.2.12.2.-Determinación de la concentración de proteína

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

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

- Reactivo A: Cu_2SO_4 al 1%
- Reactivo B: Tartrato al 2%
- Reactivo C: Na_2CO_3 al 2% y NaOH 0.1N

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



La determinación de proteína se inició agregando a cada pocillo de la placa 50µL de las muestras diluidas o los patrones y posteriormente se añadió 200µL del reactivo de Cu alcalino, las muestras se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación se añadió 50 µL de solución de Folin – Ciocalteau diluida. Las muestras se incubaron durante 30 minutos nuevamente a temperatura ambiente y después se hizo la lectura de la placa a 750nm. Todas las muestras y la recta patrón se determinaron por réplicas de cuatro. Los valores resultantes de la recta patrón se ajustaron a un modelo de ecuación polinómica para extrapolar los valores obtenidos de las absorbancias de las muestras en la recta patrón. Los resultados obtenidos se expresaron como mg proteína/mL de homogeneizado.

3.2.12.3.- Actividad enzimática de Superóxido Dismutasa

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

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

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

La determinación de la actividad enzimática de SOD-Mn se realizó con el mismo protocolo (Ukeda y col., 1997) con la diferencia de que las muestras previamente fueron tratadas con cianuro de potasio (KCN) 120mM durante 30 minutos en hielo (concentración final de KCN 4.8mM).

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

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

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

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

3.2.12.4.- Actividad enzimática de Catalasa

La determinación de la actividad enzimática de la catalasa (CAT) se determinó por el método descrito por Gerald Cohen (Cohen y col., 1996) con mínimas modificaciones descritas brevemente. La enzima CAT

cataliza el H₂O₂ en una cinética a lo largo de 4 minutos, seguido de una coloración rojiza – ocre con absorbancia medible a 450nm. Para llevar a cabo la reacción se prepararon dos baterías de tubos unos de muestreo y los segundos de reacción descritos a continuación:

1) Tubos de muestreo:

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

2) Tubos de reacción:

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

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

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

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

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

3.2.12.5.- Actividad enzimática de Glutación Peroxidasa

La determinación de esta enzima se realizó por el método descrito por Lawrence y col., (1974) con mínimas modificaciones. La técnica se

basa en la oxidación de nicotin adenin dinucleótido fosfato (NADPH) por medio de la enzima glutatión reductasa, la velocidad de reducción está relacionada con la actividad enzimática de la glutatión peroxidasa de cada una de las muestras.

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

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

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

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

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

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

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

3.2.12.6.- Determinación de especies reactivas de ácido tiobarbitúrico

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

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

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

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

3.3.- Estadística

El análisis en tiempo repetido se aplicó a los datos de ingesta semanal de alimentos para analizar los efectos dentro de los animales de experimentación (tiempo) o los efectos dentro de los grupos (fenotipo, hidrolizado proteico o entrenamiento) en los parámetros anteriores.

El efecto del fenotipo (obeso vs delgado) el protocolo de entrenamiento mixto (sedentario vs ejercicio), intervención dietética con el hidrolizado de lenteja vs placebo, datos de peso final, gasto metabólico, parámetros hemáticos, índices y parámetros en plasma y urinarios, electrocardiograma, actividad antioxidante enzimática renal y

expresión génica fueron analizados por un diseño factorial 2 x 2 x 2 ANOVA con el fenotipo y como tratamientos principales el protocolo mixto de entrenamiento y la intervención dietética. Los resultados han sido expresados como medias grupales (n=8) y el error estándar de la media (EEM) del pool. La prueba de Bonferroni se usó para detectar diferencias entre los valores medios de los tratamientos. Los análisis se realizaron con SAS versión 9.0 y el nivel de significación fue establecido en $p < 0,05$.

4.-Resultados

4.1.- Caracterización del contenido proteico, perfil peptídico, ácidos grasos y de compuestos bioactivos del hidrolizado proteico de lenteja

El contenido medio de proteína total encontrado en el hidrolizado de *Lens culinaris* fue de 49.8%. La distribución de los distintos péptidos obtenidos como consecuencia del proceso de hidrólisis proteica se estudió mediante UPLC asociada a cromatografía de masas y está representada en la figura 1 que muestra el cromatograma y los espectros de masas correspondientes a los 4 principales picos del cromatograma (tiempos de retención de 1.37, 5.08, 10.81 y 14.14min). La muestra completa mostró una amplia gama de picos cromatográficos donde apenas se encontraron iones de carga múltiple derivados de la ionización de proteínas por electro aspersion. Sin embargo, si se observan iones de menor número de cargas, posiblemente resultante de pequeñas moléculas como los péptidos. En este sentido los elementos principales del espectro de masas se detectaron en el rango de masa/carga (m/z) de 86 – 1480.

El perfil de ácidos grasos del hidrolizado proteico de lenteja se caracterizó principalmente por el contenido más elevado en ácido linoleico (37.9%) seguido de ácido cis-heptadecenoico (27.1%) y un 11.7% de ácido oleico. En proporciones más pequeñas se encontraron el ácido palmítico (8.0%) y ácido linolénico (6.6%).

En la tabla 1 se muestran los principales compuestos bioactivos que se identificaron en el extracto etanólico del hidrolizado proteico de *Lens culinaris*. Estos compuestos se pueden clasificar en diferentes especies fenólicas como lignanos, dépsidos y flavonoides. Otros compuestos presentes de naturaleza similar fueron: saponinas, iridoides, ácido arboresinico, el glucósido cardíaco cimarina y sesquiterpenos, entre otros. Los compuestos no identificados se muestran en la tabla 1+.

Figura 1

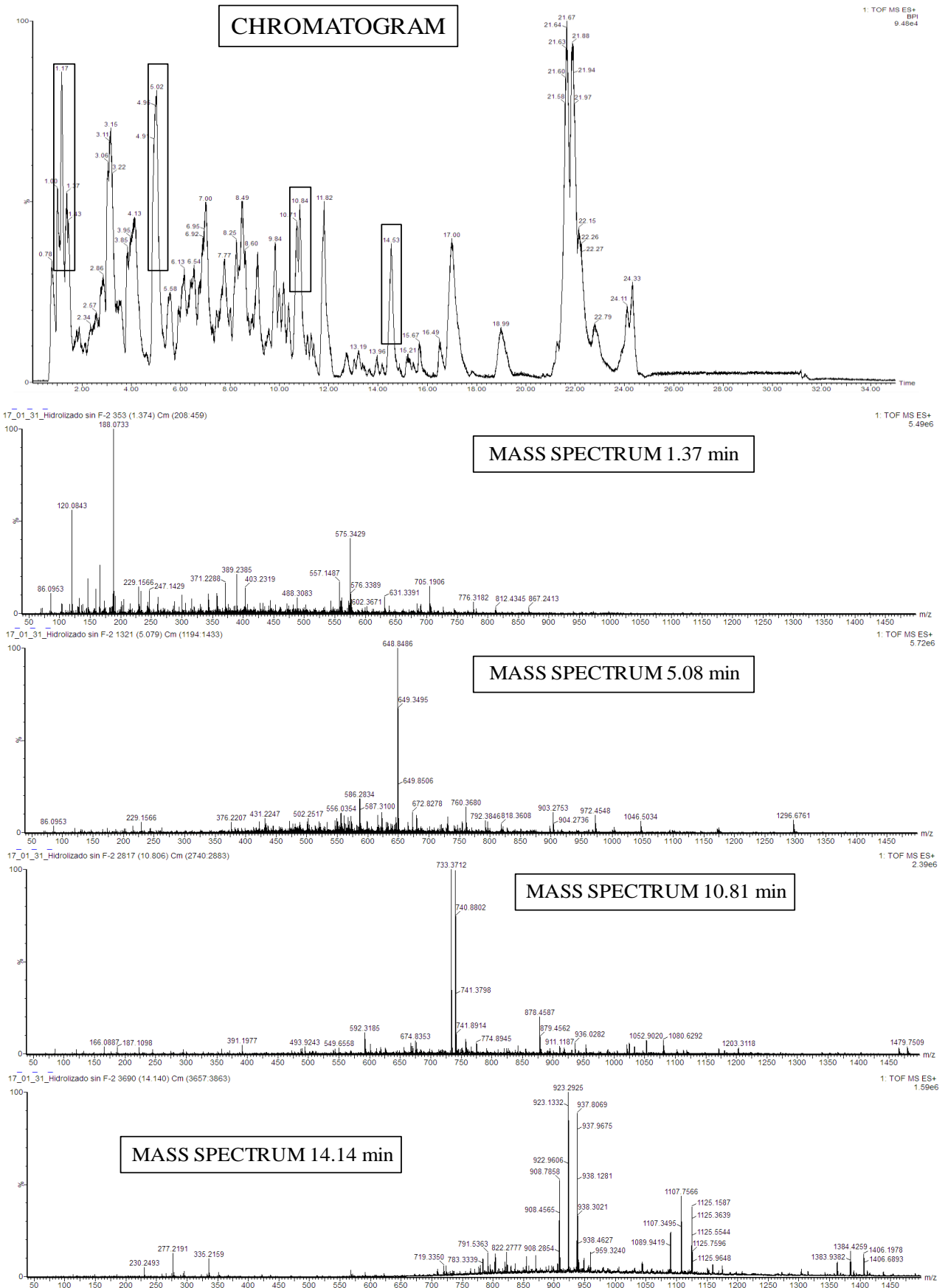


Figura 1.- Caracterización de la formación de péptidos después de la hidrólisis proteica de *Lens Culinaris* mediante fermentación con *Lactobacillus plantaris* y tratamiento con proteasa de *Bacillus spp.* Cromatograma de proteínas después de la hidrólisis y el espectrograma de masas de los principales picos del cromatograma (1.37, 5.08, 10.81 y 14.14 min).

Tabla 1.- Identificación de compuestos bioactivos presentes en el hidrolizado proteico de lenteja

TR	(M – H)-	FM	PPM	Compuesto
0.60	333.0587	C ₁₆ H ₁₃ O ₈	-6.9	Jaboticabin
2.28	553.2285	C ₂₇ H ₃₇ O ₁₂	-3.4	Nymphaeoside A
3.20	417.1024	C ₁₇ H ₂₁ O ₁₂	-2.2	Citrifolinin B epimer B
3.51	901.2595	C ₃₉ H ₄₉ O ₂₄	-1.9	Quercetin3-O-α-L rhamnopyranosyl (1→6)-[α-L-rhamnopyranosyl (1–2)]-β-D-galactopyranoside-7-O-α-L-rhamnopyranoside
3.55	477.1976	C ₂₁ H ₃₃ O ₁₂	0.8	Kanekoside B
4.06	619.2719	C ₃₂ H ₄₃ O ₁₂	-5.8	Scilliroside
4.13	547.2877	C ₃₀ H ₄₃ O ₉	-5.5	Cymarine
4.36	559.2385	C ₂₆ H ₃₉ O ₁₃	-1.1	Cichorioside L
4.47	491.1765	C ₂₁ H ₃₁ O ₁₃	0.0	3,4,5-Trimethoxyphenyl 6-O-(6-deoxy-α-L-mannopyranosyl) β-D-glucopyranoside
4.87	512.3455	C ₃₂ H ₄₈ O ₅	-9.2	(3α,4α,5α,8α,9β,11α,13α,14β,16β,17Z)-3,11-Dihydroxy-16(isopropenyloxy)-4,8,16-trimethyl-18-norcholesta-17,24-dien-21-oate
5.54	301.0348	C ₁₅ H ₉ O ₇	0.3	Quercetin
6.10	635.3777	C ₃₅ H ₅₅ O ₁₀	-2.8	Cimiracemoside B
6.19	789.4144	C ₃₉ H ₆₅ O ₁₃	-	(1β,3β,16β,22S)-16-[(6-Deoxy-α-L-mannopyranosyl) oxy]-3,22dihydroxycholesterol β-D-glucopyranoside
6.28	285.0399	C ₁₅ H ₉ O ₆	1.4	Luteolin
6.60	1193.6759	C ₅₉ H ₁₀₁ O ₂₄	6.8	Arboresinicacid
6.89	347.2430	C ₁₈ H ₃₅ O ₆	-5.3	Laurylglucoside
7.06	327.2164	C ₁₈ H ₃₁ O ₅	15.6	Corchorifattyacid
7.53	329.2326	C ₁₈ H ₃₃ O ₅	-0.6	9,12,13-Trihydroxy-10-octadecenoic acid
8.00	693.3262	C ₃₉ H ₄₉ O ₁₁	-1.9	Hirsein B

8.15	817.4163	C ₄₃ H ₆₁ O ₁₅	18.7	Quercotriterpenoside
8.21	717.3266	C ₄₁ H ₄₉ O ₁₁	-1.3	4-O-Demethylmanassantin A
8.35	941.5118	C ₄₈ H ₇₇ O ₁₈	0.8	Soyasaponin I
8.45	731.3420	C ₄₂ H ₅₁ O ₁₁	-1.5	Manassantin A
8.74	719.3417	C ₄₁ H ₅₁ O ₁₁	-1.9	Silybinderivative
8.82	589.2677	C ₃₁ H ₄₁ O ₁₁	4.8	Ajuganipponin A
9.17	1067.5413	C ₅₄ H ₈₃ O ₂₁	-1.3	Soyasaponin IV
9.39	591.2830	C ₃₁ H ₄₃ O ₁₁	4.2	Lipidoside BIII
9.65	675.3386	C ₃₆ H ₅₁ O ₁₂	0.7	Cucurbitacine-X-glucoside
10.25	677.3537	C ₃₆ H ₅₃ O ₁₂	1.2	2-O-β-D-Glucopyranosyl-cucurbitacin L

TR: Tiempo de Retención, Ms: Masa, FM: Fórmula Molecular

Tabla 1+. -Compuestos no identificados en el hidrolizado proteico de lentejas

TR	[M-H]-	FM	% Ajuste	PPM
2.76	688.2800	C ₂₈ H ₄₈ O ₁₉	96.65	1.5
2.93	608.2688	C ₂₇ H ₄₄ O ₁₅	99.02	1.2
2.98	572.3409	C ₂₆ H ₅₂ O ₁₃	99.88	5.9
3.03	705.3209	C ₄₇ H ₄₅ O ₆	97.58	-1.1
3.29	330.2024	C ₁₇ H ₃₀ O ₆	99.96	-5.5
3.40	504.2448	C ₂₇ H ₃₆ O ₉	91.04	17.7
3.62	501.2549	C ₂₁ H ₄₁ O ₁₃	99.09	0.4
3.83	357.2129	C ₁₅ H ₃₃ O ₉	98.59	0.4
4.18	542.3543	C ₂₉ H ₅₀ O ₉	98.35	16.2
4.27	580.2615	C ₂₉ H ₄₀ O ₁₂	90.58	16.4
4.69	570.2776	C ₂₈ H ₄₂ O ₁₂	91.07	17.5
4.81	783.4264	C ₃₇ H ₆₇ O ₁₇	99.90	-14.7
5.44	792.3788	C ₃₇ H ₆₀ O ₁₈	99.97	1.0
5.74	891.4451	C ₄₆ H ₆₇ O ₁₇	99.99	8.2
5.88	876.4466	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₉	92.39	12.7
6.32	754.4720	C ₃₇ H ₇₀ O ₁₅	99.52	0.7
6.47	1002.4776	C ₄₈ H ₇₄ O ₂₂	99.91	10.4
6.50	772.4611	C ₄₀ H ₆₈ O ₁₄	94.76	0.3
7.25	702.3237	C ₃₇ H ₅₀ O ₁₃	95.83	-2.0
7.91	728.3424	C ₃₉ H ₅₂ O ₁₃	94.90	2.2

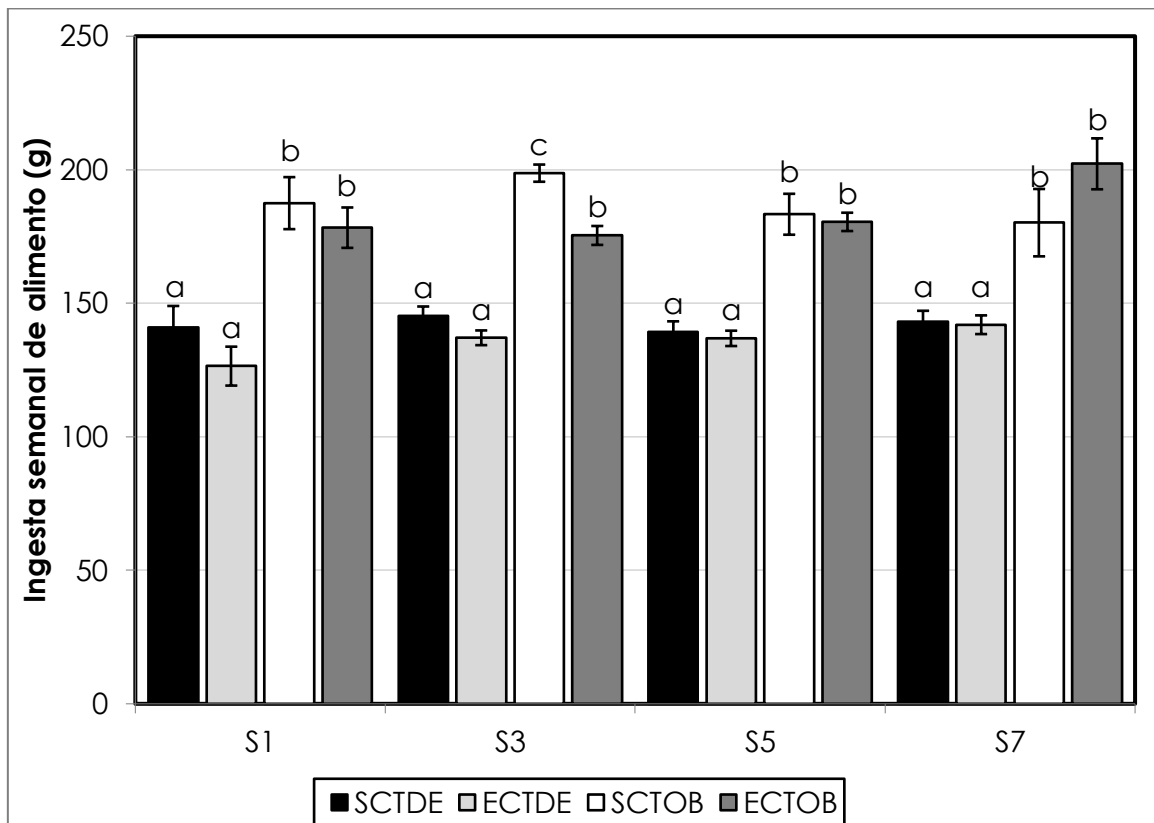
TR: Tiempo de Retención, MS: Masa, FM: Fórmula Molecular, PPM: Error

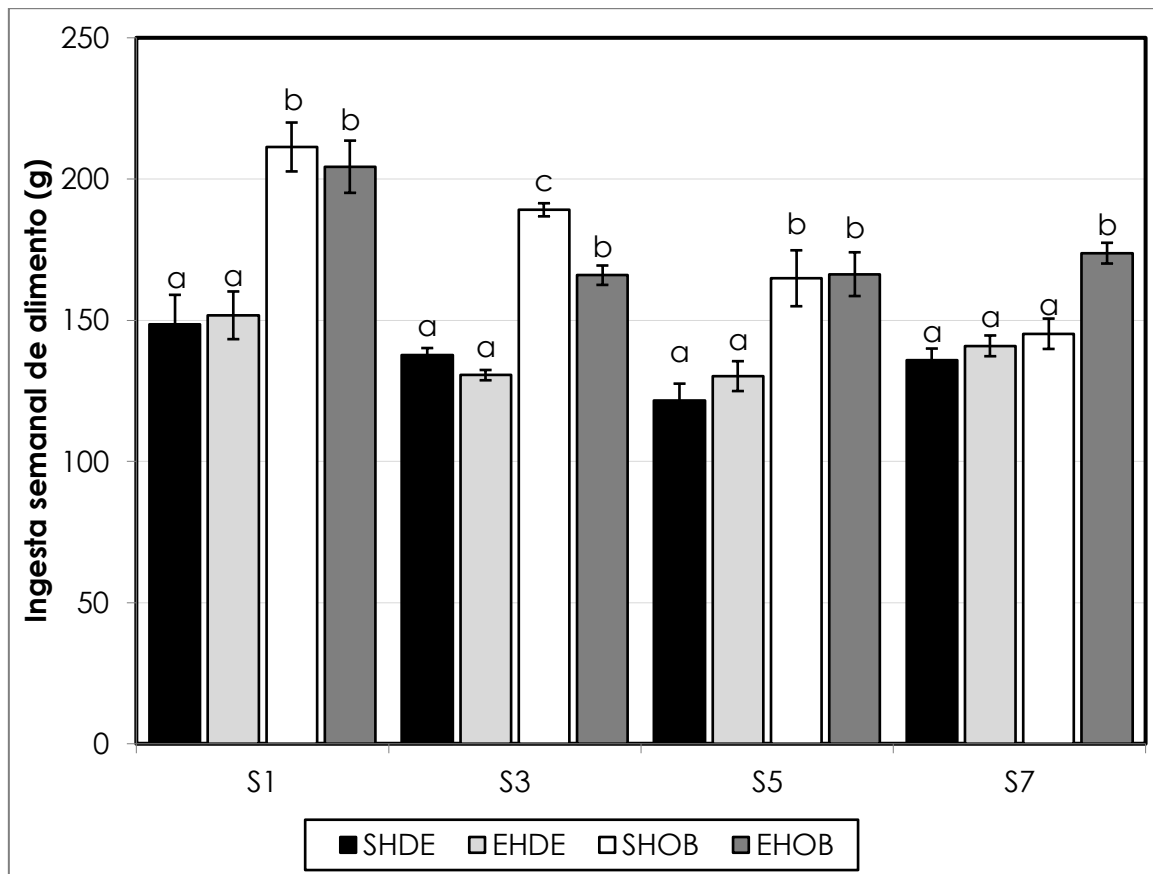
4.2.- Ingesta de alimento, cambios ponderales, composición corporal y gasto metabólico.

En las figuras 2A y 2B se muestra el efecto del fenotipo, la administración de un hidrolizado proteico de lenteja y el protocolo de entrenamiento mixto sobre la ingesta semanal de alimentos y el aumento de peso corporal de ratas Zucker. La ingesta de alimento expresada en gramos por semana (Figura 2A) se vio afectada principalmente por el fenotipo, observándose valores más altos para este parámetro en los animales de fenotipo obeso frente a sus controles delgados. La administración del hidrolizado proteico de lenteja disminuyó ligeramente la ingesta de alimento, mientras que el efecto inhibitor del ejercicio no fue tan sólido y se detectaron algunas interacciones entre fenotipo y ejercicio a lo largo del periodo experimental.

La ganancia de peso corporal se vio afectada principalmente por el fenotipo, con valores significativamente más altos en animales obesos frente a delgados (Figura 2B), mientras que la administración del hidrolizado proteico tendió a incrementar este parámetro en los animales obesos y a disminuirlo en los delgados, dando por tanto lugar a una interacción de fenotipo × hidrolizado.

Figura 2A





Efecto del Fenotipo: $P < 0.0001$; Fenotipo x Hidrolizado: $P = 0.082$

Semana 1

Efecto fenotipo $p < 0.001$
Efecto hidrolizado $p = 0.003$

Semana 3

Efecto fenotipo $p < 0.001$
Efecto ejercicio $p < 0.001$
Efecto hidrolizado $p = 0.001$
Fenotipo x ejercicio $p = 0.001$

Semana 5

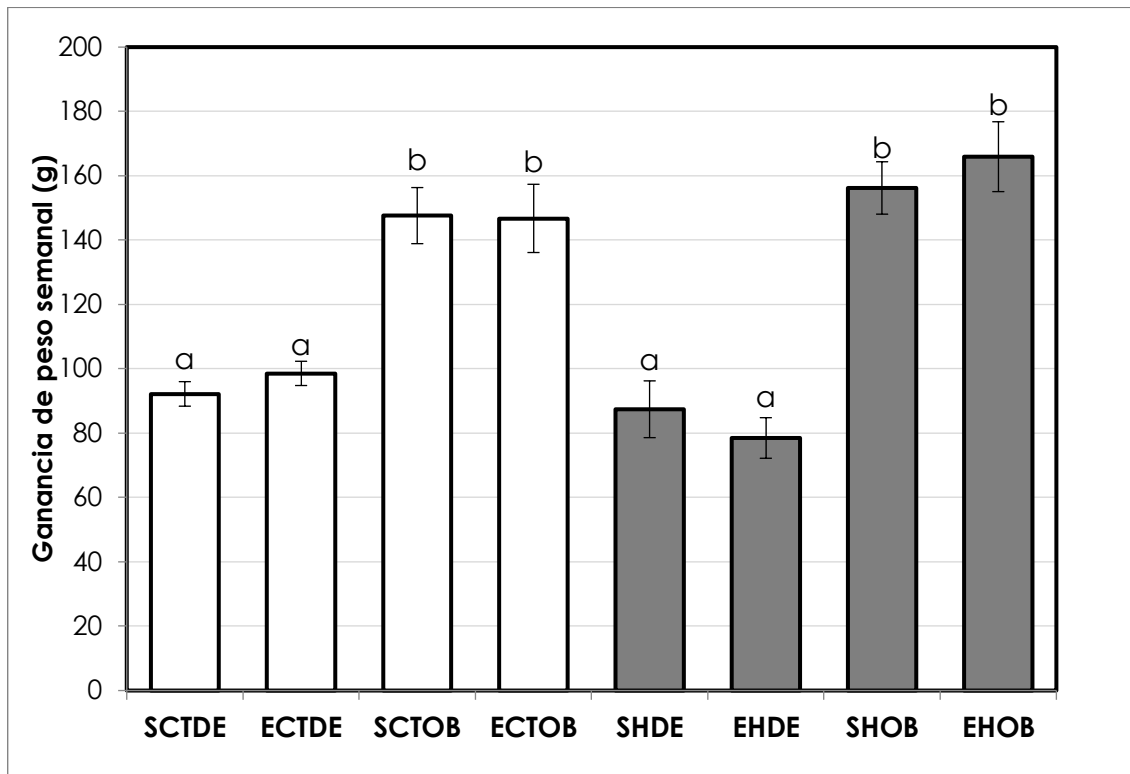
Efecto Fenotipo
 $p < 0.001$
Efecto Hidrolizado
 $p = 0.001$

Semana 7

Efecto fenotipo $p < 0.001$
Efecto ejercicio $p = 0.004$
Efecto hidrolizado $p < 0.001$
Fenotipo x Ejercicio $p = 0.014$
Fenotipo x Hidrolizado $p = 0.004$

Figura 2A.- Ingesta semanal de alimento en gramos. Grupos de ratas: SCTDE: Grupo Control Sedentario Delgado, ECTDE: Grupo Control Ejercicio Delgado, SCTOB: Grupo Control Sedentario Obeso, ECTOB: Grupo Control Ejercicio Obeso, SHDE: Grupo Hidrolizado Sedentario Delgado, EHDE: Grupo Hidrolizado Ejercicio Delgado, SHOB: Grupo Hidrolizado Sedentario Obeso, EHOB: Grupo Hidrolizado Ejercicio Obeso. Los valores medios en cada grupo de animales ($n=8$) se representan por barras verticales asociadas al EEM representado por la barra de error. Medias con diferentes letras difieren significativamente ($p < 0.05$). El test de comparaciones múltiples de Tukey se realizó independientemente en los experimentos control o hidrolizado para la ingesta semanal de alimento.

Figura 2B



Efecto Fenotipo $p < 0.001$
 Fenotipo x Hidrolizado $p = 0.027$

Figura 2B.- Incremento de peso corporal semanal en gramos. Grupos de ratas: SCTDE: Grupo Control Sedentario Delgado, ECTDE: Grupo Control Ejercicio Delgado, SCTOB: Grupo Control Sedentario Obeso, ECTOB: Grupo Control Ejercicio Obeso, SHDE: Grupo Hidrolizado Sedentario Delgado, EHDE: Grupo Hidrolizado Ejercicio Delgado, SHOB: Grupo Hidrolizado Sedentario Obeso, EHOB: Grupo Hidrolizado Ejercicio Obeso. Los valores medios en cada grupo de animales ($n=8$) se representan por barras verticales asociadas al EEM representado por la barra de error. Medias con diferentes letras difieren significativamente ($p < 0.05$).

En las figuras 2C y 2D se muestra el efecto del fenotipo, la administración del hidrolizado proteico y el protocolo de entrenamiento sobre la composición corporal, específicamente la masa grasa y la masa magra. El efecto del fenotipo dio lugar a un mayor contenido de masa grasa en ratas obesas en comparación con ratas delgadas. El protocolo de entrenamiento dio lugar a un descenso de la masa grasa en comparación a los animales sedentarios, aunque su efecto fue más pronunciado en las ratas obesas y a las que se administra el hidrolizado proteico en comparación a las delgadas y a las administradas con placebo. La administración del hidrolizado proteico disminuyó la masa

grasa solo en los animales obesos que realizaban ejercicio en comparación con sus controles administrados con placebo. La masa magra se vio afectada principalmente por efecto del fenotipo disminuyendo en los animales obesos a pesar del mayor peso corporal.

Figura 2C

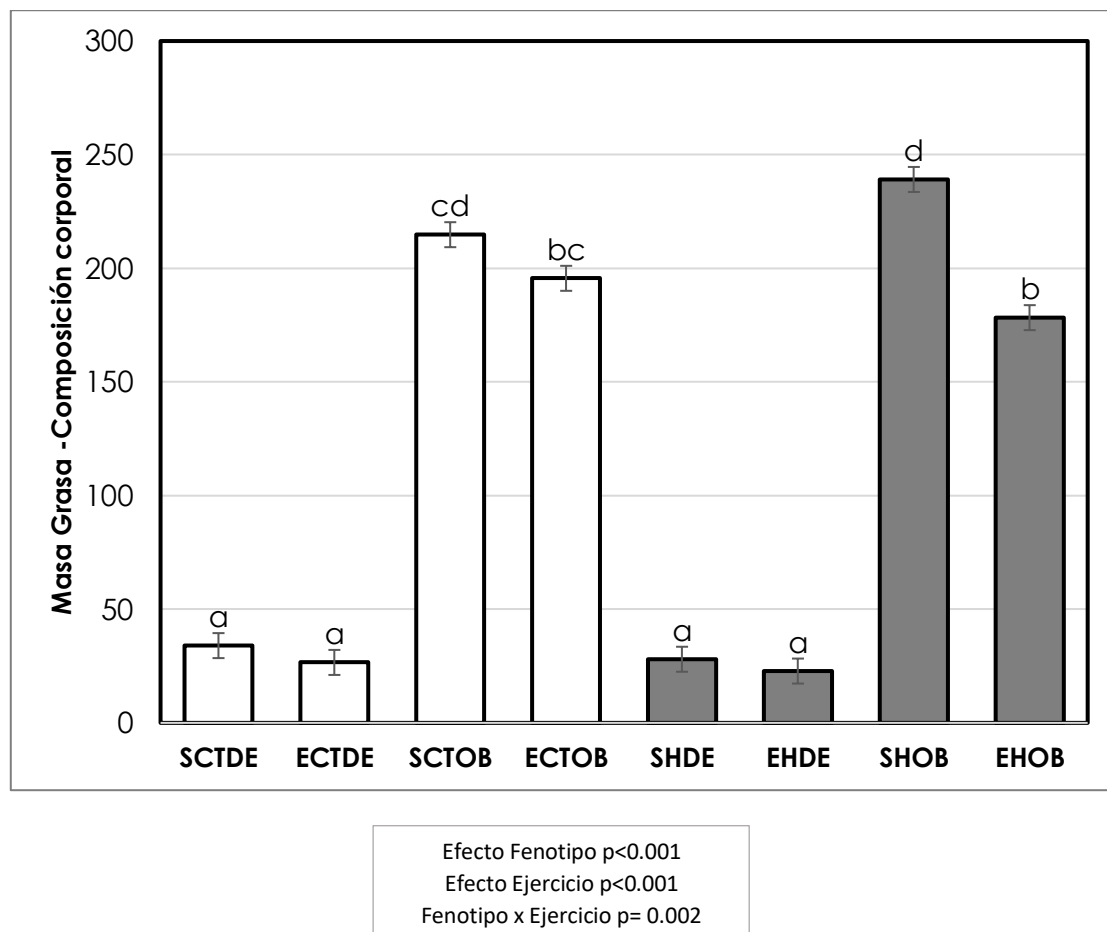


Figura 2C.-Masa grasa – Composición corporal. Grupos de ratas: SCTDE: Grupo Control Sedentario Delgado, ECTDE: Grupo Control Ejercicio Delgado, SCTOB: Grupo Control Sedentario Obeso, ECTOB: Grupo Control Ejercicio Obeso, SHDE: Grupo Hidrolizado Sedentario Delgado, EHDE: Grupo Hidrolizado Ejercicio Delgado, SHOB: Grupo Hidrolizado Sedentario Obeso, EHOB: Grupo Hidrolizado Ejercicio Obeso. Los valores medios en cada grupo de animales (n=8) se representan por barras verticales asociadas al EEM representado por la barra de error. Medias con diferentes letras difieren significativamente ($p < 0.05$).

Figura 2D

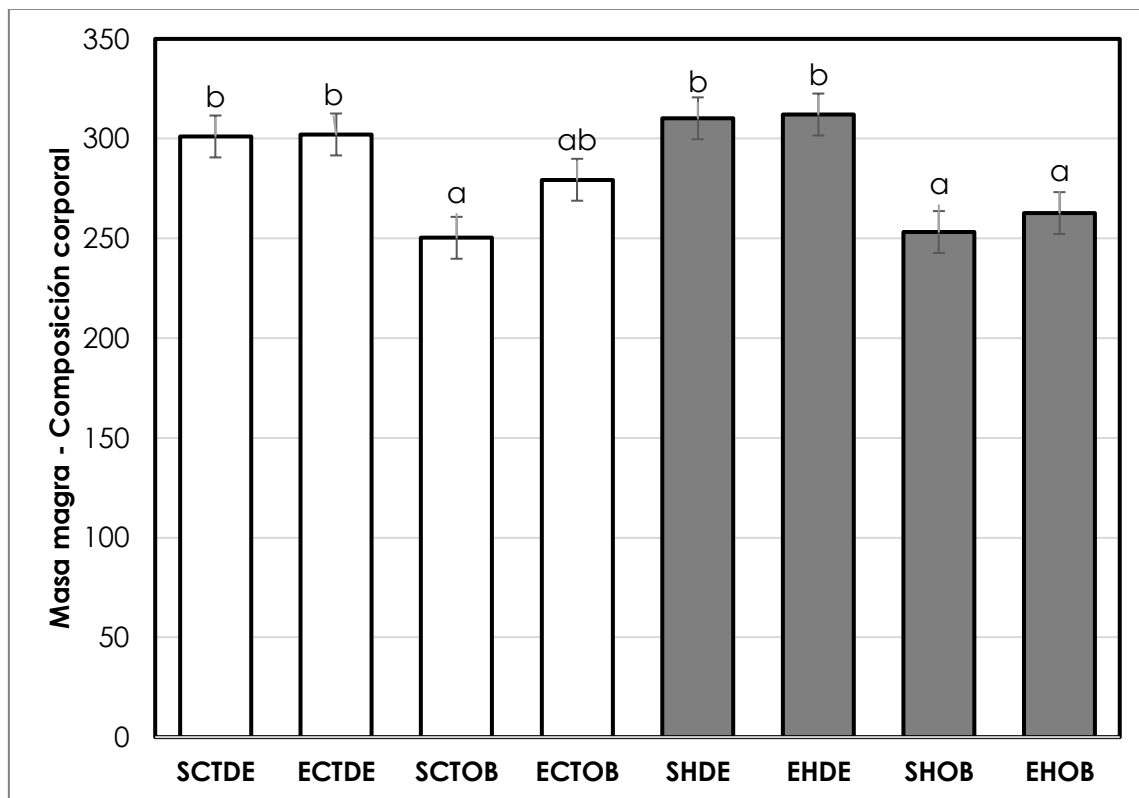
Efecto Fenotipo $p < 0.001$

Figura 2D.-Masa magra – Composición corporal. Grupos de ratas: SCTDE: Grupo Control Sedentario Delgado, ECTDE: Grupo Control Ejercicio Delgado, SCTOB: Grupo Control Sedentario Obeso, ECTOB: Grupo Control Ejercicio Obeso, SHDE: Grupo Hidrolizado Sedentario Delgado, EHDE: Grupo Hidrolizado Ejercicio Delgado, SHOB: Grupo Hidrolizado Sedentario Obeso, EHOB: Grupo Hidrolizado Ejercicio Obeso. Los valores medios en cada grupo de animales ($n=8$) se representan por barras verticales asociadas al EEM representado por la barra de error. Medias con diferentes letras difieren significativamente ($p < 0.05$).

Los efectos del fenotipo y las diferentes intervenciones ensayadas sobre el gasto metabólico son complejos (Figura 2E). Se observó un claro efecto relacionado con el ciclo de luz y oscuridad que se vio reflejado en un mayor gasto metabólico en el ciclo de oscuridad. El fenotipo obeso se relacionó con un gasto metabólico más bajo solo en los animales que se administró el hidrolizado proteico, mientras que el protocolo de entrenamiento y la administración de hidrolizado proteico tuvieron un efecto potenciador o reductor, respectivamente, sobre ese parámetro solo en el período de luz.

Figura 2E

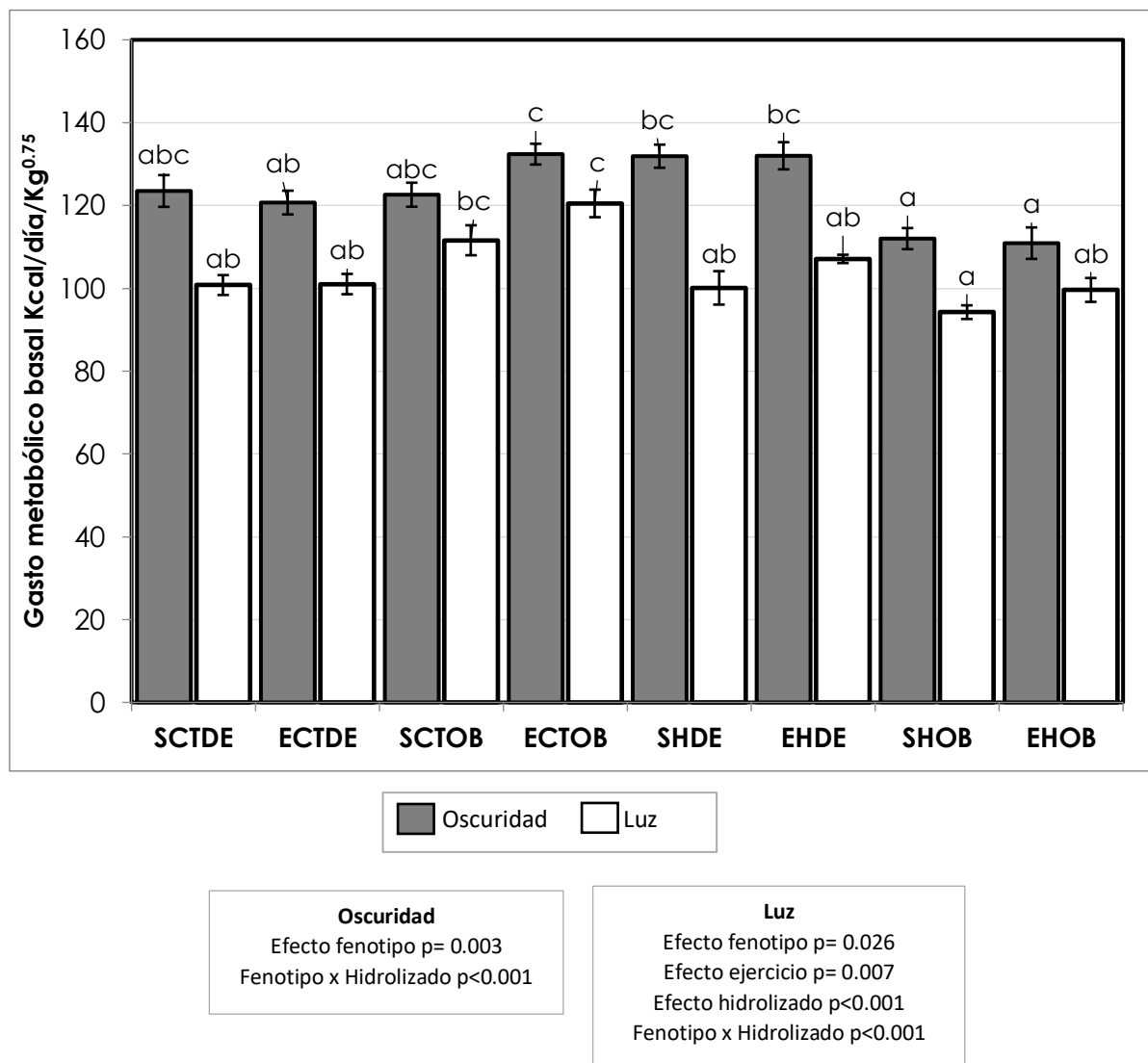


Figura 2E.- Gasto metabólico basal en Kcal/día/kg^{0.75}. Grupos de ratas: SCTDE: Grupo Control Sedentario Delgado, ECTDE: Grupo Control Ejercicio Delgado, SCTOB: Grupo Control Sedentario Obeso, ECTOB: Grupo Control Ejercicio Obeso, SHDE: Grupo Hidrolizado Sedentario Delgado, EHDE: Grupo Hidrolizado Ejercicio Delgado, SHOB: Grupo Hidrolizado Sedentario Obeso, EHOB: Grupo Hidrolizado Ejercicio Obeso. Los valores medios en cada grupo de animales (n=8) se representan por barras verticales asociadas al EEM representado por la barra de error. Medias con diferentes letras difieren significativamente (p<0.05). El estudio estadístico se hizo de forma independiente en oscuridad o luz.

4.3.- Capacidad aeróbica y estado físico

En la tabla 2 se muestran parámetros relacionados con la capacidad aeróbica y el rendimiento físico de las ratas Zucker. Se observó que todas las variables medidas se vieron afectadas por el efecto del fenotipo, lo que resultó en valores significativamente más bajos en los animales obesos en comparación con animales delgados. El protocolo de entrenamiento mixto ensayado mejoró la capacidad aeróbica y el rendimiento físico en comparación con los animales no entrenados, además se observaron efectos más pronunciados en animales delgados vs animales obesos, lo que resultó en una interacción significativa de fenotipo × ejercicio.

La administración del hidrolizado de proteína de lentejas aumentó significativamente el VO_2 máx en comparación con las ratas a las que solo se les administró el placebo. Sin embargo, no logró una mejora similar en el resto de los parámetros analizados relacionados con el rendimiento físico ($P < 0.05$). El lactato en sangre al final de la prueba incremental fue mayor en los animales obesos que en los delgados y menor en los grupos entrenados que en los no entrenados. Sin embargo, dichos resultados fueron menos marcados en los grupos de ratas que consumieron el hidrolizado proteico que los grupos control, lo que dio lugar a efectos significativamente estadísticos de fenotipo, ejercicio e hidrolizado proteico.

Tabla2. Influencia del hidrolizado proteico de lenteja, fenotipo y ejercicio sobre capacidad aerobica y e

	Control				Hidrolizado				R ²	EEM	Efecto del hidrolizado	Efecto del fenotipo
	Delgadas		Obesas		Delgadas		Obesas					
	SED	EXC	SED	EXC	SED	EXC	SED	EXC				
VO ₂ max (mL/min/kg ^{0.75})	31.0 ^{ab}	45.3 ^{de}	24.9 ^a	33.0 ^b	39.8 ^{cd}	50.0 ^e	25.4 ^a	35.2 ^{bc}	0.83	1.54	p=0.0030	p<0.0001
Tiempo de ejecución (min)	8.7 ^{bc}	17.5 ^d	6.5 ^{ab}	10.8 ^c	8.4 ^{bc}	16.2 ^d	4.0 ^a	8.8 ^{bc}	0.88	0.66	p<0.0001	p<0.0001
Velocidad máxima (cm/seg)	49.6 ^{bc}	77.3 ^d	44.8 ^b	57.6 ^c	48.3 ^{bc}	72.8 ^d	34.6 ^a	50.0 ^{bc}	0.86	2.17	p<0.0001	p<0.0001
Distancia(m)	201.4 ^{bc}	535.0 ^d	142.3 ^{ab}	275.1 ^c	192.3 ^{bc}	476.0 ^d	73.3 ^a	204.7 ^{bc}	0.86	24.8	p=0.0003	p<0.0001
Lactato (mmol/L)	5.29 ^a	3.71 ^a	12.6 ^c	9.3 ^{bc}	5.97 ^{ab}	5.06 ^a	12.6 ^c	12.2 ^c	0.71	0.92	p=0.0385	p<0.0001

Los resultados se representan como la media de 8 ratas. SED, ratas sedentarias, EXC, ratas que realizan un ejercicio. R², coeficiente de determinación, EEM, error estandar de la media . VO₂max, consumo maximo de oxigeno. Los resultados con distintos superíndices ^{a,b,c,d,e} difieren significativamente (P < 0.05).

4.4.-Parámetros hemáticos

La influencia del fenotipo, el hidrolizado proteico y el protocolo de entrenamiento sobre los parámetros hemáticos de ratas Zucker se presenta en la Tabla 3. Se observó un aumento significativo en el recuento de leucocitos por efecto del fenotipo y la administración del hidrolizado proteico, no encontrándose efecto apreciable por el protocolo de entrenamiento aplicado. Con respecto al recuento de eritrocitos y hematocrito se observó que la administración del hidrolizado proteico presentó una tendencia a disminuir los valores de estos parámetros solo en el fenotipo obeso, mientras que los valores de hemoglobina disminuyeron además en el fenotipo delgado. El protocolo de entrenamiento aplicado durante 8 semanas a las ratas Zucker causó un incremento en el contenido de hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular medio y hemoglobina corpuscular media en las ratas de fenotipo obeso a las que se administró el hidrolizado proteico. El ejercicio físico también aumentó el parámetro de amplitud de distribución eritrocitaria (RDW) en el fenotipo obeso independientemente del tratamiento dietético ensayado.

Tabla 3.- Influencia del hidrolizado proteico de lenteja, fenotipo y protocolo de entrenamiento sobre parámetros hematológicos

	Control				Hidrolizado				R ²	EEM	Efecto del hidrolizado	Efecto del fenotipo
	Delgadas		Obesas		Delgadas		Obesas					
	SED	EXC	SED	EXC	SED	EXC	SED	EXC				
GB (10 ³ /μL)	3.21 ^a	3.41 ^a	5.28 ^{ab}	3.61 ^a	4.66 ^a	5.28 ^{ab}	8.04 ^b	8.53 ^b	0.33	1.38	p=0.001	p<0.001
GR (10 ⁶ /μL)	8.51 ^{ab}	8.86 ^b	8.52 ^{ab}	8.45 ^{ab}	8.54 ^{ab}	8.44 ^{ab}	7.71 ^a	7.95 ^{ab}	0.16	0.34	p=0.013	p=0.013
HG (g/dL)	14.2 ^b	14.2 ^b	14.9 ^b	14.1 ^b	13.1 ^{ab}	13.3 ^{ab}	11.9 ^a	13.6 ^{ab}	0.31	0.65	p<0.001	p=0.849
HCT (%)	42.0 ^b	44.3 ^b	41.3 ^{ab}	42.5 ^b	41.1 ^{ab}	41.1 ^{ab}	35.8 ^a	38.7 ^{ab}	0.30	1.81	p<0.001	p=0.006
VCM (fL)	49.3 ^{bcd}	50.0 ^{cd}	48.4 ^b	50.3 ^d	48.2 ^b	48.7 ^{bc}	46.5 ^a	48.6 ^b	0.65	0.45	p<0.001	p=0.009
HCM (pg)	16.7 ^{bcd}	16.0 ^{abc}	17.5 ^d	16.7 ^{bcd}	15.4 ^a	15.8 ^{abc}	15.4 ^{ab}	17.1 ^{cd}	0.43	0.44	p<0.001	p=0.002
CMHC (g/dL)	33.9 ^{abc}	32.1 ^a	36.5 ^c	32.5 ^{ab}	31.9 ^a	32.5 ^a	33.2 ^{ab}	35.1 ^{bc}	0.46	0.78	p=0.083	p<0.001
RDW (fL)	29.9 ^a	29.5 ^a	30.5 ^a	33.3 ^b	29.6 ^a	31.9 ^{ab}	30.6 ^a	33.8 ^b	0.47	0.83	p=0.125	p<0.001

GB, glóbulos blancos, GR, glóbulos rojos, HG, hemoglobina, HCT, hematocrito, VCM, volumen corpuscular media, CMHC, contenido medio de hemoglobina corpuscular, RDW, amplitud de distribución eritrocitaria media de cada grupo de ratas (n=8). SED, ratas sedentarias, EXC, ratas que realizaban el protocolo de entrenamiento, EEM, error estándar de la media. Las medias dentro de una misma línea con diferentes letras son significativamente diferentes (P <0.05).

4.5.- Parámetros de metabolismo glucídico y lipídico.

La influencia del fenotipo, administración de un hidrolizado proteico y el protocolo de entrenamiento mixto sobre diferentes parámetros e índices de metabolismo glucídico y resistencia a la insulina se presenta en la Tabla 4. Se observó un efecto significativo del fenotipo en los niveles de glucemia e insulina plasmática, con valores más elevados en animales obesos que en animales delgados.

La administración del hidrolizado proteico disminuyó los valores de glucemia en los animales obesos, pero no en los delgados, lo que resultó en una interacción significativa entre hidrolizado y fenotipo, mientras que la insulina plasmática disminuyó como resultado del protocolo de entrenamiento en animales a los que se administró el hidrolizado proteico, pero no en ratas administradas con placebo, lo que resultó en un efecto significativo del ejercicio e interacción hidrolizado × ejercicio. El índice HOMA de resistencia a la insulina, el área bajo la curva (AUC) y el índice triglicéridos glucosa (Tr-GI) fueron significativamente más altos en ratas obesas frente a ratas delgadas, y disminuyeron como consecuencia de la administración del hidrolizado proteico y el protocolo de entrenamiento mixto, aunque el efecto de este último sobre el índice HOMA solo presentó un efecto apreciable en el grupo de animales a los que se administró el hidrolizado proteico, pero no en animales administrados con placebo.

Todos los efectos mencionados anteriormente se asociaron con diferentes tendencias de evolución en los valores de glucosa en sangre tras una sobrecarga oral de glucosa oral, observándose picos más bajos de glucemia y menores tiempos de retorno a niveles basales en los animales administrados con hidrolizado proteico o que realizaban el protocolo de ejercicio mixto (Figura 3).

Las ratas de fenotipo obeso presentaron niveles significativamente más altos de leptina en plasma en relación a las delgadas. El ejercicio causó una disminución en dicho parámetro, pero los efectos de esta

intervención fueron más marcados en los animales obesos que en los delgados. Los niveles de adiponectina se vieron significativamente afectados por el fenotipo, siendo estos mayores en ratas delgadas frente a obesas, el ejercicio indujo una disminución en dichos niveles plasmáticos, sin embargo, este efecto fue más claro en los animales delgados y los administrados con hidrolizado proteico, lo que resultó en interacciones significativas entre fenotipo × ejercicio e hidrolizado × ejercicio.

Tabla 4. Influencia del hidrolizado proteico de lenteja, fenotipo y protocolo de entrenamiento sobre p resistencia a la insulina en ratas Zucker.

	Control				Hidrolizado				R ²	EEM	Efecto del hidrolizado	Efecto del fenotipo
	Delgadas		Obesas		Delgadas		Obesas					
	SED	EXC	SED	EXC	SED	EXC	SED	EXC				
Glucosa (mmol/L)	4.49 ^a	4.81 ^{ab}	6.15 ^d	6.01 ^{cd}	5.21 ^{abc}	5.47 ^{bcd}	5.69 ^{cd}	5.45 ^{bcd}	0.49	0.26	p=0.503	p<0.001
Insulina (pg/mL)	174.7 ^a	170.8 ^a	9928.6 ^b	10124.4 ^b	100.9 ^a	60.7 ^a	13250 ^c	8491.2 ^b	0.92	814.5	p=0.371	p<0.001
HOMA-IR	1.05 ^a	1.32 ^a	71.9 ^b	78.1 ^{bc}	0.55 ^a	0.42 ^a	96.5 ^c	59.8 ^b	0.92	6.15	p=0.703	p<0.001
AUC	1815 ^a	1727 ^a	5995 ^d	4031 ^{bc}	2987 ^{ab}	3250 ^{ab}	4973 ^{cd}	3693 ^{bc}	0.68	367	p=0.1685	p<0.0001
Índice Tr-GI	7.68 ^a	7.82 ^a	10.16 ^b	9.98 ^b	7.97 ^a	8.09 ^a	9.94 ^b	9.58 ^b	0.89	0.14	p=0.8849	p<0.0001
Leptina (pg/mL)	4413 ^a	6024 ^a	111021 ^b	80647 ^b	7229 ^a	1704 ^a	120372 ^b	103498 ^b	0.81	12693	p=0.242	p<0.001
ADIP (µg/mL)	3.26 ^{ab}	3.05 ^a	2.61 ^a	2.85 ^a	4.49 ^b	2.44 ^a	3.30 ^{ab}	2.70 ^a	0.29	0.46	p=0.204	p=0.054

HOMA-IR, Modelo homeostático para la evaluar resistencia a la insulina. AUC, área bajo la curva (unidad triglicéridos-glucosa = Ln [triglicéridos plasmáticos en ayunas (mg / dL) × glucosa en ayunas (mg / dL) / 2] / medias de 8 ratas. SED, ratas sedentarias, EXC, ratas que realizan un protocolo de entrenamiento mixto, error estándar de la media. Las medias dentro de la misma línea con diferentes superíndices (^{a,b,c,d}) difieren

Figura 3

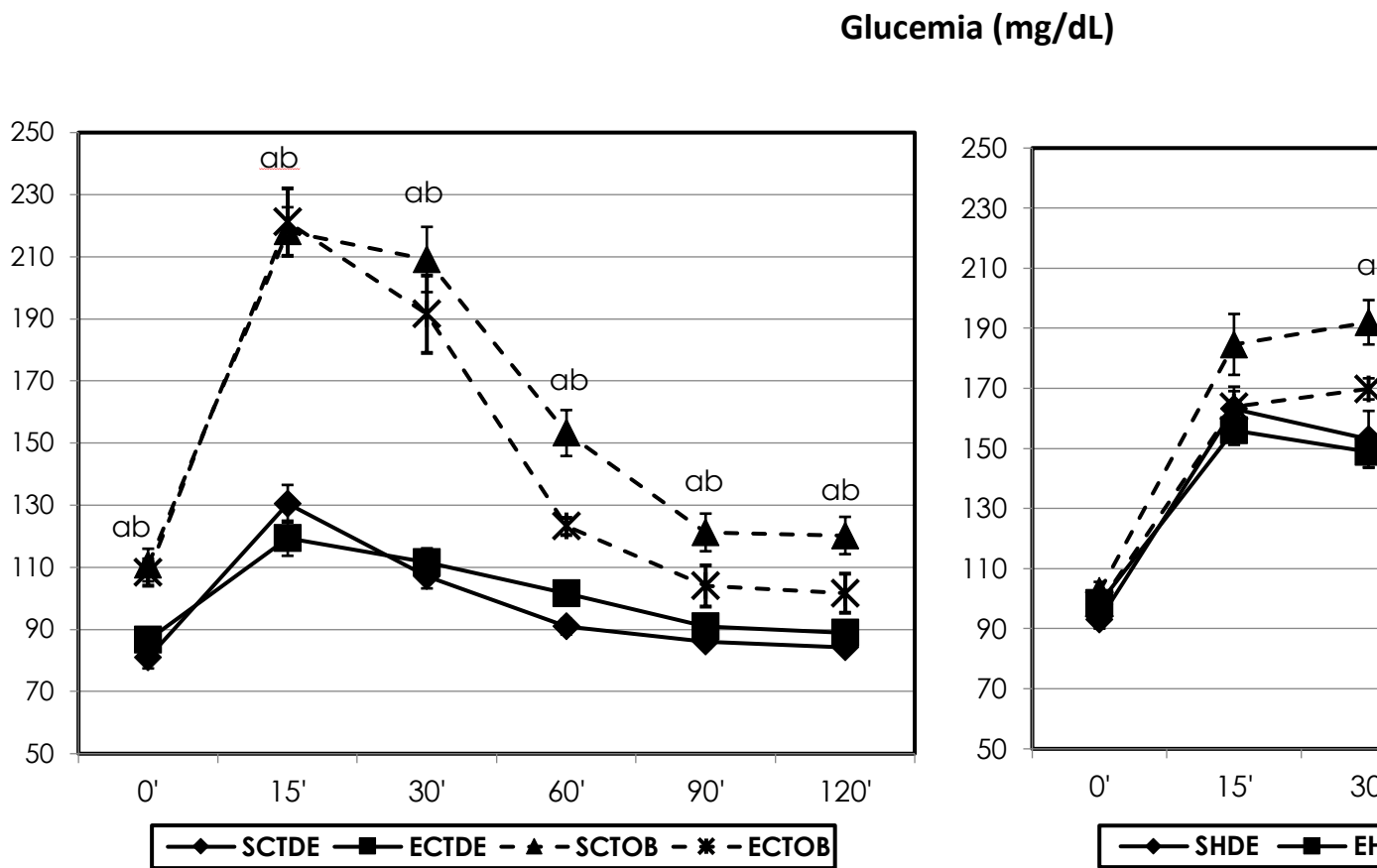


Figura 3.- Efectos de la administración de un hidrolizado proteico de lenteja y un protocolo de entrenamiento mixto sobre los niveles de glucosa en diferentes momentos tras la sobrecarga de glucosa oral. Grupos de ratas: SCTDE: Grupo Control Sedentario Delgado, ECTDE: Grupo Control Obeso, ECTOB: Grupo Control Ejercicio Obeso, SHDE: Grupo Hidrolizado Sedentario Delgado, EHDE: Grupo Hidrolizado Ejercicio Delgado, SHOB: Grupo Hidrolizado Sedentario Obeso, EHOB: Grupo Hidrolizado Ejercicio Obeso. Los valores medios en cada grupo de animales (n=8) se representan por puntos en cada línea asociadas al EEM representando los errores estándar. Las comparaciones múltiples mediante la prueba t de Dunnett. La siguiente notación se usa para expresar diferencias significativas ($p < 0.05$). a, DS: ratas delgadas sedentarias; b, OE: ratas obesas ejercicio vs DS ratas delgadas sedentarias; c, DE: ratas delgadas ejercicio vs DS: ratas delgadas sedentarias.

En la tabla 5 se muestra la influencia del fenotipo, la administración del hidrolizado proteico y el protocolo de entrenamiento sobre parámetros plasmáticos de metabolismo lipídico. Los niveles plasmáticos de todos los parámetros estudiados fueron mayores en los animales obesos en comparación a sus controles delgados, lo cual se vio reflejado en un efecto significativo del fenotipo. Por otra parte, se observó un efecto significativo del ejercicio, ya que el protocolo de entrenamiento causó una notable disminución en todos los parámetros estudiados, efecto que fue mucho más consistente en las ratas obesas que en las delgadas. En cuanto a la administración del hidrolizado proteico, son de destacar su efecto sobre los niveles de TG que mostraron una tendencia a disminuir en los animales obesos, aunque no en los delgados, y su efecto sobre los niveles de HDL-C que aumentaron significativamente en comparación a los animales administrados con placebo.

Tabla 5. Influencia del hidrolizado proteico de lenteja, fenotipo y protocolo de entrenamiento sobre parámetros

	Control				Hidrolizado				R ²	EEM	Efecto del hidrolizado	Efecto del fenotipo	Efecto del ejercicio
	Delgadas		Obesas		Delgadas		Obesas						
	SED	EXC	SED	EXC	SED	EXC	SED	EXC					
TG (mg/dL)	62.9 ^a	62.0 ^a	496.6 ^c	429.2 ^{bc}	64.7 ^a	72.9 ^a	417.2 ^{bc}	297.9 ^b	0.80	36.8	p=0.1199	p<0.0001	p=
Fosfolípidos (mg/dL)	132.7 ^a	112.4 ^a	299.2 ^d	236.9 ^{bc}	136.6 ^a	131.7 ^a	290.8 ^{cc}	219.8 ^b	0.81	14.2	p=0.7215	p<0.0001	p<
CT (mg/dL)	109.0 ^a	88.5 ^a	221.0 ^c	179.6 ^{bc}	124.8 ^{ab}	93.1 ^a	279.6 ^d	198.3 ^c	0.80	13.0	p=0.0018	p<0.0001	p<
HDL-C (mg/dL)	48.0 ^{ab}	44.6 ^a	73.3 ^c	72.8 ^c	63.3 ^{bc}	50.1 ^{ab}	117.0 ^d	101.5 ^d	0.87	3.90	p<0.0001	p<0.0001	p=
LDL-C (mg/dL)	7.57 ^a	6.85 ^a	39.2 ^b	17.7 ^a	15.4 ^a	9.3 ^a	35.7 ^b	19.8 ^a	0.71	3.12	p=0.1715	p<0.0001	p<

Los resultados son la media de 8 ratas. SED, ratas sedentarias, EXC, ratas que realizan un protocolo de ejercicio de alta intensidad, EEM, error estándar de la media. TG, triglicéridos (mg / dL), CT, colesterol total (mg / dL), HDL-C, colesterol HDL (mg / dL), LDL-C, colesterol LDL (mg / dL). Las medias dentro de la misma línea con diferentes superíndices (^{a,b,c,d}) difieren significativamente.

4.6.-Parámetros cardiacos y electrocardiográficos

Tanto el fenotipo como la administración del hidrolizado proteico mostraron un efecto significativo sobre el peso del corazón que fue mayor en ratas obesas que en sus controles delgadas (Tabla 6). Del mismo modo, la frecuencia cardíaca basal se vio significativamente afectada por el fenotipo (menor en ratas obesas frente a ratas delgadas) y también por el ejercicio (menor en ratas entrenadas frente a no entrenadas con la excepción de los animales obesos administrados con hidrolizado).

Con respecto a los parámetros electrocardiográficos, la amplitud de la onda P se vio significativamente afectada por el fenotipo, con valores más altos en ratas obesas que en ratas delgadas. Los efectos del protocolo de entrenamiento en este parámetro solo fueron consistentes en animales administrados con el hidrolizado, en los cuales causó una disminución. Se observaron efectos significativos del fenotipo, hidrolizado proteico y ejercicio físico sobre la amplitud del complejo QRS que fue mayor en las ratas obesas frente a las delgadas y disminuyó como resultado de la administración del hidrolizado proteico y el protocolo de entrenamiento.

El efecto del ejercicio fue más consistente en las ratas administradas con hidrolizado proteico en comparación con sus controles administradas con placebo, lo cual dio lugar a una interacción significativa hidrolizado × ejercicio. Similares efectos del fenotipo y el hidrolizado proteico a los descritos previamente para la amplitud de complejo QRS se observaron en la amplitud de la onda T. Sin embargo, el efecto del ejercicio varió ampliamente en relación a la amplitud de la onda T dentro de los diferentes fenotipos e intervenciones nutricionales ensayadas, aunque no se observó ninguna interacción significativa.

El intervalo QT se vio afectado considerablemente por la administración del hidrolizado proteico, alcanzando valores más altos para este parámetro en comparación con los controles placebo. En

cuanto al intervalo QTc, se vio afectado principalmente por el fenotipo en las ratas obesas que aumentó el valor de este índice en comparación con sus controles delgados, el protocolo de entrenamiento tendió a disminuir el intervalo QTc con la excepción de las ratas obesas administradas con hidrolizado proteico.

Tabla 6.- Influencia del hidrolizado proteico de lenteja, fenotipo y protocolo de entrenamiento electrocardiográficos en ratas Zucker.

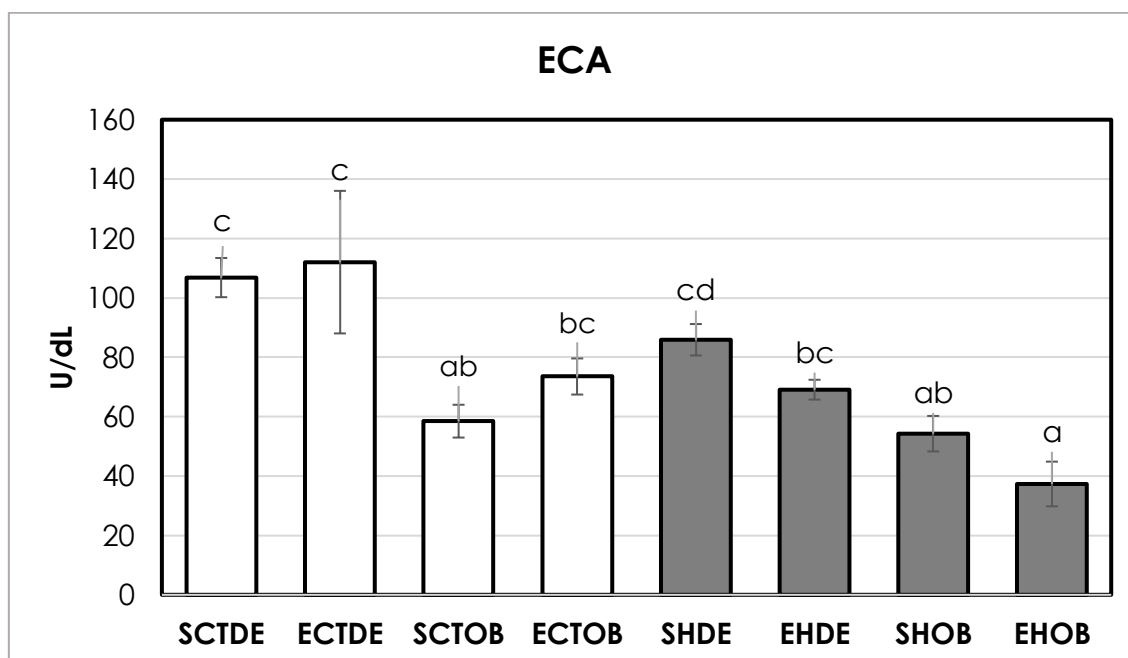
	Control				Hidrolizado				R ²	EEM	Efecto del hidrolizado	Efecto del fenotipo	Efecto del ejercicio
	Delgadas		Obesas		Delgadas		Obesas						
	SED	EXC	SED	EXC	SED	EXC	SED	EXC					
PC (g)	0.399 ^{ab}	0.360 ^a	0.477 ^c	0.458 ^{bc}	0.378 ^a	0.402 ^{ab}	0.507 ^c	0.517 ^c	0.70	0.02	p=0.006	p<0.001	p=0.001
FC	432.5 ^a	413.0 ^{ab}	390.6 ^b	373.5 ^b	433.0 ^a	393.1 ^{ab}	382.9 ^b	392.3 ^{ab}	0.44	9.05	p=0.911	p<0.001	p=0.001
LOP (s)	0.023 ^a	0.022 ^a	0.022 ^a	0.023 ^a	0.019 ^a	0.020 ^a	0.024 ^a	0.023 ^a	0.21	0.001	p=0.344	p=0.032	p=0.001
AOP (mv)	0.155 ^{ab}	0.133 ^b	0.195 ^{cd}	0.235 ^d	0.167 ^{ac}	0.104 ^b	0.135 ^b	0.140 ^b	0.62	0.011	p<0.001	p<0.001	p=0.001
IPR (s)	0.049 ^{ab}	0.044 ^b	0.050 ^{ab}	0.051 ^{ab}	0.050 ^{ab}	0.049 ^{ab}	0.051 ^{ab}	0.052 ^a	0.22	0.002	p=0.104	p=0.015	p=0.001
QRSL (s)	0.019 ^a	0.018 ^a	0.024 ^b	0.021 ^{ab}	0.018 ^a	0.020 ^{ab}	0.020 ^{ab}	0.019 ^a	0.43	0.008	p=0.044	p<0.001	p=0.001
QRS (mv)	1.017 ^{ad}	1.249 ^{ad}	2.565 ^b	2.426 ^{bc}	1.539 ^{ad}	0.963 ^{ad}	1.71 ^{ac}	0.896 ^d	0.65	0.171	p=0.001	p<0.0001	p=0.001
LOT (s)	0.049 ^a	0.040 ^a	0.071 ^b	0.047 ^a	0.065 ^b	0.039 ^a	0.066 ^b	0.070 ^b	0.66	0.003	p=0.001	p<0.0001	p<0.0001
AOT (mv)	0.202 ^{ab}	0.199 ^{ab}	0.334 ^c	0.290 ^{cd}	0.210 ^{abd}	0.122 ^b	0.294 ^{cd}	0.264 ^{adc}	0.58	0.020	p=0.0455	p<0.0001	p=0.001
IQT (s)	0.073 ^{ab}	0.066 ^b	0.104 ^c	0.079 ^{ab}	0.091 ^{ac}	0.072 ^{ab}	0.095 ^c	0.099 ^c	0.61	0.004	p=0.0014	p<0.0001	p=0.001
QTc (s)	0.151 ^{a^{cd}}	0.136 ^a	0.212 ^b	0.156 ^{ac}	0.195 ^{bd}	0.147 ^a	0.200 ^b	0.190 ^d	0.62	0.008	p=0.002	p<0.0001	p<0.0001

PC, peso cardíaco (g / 100 g de masa corporal magra), FC, frecuencia cardíaca (latidos por minuto), AOP, amplitud de la onda P (mv), IPR, intervalo PR (seg), QRSL, longitud del complejo QRS. (seg). QRS, amplitud del complejo QRS (mv), LOT, longitud de la onda T (seg), AOT, amplitud de onda T (mv), IQT, intervalo QT (seg), QTc, intervalo QT corregido (seg). Las medias son la media de 8 ratas. SED, ratas sedentarias, EXC, ratas que realizan un protocolo de entrenamiento de resistencia. Los valores con diferentes letras indican diferencias significativas (P <0.05).

4.7.- Parámetros de riesgo cardiovascular

La influencia del fenotipo, la administración del hidrolizado proteico y el protocolo de entrenamiento sobre diferentes parámetros de riesgo cardiovascular se muestra en la Figura 4. La actividad plasmática de ECA se vio afectada por el fenotipo y la administración del hidrolizado proteico, causando ambos factores una disminución significativa (Figura 4A). Sin embargo, la presión arterial medida por un método indirecto no mostró diferencias significativas bajo las condiciones experimentales del presente estudio entre animales obesos y delgados (datos no presentados). La expresión de ARNm de selectina E (*Sele*) experimentó un descenso significativo como consecuencia de la administración del hidrolizado proteico independientemente del fenotipo o ejercicio físico (Figura 4B). El índice aterogénico (IA) calculado en base a los niveles plasmáticos de colesterol total y HDL, disminuyó significativamente a causa del protocolo de entrenamiento ensayado (Figura 4C).

Figura 4A



Efecto del fenotipo $p < 0.001$
 Efecto del hidrolizado $p < 0.001$
 Hidrolizado x ejercicio $p < 0.001$

Figura 4A.- Actividad plasmática de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) en ratas Zucker. Grupos de ratas: SCTDE: Grupo Control Sedentario Delgado, ECTDE: Grupo Control Ejercicio Delgado, SCTOB: Grupo Control Sedentario Obeso, ECTOB: Grupo Control Ejercicio Obeso, SHDE: Grupo Hidrolizado Sedentario Delgado, EHDE: Grupo Hidrolizado Ejercicio Delgado, SHOB: Grupo Hidrolizado Sedentario Obeso, EHOB: Grupo Hidrolizado Ejercicio Obeso. Los valores medios en cada grupo de animales (n=8) se representan por barras verticales asociadas al EEM representado por la barra de error. Medias con diferentes letras difieren significativamente ($p < 0.05$).

Figura 4B

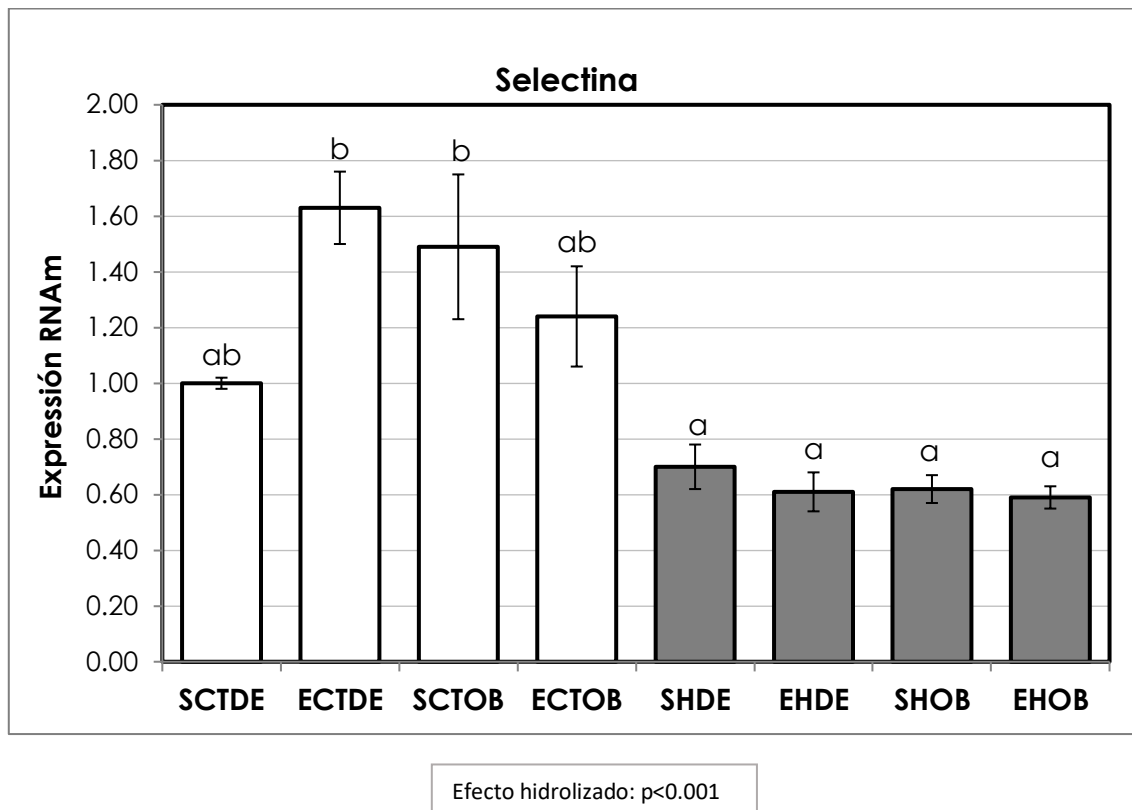
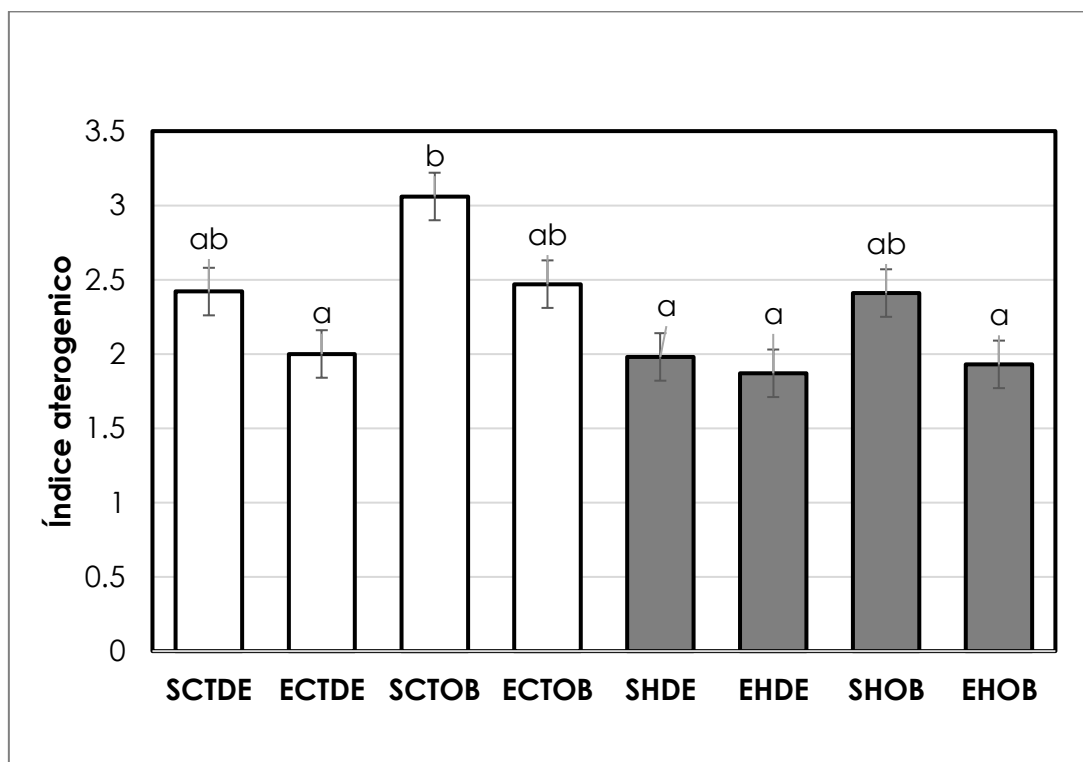


Figura 4B.- Expresión de mRNA de selectina en aorta de ratas Zucker. Grupos de ratas: SCTDE: Grupo Control Sedentario Delgado, ECTDE: Grupo Control Ejercicio Delgado, SCTOB: Grupo Control Sedentario Obeso, ECTOB: Grupo Control Ejercicio Obeso, SHDE: Grupo Hidrolizado Sedentario Delgado, EHDE: Grupo Hidrolizado Ejercicio Delgado, SHOB: Grupo Hidrolizado Sedentario Obeso, EHOB: Grupo Hidrolizado Ejercicio Obeso. Los valores medios en cada grupo de animales (n=8) se representan por barras verticales asociadas al EEM representado por la barra de error. Medias con diferentes letras difieren significativamente ($p < 0.05$).

Figura 4C



Efecto fenotipo $p=0.0007$
 Efecto ejercicio $p=0.0009$
 Efecto hidrolizado $p=0.0008$

Figura 4C.- índice aterogénico plasmático (colesterol total / colesterol HDL). Grupos de ratas: SCTOB: Grupo Control Sedentario Obeso, SCTDE: Grupo Control Sedentario Delgado, ECTOB: Grupo Control Ejercicio Obeso, ECTDE: Grupo Control Ejercicio Delgado, SHOB: Grupo Hidrolizado Sedentario Obeso, SHDE: Grupo Hidrolizado Sedentario Delgado, EHOB: Grupo Hidrolizado Ejercicio Obeso, EHDE: Grupo Hidrolizado Ejercicio Delgado. Los valores medios en cada grupo de animales ($n=8$) se representan por barras verticales asociadas al EEM representado por la barra de error. Medias con diferentes letras difieren significativamente ($p<0.05$).

4.8.- Parámetros plasmáticos y urinarios de la funcionalidad renal.

La influencia del fenotipo, el hidrolizado proteico y el ejercicio físico sobre los parámetros plasmáticos y urinarios de funcionalidad renal se representa en la tabla 7. El fenotipo afectó significativamente los niveles plasmáticos de ácido úrico que fueron más altos en ratas obesas que en sus controles delgados. Este parámetro también se vio afectado significativamente por la administración del hidrolizado proteico que aumentó significativamente tanto el contenido plasmático como el urinario en comparación a los grupos administrados con placebo. Por otra parte, Los niveles plasmáticos de urea también se vieron

significativamente afectados por el fenotipo, pero solo en los animales administrados con placebo, lo que se vio reflejado en efectos significativos de fenotipo e hidrolizado, así como a una interacción fenotipo × hidrolizado. El contenido de proteínas totales y albúmina en plasma se vio significativamente afectado por el fenotipo y el ejercicio con efectos opuestos de ambos factores, ya que, si bien el fenotipo obeso aumentó ambos parámetros, el ejercicio tendió a reducirlos. El aumento en el contenido de albúmina en plasma observado en los animales obesos se relacionó con mayores niveles de Ca y P en plasma. Además, la calcemia también aumentó significativamente por la administración del hidrolizado proteico y el protocolo de entrenamiento ensayado.

Se observaron efectos significativos de fenotipo e hidrolizado proteico sobre el peso del riñón expresado como gramos por 100 gramos de masa magra, el cual fue mayor en animales obesos frente a los delgados y en los animales administrados con el hidrolizado proteico frente a aquellos administrados con placebo. El protocolo de entrenamiento tendió a reducir el peso del riñón, pero su efecto fue más pronunciado en animales obesos en comparación a los animales delgados, lo que resultó en una interacción significativa fenotipo × ejercicio. El volumen de orina fue significativamente más elevado en ratas obesas que en ratas delgadas y experimentó un aumento adicional como consecuencia de la administración del hidrolizado proteico. Con respecto al pH de la orina, se vio significativamente afectado por el fenotipo (menor en ratas obesas) y por el tratamiento dietético (mayor en hidrolizado proteico), el protocolo de entrenamiento mostró efectos contrastados en ratas delgadas y obesas, dando lugar a una interacción fenotipo × ejercicio.

Se observó un efecto significativo del fenotipo sobre la excreción urinaria de albúmina (expresada en valores absolutos o en relación a la excreción urinaria de creatinina) que fue mayor en las ratas obesas en

comparación con las ratas delgadas, mientras que no se encontró ningún efecto significativo de la intervención dietética y si una disminución causada por el ejercicio. El contenido de creatinina en orina se redujo significativamente en los animales de fenotipo obeso y como consecuencia de la administración de hidrolizado proteico. Sin embargo, no se detectaron efectos significativos sobre el aclaramiento renal de creatinina. El contenido urinario de ácido úrico aumentó significativamente como resultado del fenotipo obeso y las intervenciones dietéticas y de ejercicio evaluadas, mientras que el contenido de P en orina se redujo significativamente después de la administración del hidrolizado proteico (datos no mostrados).

Tabla 7.- Influencia del hidrolizado proteico de lenteja, fenotipo y protocolo de entrenamiento sobre funcionalidad renal en ratas Zucker.

	Control				Hidrolizado				R ²	EEM	Efecto del hidrolizado	Efecto del fenotipo	Efecto del ejercicio
	Delgadas SED	EXC	Obesas SED	EXC	Delgadas SED	EXC	Obesas SED	EXC					
	Plasma												
AU (mg/dL)	0.75 ^a	0.52 ^a	4.54 ^{bcd}	2.86 ^{abc}	1.66 ^{ab}	2.56 ^{ab}	6.19 ^c	5.57 ^{cd}	0.56	0.91	p<0.001	p<0.001	p=0.3
URA (mg/dL)	29.4 ^{abc}	23.6 ^{ab}	36.4 ^{bc}	42.2 ^c	28.6 ^{ab}	20.8 ^a	25.8 ^{ab}	21.3 ^a	0.39	4.08	p<0.001	p=0.007	p=0.1
CRT (mg/dL)	0.60 ^a	0.43 ^a	0.23 ^a	0.35 ^a	0.50 ^a	0.37 ^a	0.30 ^a	0.42 ^a	0.03	0.19	p=0.942	p=0.126	p=0.8
TProt (g/dL)	6.44 ^{ab}	6.02 ^a	9.18 ^c	7.79 ^{bc}	6.27 ^a	6.13 ^a	8.25 ^c	7.94 ^c	0.61	0.454	p=0.365	p<0.001	p=0.0
ALB (g/dL)	3.55 ^a	2.79 ^a	3.93 ^a	3.08 ^a	2.92 ^a	2.89 ^a	3.42 ^a	3.17 ^a	0.15	0.37	p=0.190	p=0.046	p=0.0
Ca (mg/dL)	7.4 ^a	9.1 ^{ab}	8.8 ^{ab}	11.0 ^{bc}	9.6 ^{ab}	9.9 ^{ab}	13.5 ^{cd}	14.6 ^d	0.56	0.98	p<0.001	p<0.001	p=0.0
P (mg/dL)	6.33 ^a	5.79 ^a	7.08 ^{ab}	7.22 ^{ab}	5.36 ^a	5.76 ^a	8.91 ^b	8.79 ^b	0.41	0.73	p=0.120	p<0.001	p=0.9
	Orina												
PR (g)	0.40 ^{ab}	0.37 ^a	0.56 ^{cd}	0.46 ^{abc}	0.46 ^{abc}	0.48 ^{bc}	0.64 ^d	0.56 ^{cd}	0.66	0.03	p<0.001	p<0.001	p=0.0
VolU (ml)	3.17 ^a	2.94 ^a	3.13 ^a	3.71 ^{ab}	4.96 ^{ab}	3.88 ^{ab}	6.72 ^b	4.66 ^{ab}	0.22	0.98	p<0.001	p=0.099	p=0.1
pH	6.25 ^{abc}	6.09 ^{ab}	5.39 ^a	6.21 ^{abc}	7.81 ^d	7.21 ^{cd}	5.92 ^{ab}	6.70 ^{bc}	0.55	0.33	p<0.001	p<0.001	p=0.2
ALB (g/dL)	0.076 ^a	0.065 ^a	0.24 ^{ab}	0.085 ^{ab}	0.073 ^a	0.062 ^a	0.23 ^{ab}	0.26 ^b	0.34	0.06	p=0.181	p<0.001	p=0.1
CRT (mg/dL)	105.2 ^c	106.6 ^c	85.1 ^{bc}	82.4 ^{abc}	95.0 ^c	97.3 ^c	56.3 ^a	63.3 ^{ab}	0.49	8.89	p<0.001	p<0.001	p=0.6
ALB/CRT	0.75 ^a	0.60 ^{ab}	3.51 ^b	1.12 ^{acb}	0.76 ^a	0.64 ^a	4.47 ^b	2.9 ^{bc}	0.62	0.43	p=0.039	p<0.0001	p=0.0
CICr	1.36 ^a	0.99 ^a	1.19 ^a	2.25 ^a	1.54 ^a	1.48 ^a	1.55 ^a	1.47 ^a	0.01	0.56	p=0.832	p=0.361	p=0.6

AU, ácido úrico (mg / dL), URA, urea (mg / dL), CRT, creatinina (mg / dL), TProt, proteína total (g / dL), ALB, albúmina (g / dL), P, fósforo (mg / dL), PR, peso del riñón (g / 100 g de peso corporal magro), VolU, volumen urinario (ml). Los resultados son la media de 8 ratas. SED, ratas sedentarias, EXC, ratas que realizan ejercicio, R², coeficiente de determinación de la media. Las medias dentro de la misma línea con diferentes superíndices (a,b,c,d) difieren significativamente.

4.9.- Actividad antioxidante y peroxidación lipídica en riñón

Los efectos del fenotipo, el hidrolizado proteico y un protocolo de entrenamiento mixto sobre la actividad antioxidante y la peroxidación lipídica renal se presentan en la Tabla 8. La actividad Mn-SOD se vio significativamente afectada por el fenotipo y el ejercicio, lo que dio como resultado valores más bajos en ratas obesas frente a ratas delgadas y a valores más altos en animales entrenados vs animales sedentarios. El efecto del ejercicio fue más pronunciado en las ratas obesas que en las delgadas, lo que dio lugar a una interacción fenotipo × ejercicio. Se observó un efecto significativo del hidrolizado proteico sobre la actividad Cu/Zn-SOD que dio lugar a valores de actividad más bajos en las ratas administradas con el ingrediente funcional en comparación con los controles administrados con placebo. El protocolo de entrenamiento tendió a aumentar la actividad de dicha enzima, pero su efecto fue modulado por el fenotipo, dando lugar a una interacción significativa fenotipo × ejercicio. En cuanto a la actividad GPX, se observó un efecto significativo del fenotipo en los animales control administrados con placebo, pero no en aquellos administrados con hidrolizado proteico, lo que se vio reflejado en una interacción significativa fenotipo × hidrolizado. La actividad de catalasa fue significativamente menor en las ratas obesas frente a las delgadas y tendió a aumentar como resultado de la administración de hidrolizado proteico, aunque dicho incremento se observó principalmente en los animales delgados, lo que resultó en una interacción significativa de hidrolizado × fenotipo. El protocolo de entrenamiento tuvo un aumentó en la actividad de la catalasa en animales obesos y la disminuyó en los animales delgados, lo que resultó en la interacción fenotipo × ejercicio. En cuanto a la peroxidación lipídica, no se observaron resultados consistentes que pudieran señalar un efecto significativo del fenotipo o cualquiera de las dos intervenciones ensayadas.

Tabla 8.-Influencia del hidrolizado proteico de lenteja, fenotipo y ejercicio sobre la actividad antioxidante en ratas Zucker.

	Control				Hidrolizado				R ²	EEM	Efecto del hidrolizado	Efecto del fenotipo
	Delgadas		Obesas		Delgadas		Obesas					
	SED	EXC	SED	EXC	SED	EXC	SED	EXC				
Mn-SOD*	59.3 ^{ab}	61.6 ^a	46.2 ^b	52.7 ^{ab}	55.9 ^{ab}	55.0 ^{ab}	46.9 ^b	57.5 ^{ab}	0.38	2.80	p=0.5760	p=0.0008
Cu/Zn-SOD*	208.3 ^{ab}	241.6 ^{ac}	270.9 ^c	177.8 ^b	168.0 ^b	176.5 ^b	168.0 ^b	176.5 ^b	0.54	13.0	p=0.0008	p=0.0589
GPX [#]	26.9 ^{ab}	23.4 ^{ab}	29.3 ^b	43.7 ^c	23.2 ^{ab}	22.4 ^{ab}	19.8 ^a	22.4 ^{ab}	0.70	1.9	p<0.0001	p=0.0007
Catalasa [§]	8.43 ^{ab}	7.05 ^{ab}	5.63 ^b	7.71 ^{ab}	16.10 ^c	9.26 ^{ab}	4.15 ^b	6.11 ^{ab}	0.28	2.26	p=0.0295	p=0.0079
TBARS ^ª	1.74 ^{ab}	2.08 ^b	2.12 ^b	1.63 ^{ab}	1.72 ^{ab}	1.21 ^a	2.0 ^b	1.85 ^b	0.43	0.21	p=0.0240	p=0.0180

Los resultados son la media de 8 ratas. SED, ratas sedentarias, EXC, ratas que realizan un protocolo de ejercicio de 15 minutos de caminata a velocidad moderada, 5 días a la semana, durante 8 semanas de determinación, EEM, error estándar de la media. * superóxido dismutasa (Unidades / mg de proteína), [#] GPX (Unidades / mg de proteína), [§] catalasa (unidades / mg de proteína), ^ª sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (Unidades / mg de proteína). Las medias dentro de la misma línea con diferentes superíndices (a,b,c,d) difieren significativamente (p<0.05).

5.- Discusión

El síndrome metabólico es un problema de salud pública de enorme importancia debido a su creciente prevalencia y la gravedad de sus comorbilidades. Su fisiopatología se caracteriza por una sintomatología diversa, entre la que destacan resistencia a la insulina y alteración en la glucemia, hipertensión y obesidad. Estos factores provocan un mayor riesgo de aparición de otras patologías como enfermedades cardiovasculares y renales. El síndrome metabólico también genera un estado proinflamatorio y alteraciones en el estado antioxidante. El objetivo de este estudio fue evaluar en un modelo experimental de ratas Zucker dos intervenciones para el tratamiento del síndrome metabólico como la administración de un hidrolizado proteico procedente de lentejas en combinación con un protocolo de entrenamiento mixto de fuerza/resistencia y su efecto sobre la ingesta de alimentos, composición corporal, gasto metabólico, capacidad aeróbica, parámetros hemáticos, glucídicos y lipídicos, funcionalidad cardiovascular y renal y actividad antioxidante renal. Ambas intervenciones fueron eficientes para mejorar varias de las alteraciones anteriormente descritas y se observaron interesantes sinergias entre las dos intervenciones, principalmente en capacidad aeróbica, metabolismo glucídico y lipídico, actividad antioxidante y mejora en el riesgo de enfermedad cardiovascular y renal.

5.1.- Caracterización del contenido proteico, perfil de ácidos grasos, y perfil peptídico y de compuestos bioactivos del hidrolizado proteico de lenteja

El cromatograma y la espectrometría de masas llevados a cabo para una caracterización más exacta del perfil proteico y compuestos bioactivos de tipo polifenólico, mostraron la aparición de péptidos de bajo peso molecular, probablemente derivados del proceso de hidrolisis. Esto refleja las adecuadas condiciones seleccionadas para el tratamiento de la proteína derivada de lenteja. Algunos autores (Bautista-Expósito y col., 2018; García-Mora et al., 2017) han demostrado que la

digestión *in vitro* de péptidos derivados de hidrolizados de lenteja por *Savinasa*, mejora considerablemente su actividad antihipertensiva y antioxidante, debiéndose este doble potencial a sus propiedades hidrofóbicas y estructurales. En este contexto, esos mismos autores señalan que los aminoácidos cargados positivamente y los residuos de aminoácidos hidrofóbicos son determinantes para potenciar la actividad inhibitoria de la ECA, también señalan que los residuos heptapéptidos C – terminales interactúan por medio de los enlaces de hidrógeno con la ECA en su región catalítica y participan en la unión de Ang II.

Se ha demostrado que los hidrolizados de proteínas de leguminosas son eficaces en su uso como alimentos funcionales (Kapraavelou y col., 2013). Los péptidos encontrados en el extracto funcional presentan una fuerte acción bioactiva debida a sus características estructurales específicas y también asociada a su amplia variedad en compuestos polifenólicos, estos compuestos se han relacionado con numerosas acciones beneficiosas para la salud, como el metabolismo de la glucosa y los lípidos, mejora y prevención de ECV, diabetes y algunos tipos de cáncer (González Cañete y Durán Agüero, 2014; Křížová y col., 2019). Algunos autores como Kapraavelou y col. (2013) Y Martínez y col. (2018) han descrito numerosos efectos beneficiosos sobre el perfil glucídico y lipídico de hidrolizados de proteínas procedentes de leguminosas.

Otros compuestos de naturaleza bioactiva presentes en el hidrolizado proteico ensayado del presente estudio tales como saponinas, iridoide, ácido arboresinico, el glucósido cardíaco cimarina y sesquiterpenos muestran una variedad de efectos complementarios interesantes como acción antioxidante, antimicrobiana y antiinflamatoria (Rao y Gurfinkel, 2000).

El perfil de ácidos grasos encontrado en el hidrolizado proteico de lenteja se caracterizó por la presencia de ácidos linoleico, oleico, linolénico y palmítico. El ácido cis 10-heptadecenoico fue encontrado

en nuestras condiciones experimentales, pero no se ha descrito su presencia en el contenido lipídico de las lentejas, es probable que podría haberse derivado del proceso de fermentación que se llevó a cabo para preparar el hidrolizado de proteínas.

5.2.- Ingesta de alimento, cambios ponderales, composición corporal y gasto metabólico.

El modelo experimental de rata Zucker obesa se caracteriza por hiperfagia y sobrepeso, hiperinsulinemia y resistencia a la insulina y disminución de los niveles de adiponectina en plasma. Como resultado de la ingesta excesiva de alimentos, los animales desarrollan obesidad y otros trastornos metabólicos. Bajo nuestras condiciones experimentales, se observó una hiperfagia solo cuando los datos de ingesta se expresaron en g/día, pero no cuando se expresaron como g/kg de peso corporal. La administración del hidrolizado proteico tendió a disminuir la ingesta semanal a partir de la tercera semana del periodo experimental. A pesar de tal efecto anorexigénico descrito por algunos otros protocolos de intervención mixta (Kibenge y Chan, 2002), en nuestras condiciones experimentales dicha reducción no fue lo suficientemente fuerte como para mantener una disminución concurrente en el aumento de peso corporal en las ratas obesas, aunque sí lo logró en las ratas de fenotipo delgado.

Se han descrito diferentes factores responsables de la disminución de la ingesta de alimentos en estudios llevados a cabo en modelos experimentales animales de ratas similares a las de este estudio; el efecto anorexigénico del ejercicio a intensidad moderada puede estar asociado con la producción de la hormona liberadora de corticotropina, la cual forma parte del sistema lipoestabilizador_(Kibenge y Chan, 2002).

Otros factores que pueden estar asociados en la disminución de la ingesta de alimentos son los procesos prolongados de germinación, que pueden afectar las características organolépticas de las leguminosas

(Urbano y col., 2005). Así mismo, otros componentes presentes en las leguminosas como los alfa-galactósidos, la fibra dietética soluble y el almidón resistente que llegan hasta el intestino grueso sin digerirse donde se fermentan por medio de la microbiota intestinal generando flatulencias y distensión abdominal, pueden conducir a una menor ingesta (Martínez-Villaluenga y col., 2008).

Con respecto a la composición corporal, el efecto del protocolo de entrenamiento y la administración del hidrolizado dieron lugar a un descenso de la masa grasa principalmente en las ratas obesas. Por una parte, dicho efecto puede atribuirse, a la acción del ejercicio físico sobre la masa grasa. Múltiples estudios (Croff et al., 2009; Sun et al., 2020) han demostrado que esta intervención promueve vías de señalización para generar lipólisis en el tejido adiposo, además de incrementar o disminuir la actividad de hormonas como la adiponectina y la leptina. Por otra parte, el hidrolizado proteico, además de sus características antioxidantes, contiene fibra dietética soluble, la cual, además de mejorar la sensibilidad a la insulina y regular muchos marcadores de inflamación sistémica, también interviene en el proceso de homeostasis energética, (Galisteo y col., 2008; Wang y col., 2018) y puede contribuir a la disminución de masa grasa observada en las ratas Zucker. Esto resulta interesante como tratamiento frente a la obesidad y enfermedades de riesgo cardiovascular.

5.3.- Capacidad aeróbica y condición física.

Estudios previos de nuestro grupo de investigación (Coll-Risco y col., 2016; Kapravelou y col., 2017) han demostrado que una intervención durante 8 semanas con un protocolo de ejercicio aeróbico interválico o de tipo mixto generan una mejora significativa en la capacidad aeróbica y condición física de los animales obesos y delgados, además de disminuir la gravedad de las alteraciones del síndrome metabólico, especialmente las relacionadas con el metabolismo glucídico y lipídico.

Bajo nuestras condiciones experimentales, la condición física determinada por la velocidad máxima y la distancia recorrida en test incremental siempre fue menor en los animales obesos en comparación con los animales delgados, lo que resulta congruente, ya que nuestro modelo experimental de ratas Zucker obesa presenta graves trastornos metabólicos, atrofia muscular y alteración en la perfusión del músculo esquelético (Aleixandre y Miguel, 2008).

Barboza y col., (2016) han observado que en ratas Wistar macho sedentarias la baja capacidad aeróbica intrínseca se relaciona con un menor gasto de energía y una reducida capacidad de oxidación lipídica en todo el cuerpo, lo que puede inducir a mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares.

La administración del hidrolizado proteico en combinación con el protocolo de entrenamiento ensayado en el presente estudio, demostró un mayor efecto sobre la capacidad aeróbica y condición física en ratas delgadas y obesas en comparación con las ratas que solo realizaron el protocolo de entrenamiento. Esta acción es interesante y de importancia en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares y procesos obesogénicos que se relacionan con una capacidad aeróbica deteriorada que se asocia con el desarrollo del SMet.

5.4.- Parámetros hemáticos

La administración del hidrolizado de proteína de lentejas dio lugar a una disminución general en todos los parámetros hemáticos relacionados con el metabolismo del hierro, siendo sus efectos más pronunciados en el fenotipo obeso. Este efecto puede ser consecuencia del sobrepeso y la obesidad que están relacionados con una mayor deficiencia de hierro, posiblemente causada por inflamación crónica que deriva del exceso de tejido adiposo o de posibles rutas relacionadas con el reciclaje del hierro como la hepcidina y la ferroportina y no propiamente de la administración del hidrolizado (Citelli y col., 2015;

Hutchinson, 2019). Además, el empeoramiento del metabolismo de Fe de las ratas Zucker obesas puede ser debido a la lesión renal emergente en este fenotipo (Martínez y col., 2019), la cual alteraría la síntesis de eritropoyetina y con ello la regulación fisiológica en la producción de glóbulos rojos (Moore y Bellomo, 2011). Finalmente, el hidrolizado de proteína de lenteja ensayado es una buena fuente de proteína y de compuestos bioactivos, pero también contiene una variedad de compuestos antinutricionales como el ácido fítico que se ha descrito que interfieren con la biodisponibilidad de Fe (Urbano y col., 2000).

Bajo nuestras condiciones experimentales, el protocolo de entrenamiento mixto ha demostrado efectos beneficiosos sobre el metabolismo del Fe y los parámetros hemáticos. En estudios anteriores de nuestro grupo de investigación se observó un incremento en la hemoglobina y el hematocrito causado por un protocolo de entrenamiento aeróbico interválico en ratas Zucker delgadas y obesas (Kapraavelou y col., 2017). Curiosamente, en el presente estudio, los efectos del ejercicio parecen ser más marcados en los animales con peor estado de Fe (es decir, ratas obesas alimentadas con hidrolizado de proteína de lentejas), con una mejora significativa en el recuento de eritrocitos, hemoglobina, hematocrito y VCM. Dichos efectos se asociaron a valores más altos de RDW, lo que se deriva de las diferencias de tamaño entre los reticulocitos y los eritrocitos jóvenes en comparación con los eritrocitos maduros, y sugiere una mayor actividad de eritropoyesis inducida por el ejercicio en la médula ósea. Sin embargo, los incrementos en la RDW también han sido asociados por otros autores a procesos inflamatorios, resistencia al ejercicio, enfermedades cardiovasculares o al SMet (Parizadeh y col., 2019), aunque en este estudio parece ser parte de la respuesta fisiológica a las mayores demandas de oxígeno características del ejercicio.

5.5.- Parámetros del metabolismo glucídico y lipídico

Generalmente, en el origen de la mayoría de las alteraciones del metabolismo glucídico y lipídico suele encontrarse la resistencia a la insulina, la cual se describe como un factor de riesgo importante para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y enfermedad renal crónica (Chan y col., 2017; Laakso, 2015). Las intervenciones en el estilo de vida como el ejercicio físico y la administración de alimentos o extractos con compuestos bioactivos derivados de las leguminosas corrigieron efectivamente las alteraciones observadas en el área bajo la curva tras una sobrecarga oral de glucosa, un claro signo de mejora en la resistencia a la insulina. Además, también se han descrito claros beneficios en las alteraciones morfológicas y fisiológicas relacionadas con el SMet sobre el sistema cardiovascular y renal en las ratas Zucker obesas (Kapraivelou y col., 2017; Sponholtz y col., 2019; Wadden y col., 2012). Bajo nuestras condiciones experimentales, los controles obesos mostraron signos evidentes de resistencia a la insulina como sus elevados niveles de glucemia, insulina en plasma y en el índice HOMA en comparación con sus controles delgadas, mientras que la intervención combinada de ejercicio e ingrediente funcional derivado de la lenteja mostró efectos beneficios sobre estos parámetros. La administración del hidrolizado de proteína aumentó la adiponectina plasmática, una adipocina que mejora el metabolismo glucídico y refuerza el efecto de la insulina en su actividad hipoglucemiante; los valores de adiponectina fueron inferiores en ratas obesas frente a ratas delgadas, aunque no se encontraron efectos significativos en los niveles de leptina.

Tal falta de eficacia puede atribuirse a alteración genética en el receptor de leptina inherente a la rata Zucker obesa, por lo que la intervención anterior en el estilo de vida no sería lo suficientemente fuerte como para superar esta alteración metabólica. En contraste, el ejercicio físico tendió a disminuir los niveles de adiponectina y leptina en plasma a diferencia de lo descrito por de Lemos y col. (2007), quienes encontraron

que un protocolo de natación tres veces por semana durante 12 semanas indujo un aumento del 28% en los niveles plasmáticos de adiponectina en ratas Zucker obesas y diabéticas.

Las alteraciones en los niveles de adiponectina y leptina en combinación con una inflamación sistémica derivados de la obesidad pueden afectar la selección de fuentes energéticas y como consecuencia afectar la función vascular, la hemodinámica sistémica y la respuesta endotelial a la lesión (Tune y col., 2017). Por lo tanto, cabe esperar que las intervenciones combinadas de ejercicio y dieta mejoren los factores anteriores.

5.6.- Parámetros cardiacos y electrocardiográficos

El corazón de los animales obesos mostró mayor peso en comparación con sus controles delgados expresados como peso neto o en relación a la masa magra, pero se observaron diferencias más pequeñas cuando se refería al peso corporal total del animal. Dichas variaciones pueden atribuirse a una hipertrofia que evoluciona para contrarrestar la mayor cantidad de masa corporal y superficie derivada de mayores cantidades de tejido adiposo en animales obesos. Además, varios autores han correlacionado la hipertrofia cardíaca con el desarrollo de fibrosis (Chen y col., 2016). Bajo nuestras condiciones experimentales el fenotipo obeso y la administración del hidrolizado proteico indujeron un agrandamiento del tamaño cardíaco, pero este efecto no pareció generar daño al corazón como se observó en los resultados de la actividad plasmática de CK-MB que no varió entre el fenotipo delgado y obeso, y que tendió a ser más baja en ratas administradas con el hidrolizado de proteína de lenteja en comparación con sus controles placebo.

Por otra parte, otros órganos como el hígado incrementan de tamaño tras la administración del hidrolizado de lenteja, pero esta hipertrofia no se vio reflejada en signos de fibrosis en ratas Zucker (Martínez y col., 2018). Incluso diferentes autores han demostrado una

acción protectora de extractos de origen vegetal en la hipertrofia cardíaca y la fibrosis (Chen y col., 2016). Específicamente, Xuan y col., (2013) observaron que en ratas con hipertensión inducida por la angiotensina a las que se administraron extractos de lentejas cocidas o crudas durante 8 semanas, se atenuó significativamente esta alteración, así como la hipertrofia cardíaca y fibrosis perivasculares.

Los cambios en la función cardíaca inducidos por la obesidad han sido descritos por la bibliografía como "cardiomiopatía de la obesidad" y comprenden incrementos en la masa ventricular izquierda en mayor medida que el volumen ventricular, hipertrofia concéntrica del ventrículo izquierdo, infiltración de grasa miocárdica, disfunción diastólica y / o sistólica con una fracción de eyección ventricular izquierda normal o elevada. Las alteraciones electrocardiográficas en la amplitud del complejo QRS y el intervalo QTc son signos claros de enfermedad cardiovascular progresiva y dan idea de un mayor riesgo cardiovascular. Una mayor amplitud de la onda R es un factor de riesgo independiente para eventos cardiovasculares, mientras que los intervalos QT y QTc prolongados se han asociado a enfermedades cardíacas y arritmias ventriculares (VanHoose y col., 2010; Vega y col., 2017). La hipertrofia ventricular izquierda generalmente se produce en paralelo al aumento en la amplitud del complejo QRS y la longitud del intervalo QT o QTc. Además, se ha establecido una correlación directa entre el intervalo QTc y el índice de masa corporal. Tales modificaciones en el ECG junto con la función cardíaca deteriorada también se han descrito en la enfermedad cardiovascular relacionada con la diabetes (Guo y col., 2017; Superko y col., 2011). Las alteraciones del ECG observadas en ratas Zucker obesas en el presente experimento, parecen estar relacionadas con su grado de hipertrofia cardíaca, específicamente con la hipertrofia ventricular, tal como se observa en las alteraciones significativas en el complejo QRS y la amplitud de la onda T. Sin embargo, un cierto grado de hipertrofia auricular podría deducirse de la amplitud de la onda P, la cual mostró valores significativamente mayores. También se describe que las

alteraciones del ECG están relacionadas con el desarrollo potencial de la neuropatía diabética autónoma (NDA). Van Hoose y col., (2010) han descrito amplitudes de onda R elevadas y ampliación de los intervalos QTc como marcadores tempranos de NDA en el electrocardiograma de ratas Zucker diabéticas obesas. Por otra parte Mutiso y col., (2014) encontraron incrementos en la amplitud de la onda R en un modelo experimental de obesidad inducida por la dieta de rata Wistar.

La administración de hidrolizado proteico indujo efectos beneficiosos sobre parámetros electrocardiográficos, como fue el descenso de las amplitudes de onda P o T, dichos efectos parecen estar relacionadas con la mejora en la resistencia a la insulina, debido a la relación con la obesidad. Además, los beneficios del ejercicio en algunos de los parámetros electrocardiográficos alterados, como fue el aumento en la amplitud de la onda P o R principalmente en las ratas obesas, fueron mucho más evidentes en los animales a los que se administró el hidrolizado proteico, mostrando así una acción sinérgica de ambas intervenciones efectiva. Se ha descrito que el ejercicio físico induce diversos cambios morfológicos y funcionales orientados a mejorar la capacidad de bombeo del corazón y el gasto cardíaco, como el aumento del tamaño de las cavidades, la disminución de la frecuencia o el aumento de la eficiencia mecánica cardíaca. Específicamente, el entrenamiento de fuerza/resistencia interválica induce una frecuencia cardíaca más lenta y una mayor fuerza de contracción lo que provoca una remodelación excéntrica. Los cambios mencionados anteriormente en la estructura y geometría cardíaca son distintos de los ocasionados por el estrés hemodinámico crónico que tiene lugar en diversas condiciones patológicas (Vega y col., 2017). De hecho, la activación del crecimiento fisiológico derivado del ejercicio antagoniza el de las situaciones patológicas. La disminución en la frecuencia cardíaca, la amplitud QRS y el intervalo QTc lograda por el protocolo de entrenamiento mixto analizado en el presente estudio subraya su potencial para el tratamiento de la obesidad y las alteraciones cardíacas

derivadas de la resistencia a la insulina y está de acuerdo con lo descrito en la bibliografía por Van Hoose y col., (2010), que también encontraron importantes beneficios derivados del ejercicio sobre alteraciones en la amplitud de la onda R y la masa ventricular izquierda.

5.7.- Parámetros de riesgo cardiovascular

Se ha descrito que las poblaciones de ratas Zucker obesas desarrollan hipertensión a medida que avanza su edad (Osmond y col., 2009), sin embargo, en la etapa cubierta por nuestro experimento no se observaron diferencias significativas en la presión arterial entre ambos fenotipos. Sin embargo, la intervención combinada del hidrolizado proteico y el protocolo de entrenamiento mixto mostró una acción preventiva sobre la expresión génica por parte de la arteria aorta de una molécula de adhesión vascular como es la selectina y sobre la actividad plasmática de la ECA, lo cual podría tener un papel protector frente al desarrollo de la disfunción endotelial y la enfermedad cardiovascular. Se sabe que la interacción de la glicoproteína P-ligando-1 de la selectina (PSGL-1) con la selectina-P está regulada por un aumento en los factores de riesgo característicos del síndrome metabólico y podría desempeñar un papel importante en su fisiopatología (Patel y col., 2017). Por otra parte, la inflamación crónica y el estrés oxidativo característicos de este síndrome pueden conducir a la disfunción endotelial y la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona (Zhang y Lerman, 2017). En este sentido y bajo nuestras condiciones experimentales parece de especial relevancia la inhibición observada *in vivo* de la ECA derivada de la administración del hidrolizado de proteico de lentejas. Tal acción inhibitoria, junto con una fuerte actividad antioxidante, ha sido descrita *in vitro* por Bautista-Expósito y col., (2018), quienes estudiaron cómo las diferentes condiciones de procesamiento para la hidrólisis de proteínas de lentejas pueden mejorar la calidad y funcionalidad nutricional del producto resultante.

5.8.-Parámetros plasmáticos y urinarios de la funcionalidad renal

Las ratas Zucker obesas exhibieron niveles elevados de ácido úrico en plasma, el cual se considera un factor de riesgo y predictor de enfermedades metabólicas y cardiovasculares por su implicación en mecanismos de almacenamiento de grasa (Choi y col., 2014). Así mismo, la obesidad y el síndrome metabólico se han asociado con hiperuricemia (Norvik y col., 2016). En nuestras condiciones experimentales, la concentración plasmática de ácido úrico se vio alterado por la administración del hidrolizado proteico que tendió a incrementarlo. Dicho incremento podría atribuirse a la composición química del hidrolizado, que era alta en diversos péptidos y ácidos nucleicos. El protocolo de entrenamiento mostró en términos generales una acción reductora sobre el ácido úrico plasmático, pero debido a su interacción con la administración del hidrolizado proteico, sus efectos no alcanzaron significación estadística.

La concentración plasmática de albúmina se vio levemente afectada por el fenotipo obeso y dado que la mayoría de las proteínas presentes en el plasma son sintetizadas por el hígado, el aumento en los niveles de albúmina se correlacionó con un mayor nivel de proteínas totales, el cual a su vez se asoció a un aumento de los niveles plasmáticos de Ca y P. Este aumento podría derivarse de una funcionalidad alterada del hígado o la ingesta excesiva de proteínas por parte de animales obesos y que según lo observado fue parcialmente contrarrestado por la administración del hidrolizado proteico de lentejas. Otro hallazgo interesante relacionado con la administración del extracto funcional derivado de la lenteja fue su acción sobre el equilibrio de urea plasmática. Este metabolito se produce principalmente a partir de amoníaco en el hígado y, en menor medida, en el riñón. Los niveles plasmáticos más altos de urea en animales obesos podrían atribuirse a la función renal alterada con la edad o al desequilibrio metabólico de aminoácidos. La administración del hidrolizado proteico condujo a una

disminución de la urea plasmática, lo que puede atribuirse a que los carbohidratos fermentables presentes en el ingrediente funcional pueden originar un aumento en la excreción fecal de N, lo cual puede a su vez conducir a menores concentraciones plasmáticas de urea en plasma y la disminución de la excreción urinaria de N. Dado que las concentraciones elevadas de nitrógeno ureico en suero se han asociado con síntomas clínicos de insuficiencia renal crónica (Younes y col., 1999), la acción protectora de nuestro hidrolizado proteico merece una especial consideración.

A pesar de que un índice de funcionalidad renal ampliamente utilizado como es el aclaramiento renal de creatinina, no se vio afectado por la obesidad genética o las intervenciones evaluadas, sin embargo, la excreción urinaria de albúmina en orina o la relación albúmina/creatinina fueron más elevados en el fenotipo obeso. La microalbuminuria representa un signo temprano de enfermedad cardiovascular y renal progresiva incluso en sujetos con tasa de filtración glomerular preservada. También caracteriza las etapas iniciales de enfermedad renal en ratas Zucker obesas que paralelamente desarrolla alteraciones morfológicas como glomeruloesclerosis e hipertrofia de glomérulos y túbulos renales (Martínez y col., 2019). En nuestro experimento, los niveles más elevados de albúmina urinaria se correlacionan con los niveles plasmáticos más bajos de adiponectina y con la hiperuricemia característicos del modelo de rata Zucker obeso. La alta correlación entre el ácido úrico en plasma y la relación entre albúmina/creatinina en orina ($r = 0.73$) en nuestro estudio concuerda con lo descrito por Solbu y col., (2016) en el estudio Tromsø. Además, la proporción urinaria de albúmina/creatinina en ratas Zucker obesas se asoció a un mayor peso del riñón en comparación con sus controles delgadas. Las dos intervenciones implementadas en este estudio han mejorado y equilibrado varios de los parámetros alterados de la funcionalidad renal anteriormente mencionados. La administración del hidrolizado proteico de lenteja fue eficiente para aumentar el volumen y

el pH urinario, lo que puede deberse a que la ingesta de alimentos funcionales de origen vegetal ricos en citrato y potasio, como las legumbres, ejercen una acción alcalinizante sobre la orina (Sabboh y col., 2006) y contribuyen a la prevención de formación de cálculos renales. Con respecto al ejercicio físico, además de su acción beneficiosa mencionada anteriormente sobre el ácido úrico en plasma, también demostró una acción preventiva que contrarrestó otros parámetros plasmáticos alterados como el contenido de urea, proteínas totales o albúmina, así como el peso del riñón y la excreción de albúmina urinaria. Señal de que esta intervención es una estrategia eficiente para el tratamiento de enfermedad renal, por si sola o en combinación con intervenciones dietéticas en el estilo de vida.

5.9.- Actividad antioxidante y peroxidación lipídica en riñón

Bajo nuestras condiciones experimentales, los efectos de las intervenciones fueron complejos y diversos. Se evidenció el deterioro en el estado renal de defensa antioxidante por la disminución en la actividad enzimática de Mn - SOD y catalasa asociada con una mayor actividad de GPX principalmente en ratas de fenotipo obeso. Estos resultados tiene sentido ya que la obesidad se correlaciona fuertemente con mayor estrés oxidativo (Bonomini y col., 2015). Sin embargo, el protocolo de entrenamiento revirtió los cambios derivados de la obesidad en las actividades de Mn – SOD, GPX y catalasa. Este efecto beneficioso coincide con lo descrito por múltiples estudios que señalan que el ejercicio físico moderado promueve un efecto antioxidante, ayudando a mejorar el estado de equilibrio redox (Sousa y col., 2017). Por el contrario, un entrenamiento de intensidad excesiva puede ser perjudicial y empeorar el estado antioxidante. El ejercicio físico resultó ser una estrategia efectiva para disminuir el impacto del estrés oxidativo.

Es de especial relevancia destacar la inducción en la actividad de la enzima catalasa y la reducción de la actividad GPX y Cu/Zn-SOD mediante la administración de hidrolizado proteico que demostró una

influencia positiva sobre el balance y regulación de la actividad antioxidante. Algunos autores (Zou y col., 2011) describen la capacidad antioxidante de compuestos derivados de lentejas y sugieren que podrían ser útiles para la promoción de la salud. También informan sobre los efectos protectores en contra de la formación de ROS que se atribuyen a los componentes fenólicos de los extractos de lentejas.

6.- Conclusión

1.- Las adecuadas condiciones seleccionadas para el tratamiento de hidrólisis proteica de *Lens Culinaris* (fermentación de 15 horas con *Lactobacillus plantarum* y en paralelo tratamiento con *Savinasa* a pH 8.5) dieron lugar a un producto con un alto componente polifenólico y polipeptídico que le confiere capacidad para ser empleado como herramienta en alteraciones relacionadas con el síndrome metabólico.

2.- El hidrolizado proteico por sí mismo demostró tener efecto *in vivo* sobre la baja expresión génica en aorta de selectina E así como sobre el aumento de la actividad inhibitoria de la ECA. Otros efectos de la administración del hidrolizado proteico fueron una disminución de la hiperfagia y una mejora de los parámetros del metabolismo glucídico y lipídico (AUC, HOMA-IR, TG, LDL) así como el aumento de adiponectina plasmática. Por todo ello se le puede atribuir al hidrolizado un valor protector en el desarrollo de disfunción endotelial y en el control metabólico relacionado con la sensibilidad a la insulina.

3.- El protocolo de entrenamiento ensayado durante 8 semanas, demostró ser eficaz para mejorar la capacidad aeróbica y corregir las alteraciones de parámetros electrocardiográficos, como el aumento de la onda P y R, alteradas en perfiles con sobrepeso u obesidad. Por lo tanto, podemos afirmar que el protocolo de entrenamiento puede mejorar las alteraciones cardiovasculares asociadas a la obesidad.

4.- El protocolo de ejercicio, por si solo o en combinación con el hidrolizado proteico, demostró una acción beneficiosa sobre parámetros e índices de funcionalidad renal entre los que destaca la disminución urinaria de albumina y el aumento del pH urinario. Estos efectos junto a la mejora en el estado de equilibrio redox en el riñón nos permiten concluir que el modelo de ejercicio físico ensayado resultó ser una estrategia efectiva en la recuperación de la función renal de ratas Zucker obesas.

En general, los resultados del estudio muestran que, si bien las intervenciones ensayadas por separado tienen un potencial para mejorar

o revertir los factores de riesgo del síndrome metabólico, su combinación aumenta dichos efectos.

Conclusión general

Por todo ello concluimos que el enfoque experimental que combina la administración de un alimento funcional derivado de las leguminosas junto con la implementación de programas de ejercicio protocolizados muestra un gran potencial como nuevas estrategias terapéuticas y alternativas para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares y renales asociadas al síndrome metabólico.

7.- Bibliografía

1. Alberti, K.G.M.M., and Zimmet, P.Z. (1998). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO Consultation. *Diabet. Med.* 15, 539–553.
2. Alberti, K.G.M.M., Zimmet, P., Shaw, J., and IDF Epidemiology Task Force Consensus Group (2005). The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet Lond. Engl.* 366, 1059–1062.
3. Alberti, K.G.M.M., Eckel, R.H., Grundy, S.M., Zimmet, P.Z., Cleeman, J.I., Donato, K.A., Fruchart, J.-C., James, W.P.T., Loria, C.M., and Smith, S.C. (2009). Harmonizing the Metabolic Syndrome: A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 120, 1640–1645.
4. Aleixandre, A., and Miguel, M. (2008a). Ratas Zucker como modelo experimental para el estudio de diferentes enfermedades. *Endocrinol. Nutr.* 55, 217–222.
5. Aleixandre, A., and Miguel, M. (2008b). Ratas Zucker como modelo experimental para el estudio de diferentes enfermedades. *Endocrinol. Nutr.* 55, 217–222.
6. Arnold, M., Pandeya, N., Byrnes, G., Renehan, P.A.G., Stevens, G.A., Ezzati, P.M., Ferlay, J., Miranda, J.J., Romieu, I., Dikshit, R., et al. (2015). Global burden of cancer attributable to high body-mass index in 2012: a population-based study. *Lancet Oncol.* 16, 36–46.
7. Avendaño, L.H., and Hernando (2009). *Nefrología Clínica* (Ed. Médica Panamericana).
8. Ávila, M.H., Dommarco, J.R., Levy, T.S., Nasu, L.C., Acosta, L.M.G., Pineda, E.B.G., Martínez, M.R., Gómez-Humarán, I.M., Hernández, P.S., Hernández, S.V., et al. (2016). Responsables de la ENSANUT MC 2016. 149.
9. Ayala, I., Camara, P., and Fernández-Pardo, J. (2008). MODELOS ANIMALES EXPERIMENTALES DE ENFERMEDAD DE HÍGADO GRASO Y SÍNDROME METABÓLICO. *An. Vet. Murcia* 24.
10. Bahceci, M., Gokalp, D., Bahceci, S., Tuzcu, A., Atmaca, S., and Arikian, S. (2007). The correlation between adiposity and adiponectin, tumor necrosis factor α , interleukin-6 and high sensitivity C-reactive protein levels. Is adipocyte size associated with inflammation in adults? *J. Endocrinol. Invest.* 30, 210–214.

11. Bakris, G.L., Fonseca, V., Katholi, R.E., McGill, J.B., Messerli, F.H., Phillips, R.A., Raskin, P., Wright, J.T., Oakes, R., Lukas, M.A., et al. (2004). Metabolic Effects of Carvedilol vs Metoprolol in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus and Hypertension: A Randomized Controlled Trial. *JAMA* 292, 2227–2236.
12. Bautista-Expósito, S., Peñas, E., Dueñas, M., Silván, J.M., Frias, J., and Martínez-Villaluenga, C. (2018a). Individual contributions of Savinase and *Lactobacillus plantarum* to lentil functionalization during alkaline pH-controlled fermentation. *Food Chem.* 257, 341–349.
13. Bautista-Expósito, S., Peñas, E., Dueñas, M., Silván, J.M., Frias, J., and Martínez-Villaluenga, C. (2018b). Individual contributions of Savinase and *Lactobacillus plantarum* to lentil functionalization during alkaline pH-controlled fermentation. *Food Chem.* 257, 341–349.
14. Becerra-Tomás, N., Díaz-López, A., Rosique-Esteban, N., Ros, E., Buil-Cosiales, P., Corella, D., Estruch, R., Fitó, M., Serra-Majem, L., Arós, F., et al. (2018). Legume consumption is inversely associated with type 2 diabetes incidence in adults: A prospective assessment from the PREDIMED study. *Clin. Nutr. Edinb. Scotl.* 37, 906–913.
15. Berg Anders H., and Scherer Philipp E. (2005). Adipose Tissue, Inflammation, and Cardiovascular Disease. *Circ. Res.* 96, 939–949.
16. Berhane, A.M., Weil, E.J., Knowler, W.C., Nelson, R.G., and Hanson, R.L. (2011). Albuminuria and Estimated Glomerular Filtration Rate as Predictors of Diabetic End-Stage Renal Disease and Death. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 6, 2444–2451.
17. Bonomini, F., Rodella, L.F., and Rezzani, R. (2015). Metabolic Syndrome, Aging and Involvement of Oxidative Stress. *Aging Dis.* 6, 109–120.
18. Briones Ana M., Nguyen Dinh Cat Aurelie, Callera Glaucia E., Yogi Alvaro, Burger Dylan, He Ying, Corrêa Jose W., Gagnon Anne Marie, Gomez-Sanchez Celso E., Gomez-Sanchez Elise P., et al. (2012). Adipocytes Produce Aldosterone Through Calcineurin-Dependent Signaling Pathways. *Hypertension* 59, 1069–1078.
19. Bruce, C.R., and Dyck, D.J. (2004). Cytokine regulation of skeletal muscle fatty acid metabolism: effect of interleukin-6 and tumor necrosis factor- α . *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* 287, E616–E621.
20. Buchwald, H., Estok, R., Fahrenbach, K., Banel, D., Jensen, M.D., Pories, W.J., Bantle, J.P., and Sledge, I. (2009). Weight and Type 2 Diabetes

- after Bariatric Surgery: Systematic Review and Meta-analysis. *Am. J. Med.* 122, 248-256.e5.
21. Cabanillas, B., Pedrosa, M.M., Rodríguez, J., González, A., Muzquiz, M., Cuadrado, C., Crespo, J.F., and Burbano, C. (2010). Effects of enzymatic hydrolysis on lentil allergenicity. *Mol. Nutr. Food Res.* 54, 1266–1272.
 22. Carlsson, L.M.S., Peltonen, M., Ahlin, S., Anveden, Å., Bouchard, C., Carlsson, B., Jacobson, P., Lönnroth, H., Maglio, C., Näslund, I., et al. (2012). Bariatric Surgery and Prevention of Type 2 Diabetes in Swedish Obese Subjects. *N. Engl. J. Med.* 367, 695–704.
 23. Castela M., , José L. Górriz¹, , Jordi Bover¹, , Julián Segura-de la Morena², , Jesús Cebollada³, , Javier Escalada⁴, , Enric Esmatjes⁵, , Lorenzo Fácila⁶, , Javier Gamarra⁷, et al. (2014). Documento de consenso para la detección y manejo de la enfermedad renal crónica. *Nefrología*.
 24. Chade, A.R., and Hall, J.E. (2016). Role of the Renal Microcirculation in Progression of Chronic Kidney Injury in Obesity. *Am. J. Nephrol.* 44, 354–367.
 25. Chan, D.T., Watts, G.F., Irish, A.B., and Dogra, G.K. (2017). Insulin resistance and vascular dysfunction in chronic kidney disease: mechanisms and therapeutic interventions. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 32, 1274–1281.
 26. Chang, A., Horn, L.V., Jacobs, D.R., Liu, K., Muntner, P., Newsome, B., Shoham, D.A., Durazo-Arvizu, R., Bibbins-Domingo, K., Reis, J., et al. (2013). Lifestyle-Related Factors, Obesity, and Incident Microalbuminuria: The CARDIA (Coronary Artery Risk Development in Young Adults) Study. *Am. J. Kidney Dis.* 62, 267–275.
 27. Chen, S. (2013). Retooling the Creatinine Clearance Equation to Estimate Kinetic GFR when the Plasma Creatinine Is Changing Acutely. *J. Am. Soc. Nephrol.* 24, 877–888.
 28. Chen, Y.-F., Shibu, M.A., Fan, M.-J., Chen, M.-C., Viswanadha, V.P., Lin, Y.-L., Lai, C.-H., Lin, K.-H., Ho, T.-J., Kuo, W.-W., et al. (2016). Purple rice anthocyanin extract protects cardiac function in STZ-induced diabetes rat hearts by inhibiting cardiac hypertrophy and fibrosis. *J. Nutr. Biochem.* 31, 98–105.
 29. Chicharro, J.L., and Mojares, L.M.L. (2008). *Fisiología Clínica del Ejercicio* (Ed. Médica Panamericana).

30. Chicharro, J.L., and Vaquero, A.F. (2006). *Fisiología del ejercicio / Physiology of Exercise* (Ed. Médica Panamericana).
31. Choi, Y.-J., Shin, H.-S., Choi, H.S., Park, J.-W., Jo, I., Oh, E.-S., Lee, K.-Y., Lee, B.-H., Johnson, R.J., and Kang, D.-H. (2014). Uric acid induces fat accumulation via generation of endoplasmic reticulum stress and SREBP-1c activation in hepatocytes. *Lab. Invest.* 94, 1114–1125.
32. Chung, J., Kim, K., Hong, J., and Kong, H.-J. (2017). Effects of prolonged exercise versus multiple short exercise sessions on risk for metabolic syndrome and the atherogenic index in middle-aged obese women: a randomised controlled trial. *BMC Womens Health* 17, 65.
33. Citelli, M., Fonte-Faria, T., Nascimento-Silva, V., Renovato-Martins, M., Silva, R., Luna, A.S., Silva, S.V. da, and Barja-Fidalgo, C. (2015). Obesity promotes alterations in iron recycling. *Nutrients* 7, 335–348.
34. Clemente et al. (2011). Efecto de la suplementación de vitamina en el rendimiento de una prueba incremental de consumo máximo de oxígeno en ratas wistar - Dialnet.
35. Cohen, G., Kim, M., and Ogwu, V. (1996). A modified catalase assay suitable for a plate reader and for the analysis of brain cell cultures. *J. Neurosci. Methods* 67, 53–56.
36. Coll-Risco, I., Aparicio, V.A., Nebot, E., Camiletti-Moirón, D., Martínez, R., Kapravelou, G., López-Jurado, M., Porres, J.M., and Aranda, P. (2016). Effects of interval aerobic training combined with strength exercise on body composition, glycaemic and lipid profile and aerobic capacity of obese rats. *J. Sports Sci.* 34, 1452–1460.
37. Croft, L., Bartlett, J.D., MacLaren, D.P.M., Reilly, T., Evans, L., Matthey, D.L., Nixon, N.B., Drust, B., and Morton, J.P. (2009). High-intensity interval training attenuates the exercise-induced increase in plasma IL-6 in response to acute exercise. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 34, 1098–1107.
38. Delhey, L., Jin, J., Thapa, S., DeLongchamp, R., and Faramawi, M.F. (2019). The association of metabolic syndrome and QRS | T angle in US adults (NHANES III). *Ann. Noninvasive Electrocardiol. Off. J. Int. Soc. Holter Noninvasive Electrocardiol. Inc* e12678.
39. Dominguez, J.F., Guo, L., Carrasco Molnar, M.A., Ballester Escobedo, A., Dunphy, T., Lund, T.D., and Turman, J.E. (2009). Novel Indirect Calorimetry Technology to Analyze Metabolism in Individual Neonatal Rodent Pups. *PLoS ONE* 4, e6790.

40. Donnelly, J.E., Blair, S.N., Jakicic, J.M., Manore, M.M., Rankin, J.W., Smith, B.K., and American College of Sports Medicine (2009). American College of Sports Medicine Position Stand. Appropriate physical activity intervention strategies for weight loss and prevention of weight regain for adults. *Med. Sci. Sports Exerc.* *41*, 459–471.
41. Dronavalli Suma, and Bakris George L. (2008). Mechanistic Insights into Diuretic-Induced Insulin Resistance. *Hypertension* *52*, 1009–1011.
42. Eirin, A., Lerman, A., and Lerman, L.O. (2017). The Emerging Role of Mitochondrial Targeting in Kidney Disease. In *Pharmacology of Mitochondria*, H. Singh, and S.-S. Sheu, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 229–250.
43. Espinola-Klein, C., Rupprecht, H.J., Bickel, C., Lackner, K., Schnabel, R., Munzel, T., and Blankenberg, S. (2007). Inflammation, atherosclerotic burden and cardiovascular prognosis. *Atherosclerosis* *195*, e126–e134.
44. Expert Panel on Detection, E. (2001). Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* *285*, 2486–2497.
45. Farah, R., Khamisy-Farah, R., and Shurtz-Swirski, R. (2013). Calcium channel blocker effect on insulin resistance and inflammatory markers in essential hypertension patients. *Int. Angiol. J. Int. Union Angiol.* *32*, 85–93.
46. Fernández-Bergés, D., Cabrera de León, A., Sanz, H., Elosua, R., Gembé, M.J., Alzamora, M., Vega-Alonso, T., Félix-Redondo, F.J., Ortiz-Marrón, H., Rigo, F., et al. (2012). Síndrome metabólico en España: prevalencia y riesgo coronario asociado a la definición armonizada y a la propuesta por la OMS. *Estudio DARIOS. Rev. Esp. Cardiol.* *65*, 241–248.
47. Finucane, M.M., Stevens, G.A., Cowan, M.J., Danaei, G., Lin, J.K., Paciorek, C.J., Singh, G.M., Gutierrez, H.R., Lu, Y., Bahalim, A.N., et al. (2011). National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9·1 million participants. *The Lancet* *377*, 557–567.
48. Fischer, C.P., Plomgaard, P., Hansen, A.K., Pilegaard, H., Saltin, B., and Pedersen, B.K. (2004). Endurance training reduces the contraction-induced interleukin-6 mRNA expression in human skeletal muscle. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* *287*, E1189–E1194.

49. Fiuza-Luces, C., Garatachea, N., Berger, N.A., and Lucia, A. (2013). Exercise is the Real Polypill. *Physiology* 28, 330–358.
50. Forouzanfar, M.H., Afshin, A., Alexander, L.T., Anderson, H.R., Bhutta, Z.A., Biryukov, S., Brauer, M., Burnett, R., Cercy, K., Charlson, F.J., et al. (2016). Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet* 388, 1659–1724.
51. Foschia, M., Horstmann, S.W., Arendt, E.K., and Zannini, E. (2017). Legumes as Functional Ingredients in Gluten-Free Bakery and Pasta Products. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 8, 75–96.
52. Foster, M., Hwang, S.-J., Massaro, J., Hoffmann, U., de Boer, I.H., Robins, S., Vasan, R., and Fox, C. (2011). Association of Subcutaneous and Visceral Adiposity with Albuminuria: The Framingham Heart Study. *Obes. Silver Spring Md* 19, 1284–1289.
53. Fouad, A.A., and Rehab, F.M.A. (2015). Effect of germination time on proximate analysis, bioactive compounds and antioxidant activity of lentil (*Lens culinaris* Medik.) sprouts. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 14, 233–246.
54. Frassetto, L., and Kohlstadt, I. (2011). Treatment and prevention of kidney stones: an update. *Am. Fam. Physician* 84, 1234–1242.
55. Fukuda, A., Chowdhury, M.A., Venkatareddy, M.P., Wang, S.Q., Nishizono, R., Suzuki, T., Wickman, L.T., Wiggins, J.E., Muchayi, T., Fingar, D., et al. (2012). Growth-Dependent Podocyte Failure Causes Glomerulosclerosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 23, 1351–1363.
56. Galisteo, M., Duarte, J., and Zarzuelo, A. (2008). Effects of dietary fibers on disturbances clustered in the metabolic syndrome. *J. Nutr. Biochem.* 19, 71–84.
57. Gan, R.-Y., Shah, N.P., Wang, M.-F., Lui, W.-Y., and Corke, H. (2016). Fermentation alters antioxidant capacity and polyphenol distribution in selected edible legumes. *Int. J. Food Sci. Technol.* 51, 875–884.
58. Ganesan, K., and Xu, B. (2017). Polyphenol-Rich Lentils and Their Health Promoting Effects. *Int. J. Mol. Sci.* 18.
59. Garcia-Mora, P., Peñas, E., Frias, J., and Martínez-Villaluenga, C. (2014). Savinase, the Most Suitable Enzyme for Releasing Peptides from Lentil (*Lens culinaris* var. Castellana) Protein Concentrates with Multifunctional Properties. *J. Agric. Food Chem.* 62, 4166–4174.

60. Garcia-Mora, P., Peñas, E., Frias, J., Gomez, R., and Martinez-Villaluenga, C. (2015). High-pressure improves enzymatic proteolysis and the release of peptides with angiotensin I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities from lentil proteins. *Food Chem.* 171, 224–232.
61. García-Mora, P., Martín-Martínez, M., Angeles Bonache, M., González-Múniz, R., Peñas, E., Frias, J., and Martinez-Villaluenga, C. (2017). Identification, functional gastrointestinal stability and molecular docking studies of lentil peptides with dual antioxidant and angiotensin I converting enzyme inhibitory activities. *Food Chem.* 221, 464–472.
62. Gierach, M., Gierach, J., Ewertowska, M., Arndt, A., and Junik, R. (2014). Correlation between Body Mass Index and Waist Circumference in Patients with Metabolic Syndrome.
63. Goldstein Larry B., Bushnell Cheryl D., Adams Robert J., Appel Lawrence J., Braun Lynne T., Chaturvedi Seemant, Creager Mark A., Culebras Antonio, Eckel Robert H., Hart Robert G., et al. (2011). Guidelines for the Primary Prevention of Stroke. *Stroke* 42, 517–584.
64. González Cañete, N., and Durán Agüero, S. (2014). [Soya isoflavones and evidences on cardiovascular protection]. *Nutr. Hosp.* 29, 1271–1282.
65. Grundy, S.M. (2012). Pre-Diabetes, Metabolic Syndrome, and Cardiovascular Risk. *J. Am. Coll. Cardiol.* 59, 635–643.
66. Grundy, S.M. (2016). Metabolic syndrome update. *Trends Cardiovasc. Med.* 26, 364–373.
67. Grundy, S.M., Barlow, C.E., Farrell, S.W., Vega, G.L., and Haskell, W.L. (2012). Cardiorespiratory Fitness and Metabolic Risk. *Am. J. Cardiol.* 109, 988–993.
68. Grundy Scott M. (2008). Metabolic Syndrome Pandemic. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 629–636.
69. Guallar-Castillón, P., Pérez, R.F., López García, E., León-Muñoz, L.M., Aguilera, M.T., Graciani, A., Gutiérrez-Fisac, J.L., Banegas, J.R., and Rodríguez-Artalejo, F. (2014). Magnitud y manejo del síndrome metabólico en España en 2008-2010: Estudio ENRICA. *Rev. Esp. Cardiol.* 67, 367–373.
70. Guo, X., Li, Z., Guo, L., Yu, S., Yang, H., Zheng, L., Pan, G., Zhang, Y., Sun, Y., and Pletcher, M.J. (2017). Effects of Metabolically Healthy and Unhealthy Obesity on Prolongation of Corrected QT Interval. *Am. J. Cardiol.* 119, 1199–1204.

71. Hansson, G.K. (2005). Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease. *N. Engl. J. Med.* 352, 1685–1695.
72. Haram, P.M., Kemi, O.J., Lee, S.J., Bendheim, M.O., Al-Share, Q.Y., Waldum, H.L., Gilligan, L.J., Koch, L.G., Britton, S.L., Najjar, S.M., et al. (2008). Aerobic interval training vs. continuous moderate exercise in the metabolic syndrome of rats artificially selected for low aerobic capacity. *Cardiovasc. Res.* 81, 723–732.
73. Hayashi, K., Fujiwara, K., Oka, K., Nagahama, T., Matsuda, H., and Saruta, T. (1997). Effects of insulin on rat renal microvessels: Studies in the isolated perfused hydronephrotic kidney. *Kidney Int.* 51, 1507–1513.
74. Henningsen, J., Rigbolt, K.T.G., Blagoev, B., Pedersen, B.K., and Kratchmarova, I. (2010). Dynamics of the Skeletal Muscle Secretome during Myoblast Differentiation. *Mol. Cell. Proteomics* 9, 2482–2496.
75. Hernandez, A.G. (DRT) (2010). Tratado de nutrición / Nutrition Treatise: Nutrición Clínica / Clinical Nutrition (Ed. Médica Panamericana).
76. Hittel, D., Axelson, M., Sarna, N., Shearer, J., Huffman, K., and Kraus, W. (2010). Myostatin Decreases with Aerobic Exercise and Associates with Insulin Resistance. *Med. Sci. Sports Exerc.* 42, 2023–2029.
77. Hittel, D.S., Berggren, J.R., Shearer, J., Boyle, K., and Houmard, J.A. (2009). Increased Secretion and Expression of Myostatin in Skeletal Muscle From Extremely Obese Women. *Diabetes* 58, 30–38.
78. Hutchinson C. 2019 A review of iron studies in overweight and obese children and adolescents: a double burden in the young? - Abstract - Europe PMC.
79. Hutley, L., and Prins, J.B. (2005). Fat as an Endocrine Organ: Relationship to the Metabolic Syndrome. *Am. J. Med. Sci.* 330, 280–289.
80. Izaola, O. (2015). INFLAMACIÓN Y OBESIDAD (LIPOINFLAMACIÓN). *Nutr. Hosp.* 2352–2358.
81. Johnson, A.R., Milner, J.J., and Makowski, L. (2012). The inflammation highway: metabolism accelerates inflammatory traffic in obesity. *Immunol. Rev.* 249, 218–238.
82. Kapravelou, G., Martínez, R., Andrade, A.M., Sánchez, C., Chaves, C.L., López-Jurado, M., Aranda, P., Cantarero, S., Arrebola, F., Fernández-Segura, E., et al. (2013). Health promoting effects of

- Lupin (*Lupinus albus* var. *multolupa*) protein hydrolyzate and insoluble fiber in a diet-induced animal experimental model of hypercholesterolemia. *Food Res. Int.* 54, 1471–1481.
83. Kapravelou, G., Martínez, R., Andrade, A.M., López Chaves, C., López-Jurado, M., Aranda, P., Arrebola, F., Cañizares, F.J., Galisteo, M., and Porres, J.M. (2015). Improvement of the antioxidant and hypolipidaemic effects of cowpea flours (*Vigna unguiculata*) by fermentation: results of in vitro and in vivo experiments. *J. Sci. Food Agric.* 95, 1207–1216.
84. Kapravelou, G., Martínez, R., Nebot, E., López-Jurado, M., Aranda, P., Arrebola, F., Cantarero, S., Galisteo, M., and Porres, J. (2017). The Combined Intervention with Germinated *Vigna radiata* and Aerobic Interval Training Protocol Is an Effective Strategy for the Treatment of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) and Other Alterations Related to the Metabolic Syndrome in Zucker Rats. *Nutrients* 9, 774.
85. Kemi, O., Haram, P., Loennechen, J., Osnes, J., Skomedal, T., Wisloff, U., and Ellingsen, O. (2005). Moderate vs. high exercise intensity: Differential effects on aerobic fitness, cardiomyocyte contractility, and endothelial function. *Cardiovasc. Res.* 67, 161–172.
86. Kibenge, M.T., and Chan, C.B. (2002). The effects of high-fat diet on exercise-induced changes in metabolic parameters in Zucker fa/fa rats. *Metabolism* 51, 708–715.
87. Kim, E.Y., Anderson, M., and Dryer, S.E. (2011). Insulin increases surface expression of TRPC6 channels in podocytes: role of NADPH oxidases and reactive oxygen species. *Am. J. Physiol.-Ren. Physiol.* 302, F298–F307.
88. Kosmala, W., Przewlocka-Kosmala, M., Wojnalowicz, A., Mysiak, A., and Marwick, T.H. (2012). Integrated backscatter as a fibrosis marker in the metabolic syndrome: association with biochemical evidence of fibrosis and left ventricular dysfunction. *Eur. J. Echocardiogr.* 13, 459–467.
89. Kovesdy, C.P., Furth, S., and Zoccali, C. (2017). Obesidad y enfermedad renal: consecuencias ocultas de la epidemia. *Nefrología* 37, 360–369.
90. Křížová, L., Dadáková, K., Kašparovská, J., and Kašparovský, T. (2019). Isoflavones. *Mol. Basel Switz.* 24.
91. Kuttan, G., Kumar, K.B.H., Guruvayoorappan, C., and Kuttan, R. (2007). Antitumor, anti-invasion, and antimetastatic effects of curcumin. *Adv. Exp. Med. Biol.* 595, 173–184.

92. Laakso, M. (2015). Is Insulin Resistance a Feature of or a Primary Risk Factor for Cardiovascular Disease? *Curr. Diab. Rep.* 15, 105.
93. Lawrence, R.A., Sunde, R.A., Schwartz, G.L., and Hoekstra, W.G. (1974). Glutathione peroxidase activity in rat lens and other tissues in relation to dietary selenium intake. *Exp. Eye Res.* 18, 563–569.
94. Lee, M.P.-S., Orlov, D., and Sweeney, G. (2005). Leptin induces rat glomerular mesangial cell hypertrophy, but does not regulate hyperplasia or apoptosis. *Int. J. Obes.* 29, 1395–1401.
95. Lehr, S., Hartwig, S., and Sell, H. (2012). Adipokines: A treasure trove for the discovery of biomarkers for metabolic disorders. *PROTEOMICS – Clin. Appl.* 6, 91–101.
96. Lemos, E.T., Reis, F., Baptista, S., Pinto, R., Sepodes, B., Vala, H., Rocha-Pereira, P., Silva, A.S., and Teixeira, F. (2007). Exercise training is associated with improved levels of C-reactive protein and adiponectin in ZDF (type 2) diabetic rats. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* 13, BR168-174.
97. León-Pedroza, J.I., González-Tapia, L.A., del Olmo-Gil, E., Castellanos-Rodríguez, D., Escobedo, G., and González-Chávez, A. (2015). Inflamación sistémica de grado bajo y su relación con el desarrollo de enfermedades metabólicas: de la evidencia molecular a la aplicación clínica. *Cir. Cir.* 83, 543–551.
98. Lerman, L.O., and Lerman, A. (2011). The Metabolic Syndrome and Early Kidney Disease: Another Link in the Chain? *Rev. Esp. Cardiol.* 64, 358–360.
99. Li, L., Yang, C., Zhao, Y., Zeng, X., Liu, F., and Fu, P. (2014). Is hyperuricemia an independent risk factor for new-onset chronic kidney disease?: a systematic review and meta-analysis based on observational cohort studies. *BMC Nephrol.* 15, 122.
100. Locatelli, F., Pozzoni, P., and Vecchio, L.D. (2006). Renal Manifestations in the Metabolic Syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17, S81–S85.
101. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
102. Luengo, E. (2007). *Alimentos funcionales y nutraceuticos* (Madrid: Acción Médica).
103. Luis-Lima, S., Higuera Linares, T., Henríquez-Gómez, L., Alonso-Pescoso, R., Jimenez, A., López-Hijazo, A.M., Negrín-Mena, N.,

- Martín, C., Sánchez-Gallego, M., Galindo-Hernández, S.J., et al. (2019). The Error of Estimated GFR in Type 2 Diabetes Mellitus. *J. Clin. Med.* 8, 1543.
104. Ma Shuangtao, Zhu Xiang-Yang, Eirin Alfonso, Woollard John R., Jordan Kyra L., Tang Hui, Lerman Amir, and Lerman Lilach O. (2016). Perirenal Fat Promotes Renal Arterial Endothelial Dysfunction in Obese Swine through Tumor Necrosis Factor- α . *J. Urol.* 195, 1152–1159.
105. Machado, M.V., Vieira, A.B., da Conceição, F.G., Nascimento, A.R., da Nóbrega, A.C.L., and Tibirica, E. (2017). Exercise training dose differentially alters muscle and heart capillary density and metabolic functions in an obese rat with metabolic syndrome. *Exp. Physiol.* 102, 1716–1728.
106. Martínez, R., López-Jurado, M., Wanden-Berghe, C., Sanz-Valero, J., Porres, J.M., and Kapravelou, G. (2016). Beneficial effects of legumes on parameters of the metabolic syndrome: a systematic review of trials in animal models. *Br. J. Nutr.* 116, 402–424.
107. Martínez, R., Kapravelou, G., López-Chaves, C., Cáceres, E., Coll-Risco, I., Sánchez-González, C., Llopis, J., Arrebola, F., Galisteo, M., Aranda, P., et al. (2019a). Aerobic interval exercise improves renal functionality and affects mineral metabolism in obese Zucker rats. *Am. J. Physiol.-Ren. Physiol.* 316, F90–F100.
108. Martínez, R., Kapravelou, G., López-Chaves, C., Cáceres, E., Coll-Risco, I., Sánchez-González, C., Llopis, J., Arrebola, F., Galisteo, M., Aranda, P., et al. (2019b). Aerobic interval exercise improves renal functionality and affects mineral metabolism in obese Zucker rats. *Am. J. Physiol.-Ren. Physiol.* 316, F90–F100.
109. Martínez-Villaluenga, C., Frias, J., and Vidal-Valverde, C. (2008). Alpha-Galactosides: Antinutritional Factors or Functional Ingredients? *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 48, 301–316.
110. Matthews, D.R., Hosker, J.P., Rudenski, A.S., Naylor, B.A., Treacher, D.F., and Turner, R.C. (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28, 412–419.
111. Matthews, V.B., Åström, M.-B., Chan, M.H.S., Bruce, C.R., Krabbe, K.S., Prelovsek, O., Åkerström, T., Yfanti, C., Broholm, C., Mortensen, O.H., et al. (2009). Brain-derived neurotrophic factor is produced by skeletal muscle cells in response to contraction and enhances fat oxidation via activation of AMP-activated protein kinase. *Diabetologia* 52, 1409–1418.

112. Moore, E., and Bellomo, R. (2011). Erythropoietin (EPO) in acute kidney injury. *Ann. Intensive Care* 1, 3.
113. Mutiso, S., Rono, D., and Bukachi, F. (2014). Relationship between anthropometric measures and early electrocardiographic changes in obese rats. *BMC Res. Notes* 7, 931.
114. Newman, C.L., Moe, S.M., Chen, N.X., Hammond, M.A., Wallace, J.M., Nyman, J.S., and Allen, M.R. (2014). Cortical Bone Mechanical Properties Are Altered in an Animal Model of Progressive Chronic Kidney Disease. *PLOS ONE* 9, e99262.
115. Norvik, J.V., Storhaug, H.M., Ytrehus, K., Jenssen, T.G., Zykova, S.N., Eriksen, B.O., and Solbu, M.D. (2016). Overweight modifies the longitudinal association between uric acid and some components of the metabolic syndrome: The Tromsø Study. *BMC Cardiovasc. Disord.* 16, 85.
116. Nunnari, J., and Suomalainen, A. (2012). Mitochondria: In Sickness and in Health. *Cell* 148, 1145–1159.
117. Oboh, G., and Rocha, J.B.T. (2007). Polyphenols in red pepper [*Capsicum annum* var. *aviculare* (Tepin)] and their protective effect on some pro-oxidants induced lipid peroxidation in brain and liver. *Eur. Food Res. Technol.* 225, 239–247.
118. Oh, Y.S., Lee, Y.-J., Park, E.Y., and Jun, H.-S. (2011). Interleukin-6 treatment induces beta-cell apoptosis via STAT-3-mediated nitric oxide production. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 27, 813–819.
119. Ohkawa, H., Ohishi, N., and Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351–358.
120. Okorodudu, D.O., Jumean, M.F., Montori, V.M., Romero-Corral, A., Somers, V.K., Erwin, P.J., and Lopez-Jimenez, F. (2010). Diagnostic performance of body mass index to identify obesity as defined by body adiposity: a systematic review and meta-analysis. *Int. J. Obes.* 2005 34, 791–799.
121. OMS., 2016 OMS | Informe mundial sobre la diabetes. Consultada: 2019-10-08. <https://www.who.int/diabetes/global-report/es/>.
122. OMS., 2018 OMS | Enfermedades no transmisibles. Consultada 2019-10-07. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>.

123. OMS., 2019 OMS | Enfermedades Cardiovasculares. Consultada: 2019-12-06. http://www.who.int/topics/cardiovascular_diseases/es/.
124. OMS., 2020 OMS., 2020. La actividad física en los adultos. Consultada: 2020-01-15. https://www.who.int/dietphysicalactivity/factsheet_adults/es/.
125. Oner, E., Erturk, M., Birant, A., Kalkan, A.K., Uzun, F., Avci, Y., Gürdoğan, M., Pusuroglu, H., and Yildirim, A. (2015). Fragmented QRS complexes are associated with left ventricular systolic and diastolic dysfunctions in patients with metabolic syndrome. *Cardiol. J.* 22, 691–698.
126. Ortiz, A., Sanchez-Niño, M.D., Crespo-Barrio, M., De-Sequera-Ortiz, P., Fernández-Giráldez, E., García-Maset, R., Macía-Heras, M., Pérez-Fontán, M., Rodríguez-Portillo, M., Salgueira-Lazo, M., et al. (2019). The Spanish Society of Nephrology (SENEFRO) commentary to the Spain GBD 2016 report: Keeping chronic kidney disease out of sight of health authorities will only magnify the problem. *Nefrol. Engl. Ed.* 39, 29–34.
127. Osmond, J.M., Mintz, J.D., Dalton, B., and Stepp, D.W. (2009). Obesity increases blood pressure, cerebral vascular remodeling, and severity of stroke in the Zucker rat. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 53, 381–386.
128. Ostman, C., Smart, N.A., Morcos, D., Duller, A., Ridley, W., and Jewiss, D. (2017). The effect of exercise training on clinical outcomes in patients with the metabolic syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Cardiovasc. Diabetol.* 16, 110.
129. Ostrowski, K., Schjerling, P., and Pedersen, B.K. (2000). Physical activity and plasma interleukin-6 in humans – effect of intensity of exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* 83, 512–515.
130. Parizadeh, S.M., Jafarzadeh-Esfehani, R., Bahreyni, A., Ghandehari, M., Shafiee, M., Rahmani, F., Parizadeh, M.R., Seifi, S., Ghayour-Mobarhan, M., Ferns, G.A., et al. (2019). The diagnostic and prognostic value of red cell distribution width in cardiovascular disease; current status and prospective. *BioFactors* 45, 507–516.
131. Patel, M.S., Miranda-Nieves, D., Chen, J., Haller, C.A., and Chaikof, E.L. (2017). Targeting P-selectin glycoprotein ligand-1/P-selectin interactions as a novel therapy for metabolic syndrome. *Transl. Res.* 183, 1–13.

132. Pedersen, B.K., Åkerström, T.C.A., Nielsen, A.R., and Fischer, C.P. (2007). Role of myokines in exercise and metabolism. *J. Appl. Physiol.* 103, 1093–1098.
133. Peyrol, J., Riva, C., and Amiot, M.J. (2017). Hydroxytyrosol in the Prevention of the Metabolic Syndrome and Related Disorders. *Nutrients* 9.
134. Pinto-Sietsma, S.-J., Navis, G., Janssen, W.M.T., de Zeeuw, D., Gans, R.O.B., de Jong, P.E., and PREVEND Study Group (2003). A central body fat distribution is related to renal function impairment, even in lean subjects. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* 41, 733–741.
135. Prieto, P.G., Cancelas, J., Villanueva-Peñacarrillo, M.L., Valverde, I., and Malaisse, W.J. (2004). Plasma D-Glucose, D-Fructose and Insulin Responses after Oral Administration of D-Glucose, D-Fructose and Sucrose to Normal Rats. *J. Am. Coll. Nutr.* 23, 414–419.
136. Provan, D., Baglin, T., Dokal, I., and Vos, J. de (2017). *Manual de hematología clínica* (Elsevier Health Sciences).
137. Pruessner, J.C., Kirschbaum, C., Meinlschmid, G., and Hellhammer, D.H. (2003). Two formulas for computation of the area under the curve represent measures of total hormone concentration versus time-dependent change. *Psychoneuroendocrinology* 28, 916–931.
138. Quinn, L.S., and Anderson, B.G. (2011). Interleukin-15, IL-15 Receptor-Alpha, and Obesity: Concordance of Laboratory Animal and Human Genetic Studies.
139. Rajamani, K., Colman, P.G., Li, L.P., Best, J.D., Voysey, M., D'Emden, M.C., Laakso, M., Baker, J.R., and Keech, A.C. (2009). Effect of fenofibrate on amputation events in people with type 2 diabetes mellitus (FIELD study): a prespecified analysis of a randomised controlled trial. *The Lancet* 373, 1780–1788.
140. Rao, A.V., and Gurfinkel, D.M. (2000). The Bioactivity of Saponins: Triterpenoid and Steroidal Glycosides. *Drug Metabol. Drug Interact.* 17.
141. Reaven, G.M. (1988). Role of Insulin Resistance in Human Disease. *Diabetes* 37, 1595–1607.
142. Ritchie, S.A., and Connell, J.M.C. (2007). The link between abdominal obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 17, 319–326.

143. Robinson, J.G., Farnier, M., Krempf, M., Bergeron, J., Luc, G., Averna, M., Stroes, E.S., Langslet, G., Raal, F.J., El Shahawy, M., et al. (2015). Efficacy and Safety of Alirocumab in Reducing Lipids and Cardiovascular Events. *N. Engl. J. Med.* 372, 1489–1499.
144. Roca-Rivada, A., Al-Massadi, O., Castelao, C., Senín, L.L., Alonso, J., Seoane, L.M., García-Caballero, T., Casanueva, F.F., and Pardo, M. (2012). Muscle tissue as an endocrine organ: Comparative secretome profiling of slow-oxidative and fast-glycolytic rat muscle explants and its variation with exercise. *J. Proteomics* 75, 5414–5425.
145. Rochlani, Y., Pothineni, N.V., Kovelamudi, S., and Mehta, J.L. (2017). Metabolic syndrome: pathophysiology, management, and modulation by natural compounds. *Ther. Adv. Cardiovasc. Dis.* 11, 215–225.
146. Ruiz, J.S. (2009). *Control Global Del Riesgo Cardiometabolico* (Ediciones Díaz de Santos).
147. S. Kostapanos, M., Florentin, M., S. Elisaf, M., and P. Mikhailidis, D. (2013). Hemostatic Factors and the Metabolic Syndrome.
148. Sabatine, M.S., Giugliano, R.P., Wiviott, S.D., Raal, F.J., Blom, D.J., Robinson, J., Ballantyne, C.M., Somaratne, R., Legg, J., Wasserman, S.M., et al. (2015). Efficacy and Safety of Evolocumab in Reducing Lipids and Cardiovascular Events. *N. Engl. J. Med.* 372, 1500–1509.
149. Sabboh, H., Besson, C., Tressol, J.-C., Coudray, C., Horcajada, M.-N., Coxam, V., Révész, C., and Demigné, C. (2006). Organic potassium salts or fibers effects on mineral balance and digestive fermentations in rats adapted to an acidogenic diet. *Eur. J. Nutr.* 45, 342–348.
150. Schmidt-Kassow, M., Schädle, S., Otterbein, S., Thiel, C., Doebling, A., Lötsch, J., and Kaiser, J. (2012). Kinetics of serum brain-derived neurotrophic factor following low-intensity versus high-intensity exercise in men and women. *Neuroreport* 23, 889–893.
151. Sha, J., Zhang, S., Tang, M., Chen, K., Zhao, X., and Wang, F. (2011). Fragmented QRS Is Associated with All-Cause Mortality and Ventricular Arrhythmias in Patient with Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. *Ann. Noninvasive Electrocardiol.* 16, 270–275.
152. Sharma, K. (2009). The link between obesity and albuminuria: adiponectin and podocyte dysfunction. *Kidney Int.* 76, 145–148.

153. Sharma, K., RamachandraRao, S., Qiu, G., Usui, H.K., Zhu, Y., Dunn, S.R., Ouedraogo, R., Hough, K., McCue, P., Chan, L., et al. (2008). Adiponectin regulates albuminuria and podocyte function in mice. *J. Clin. Invest.* 118, 1645–1656.
154. Shulman, G.I. (2014). Ectopic Fat in Insulin Resistance, Dyslipidemia, and Cardiometabolic Disease. *N. Engl. J. Med.* 371, 1131–1141.
155. Skorecki, K., Chertow, G.M., Marsden, P.A., Taal, M.W., and Yu, A.S.L. (2018). *Brenner y Rector. El riñón* (Elsevier Health Sciences).
156. Solbu, M.D., Norvik, J.V., Storhaug, H.M., Eriksen, B.O., Melsom, T., Eggen, A.E., Zykova, S.N., Kronborg, J.B., and Jenssen, T.G. (2016). The Association Between Adiponectin, Serum Uric Acid and Urinary Markers of Renal Damage in the General Population: Cross-Sectional Data from the Tromsø Study. *Kidney Blood Press. Res.* 41, 623–634.
157. Sousa, C.V., Sales, M.M., Rosa, T.S., Lewis, J.E., de Andrade, R.V., and Simões, H.G. (2017). The Antioxidant Effect of Exercise: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sports Med. Auckl. NZ* 47, 277–293.
158. Souweine, J.-S., Corbel, A., Rigother, C., Roque, C.D. de L., Hadjadj, S., Cristol, J.-P., Combe, C., Bigot-Corbel, E., and Beauvieux, M.-C. (2019). Intérêt de l'albuminurie en néphrologie, diabétologie et comme marqueur de risque cardiovasculaire. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 77, 26–35.
159. Sponholtz, T.R., van den Heuvel, E.R., Xanthakis, V., and Vasan, R.S. (2019). Association of Variability in Body Mass Index and Metabolic Health With Cardiometabolic Disease Risk. *J. Am. Heart Assoc.* 8.
160. Standl, E., Erbach, M., and Schnell, O. (2012). What should be the antihypertensive drug of choice in diabetic patients and should we avoid drugs that increase glucose levels? Pro and Cons. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 28, 60–66.
161. Stern, J., Johnson, P.R., Greenwood, M.R.C., Zucker, L.M., and Hirsch, J. (1972). Insulin Resistance and Pancreatic Insulin Release in the Genetically Obese Zucker Rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 139, 66–69.
162. Strasinger, S.K., and Lorenzo, M.S.D. (2010). *Anlisis de orina y de los líquidos corporales / Urinalysis and body fluids* (Ed. Médica Panamericana).

163. Sun, L., Li, F.-H., Li, T., Min, Z., Yang, L.-D., Gao, H.-E., Wu, D.-S., and Xie, T. (2020). Effects of high-intensity interval training on adipose tissue lipolysis, inflammation, and metabolomics in aged rats. *Pflugers Arch.*
164. Superko, H.R., Momary, K.M., Pendyala, L.K., Williams, P.T., Frohwein, S., Garrett, B.C., Skrifvars, C., Gadesam, R., King, S.B., Rolader, S., et al. (2011). Firefighters, Heart Disease, and Aspects of Insulin Resistance: The FEMA Firefighter Heart Disease Prevention Study. *J. Occup. Environ. Med.* 53, 758–764.
165. Swinburn, B.A., Sacks, G., Hall, K.D., McPherson, K., Finegood, D.T., Moodie, M.L., and Gortmaker, S.L. (2011). The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. *The Lancet* 378, 804–814.
166. Tabas Ira, Williams Kevin Jon, and Borén Jan (2007). Subendothelial Lipoprotein Retention as the Initiating Process in Atherosclerosis. *Circulation* 116, 1832–1844.
167. Taleb, S. (2016). Inflammation in atherosclerosis. *Arch. Cardiovasc. Dis.* 109, 708–715.
168. Tao, J.-L., Wen, Y.-B., Shi, B.-Y., Zhang, H., Ruan, X.-Z., Li, H., Li, X.-M., Dong, W.-J., and Li, X.-W. (2012). Endoplasmic reticulum stress is involved in podocyte apoptosis induced by saturated fatty acid palmitate. *Chin. Med. J. (Engl.)* 125, 3137–3142.
169. Taylor, E.N., Stampfer, M.J., and Curhan, G.C. (2005). Obesity, weight gain, and the risk of kidney stones. *JAMA* 293, 455–462.
170. The AIM-HIGH Investigators (2011). Niacin in Patients with Low HDL Cholesterol Levels Receiving Intensive Statin Therapy. *N. Engl. J. Med.* 365, 2255–2267.
171. The HPS2-THRIVE Collaborative Group (2014). Effects of Extended-Release Niacin with Laropiprant in High-Risk Patients. *N. Engl. J. Med.* 371, 203–212.
172. Torino, M.I., Limón, R.I., Martínez-Villaluenga, C., Mäkinen, S., Pihlanto, A., Vidal-Valverde, C., and Frias, J. (2013). Antioxidant and antihypertensive properties of liquid and solid state fermented lentils. *Food Chem.* 136, 1030–1037.
173. Tune, J.D., Goodwill, A.G., Sassoon, D.J., and Mather, K.J. (2017). Cardiovascular consequences of metabolic syndrome. *Transl. Res.* 183, 57–70.

174. Turkbey, E.B., McClelland, R.L., Kronmal, R.A., Burke, G.L., Bild, D.E., Tracy, R.P., Arai, A.E., Lima, J.A.C., and Bluemke, D.A. (2010). The Impact of Obesity on the Left Ventricle: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *JACC Cardiovasc. Imaging* 3, 266–274.
175. Ukeda, H., Maeda, S., Ishii, T., and Sawamura, M. (1997). 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.* 251, 206–209.
176. Urbano, G., López-Jurado, M., Aranda, P., Vidal-Valverde, C., Tenorio, E., and Porres, J. (2000). The role of phytic acid in legumes: antinutrient or beneficial function? *J. Physiol. Biochem.* 56, 283–294.
177. Urbano, G., López-Jurado, M., Frejnagel, S., Gómez-Villalva, E., Porres, J.M., Frías, J., Vidal-Valverde, C., and Aranda, P. (2005). Nutritional assessment of raw and germinated pea (*Pisum sativum* L.) protein and carbohydrate by in vitro and in vivo techniques. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif* 21, 230–239.
178. VanHoose, L., Sawers, Y., Loganathan, R., Vacek, J.L., Stehno-Bittel, L., Novikova, L., Al-Jarrah, M., and Smirnova, I.V. (2010a). Electrocardiographic changes with the onset of diabetes and the impact of aerobic exercise training in the Zucker Diabetic Fatty (ZDF) rat. *Cardiovasc. Diabetol.* 9, 56.
179. VanHoose, L., Sawers, Y., Loganathan, R., Vacek, J.L., Stehno-Bittel, L., Novikova, L., Al-Jarrah, M., and Smirnova, I.V. (2010b). Electrocardiographic changes with the onset of diabetes and the impact of aerobic exercise training in the Zucker Diabetic Fatty (ZDF) rat. *Cardiovasc. Diabetol.* 9, 56.
180. Vega, R.B., Konhilas, J.P., Kelly, D.P., and Leinwand, L.A. (2017a). Molecular Mechanisms Underlying Cardiac Adaptation to Exercise. *Cell Metab.* 25, 1012–1026.
181. Vega, R.B., Konhilas, J.P., Kelly, D.P., and Leinwand, L.A. (2017b). Molecular Mechanisms Underlying Cardiac Adaptation to Exercise. *Cell Metab.* 25, 1012–1026.
182. Wada, T., The Research Group of Diabetic Nephropathy, Ministry of Health, Labour, and Welfare of Japan, Haneda, M., Furuichi, K., Babazono, T., Yokoyama, H., Iseki, K., Araki, S., Ninomiya, T., Hara, S., et al. (2014). Clinical impact of albuminuria and glomerular filtration rate on renal and cardiovascular events, and all-cause mortality in Japanese patients with type 2 diabetes. *Clin. Exp. Nephrol.* 18, 613–620.

183. Wadden, T.A., Webb, V.L., Moran, C.H., and Bailer, B.A. (2012). Lifestyle Modification for Obesity: New Developments in Diet, Physical Activity, and Behavior Therapy. *Circulation* 125, 1157–1170.
184. Wang, H., Hong, T., Li, N., Zang, B., and Wu, X. (2018). Soluble dietary fiber improves energy homeostasis in obese mice by remodeling the gut microbiota. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 498, 146–151.
185. Wang, T., Xiang, Z., Wang, Y., Li, X., Fang, C., Song, S., Li, C., Yu, H., Wang, H., Yan, L., et al. (2017). (-)-Epigallocatechin Gallate Targets Notch to Attenuate the Inflammatory Response in the Immediate Early Stage in Human Macrophages. *Front. Immunol.* 8, 433.
186. Wieser, V., Moschen, A.R., and Tilg, H. (2013). Inflammation, Cytokines and Insulin Resistance: A Clinical Perspective. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 61, 119–125.
187. Wisløff, U., Helgerud, J., Kemi, O.J., and Ellingsen, Ø. (2001). Intensity-controlled treadmill running in rats: $\dot{V}O_{2\max}$ and cardiac hypertrophy. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 280, H1301–H1310.
188. Wu, J., Li, J., Zhang, N., and Zhang, C. (2011). Stem cell-based therapies in ischemic heart diseases: a focus on aspects of microcirculation and inflammation. *Basic Res. Cardiol.* 106, 317–324.
189. Xu, H., Barnes, G.T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C.J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J.S., Tartaglia, L.A., et al. (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 112, 1821–1830.
190. Xu, L.H.R., Adams-Huet, B., Poindexter, J.R., Maalouf, N.M., Moe, O.W., and Sakhaee, K. (2017). Temporal Changes in Kidney Stone Composition and in Risk Factors Predisposing to Stone Formation. *J. Urol.* 197, 1465–1471.
191. Xuan, C.-L., Yao, F.-R., Guo, L.-R., Liu, Q., Chang, S.K.C., Liu, K.-X., and Sun, C.-W. (2013). Comparison of extracts from cooked and raw lentil in antagonizing angiotensin II-induced hypertension and cardiac hypertrophy. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 17, 2644–2653.
192. Younes, H., Alphonse, J.C., Behr, S.R., Demigné, C., and Rémésy, C. (1999). Role of fermentable carbohydrate supplements with a low-protein diet in the course of chronic renal failure: experimental bases. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* 33, 633–646.

193. Zhang, X., and Lerman, L.O. (2017). The metabolic syndrome and chronic kidney disease. *Transl. Res.* 183, 14–25.
194. Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J.M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425–432.
195. Zou, Y., Chang, S.K.C., Gu, Y., and Qian, S.Y. (2011). Antioxidant activity and phenolic compositions of lentil (*Lens culinaris* var. Morton) extract and its fractions. *J. Agric. Food Chem.* 59, 2268–2276.
196. Zreikat, H.H., Harpe, S.E., Slattum, P.W., Mays, D.P., Essah, P.A., and Cheang, K.I. (2014). Effect of Renin–Angiotensin System Inhibition on Cardiovascular Events in Older Hypertensive Patients with Metabolic Syndrome. *Metabolism* 63, 392–399.
197. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposesText with EEA relevance. 47.