

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

La obesidad, un estado de envejecimiento prematuro: estudio conductual, inmunitario y de estrés oxidativo en modelos murinos

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Nuria María de Castro de Frutos

Directora
Mónica de la Fuente del Rey

Madrid, 2016

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**



**LA OBESIDAD, UN ESTADO DE
ENVEJECIMIENTO PREMATURO
ESTUDIO CONDUCTUAL, INMUNITARIO Y
DE ESTRÉS OXIDATIVO EN MODELOS
MURINOS**

Tesis Doctoral con Mención Europea

NURIA MARÍA DE CASTRO DE FRUTOS

Madrid, 2015

MÓNICA DE LA FUENTE DEL REY, Catedrática de Fisiología Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid,
AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “**LA OBESIDAD, UN ESTADO DE ENVEJECIMIENTO PREMATURO. ESTUDIO CONDUCTUAL, INMUNOLÓGICO Y DE ESTRÉS OXIDATIVO EN MODELOS MURINOS**”, realizada por **NURIA MARÍA DE CASTRO DE FRUTOS**, bajo mi dirección y supervisión, para la obtención del grado de Doctor con Mención Europea, por la Universidad Complutense de Madrid.

En Madrid, a 26 de Octubre de 2015

VºBº de la Directora de Tesis

Dra. Mónica de la Fuente del Rey

Nuria María de Castro de Frutos

La realización del presente trabajo se ha llevado a cabo con el apoyo económico prestado por los proyectos BFU2008-04336, BFU2011-30336 y DEP2006-56187-C04-02/PREV del actual Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO), de la Red de Envejecimiento y Fragilidad (RETICEF) (RD06/0013/0003; RD12/0043/0018) del Instituto de Salud Carlos III, del grupo UCM-CM: Envejecimiento, Neuroinmunología y Nutrición (ENEROINN) (Nº 910379), y con la concesión a Nuria María de Castro de Frutos de una beca para la formación de personal investigador (FPU) del Ministerio de Educación y Ciencia (MEC).

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

apoE: Apolipoproteína E

ASP: Proteína de señalización de *Agouti* (del inglés, *agouti* signaling protein)

ATP: Adenosín trifosfato

ATP-III: Guía para el tratamiento en adultos III (del inglés, Adult Treatment Panel III)

BCR: Receptor de las células B

Ca²⁺ : Calcio

CAT: Catalasa

CETP: Proteína de transferencia de ésteres de colesterol

CHOP: Proteína de unión homóloga a C-EBP

Con A: Concanavalina A

Cpm: cuentas por minuto

ECs: Células endoteliales (del inglés, Endothelial cells)

EF: Eficacia fagocítica

EGCG: Epigallocatequina-galato

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (del inglés, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial

FAD: Flavín adenín dinucleótido

FFAs: Ácidos grasos libres (del inglés, Free fatty acids)

fMLP: Péptido formilado o N- formil-Metionil-Leucil-Fenilalanina

G-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos

GLUT-1: Transportador de glucosa tipo 1

GM-CSF: Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos

GPC: Glicerofosfolina

GPx: Glutathion peroxidasa

GR: Glutathion reductasa

GSH: Glutathion

GSSG: Glutathion oxidado

HDL: Lipoproteína de alta densidad

HIF-1: Factor 1 inducible por hipoxia

HPA: Hipotálamo hipófisis adrenal

H₂O₂: Peróxido de Hidrógeno

ICAM-1: Molécula de adhesión intracelular-1

IDF: Federación Internacional de Diabetes (del inglés, “International Diabetes Federation”)

IF: Índice de fagocitosis

IFN: Interferón

Ig: Inmunoglobulina

IL: Interleuquina

IL-1ra: Receptor antagonista de IL-1

IMC: Índice de masa corporal

iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible

IRS1: Sustrato 1 del receptor de insulina

JNK: Quinasa c-jun N-terminal

LDL: Lipoproteína de baja densidad

LPL: Lipoproteína lipasa

LPS: Lipopolisacárido (de la membrana de *E. coli*)

LTB₄: Leucotrieno B₄

MC1-R: Receptor subtipo 1 de melanocortina

MC4-R: Receptor subtipo 4 de melanocortina

MCP-1: Proteína quimioatrayente de monocitos 1

MDA: Malondialdehído

MIP-1 α : Proteína inflamatoria de macrófagos1 α

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero

MSH: Hormona estimulante de melanocitos

Na⁺: Sodio

NAC: N-acetil cisteína

NAD⁺: Nicotinamida adenina dinucleótido

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, forma reducida

NEFA: Ácidos grasos no esterificados

NF- κ B: Factor nuclear de transcripción κ B

NK: Asesinas naturales (del inglés, Natural Killer)

NO: Óxido nítrico

O₂^{•-}: Anión superóxido

OH: radical hidroxilo

PAF: Factor activador de plaquetas

PAI-1: Inhibidor del activador del plasminógeno tipo-1

PCR: Proteína C reactiva

PGE2: Prostaglandina E2

PHA: Fitohemaglutinina

PKC: Proteína kinasa C

PMA: Forbol 12-miristato 13-acetato

POMC: Proopiomelanocortina

PPAR: Receptor activado por el proliferador de peroxisomas

Ps: Fosfoserina (del inglés, Phosphoserine)

PTK: Proteína tirosina quinasa

RANTES: Expresado y secretado por células T normales, y regulado por activación

RBP4: Proteína transportadora de retinol-4

ROS: Especies reactivas de oxígeno (del inglés, Reactive Oxygen Species)

SOD: Superóxido dismutasa

TAC: Capacidad antioxidante total (del inglés, Total Antioxidant Capacity)

TBARS: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

TCR: Receptor de las células T

TGF: Factor de crecimiento transformante

Th: Célula T helper colaboradora

TNF: Factor de necrosis tumoral

UCP: Proteínas desacoplantes

UPR: Respuesta a proteínas no plegadas (del inglés, Unfolded protein response)

VCAM-1: Molécula de adhesión vascular-1

VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular

VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad

XDH: Xantina deshidrogenasa

XO: Xantina oxidasa

ÍNDICE

Resumen	17
Abstract	23
1. INTRODUCCIÓN	29
1.1. EL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO	29
1.1.1. Definición del envejecimiento. Longevidad media y máxima	29
1.1.2. La edad biológica	30
1.1.3. Teorías del envejecimiento	31
1.1.3.1. Envejecimiento genéticamente programado	32
1.1.3.2. Envejecimiento por acumulación de daño	33
1.2. EL ESTRÉS OXIDATIVO E INFLAMATORIO	38
1.2.1. Los radicales libres: producción, efectos y oxidación	39
1.2.1.1. Fuentes de especies reactivas de oxígeno (ROS)	40
1.2.1.2. Efecto de los radicales libres: reacciones de oxidación	42
1.2.2. Las defensas antioxidantes: respuesta celular a la agresión oxidativa	46
1.2.2.1. Antioxidantes endógenos	47
1.2.2.2. Antioxidantes exógenos	53
1.2.3. La respuesta inflamatoria	56
1.3. EL SISTEMA INMUNITARIO Y EL ENVEJECIMIENTO	60
1.3.1. Introducción al funcionamiento del sistema inmunitario	60
1.3.2. La inmunosenescencia	63
1.3.3. El sistema inmunitario como marcador de edad biológica y predictor de longevidad	78
1.3.4. Causas de la inmunosenescencia. El estrés oxidativo	79
1.4. LA COMUNICACIÓN NEUROINMUNOENDOCRINA Y EL ENVEJECIMIENTO	81
1.4.1. Conceptos generales de la comunicación entre los sistemas homeostáticos	81
1.4.2. Comunicación neuroinmunoendocrina en el envejecimiento	84

1.5. LA OBESIDAD Y EL SISTEMA INMUNITARIO	86
1.5.1. Conceptos generales de la obesidad y el síndrome metabólico	86
1.5.2. El tejido adiposo como órgano de almacenamiento y órgano endocrino	96
1.5.3. Estado inflamatorio y oxidativo en la obesidad	99
1.5.4. Modelos animales para el estudio de la obesidad	116
1.5.5. Obesidad y sistema inmunitario	120
 1.6. EL EJERCICIO FÍSICO COMO ESTRATEGIA PARA EL CONTROL DE LA OBESIDAD Y EL SÍNDROME METABÓLICO	 129
1.6.1. Conceptos generales	129
1.6.2. El ejercicio físico como terapia para el control de la inflamación de bajo grado: hipótesis anti-inflamatoria del ejercicio	130
1.6.3. El ejercicio físico y la inflamación en el síndrome metabólico	132
1.6.4. El ejercicio físico y el sistema inmunitario	134
 2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	 138
 3. MATERIAL Y MÉTODOS	 141
3.1. MATERIAL	141
3.1.1. Material biológico	141
3.1.1.1. Animales	141
3.1.1.2. Línea celular	142
3.1.2. Medios	143
3.1.2.1. Medios preparados en el laboratorio	143
3.1.2.2. Medios comerciales	144
3.1.3. Reactivos y kits comerciales	144
3.1.4. Material de laboratorio	146
3.1.5. Aparataje	147
 3.2. ESTUDIOS REALIZADOS EN RATAS ZUCKER GENÉTICAMENTE OBESAS.....	 149

3.2.1. ESTUDIO INMUNOLÓGICO, DE ESTRÉS OXIDATIVO Y DEL PERFIL METABÓLICO EN RATAS MACHO GENÉTICAMENTE OBESAS, JÓVENES Y ADULTAS.....	149
3.2.1.1. Diseño experimental	149
3.2.1.2. Toma de muestras biológicas: plasma y suspensión peritoneal. Extracción y procesamiento de los órganos	152
3.2.1.3. Recuento y análisis de la viabilidad celular	154
3.2.1.4. Mantenimiento de la línea tumoral murina YAC-1	154
3.2.1.5. Valoración de parámetros de funcionalidad inmunitaria	156
3.2.1.6. Valoración de parámetros de estrés oxidativo	162
3.2.1.7. Estudio del perfil metabólico	170
3.2.1.8. Análisis estadístico	174
3.2.2. EFECTO DEL EJERCICIO FÍSICO EN RATAS MACHO GENÉTICAMENTE OBESAS ADULTAS. ESTUDIO INMUNOLÓGICO Y DE ESTRÉS OXIDATIVO	175
3.2.2.1. Diseño experimental	175
3.2.2.2. Programa de ejercicio	176
3.2.2.3. Toma de muestras biológicas: sangre y órganos	178
3.2.2.4. Recuento y análisis de la viabilidad celular	179
3.2.2.5. Valoración de parámetros de funcionalidad inmunitaria	179
3.2.2.6. Valoración de parámetros de estrés oxidativo	181
3.2.2.7. Análisis estadístico	182
3.3. ESTUDIOS EN RATONES HEMBRA GENÉTICAMENTE OBESOS: CONDUCTUAL, INMUNOLÓGICO Y DEL ESTADO ANTIOXIDANTE EN EL ENVEJECIMIENTO	183
3.3.1. Diseño experimental	183
3.3.2. Estudio conductual	185
3.3.2.1. Capacidad sensoriomotora	185
3.3.2.2. Comportamiento exploratorio y respuestas de ansiedad	189
3.3.3. Toma de muestras biológicas: suspensión peritoneal y sangre	195
3.3.4. Recuento y análisis de la viabilidad celular	196
3.3.5. Valoración de parámetros de funcionalidad inmunitaria	196

3.3.6. Valoración de parámetros de estado antioxidante	198
3.3.7. Análisis estadístico	201
 3.4. ACTIVIDAD NATURAL KILLER, CAPACIDAD PROLIFERATIVA Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL EN RATAS WISTAR MACHO ADULTAS CON SOBREPESO INDUCIDO POR DIETA HIPERCALÓRICA. ESTUDIO PRELIMINAR	 202
3.4.1. Diseño experimental	202
3.4.2. Toma de muestras biológicas: sangre y órganos	203
3.4.3. Recuento y análisis de la viabilidad celular	204
3.4.4. Valoración de parámetros de funcionalidad inmunitaria	204
3.4.5. Análisis estadístico	205
 4. RESULTADOS	 206
4.1. ESTUDIOS REALIZADOS EN RATAS ZUCKER GENÉTICAMENTE OBESAS	206
4.1.1. ESTUDIO INMUNOLÓGICO, DE ESTRÉS OXIDATIVO Y DEL PERFIL METABÓLICO EN RATAS MACHO GENÉTICAMENTE OBESAS, JÓVENES Y ADULTAS	206
4.1.1.1. Estudio de varias funciones inmunitarias y de estrés oxidativo en ratas Zucker genéticamente obesas adultas. Estudio comparativo con ratas de la cepa Wistar	206
4.1.1.2. Estudio de varias funciones inmunitarias, de estrés oxidativo y del perfil metabólico en ratas Zucker genéticamente obesas jóvenes y adultas	232
 4.1.2. EFECTO DEL EJERCICIO FÍSICO EN RATAS MACHO GENÉTICAMENTE OBESAS ADULTAS. ESTUDIO INMUNOLÓGICO Y DE ESTRÉS OXIDATIVO	 268
4.1.2.1. Efecto del ejercicio físico sobre el peso corporal, en el momento del sacrificio	269
4.1.2.2. Efecto del ejercicio físico sobre el peso relativo de los distintos órganos extraídos tras el sacrificio	269
4.1.2.3. Efecto del ejercicio físico sobre la glucemia, en el momento del sacrificio ...	271
4.1.2.4. Efecto del ejercicio físico sobre varios parámetros de función inmunitaria de leucocitos de bazo	272

4.1.2.5. Efecto del ejercicio físico sobre parámetros de estrés oxidativo	274
4.2. ESTUDIOS EN RATONES HEMBRA GENÉTICAMENTE OBESOS: CONDUCTUAL, INMUNOLÓGICO Y DEL ESTADO ANTIOXIDANTE EN EL ENVEJECIMIENTO	280
4.2.1. Evolución del peso corporal	280
4.2.2. Estudio de la glucemia	282
4.2.3. Estudio conductual	283
4.2.3.1. Peso corporal y batería de pruebas de capacidad sensoriomotora	284
4.2.3.2. Batería de pruebas de comportamiento exploratorio y respuestas de ansiedad	298
4.2.4. Estudio de varias funciones inmunitarias en leucocitos peritoneales	345
4.2.4.1. Actividad citotóxica “Natural Killer”	345
4.2.4.2. Capacidad proliferativa de los linfocitos	346
4.2.4.3. Niveles de citoquinas	350
4.2.5. Estudio de parámetros de estado antioxidante en leucocitos peritoneales	363
4.2.6. Estudio de la longevidad en ratones homocigotos (db/db), heterocigotos (db/+) y salvajes	367
4.3. ACTIVIDAD NATURAL KILLER, CAPACIDAD PROLIFERATIVA Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL EN RATAS WISTAR MACHO ADULTAS CON SOBREPESO INDUCIDO POR DIETA HIPERCALÓRICA. ESTUDIO PRELIMINAR	368
4.3.1. Peso corporal en el momento del sacrificio	368
4.3.2. Estudio de la actividad “Natural Killer” en leucocitos de bazo y ganglios axilares	369
4.3.3. Estudio de la capacidad proliferativa en leucocitos de bazo y ganglios axilares	370
4.3.4. Estudio de la capacidad antioxidante total plasmática	371
5. DISCUSIÓN	373
5.1. ESTUDIOS REALIZADOS EN RATAS ZUCKER GENÉTICAMENTE OBESAS	373

5.1.1. ESTUDIO INMUNOLÓGICO, DE ESTRÉS OXIDATIVO Y DEL PERFIL METABÓLICO EN RATAS MACHO GENÉTICAMENTE OBESAS, JÓVENES Y ADULTAS	373
5.1.1.1. Estudio de varias funciones inmunitarias y de estrés oxidativo en ratas Zucker genéticamente obesas adultas. Estudio comparativo con ratas de la cepa Wistar	373
5.1.1.2. Estudio de varias funciones inmunitarias, de estrés oxidativo y del perfil metabólico en ratas Zucker genéticamente obesas jóvenes y adultas	395
5.1.2. EFECTO DEL EJERCICIO FÍSICO EN RATAS MACHO GENÉTICAMENTE OBESAS ADULTAS. ESTUDIO INMUNOLÓGICO Y DE ESTRÉS OXIDATIVO	423
5.2. ESTUDIOS EN RATONES HEMBRA GENÉTICAMENTE OBESOS: CONDUCTUAL, INMUNOLÓGICO Y DEL ESTADO ANTIOXIDANTE EN EL ENVEJECIMIENTO	437
5.3. ACTIVIDAD NATURAL KILLER, CAPACIDAD PROLIFERATIVA Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL EN RATAS WISTAR MACHO ADULTAS CON SOBREPESO INDUCIDO POR DIETA HIPERCALÓRICA. ESTUDIO PRELIMINAR	463
6. CONCLUSIONES	468
6 bis. CONCLUSIONS	471
7. BIBLIOGRAFÍA	474
ANEXO	526

**LA OBESIDAD, UN ESTADO DE ENVEJECIMIENTO PREMATURO
ESTUDIO CONDUCTUAL, INMUNITARIO Y DE ESTRÉS OXIDATIVO EN
MODELOS MURINOS**

La obesidad se puede definir como un estado de desequilibrio entre la ingestión y el gasto de calorías que conlleva una excesiva o anormal acumulación de grasa corporal. La prevalencia de esta enfermedad ha aumentado de manera alarmante en la mayor parte de los países, alcanzando proporciones epidémicas en los últimos años, representando uno de los problemas de salud más importantes. La etiología de la obesidad es multifactorial, en ella están implicados factores genéticos, metabólicos, medioambientales y de estilo de vida, además de psico-sociales. La morbilidad asociada a esta enfermedad se manifiesta en múltiples alteraciones, entre las que destacan desórdenes metabólicos como resistencia a la insulina, diabetes mellitus tipo II y dislipidemia; enfermedades cardiovasculares como la hipertensión, aterosclerosis, insuficiencia cardíaca y la enfermedad cerebrovascular; y también el síndrome metabólico, así como enfermedades respiratorias, desórdenes gastrointestinales, y alteraciones musculo-esqueléticas. El desequilibrio energético característico de la obesidad conlleva la expansión del tejido adiposo, que provoca anomalías en la función de los adipocitos, como son el estrés oxidativo, con la generación de especies reactivas de oxígeno. Además, tiene lugar la liberación sistémica de adipoquinas relacionadas con la inflamación secretadas por los adipocitos, que genera un estado de inflamación crónica moderada o de bajo grado. Entre los marcadores inflamatorios liberados por el tejido adiposo en la obesidad se encuentran diferentes citoquinas y proteínas de fase aguda, así como la hormona leptina, siendo los individuos obesos resistentes a esta hormona, lo que da lugar a un aumento compensatorio de las concentraciones circulantes.

Para conservar el estado de salud de un individuo es necesario el mantenimiento de la homeostasis del organismo, lo que se consigue gracias al correcto funcionamiento de los sistemas reguladores, el nervioso, el inmunitario y el endocrino y la comunicación entre los mismos. Concretamente, se ha comprobado que el sistema inmunitario es un excelente marcador de salud. El proceso de envejecimiento se debe a

una oxidación e inflamación, que supone el deterioro de dichos sistemas reguladores, lo que hace aumentar la morbilidad y mortalidad con el avance de la edad. Por otro lado, la obesidad es un estado de inflamación y oxidación, situaciones en las que el sistema inmunitario se encuentra muy implicado, dada la necesaria producción de compuestos inflamatorios y oxidantes que lleva a cabo en el desarrollo de su labor defensiva. Puesto que el sistema inmunitario parece encontrarse implicado en la velocidad a la que se lleva a cabo el proceso de envejecimiento, esto es, en la edad biológica de cada individuo y consecuentemente su longevidad, es relevante comprobar si sujetos con obesidad muestran una inmunosenescencia y alteración del estado redox y conductual que les haga manifestar un envejecimiento prematuro. Por lo tanto, la **hipótesis** de este trabajo es que la obesidad es una enfermedad que se acompaña de cambios en la función inmunitaria y en parámetros de estrés oxidativo e inflamatorio, así como conductuales, que podrían manifestar un deterioro a nivel de los sistemas homeostáticos, lo que conduciría a un estado de envejecimiento prematuro. Además, el ejercicio regular y de intensidad moderada, que tiene efectos beneficios para el sistema inmunitario, puede constituir una estrategia no farmacológica, útil para restaurar el equilibrio funcional y redox en la obesidad, que permitirá poder hacer frente al estrés asociado a la realización de un ejercicio agudo. Para dar respuesta a la hipótesis indicada, se han planteado los siguientes **objetivos** que se han llevado a cabo en animales de experimentación:

1º objetivo: Caracterizar en un modelo de obesidad genética, la rata Zucker, diversos parámetros de función inmunitaria y estrés oxidativo. Este objetivo a su vez fue subdividido en los siguientes dos sub-objetivos:

1.a. Valorar una serie de funciones inmunitarias y parámetros de estrés oxidativo a la edad adulta (seis meses), en la rata Zucker, tanto “*fa/fa*” como “lean” y comparar con la cepa de rata Wistar.

1.b. Comparar distintas funciones inmunitarias, parámetros de estrés oxidativo y perfil metabólico en la rata Zucker de edad juvenil (dos meses) y adulta (seis meses).

2º objetivo: Estudiar los cambios en parámetros de función inmunitaria y estrés oxidativo en un modelo de obesidad genética, la rata Zucker, a la edad adulta (seis

meses), tras llevar a cabo un programa de ejercicio físico con entrenamiento, así como valorar el efecto del mismo ante la realización de un ejercicio físico agudo.

3° objetivo: Analizar en un modelo de obesidad genética en ratón, ratones *db/db*, mediante un estudio longitudinal iniciado a la edad juvenil (dos meses), los cambios en diversos parámetros conductuales, de funcionalidad y estado antioxidante en los leucocitos peritoneales, así como su relación con la longevidad de los animales.

4° objetivo: Realizar un estudio preliminar sobre el estado de algunos parámetros (actividad “Natural Killer”, capacidad proliferativa de linfocitos y capacidad antioxidante total) en un modelo de sobrepeso inducido por dieta hipercalórica, en rata Wistar adulta (seis meses).

Los **resultados** correspondientes al 1° objetivo muestran que a la edad adulta las ratas obesas Zucker presentan un deterioro en la capacidad fagocítica de macrófagos peritoneales, de la actividad “Natural Killer” (NK) y la proliferación de linfocitos en bazo y timo, así como un mayor estado inflamatorio de las células esplénicas (con un aumento en la liberación de IL-1 β y TNF- α , y una disminución de la IL-2), y un mayor estado oxidativo (con disminuidos niveles de TAC en bazo, bajos niveles de GSH total y menor actividad de la GR, así como un aumento de la actividad XO en timo), respecto a las ratas Wistar. A la edad juvenil, las ratas Zucker *fa/fa* obesas muestran un deterioro prematuro de la actividad NK y la capacidad proliferativa en bazo y timo, respecto a sus controles lean, mientras que no se encuentran diferencias en estas funciones entre ambas ratas Zucker, a la edad adulta. Además, con dos y seis meses las ratas *fa/fa* presentan un mayor estado inflamatorio en bazo (con una desregulación en las citoquinas pro- y anti-inflamatorias). Las ratas *fa/fa* muestran, en general, unas defensas antioxidantes semejantes a las ratas lean a los dos meses, mientras que son menores en la edad adulta (como sucede con los niveles de GSH y la actividad GR en timo, así como con las actividades GPx y GR en hígado). Con el paso a la edad adulta, existe una disminución en los niveles de GSH, la TAC y en las actividades GPx y GR en ratas *fa/fa*, que en algunos casos es mayor que en ratas lean. Asimismo, las ratas *fa/fa* presentan una alteración de la homeostasis de la glucosa y disfunciones metabólicas tempranas en la

ruta de metilación y trans-sulfuración hepáticas, así como en el tejido cardíaco. En cuanto al 2º objetivo, los resultados indican que el entrenamiento físico regular en ratas *fa/fa* adultas no modifica en sí mismo la actividad NK ni la capacidad proliferativa en respuesta a LPS y PHA de leucocitos de bazo, pero preserva ésta última frente al golpe de ejercicio agudo, modulando además la liberación de TNF- α . Por otro lado, las ratas sedentarias manifiestan un aumento de la actividad XO y una disminución de la TAC en bazo e hígado cuando se someten al ejercicio agudo, mientras que no ocurre en ratas entrenadas. Los niveles de GSH total, aumentaron en leucocitos de bazo de ratas entrenadas sometidas a ejercicio agudo. En lo que respecta al 3º objetivo, los resultados obtenidos muestran que los ratones obesos *db/db* presentan un deterioro acelerado de la capacidad sensoriomotora (coordinación motora y vigor muscular), así como del comportamiento exploratorio (actividad horizontal y vertical), además de manifestar una marcada conducta de ansiedad. Estos ratones también se caracterizan por un deterioro prematuro de la capacidad proliferativa de leucocitos peritoneales en respuesta a los mitógenos Con A y especialmente LPS, y un desbalance en la liberación de citoquinas (con niveles desregulados de IL-10, disminuidos de IL-2, y aumentados de IL-1 β y TNF- α). Los niveles de GSH total en estos leucocitos están elevados, principalmente a la edad juvenil, así como la actividad GPx en todas las edades estudiadas (juvenil, adulta y madura). Por último, ratones *db/db* muestran una menor esperanza de vida. Los resultados del 4º objetivo indican un deterioro de la actividad NK y la capacidad proliferativa de leucocitos de bazo y ganglio, así como una TAC plasmática aumentada en ratas Wistar con sobrepeso.

Como **conclusión** se podría decir que:

1.1. Las ratas Zucker (lean y *fa/fa*) a la edad adulta (seis meses) presentan una inmunosenescencia prematura y un mayor estado oxidativo e inflamatorio en relación a la cepa de ratas Wistar.

1.2. Las ratas obesas *fa/fa* adultas no parecen manifestar un mayor deterioro de la función inmunitaria respecto a las lean. Sin embargo, sí muestran un mayor estado inflamatorio de las células esplénicas, y un mayor estado de oxidación en leucocitos del

timo y en el hígado. Las ratas lean (*fa/+*) a la edad adulta no constituyen un buen control para los estudios de función inmunitaria y de estado oxidativo en bazo.

1.3. Las ratas obesas *fa/fa* jóvenes (dos meses de edad), muestran respecto a las lean una inmunosenescencia prematura acompañada de un estado proinflamatorio de los leucocitos esplénicos. Además, presentan alteraciones en el metabolismo hepático, cardíaco y adiposo.

1.4. Las ratas Zucker experimentan un deterioro en la función leucocitaria, un aumento de inflamación y menor defensa antioxidante en el paso de la edad juvenil a la adulta. También presentan cambios en el metabolismo hepático, cardíaco y adiposo.

2.1. Un programa de entrenamiento físico regular, basado en fases de adaptación, progresión y mantenimiento en cuanto a intensidad y duración, con finalización a la edad adulta en ratas obesas *fa/fa*, parece atenuar la inmunosenescencia que estos animales presentan en la capacidad proliferativa de linfocitos, así como modular la producción de TNF- α , ante la realización de un golpe de ejercicio agudo.

2.2. El programa de entrenamiento físico genera un adecuado estado redox en ratas obesas, que les permite generar un menor estrés oxidativo al realizar el ejercicio agudo.

3.1. Los ratones obesos *db/db* presentan un deterioro conductual prematuro y acelerado de la capacidad sensoriomotora y del comportamiento exploratorio, así como un estado temprano de ansiedad, lo que sugiere un envejecimiento prematuro.

3.2. Los ratones *db/db* muestran una inmunosenescencia de la capacidad proliferativa de los leucocitos peritoneales, que es prematura en respuesta a LPS. También presentan una desregulación temprana de las citoquinas liberadas por dichas células inmunitarias, así como cambios en sus defensas antioxidantes.

3.3. Los ratones heterocigotos (*db/+*) manifiestan un deterioro conductual y de la capacidad proliferativa de los leucocitos peritoneales, así como un estado inflamatorio de dichas células que, en general, es similar al de los ratones homocigotos *db/db*. Por ello, estos animales heterocigotos no se pueden considerar unos adecuados controles.

3.4. Los ratones *db/db*, muestran una menor esperanza de vida que sus controles (*db/+*) y salvajes, por lo que se puede proponer a la obesidad como un estado de envejecimiento prematuro.

4. Una dieta hipercalórica, con un 25,5% de grasa es capaz de generar un estado de sobrepeso en ratas Wistar adultas, las cuales muestran una inmunosenescencia prematura en la actividad “Natural Killer” y en la capacidad proliferativa de leucocitos de bazo y ganglios axilares.

Como conclusión general, debido al deterioro conductual, de función inmunitaria y estado de inflamación y oxidación prematuros encontrados en animales de experimentación obesos, y especialmente a la menor esperanza de vida que se ha detectado en los ratones *db/db*, se puede proponer a la obesidad como un estado de envejecimiento prematuro.

**OBESITY, A PREMATURE AGEING STATE
BEHAVIOURAL, IMMUNE AND OXIDATIVE STRESS STUDY IN MURINE
MODELS**

Obesity can be defined as an imbalance state between the ingestion and caloric expenditure which involves an excessive or unusual accumulation of body fat. The prevalence of this disease has increased alarmingly in most countries, reaching epidemic proportions within the last years and representing one of the most important health problems. Obesity's etiology is multifactorial, being involved genetic, metabolic, environmental and lifestyle factors, as well as psico-social conditions. The associated morbidity to this disease results in multiple alterations, among which it can be mentioned metabolic disorders (such as insulin resistance, type II diabetes mellitus and dyslipidemia), cardiovascular diseases (such as hypertension, atherosclerosis, heart failure and the brain vascular disease) and also the metabolic syndrome, as well as respiratory diseases, gastrointestinal disorders, and muscle-skeletal alterations. The energetic imbalance associated with obesity involves adipose tissue growth, which causes abnormalities in the adipocytes function, as oxidative stress, with the reactive oxygen species generation. Furthermore, the systemic release of adipokines by adipose cells takes place in relation to the inflammation, which generates a moderate or low chronic inflammatory state. Among the inflammatory markers released by adipose tissue in obesity conditions, different cytokines and acute phase proteins are included, as well as the leptin hormone, being obese individuals resistant to this hormone, which causes a compensatory increase of its concentration in peripheral blood.

In order to preserve the health state of an individual, keeping the homeostasis of the organism is necessary, and this homeostasis can be achieved thanks to the correct work of the regulatory systems: the nervous, the immune and the endocrine, and the crosstalk between them. In particular, it has been confirmed that the immune system is an excellent marker of health. Ageing is caused by an oxidation and inflammation process, which leads to an impairment of the above mentioned regulatory systems, which increases the morbidity and mortality in advancing age. On the other hand, obesity is a state of inflammation and oxidation, situations in which the immune system

is deeply involved, given the necessary production of inflammatory and oxidant compounds which allows the development of its defensive role. Considering that the immune system seems to be involved in the ageing rate, that is, in the biological age of each individual and consequently in its longevity, it is relevant to study if obese subjects show immunosenescence, an altered redox state and behavioural alterations that makes them suffer a premature ageing process. Therefore, the **hypothesis** of this work is that obesity is a disease that implies changes in the immune function and in oxidative, inflammatory and behavioural parameters, which could exhibit an impairment of the homeostatic systems, which could lead to a premature ageing state. Besides, regular and moderate exercise, which has beneficial effects for the immune system, can constitute a useful non-pharmacological strategy for restoring the functional and redox balance in obesity, which will enable to deal with stress associated with a bout of exercise. In order to find an answer to the above described hypotheses, we have considered the following **objectives** which have been developed in experimental animals:

1st objective: “Characterizing several immune functions and oxidative stress parameters in a model of genetic obesity, the Zucker rat”. This objective was divided in the following two sub-objectives:

1.a. Assessing several immune functions and oxidative stress parameters in the Zucker rat (“*fa/fa*” and “lean”) at an adult age (six months), as well as comparing results with the ones obtained with Wistar rats of the same age.

1.b. Comparing several immune functions, oxidative stress parameters and metabolic profile parameters in Zucker rats at young (two months) and adult (six months) age.

2nd objective: Studying the changes in immune function and oxidative stress parameters in a model of genetic obesity, the Zucker rat, at an adult age (six months), after carrying out a physical exercise training programme, as well as assessing the effects of a physical exercise training programme when the animal has to face a bout physical exercise.

3rd objective: Analysing, in a mouse model of genetic obesity, *db/db* mice, the changes in several behavioural, functional and antioxidant state parameters in peritoneal leucocytes, as well as its relationship with the longevity of the animals, with a longitudinal study started at young age (two months).

4th objective: Carrying out a preliminary study about the state of several parameters (“Natural Killer” activity, proliferative capacity of lymphocytes and total antioxidant capacity) in an overweight model induced by hypercaloric diet in adult Wistar rats (six months).

Regarding the 1st objective, the **results** show that, at an adult age, obese Zucker rats exhibit an impaired phagocytic capacity of their peritoneal macrophages, as well as an impaired “Natural Killer” (NK) activity and lymphocytes proliferation capacity from spleen and thymus, as well as a higher inflammatory state of splenic cells (with an increase in the IL-1 β and TNF- α release, and a decrease of IL-2 levels), and a higher oxidative state (with reduced TAC levels in spleen, lower levels of total GSH and less GR activity, as well as an increased XO activity in thymus), with respect to Wistar rats. At a young age, Zucker *fa/fa* obese rats show a premature impairment of the NK activity and the proliferative capacity in spleen and thymus, with respect to its lean controls. However, differences have not been found in these functions between both Zucker rats, at an adult age. Moreover, two and six months-old *fa/fa* rats show a higher inflammatory state in spleen (with a deregulation in the pro- and anti-inflammatory cytokines). The *fa/fa* rats show, in general, similar antioxidant defences to lean rats at two months, however they are lower at an adult age (as occurs with the total GSH levels and the GR activity in thymus, as well as with the GPx and GR activities in liver). With the transition to an adult age, a reduction in the total GSH levels, TAC and in the GPx and GR activities is shown in *fa/fa* rats, which in some cases is higher than in lean rats. Moreover, the *fa/fa* rats show an alteration of the glucose homeostasis and early metabolic dysfunctions in the hepatic methylation and trans-sulfuration pathways, as well as in the cardiac tissue. Regarding the 2nd objective, results indicate that regular physical training in *fa/fa* rats do not modify NK activity and proliferative capacity of spleen leucocytes in response to LPS and PHA, but preserves this proliferative response

against an acute bout of exercise, modulating as well the release of TNF- α . On the other hand, sedentary rats exhibit an increased XO activity and a reduction of the TAC in spleen and liver when they go through acute exercise, a situation that does not occur in trained rats. Total GSH levels increased in spleen leucocytes of trained rats submitted to acute exercise. With regards to the 3rd objective, the results obtained show that obese *db/db* mice exhibit an accelerated impairment of the sensorimotor capacity (motor coordination and muscular vigor), as well as of the exploratory behaviour (horizontal and vertical activities), besides exhibiting a marked anxiety behavior. These mice are also characterized by a premature impairment of the proliferative capacity of peritoneal leucocytes in response to Con A and specially LPS mitogens, and an imbalance in the cytokines release (with deregulated levels of IL-10, reduced IL-2, and increased IL-1 β and TNF- α levels). Total GSH levels in those leucocytes are increased, mainly at young age, as well as the GPx activity in all studied ages (young, adult and mature). Finally, *db/db* mice show a shorter life span. Results of the 4th objective indicate an impairment of the NK activity and the proliferative capacity of spleen and axillary nodes leucocytes, as well as an increased plasmatic TAC in overweight Wistar rats.

In conclusion:

1.1. Zucker rats (lean and *fa/fa*) show a premature immunosenescence and a higher oxidative and inflammatory state with respect to Wistar rats strain, at an adult age (six months).

1.2. The obese *fa/fa* adult rats do not seem to exhibit a higher immune function impairment with respect to lean rats. However, *fa/fa* rats show a higher inflammatory state of splenic cells and a higher oxidation state in thymus leucocytes and in liver. Adult lean rats (*fa/+*) do not constitute an appropriate control for the immune function and oxidative state analysis in spleen.

1.3. The *fa/fa* obese young rats (two months old), show a premature immunosenescence and a proinflammatory state of spleen leucocytes, with respect to lean rats. Furthermore, these rats show an altered hepatic, cardiac and adipose metabolism.

1.4. Zucker rats experience an impairment in the leucocitary function, a higher inflammatory state and less antioxidant defences in the course from young to adult age. Moreover, these rats also show changes in the hepatic, cardiac and adipose metabolism.

2.1. A regular physical exercise training programme, based on adaptation, progression and maintenance phases regarding intensity and duration, and that ends at an adult age in *fa/fa* obese rats, seems to attenuate the immunosenescence process that these animals show regarding the lymphocytes proliferative capacity, as well as to modulate the release of TNF- α when the animal has to complete a bout physical exercise.

2.2. The physical training programme produces a suitable redox state in obese rats, which allows them to maintain a lower oxidative stress after completing the bout of exercise.

3.1. The *db/db* obese mice show a premature and accelerated behavioural impairment of the sensorimotor capacity and exploratory behaviour, as well as an early anxiety state, which suggests a premature ageing state.

3.2. The *db/db* mice show immunosenescence of the proliferative capacity of their peritoneal leucocytes, which means that is a premature immunosenescence in response to LPS. In addition, they show an early deregulation in the released cytokines by these immune cells, as well as changes in its antioxidant defences.

3.3. The heterozygotic mice (*db/+*) show a behavioural and proliferative capacity impairment of peritoneal leucocytes, as well as an inflammatory state of these cells, that, in general, is similar to the one show by homozygotic *db/db* mice. Therefore, these heterozygotic animales cannot be considered appropriate controls.

3.4. The *db/db* mice show a lower life span than its controls (*db/+*) and wild type, so obesity can be proposed as a premature ageing state.

4. A hypercaloric diet, with a 25,5% of fat is able to generate a state of overweight in adult Wistar rats, which show a premature immunosenescence in the “Natural Killer” activity and the proliferative capacity of leucocytes from spleen and axillary nodes.

As a general conclusion, due to the premature behavioural and immune function impairment and the inflammation and oxidative states found in obese experimental animal models, and specially due to the shorter life span that has been detected in the *db/db* mice, obesity can proposed as a premature ageing state.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO

1.1.1. Definición del envejecimiento. Longevidad media y máxima

El envejecimiento se considera como un proceso de cambios biológicos que acontecen con el paso de los años asociados a un descenso lineal y mantenido de la capacidad máxima de las funciones biológicas. (Strehler 1977) definió el envejecimiento atendiendo a cuatro principios básicos: 1) es universal, es decir, ocurre en todos los individuos de todas las especies; 2) es progresivo, ya que tiene lugar de forma gradual en el tiempo; 3) es intrínseco, al tener un origen interno, y 4) es un proceso deletéreo, pues se produce una disminución de la capacidad funcional del individuo.

La manifestación principal del proceso de envejecimiento es el deterioro orgánico generalizado y la pérdida progresiva de funciones a cualquier nivel de organización biológica, desde el molecular al poblacional (Miquel, Economos et al. 1980) (Miquel 1984) (Miquel 1986), que conduce en último término a la muerte cuando la capacidad del organismo para mantener su homeostasis se ve sobrepasada por la intensidad de los procesos y mecanismos desestabilizadores. Por tanto, la característica común del envejecimiento fisiológico es una disminución progresiva de la capacidad homeostática que se manifiesta como una menor capacidad de reacción frente a las perturbaciones ambientales internas o externas como situaciones de estrés físico o psicológico (Pedersen, Wan et al. 2001).

El envejecimiento se inicia en la edad adulta y su duración constituye la longevidad de cada individuo, al finalizar con la muerte del mismo. Esto representa la longevidad media, también conocida como esperanza de vida media, y que se define como la edad que, como media, alcanzan los individuos de una población, que han nacido en la misma fecha. En las últimas décadas la mejoría de las condiciones nutricionales además de higiénico-sanitarias en los países desarrollados, ha supuesto una mejor calidad de vida y ha conducido a un aumento significativo de la esperanza de

vida media de la población (Troen 2003). Por este motivo, uno de los retos más importantes de los gerontólogos consiste en averiguar cómo se producen los procesos de envejecimiento, cuáles son sus consecuencias y qué tipo de intervenciones pueden lograr aumentar la esperanza de vida media a través de un enlentecimiento de la aparición del deterioro fisiológico característico de la vejez.

La esperanza de vida máxima, es decir, el número máximo de años que pueden vivir los individuos de una determinada especie (120 años en la especie humana), no puede modificarse, sino que es específica de cada especie y en ella interviene de manera importante un componente genético (Troen 2003). Así, determinados estudios biodemográficos predicen que la eliminación de las principales causas de mortalidad (como son los procesos de cáncer, las enfermedades cardiovasculares, etc.) añadiría no más de 10 años a la esperanza de vida media en humanos, mientras que la esperanza de vida máxima no se vería modificada (Roush 1996). Esto implica que existe un límite para la esperanza de vida máxima.

1.1.2. La edad biológica

Una de las principales características del envejecimiento es su heterogeneidad, ya que hay procesos que mantienen su capacidad funcional hasta los 80-90 años, mientras que otros se alteran en edades mucho más tempranas (Semsei 2000). Así, existe una diferente tasa de envejecimiento en los distintos órganos y tejidos de un individuo. Este hecho también sucede entre los individuos de una población de la misma especie con igual edad cronológica, puesto que no todos ellos presentan la misma tasa de envejecimiento. Esto ha dado lugar al concepto de edad biológica, que hace referencia a la velocidad a la que envejece cada individuo, esto es, la edad fisiológica, sin considerar los procesos patológicos (Borkan and Norris 1980) (Soler and Miquel 2009).

La edad biológica es un concepto funcional que depende de un amplio número de variables fisiológicas, bioquímicas y psicológicas condicionadas por la herencia y el medio ambiente (McFarland 1953). Dicho concepto parece más fiable como índice de salud y rendimiento físico y mental que la edad cronológica, dada la gran variación

interindividual que acompaña al proceso de envejecimiento (Shock 1979). En este sentido, la Gerontología Experimental confirma que individuos con la misma edad cronológica (tanto humanos como animales) pueden diferir en el grado de preservación de sus funciones biológicas. El problema que presenta la edad biológica es cómo medirla, lo que no resulta tan sencillo como en el caso de la edad cronológica. Toda una serie de investigaciones han sido llevadas a cabo para determinar parámetros fisiológicos, bioquímicos y psicológicos que lo permitan. Una de las investigaciones más completas en este sentido fue el estudio longitudinal realizado por (Borkan and Norris 1980), el cual puso de manifiesto que los sujetos que presentaban ciertos parámetros más envejecidos que la mayoría de individuos de su misma edad cronológica, tenían menor esperanza de vida. No obstante, ni en dicho estudio ni en la mayoría de investigaciones acerca de la edad biológica se han considerado los parámetros inmunitarios. En la actualidad las funciones inmunitarias parecen ser esenciales y muy representativas de la verdadera edad biológica de un individuo. Así, varios estudios más recientes han demostrado una correlación positiva entre la longevidad y el mantenimiento de una adecuada funcionalidad de las células T, las “Natural Killer” y las fagocíticas (Ogata, Yokose et al. 1997) (De la Fuente 2002) (Guayerbas and De la Fuente 2003) (De la Fuente and Miquel 2009) (De la Fuente 2014 (a)).

1.1.3. Teorías del envejecimiento

Uno de los principales retos para los gerontólogos consiste en ser capaces de discernir entre las causas del envejecimiento y sus efectos en sistemas tan complejos como los organismos vivos. Con cada descubrimiento relevante en el campo de la biología molecular o celular han ido apareciendo nuevas teorías del envejecimiento o se han ido modificando las ya existentes. De hecho, muchas de las teorías aceptadas actualmente que tratan de explicar el envejecimiento se complementan mutuamente.

Para dar respuesta al cómo, el dónde y el porqué del envejecimiento se han descrito más de 300 teorías, de acuerdo a la revisión de Medvedev (Medvedev 1990), número que ha ido aumentando desde entonces (Miquel 2009). Estas teorías que se

pueden agrupar bajo dos enunciados: teorías del envejecimiento genéticamente programado y teorías del envejecimiento por acumulación de daño o epigenéticas.

1.1.3.1. Envejecimiento genéticamente programado

Estas teorías proponen que el envejecimiento es el resultado de un programa genético predeterminado que controla el crecimiento, el desarrollo y la senescencia de los organismos (Kanungo 1975). Este control genético del envejecimiento es apoyado por numerosas evidencias, como son las observaciones de que los descendientes de padres longevos viven más que aquellos cuyos padres tuvieron una longevidad menor (Lansing 1959), y la coincidencia en la edad de la muerte de gemelos monocigóticos (Kallman 1959). En este apartado se incluyen distintas teorías, y a continuación se van a mencionar algunas de las más conocidas.

La teoría del límite mitótico (Hayflick 1980) proponía que la pérdida de la capacidad mitótica es idéntica al envejecimiento celular. La teoría del acortamiento de los telómeros, basada en la misma idea, fue inicialmente propuesta por Harley y sus colaboradores (Harley, Futcher et al. 1990), según la cual la célula en cada división pierde una determinada cantidad de ADN telomérico, lo que conduce a la senescencia celular, sugiriendo este hecho que se requiere una cierta longitud telomérica que actuaría como reloj mitótico (Vaziri and Benchimol 1996). Otros gerontólogos moleculares postulan que la causa fundamental del envejecimiento debe residir en lesiones del ADN tanto mitocondrial como nuclear (Cutler 1986) (Monnier, Sell et al. 1991) (Oliva, Muñiz et al. 1997).

La mayoría de estas teorías han sido cuestionadas. Así, Strehler indicó que el envejecimiento no podía deberse a un límite de divisiones, dado que existen células que apenas se dividen (Strehler 1977). Actualmente, no existen evidencias de la existencia de genes específicos inductores del envejecimiento, a pesar de que sí existen genes que tienen una influencia indirecta sobre la longevidad y que se denominan gerontogenes (Rattan 1995).

1.1.3.2. Envejecimiento por acumulación de daño

Sin dejar a un lado el papel fundamental que juega la herencia en el proceso de envejecimiento, estas teorías se basan en la influencia de otros factores tanto endógenos como exógenos, de modo que el envejecimiento sería el resultado de una serie de eventos que ocurren al azar o de forma estocástica, es decir, no están guiados por ningún programa (Hayflick 2007). De forma general, se asume que con el tiempo tiene lugar una acumulación progresiva de daño debida a una menor eficacia de los sistemas de mantenimiento y reparación. El daño puede establecerse en cualquier macromolécula que no cumpla su función con la máxima eficacia, así como en cualquier nivel de organización (genes, células, orgánulos celulares, procesos fisiológicos, etc.).

La teoría del error catastrófico propuesta por (Orgel 1963) sugiere que el envejecimiento está ligado a errores en la transcripción de ARN y en su traducción a proteínas, lo cual conduciría a una acumulación de proteínas alteradas y no funcionales. La glicosilación de los ácidos nucleicos y de las proteínas se propone como base de muchos procesos que acontecen en el envejecimiento (Cerami 1985). Además, las uniones covalentes o por puentes de hidrógeno de dos o más moléculas también son propuestas como causantes de los cambios que ocurren con la edad (Bjorkstein 1974). Otros investigadores apuntan a la desorganización de las membranas celulares y subcelulares como un hecho importante en el envejecimiento (Zs-Nagy 1974). El mecanismo responsable sería la peroxidación de los ácidos grasos insaturados, con los consiguientes cambios en la permeabilidad, función e integridad de la membrana.

Otra serie de teorías del envejecimiento incluidas en este apartado hacen referencia a los sistemas fisiológicos, especialmente a los homeostáticos, como el sistema nervioso, el endocrino, y el inmunitario, dada la importancia que tienen dichos sistemas en la regulación de todos los procesos fisiológicos (Strehler 2000). Debido a que el sistema neuroendocrino regula el desarrollo temprano, el crecimiento, la pubertad, el sistema reproductor, el metabolismo y muchos otros aspectos de la fisiología normal del individuo, los cambios en este sistema provocarían efectos en todo el organismo (Troen 2003). De este modo, la teoría neuroendocrina del envejecimiento (Frolkis 1982) (Meites, Goya et al. 1986) se apoya en diferentes experimentos que

revelan que, cuando se provoca alguna alteración a nivel hormonal o nervioso en los animales de experimentación, la desregulación que tiene lugar en el sistema neuroendocrino provoca que la esperanza de vida media de estos animales se reduzca. Este hecho se ha comprobado en ratones hipofisectomizados, mientras que si esta intervención estaba seguida de una terapia de reemplazo hormonal, se conseguía que estos roedores mantuvieran una esperanza de vida media similar a la de los controles (Denckla 1975). De la misma manera, se ha observado en ratas con una corta esperanza de vida media que la transmisión dopaminérgica cerebral estaba reducida en sus neuronas (Gilad and Gilad 1987) y que la levodopa, una droga dopaminérgica, puede prolongar la esperanza de vida media restaurando esta transmisión. Sin embargo, muchos organismos que sufren procesos de envejecimiento similares a los de vertebrados superiores no poseen sistemas neuroendocrinos como tales. Por tanto, los cambios que ocurren en este sistema podrían deberse a las alteraciones celulares relacionadas con la edad, es decir, serían manifestaciones secundarias del proceso de envejecimiento.

También existen teorías que implican al sistema inmunitario en el proceso de envejecimiento (Walford 1969) (Burnet 1970). Y es que con la edad, como se comentará en detalle más adelante, hay una menor respuesta funcional de células T, además de un desequilibrio en las subpoblaciones de células T a favor de los linfocitos T de memoria, mientras que disminuye la proporción de linfocitos T vírgenes, así como una reducida resistencia a enfermedades infecciosas (Miller 1996). La inmunidad humoral (mediada por células B) también se deteriora con la edad (Troen 2003). Por otro lado, es sabido que las enfermedades autoinmunes aumentan al envejecer, así como el número de autoanticuerpos en suero (Walford 1974). No obstante, aunque el sistema inmunitario juega un papel central en el mantenimiento de la salud y la supervivencia del individuo, muchos organismos que comparten procesos de envejecimiento con organismos superiores carecen de sistemas inmunitarios complejos y bien definidos. Por tanto, la idea de que el deterioro de este sistema es la causa del envejecimiento es difícil de mantener (De la Fuente and Miquel 2009).

Además, en base a la comunicación existente entre el sistema neuroendocrino y el inmunitario, se propuso otra teoría basada en la idea de que las alteraciones que en esta comunicación se producen con el paso del tiempo, serían las responsables de la mayoría de las disfunciones asociadas al envejecimiento (Fabris 1991).

Estas teorías neuroendocrina, inmunitaria y neuroinmunoendocrina no explican cómo tiene lugar el proceso de envejecimiento, dado que animales que carecen de sistema neuroendocrino o inmunitario claramente definido también sufren los procesos de envejecimiento. Sin embargo, el deterioro de las células constituyentes de estos sistemas sí puede servir como indicador de la velocidad a la que un organismo que posea bien constituidos estos sistemas está envejeciendo, como en el caso de los mamíferos (ratones, ratas o humanos, por ejemplo), y permite relacionar su estado con la longevidad media.

Una de las teorías que goza de una mayor aceptación entre los gerontólogos es la teoría de los “Radicales Libres”, propuesta por (Harman 1956) y que posteriormente se ha perfilado por éste y otros autores ((Harman 1972), (Miquel, Economos et al. 1980), (Miquel 1992), (Barja 2004 (a)) (Barja 2013). El concepto fundamental en que se basa esta teoría epigenética es que el uso del oxígeno por parte de las células de los organismos aerobios tiene como consecuencia la aparición de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (conocidas con el acrónimo anglosajón “ROS”, referente a *Reactive Oxygen Species*) que son altamente reactivos e inestables y que producen daño a biomoléculas. Así, la pérdida de funcionalidad de los sistemas fisiológicos que se observa a lo largo de la edad se debe a la acumulación progresiva e irreversible del daño oxidativo a nivel molecular.

Esta teoría se apoya en una serie de hechos, recogidos en otras teorías del envejecimiento, entre los que destacan: la relación inversa entre la longevidad máxima y la tasa de metabolismo basal; la acumulación de gránulos de lipofucsina, que es un producto terminal de la peroxidación lipídica, en diversos tejidos; la aparición de enfermedades en la vejez en cuya patofisiología se encuentran implicados los radicales libres, como son el Alzheimer o la aterosclerosis; el efecto beneficioso de la restricción calórica sobre la longevidad, debido a una disminución en la tasa de producción de ROS; y la relación entre la vida media y el estado de oxidación del individuo

(considerando tanto los niveles de oxidantes como los de antioxidantes y enzimas de su metabolismo) (De la Fuente and Miquel 2009).

Debido a que el oxígeno se emplea principalmente en la respiración que permite el mantenimiento de los procesos metabólicos, dentro del contexto de la teoría de los radicales libres, Miquel y sus colaboradores propusieron en 1980 que la mitocondria, y más específicamente el ADN mitocondrial (ADN_{mt}), constituyen la principales dianas de la oxidación llevada a cabo por las ROS, debido a su tan cercana localización al principal lugar de producción de éstos: la membrana interna mitocondrial. Esta es la base principal de la teoría mitocondrial del envejecimiento, que durante los años ochenta Miquel y su grupo confirmaron y perfilaron (Miquel, Economos et al. 1980) (Economos, Miquel et al. 1980) (Fleming, Miquel et al. 1982), lo que vendría a completar la teoría de Harman en su forma original. Esta teoría mitocondrial confirmada también por otros investigadores (Harman 1972) (Barja 1999) (Sastre, Pallardo et al. 2000 (a)) (Sastre, Pallardo et al. 2000 (b)) (Salvioli, Bonafé et al. 2001), propone que el daño oxidativo al genoma mitocondrial permitiría que, en esta organela, se perdiera la capacidad de regenerar las proteínas hidrofóbicas de la membrana interna, que son esenciales para la función respiratoria y la producción de ATP. Así, se puede explicar mejor el carácter irreversible de las lesiones peroxidativas ligadas a la respiración mitocondrial, y la teoría de los radicales libres se vuelve más plausible para los gerontólogos moleculares que opinan que la causa del envejecimiento debe estar en una lesión del ADN mitocondrial (Fleming, Miquel et al. 1982) (Miquel and Fleming 1983). Este hecho tendría lugar en las células postmitóticas, que siendo diferenciadas y no poseyendo apenas capacidad mitótica, no permitirían la regeneración de las mitocondrias dañadas, lo que conduciría a que todas las células perdieran su capacidad bioenergética y, consecuentemente, su funcionalidad (Miquel 1992) (Miquel, de Juan et al. 1992) (Miquel 1998). Esta teoría fue posteriormente desarrollada y ampliada por otros investigadores (Sastre, Pallardo et al. 2000 (a)) (Sastre, Pallardo et al. 2000 (b)) (Barja 2002 (a)) (Barja 2002 (b)) (Viña, Sastre et al. 2003) (Barja 2004 (a)) (Barja 2004 (b)) (Sanz, Caro et al. 2005) (Wallace 2005) (Barja 2013). Un hecho que apoya la relevancia de esta teoría ha sido la observación de que la producción mitocondrial de ROS (con el consecuente daño al ADN_{mt}) no es constante entre las distintas especies animales, es más, se correlaciona inversamente con la longevidad máxima de éstas

(Barja and Herrero 2000). Esta característica, junto con la baja proporción de ácidos grasos insaturados encontrada en los animales de mayor longevidad, sugiere que la producción de ROS no es simplemente un subproducto de la respiración mitocondrial, sino que existe una conexión entre el estrés oxidativo y la tasa endógena de envejecimiento en las diferentes especies animales (Barja 2004 (b)).

También se ha corroborado que los defectos en la respiración mitocondrial que acontecen con la edad ocurren no sólo en los tejidos de individuos sanos (Trounce, Byrne et al. 1989), sino también en los de aquellos que padecen enfermedades en cuya patofisiología se encuentran implicados los radicales libres y cuyos síntomas aumentan con el envejecimiento, como son el Parkinson (Schapira, Cooper et al. 1990) (Schapira, Mann et al. 1990), el Corea de Huntington (Beal 1994), el Alzheimer (Hoyer 1986) (Sims, Finegan et al. 1987) y la aterosclerosis (Halliwell and Gutteridge 1989). Por otro lado, se ha corroborado que los efectos deletéreos del proceso de envejecimiento se manifiestan en mayor medida en las células y tejidos postmitóticos, los cuales se ven irreversiblemente dañados ya que no son capaces de reponer mediante mitosis el número de células intactas que se necesitarían para continuar llevando a cabo las funciones fisiológicas de ese tejido (Miquel 1991).

Posteriormente se han propuesto otras teorías del envejecimiento, relacionadas con lo que se acaba de comentar. Así, dado que al envejecer tiene lugar un proceso de inflamación, se acuñó el término “inflamm-aging” (Chung, Sung et al. 2006) (De Martinis, Franceschi et al. 2006) (Franceschi 2007). Más recientemente se ha propuesto la teoría de oxidación-inflamación (De la Fuente, Hernanz et al. 2005) (De la Fuente 2008 (a)) (De la Fuente and Miquel 2009) (De la Fuente 2014 (a)). En ella se sugiere que el envejecimiento está ligado al estrés oxidativo crónico que afecta a todas las células del organismo, pero particularmente a aquellas de los sistemas nervioso, endocrino e inmunitario. Son precisamente estos sistemas los que muestran un mayor daño oxidativo con el envejecimiento y, siendo incapaces de preservar el correcto balance redox, sufrirían pérdidas funcionales incompatibles con la adecuada preservación de la homeostasis, dando lugar por tanto a un aumento en la morbilidad y mortalidad características de edades avanzadas. Esta teoría propone un papel central del

sistema inmunológico, no como base del envejecimiento, sino como mecanismo que modifica la tasa a la que éste se produce. Según ésta, la inflamación y la oxidación, dos procesos íntimamente relacionados (Vida, González et al. 2014), y que acontecen principalmente en las células inmunitarias mal reguladas, jugarían un papel fundamental no solo en la inmunosenescencia, sino que también contribuirían de forma determinante al aumento del estrés inflamatorio y oxidativo del organismo, y a la pérdida de la homeostasis corporal y de la salud, acelerando el proceso de envejecimiento. Así, la participación del sistema inmunitario en el concepto de “inflamm-aging” (Franceschi 2007), ha sido ampliada acuñándose el de “oxi-inflamm-aging”, haciendo referencia también al importante papel que juegan los leucocitos en la oxidación que se produce con la edad (De la Fuente and Miquel 2009).

A pesar del gran número de teorías existentes, el envejecimiento no puede ser explicado por una causa simple y, por lo tanto, ninguna teoría por sí sola puede dar una explicación completa a nivel molecular, celular y fisiológico, a la degeneración que tiene lugar con el paso del tiempo. En un intento de dar respuesta a las tres preguntas básicas de la gerontología: el cómo, el dónde y el porqué del envejecimiento, se puede proponer que el cómo, se debe a la oxidación, el dónde, comienza en las mitocondrias de las células post-mitóticas y respecto al porqué, utilizando conceptos de teorías evolucionistas del envejecimiento como la de Williams, se propone que el proceso de envejecimiento es consecuencia de mantener el número apropiado de individuos en cada especie (Miquel 2009) (De la Fuente and Miquel 2009).

1.2. EL ESTRÉS OXIDATIVO E INFLAMATORIO

El correcto funcionamiento del organismo se basa en un perfecto equilibrio entre los niveles de radicales libres, ROS y compuestos inflamatorios que se generan, así como de las defensas antioxidantes y anti-inflamatorias de las cuales se disponen para neutralizarlos. Es la pérdida de este equilibrio, por un exceso en la producción de los primeros o por una menor disponibilidad o control de los segundos, lo que conduce a lo que se conoce como estrés oxidativo y estrés inflamatorio. Esto es lo que subyace a la

velocidad de envejecimiento y a la enfermedad. En el organismo, al envejecer, se produce un aumento en los niveles de ROS y compuestos inflamatorios, y una menor presencia y acción de las defensas antioxidantes y anti-inflamatorias, siendo esta situación de estrés oxidativo e inflamatorio lo que lleva al daño en las biomoléculas y a la consecuente falta de función celular (De la Fuente 2007) (De la Fuente and Miquel 2009).

1.2.1. Los radicales libres: producción, efectos y oxidación

Para los organismos aerobios el oxígeno es vital para la existencia y a la vez irremediablemente lesivo. La paradoja del oxígeno deriva de su misma naturaleza química, puesto que su elevada capacidad para aceptar electrones (e^-) lo convierte en un poderoso agente oxidante. Así, la molécula de oxígeno, por su carácter de bi-radical, puede ser reducido por cuatro transferencias sucesivas de un electrón, catalizadas por la citocromo oxidasa al final de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, en un proceso que se denomina “reducción univalente del oxígeno”. En esta vía se generan intermediarios reactivos. El primero, resultante de la reducción con un electrón del oxígeno molecular, es el radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$). La adición de un segundo electrón y dos protones genera la especie reactiva de oxígeno peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Un tercer electrón produce el radical hidroxilo ($\bullet OH$), que posee una elevada reactividad. Finalmente, el cuarto producto de la reducción del oxígeno es el agua (figura 1).

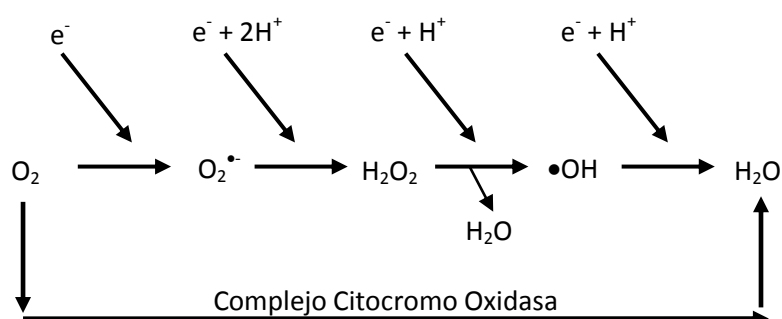


Figura 1. Vía univalente de reducción del oxígeno. Formación de especies reactivas de oxígeno por adición de electrones al oxígeno molecular.

Dos de los intermediarios, el $O_2^{\bullet-}$ y el $\bullet OH$, son radicales libres. El $O_2^{\bullet-}$ se disocia a pH fisiológico y se carga como un anión. El radical anión superóxido resultante es bastante poco reactivo y en medios biológicos se comporta como un agente reductor débil, reduciendo el hierro de la ferritina, del citocromo C y de la citocromo oxidasa. Además, como anión su permeabilidad para atravesar membranas es muy reducida (excepto en los eritrocitos, que poseen un sistema especial de transporte de $O_2^{\bullet-}$). El H_2O_2 , es una especie reactiva de oxígeno, pero no es un radical (ya que todos los electrones de su orbital externo se encuentran apareados) y es químicamente estable; sin embargo, puede servir como precursor de ellos, ya que en sistemas biológicos puede romperse homolíticamente por acción de metales de transición tales como el Fe^{2+} y el Cu^+ , para liberar $\bullet OH$. Se produce intracelularmente por los peroxisomas y la mitocondria y puede difundirse al interior de las células desde el espacio extracelular. Se genera en grandes cantidades a partir de células especializadas durante la inflamación. El $\bullet OH$ es un radical, el más reactivo de todos. Finalmente, hay que mencionar el oxígeno singlete ($^1O_2$), que no se genera por reacciones redox sino por absorción de energía electromagnética, la cual invierte transitoriamente el giro de uno de los dos electrones desapareados del oxígeno y lo convierte en una molécula muy inestable y altamente oxidante frente a otras biomoléculas (Cascales 1999).

La reactividad y la vida media de las ROS difieren considerablemente (de 10^{-5} a 10^{-9} seg) (Pryor 1986). Algunas son lo suficientemente estables como para difundir a cierta distancia, mientras que otras como el $\bullet OH$ son tan reactivas que reaccionan en el lugar de formación. En general, se puede afirmar que los radicales libres iniciales producen efectos locales, y los radicales secundarios, así como los productos de degradación originados por los mismos, pueden ejercer sus efectos en lugares distantes de donde se formó el primer radical.

1.2.1.1. Fuentes de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Las fuentes de ROS son muy variadas. Pueden ser tanto endógenas, producidas por el propio organismo (fundamentalmente en la cadena respiratoria mitocondrial y los leucocitos activados), como exógenas, esto es, medioambientales (diversas radiaciones y contaminantes).

● Fuentes endógenas de ROS

A nivel subcelular, la mitocondria (orgánulo que se encuentra presente en todas las células aeróbicas), y en concreto la cadena de transporte de electrones mitocondrial, constituye la fuente más importante de especies reactivas de oxígeno como el $O_2^{\bullet-}$ (Cino and Del Maestro 1989). La cantidad de $O_2^{\bullet-}$ producido en la mitocondria se ve incrementada cuando la concentración de oxígeno aumenta o la cadena respiratoria se encuentra en su mayor parte reducida (McCord 1993). Se estima que entre un 1-2% del oxígeno consumido por la mitocondria es transformado en especies reactivas.

Otros orgánulos subcelulares son también capaces de generar ROS, como el retículo endoplásmico (debido a las reacciones producidas por la enzima citocromo P-450 para la metabolización de compuestos xenobióticos y la detoxificación de dosis agudas de toxinas, lo que genera la aparición de $O_2^{\bullet-}$) (Paolini, Perocco et al. 2004) y los peroxisomas (Nikalakantan, Spear et al. 1998). Por otro lado, determinadas enzimas presentes en el citosol producen también $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 , como la xantina oxidasa (enzima clave en el metabolismo de las purinas que cataliza la conversión de la hipoxantina en xantina y finalmente en ácido úrico) (Borges, Fernandes et al. 2002) y la ciclooxygenasa (implicada en el metabolismo del ácido araquidónico) (Feng, Xia et al. 1995).

A nivel celular, las ROS no son solo producidas como agentes citotóxicos, sino también como subproductos de las reacciones de transferencia electrónica, necesarios para muchos procesos funcionales. Así, por ejemplo, las células del sistema inmunitario son uno de los tipos celulares en los que la producción de ROS es una consecuencia clave de la activación y funcionamiento normal de éstas. Y es que los fagocitos como macrófagos y neutrófilos ejercen una función defensiva eliminando patógenos, para lo cual utilizan una mezcla de ROS (Robinson and Badwey 1994) en un proceso conocido como “estallido respiratorio”. En la actividad citotóxica llevada a cabo por las células NK también se liberan grandes cantidades de ROS, al igual que en los linfocitos, en los que juegan un importante papel en la señalización intracelular (Higuchi and Nagahata 1998) (Suzuki and Ono 1999).

Finalmente, hay que citar el proceso de generación accidental de ROS, que incluye las llamadas “reacciones de autooxidación”, normalmente catalizadas por iones de metales de transición en las que compuestos como las catecolaminas, el ácido ascórbico y las flavinas reducidas podrían reaccionar con el oxígeno para generar superóxido (Fridovich 1989) (McCord 1993).

● Fuentes exógenas de ROS

Las ROS también pueden ser producidas por factores exógenos, en su mayoría contaminantes de tipo ambiental. El principal ejemplo es la radiación ionizante, cuyos efectos se agravan en presencia de oxígeno, y provocan la formación de $\bullet\text{OH}$ a partir de la radiolisis del agua (Halliwell and Gutteridge 1999) (Halliwell and Gutteridge 1999). Por su parte, la exposición de la piel a los rayos ultravioleta UVA (320-400 nm) o UVB (290-320 nm) da lugar a la formación de ROS tales como el anión superóxido, el radical hidroxilo, el oxígeno singlete y peróxidos lipídicos (Sakurai, Yasui et al. 2005) (Marrot, Jones et al. 2008). Los metales constituyen también fuentes de ROS debido a su capacidad de perder electrones, por lo que la exposición a altas concentraciones de cualquier metal pesado podría resultar en la aparición de daño oxidativo (Halliwell and Gutteridge 1999). Asimismo, se pueden mencionar como fuentes exógenas de radicales libres los pesticidas (como el Paraquat), los hidrocarburos aromáticos policíclicos y los compuestos halogenados (Limon-Pacheco and Gonsebatt 2009). Por último, el ozono presente en el aire es también capaz de reaccionar con moléculas biológicas produciendo radicales libres (Pryor, Prier et al. 1983).

1.2.1.2. Efecto de los radicales libres: reacciones de oxidación

La presencia de gran cantidad de sustancias de carácter antioxidante en las células de los tejidos, procedentes tanto de fuentes endógenas como exógenas, ayuda a controlar el estrés oxidativo *in vivo*. Sin embargo, la neutralización y eliminación de los radicales de oxígeno por parte de los antioxidantes no es un mecanismo eficiente al 100%, con lo que aparece un cierto nivel de daño oxidativo que afecta a todos los tipos de macromoléculas biológicas: tanto a los lípidos (Abuja and Albertini 2001) (Remita 2001) como a las proteínas (Schacter 2000) (Linton, Davies et al. 2001) y al ADN (Box, Dawidzik et al. 2001) (Chatgililoglu and O'Neill 2001), habiéndose encontrado una

asociación entre el proceso de envejecimiento y un aumento en el daño que las ROS producen en las macromoléculas en una gran variedad de tejidos (Sohal and Weindruch 1996) (Beckman and Ames 1998) (Grune and Davies 2001), como ya ha sido comentado. Más concretamente, son los tejidos compuestos por células postmitóticas, tales como el cerebro y el corazón, aquellos que tienden a acumular mayores cantidades de daño con respecto a aquellos tejidos constituidos por células premitóticas (Sohal, Agarwal et al. 1994) (Sohal and Weindruch 1996).

No obstante, el daño oxidativo no se limita al ataque directo de las ROS, sino que también tienen lugar reacciones cruzadas entre productos de peroxidación de diferentes macromoléculas. Esto se produce con especial frecuencia en el caso de la peroxidación lipídica, que puede llevar finalmente a daño en las proteínas o en el ADN (Marnett 2000) (Blair 2001).

● Daño peroxidativo a lípidos

Los procesos de degradación de lípidos fueron los primeros que se detectaron como consecuencia del daño producido por los radicales libres. Dichos procesos afectan a los lípidos de membrana (tanto plasmática como de los orgánulos intracelulares) y en muchos casos también a las proteínas de membrana plasmática.

La peroxidación lipídica conlleva una serie de reacciones intramoleculares y de descomposición que dan lugar a la formación de endoperóxidos cíclicos y aldehídos insaturados. Estos últimos son reactivos y pueden actuar como agentes mutágenos (Marnett, Hurd et al. 1985) o inactivando diversas enzimas (Szweda, Uchida et al. 1993). Asimismo, dicha peroxidación provoca un aumento en la viscosidad de las membranas, una fragmentación de los ácidos grasos (con la consiguiente aparición de productos de degradación como el Malondialdehído o MDA) y una disminución de su resistencia eléctrica, facilitándose en consecuencia el intercambio entre las dos monocapas, con lo que aumentan los entrecruzamientos con proteínas y se produce la disminución de la movilidad lateral y rotacional de las mismas (Chen and Yu 1994).

Estudios recientes empleando técnicas de cromatografía líquida de alta resolución han demostrado un aumento en los niveles de peroxidación lipídica con la

edad, tanto en humanos (Miyazawa, Suzuki et al. 1996) (Kinoshita, Oikawa et al. 2000) como en roedores (Tahara, Matsuo et al. 2001) (Alvarado, Álvarez et al. 2005).

● Daño peroxidativo a proteínas

La oxidación de las proteínas es un proceso que está menos caracterizado que el de las otras macromoléculas. Las principales modificaciones oxidativas que sufren las proteínas incluyen la oxidación de grupos sulfhidrilo, las reacciones con aldehídos, los entrecruzamientos proteína-proteína y la fragmentación peptídica (Stadtman and Berlett 1997) (Stadtman and Levine 2000). Cuando la proteína dañada es una enzima, generalmente tiene lugar una pérdida de su actividad, convirtiéndola en una forma altamente susceptible de sufrir degradación proteolítica por parte de proteasas citosólicas (Davies 1987) (Davies and Delsignore 1987) (Davies, Delsignore et al. 1987).

El daño oxidativo a proteínas aumenta con el envejecimiento (Merker, Stolzing et al. 2001). Esto se ha comprobado en una gran variedad de células y tejidos, incluyendo fibroblastos (Oliver, Ahn et al. 1987), cerebro (Carney, Starke-Reed et al. 1991) (Smith, Carney et al. 1991), hígado (Starke-Reed and Oliver 1989), músculo esquelético (Mecocci, Fano et al. 1999) y corazón (Leeuwenburgh, Wagner et al. 1997).

● Daño peroxidativo al ADN

El efecto más deletéreo del ataque oxidativo de los radicales libres se produce en el ADN, cuyo sistema de reparación es mucho más complejo que el del resto de las macromoléculas, lo que da lugar a la generación de mutaciones y alteraciones genómicas. Se considera como daño al ADN a todas aquellas modificaciones que alteran sus propiedades codificadoras o su normal replicación y transcripción, tales como: deleciones, translocaciones, descenso en las metilaciones, aparición de puentes cruzados entre cadenas de ADN o entre ADN y proteínas, fragmentaciones, roturas simples o dobles de la cadena y modificación de las bases (Bohr and Anson 1995) (Box, Dawidzik et al. 2001).

Al igual que sucede en los lípidos y en las proteínas, el radical hidroxilo es el iniciador más importante del daño al ADN. El H_2O_2 y el $\text{O}_2^{\bullet-}$ no son capaces de dañarlo directamente, sino de forma indirecta por reacciones con metales de transición. A pesar de ello, el H_2O_2 desempeña un papel importante en el daño al ADN nuclear, ya que al ser una molécula sin carga es capaz de atravesar las membranas y difundir desde su lugar de generación hasta el núcleo, reaccionando allí con los metales asociados a la cromatina (como el cobre) y provocando la aparición de radicales (Altman, Zastawny et al. 1995).

Tanto el ADN nuclear como el mitocondrial son susceptibles de sufrir el ataque por radicales libres, aunque el daño al ADN mitocondrial se considera más importante a la hora de determinar la longevidad máxima de las especies (Barja, Cadenas et al. 1994). Y es que este último sufre un daño más intenso debido en gran parte a su localización cerca del principal lugar de producción de radicales, la cadena respiratoria mitocondrial. Pero además de las diferencias en cuanto a su localización, el ADN_{mt} contiene una mayor densidad de información que el ADN nuclear y no presenta intrones, por lo que cualquier alteración afectará siempre a información codificante funcional. El hecho de que además no presente histonas que lo protejan (Richter 1995) y tenga una menor tasa de recambio le lleva en última instancia a tener una tasa de mutación mucho más elevada que la del ADN nuclear (Barja 2004 (b)). Y dado que la información codificada en el ADN_{mt} es esencial para el buen funcionamiento de la cadena de transporte electrónico en esta organela, la presencia de mutaciones o daños podría dar lugar a una alteración en la cadena respiratoria, lo que conllevaría un incremento en la producción de radicales y se generaría así un círculo vicioso (Bandy and Davison 1990).

Con el envejecimiento se ha detectado un incremento, tanto en humanos como en roedores, en el daño al ADN nuclear y mitocondrial en cerebro, hígado, corazón y macrófagos peritoneales (Sohal, Agarwal et al. 1994) (Sohal, Agarwal et al. 1995) (Kaneko, Tahara et al. 1996) (Lezza, Mecocci et al. 1999) (Herrero and Barja 2001) (De la Fuente, Hernanz et al. 2004). Este aumento en el daño al ADN también se ha descrito

en leucocitos peritoneales de ratón en un modelo de envejecimiento prematuro (De la Fuente, Hernanz et al. 2004) (Alvarado, Álvarez et al. 2006).

1.2.2. Las defensas antioxidantes: respuesta celular a la agresión oxidativa

En los organismos aerobios, tal y como se ha expuesto anteriormente, una de las mayores amenazas internas de la homeostasis celular surge de los intermediarios reactivos generados en el propio metabolismo del oxígeno. Para protegerse de esta toxicidad y asegurar su supervivencia, estos organismos han evolucionado desarrollando una serie de mecanismos para eliminar el exceso de los efectos de los subproductos derivados del oxígeno, que se conocen como “Sistemas de defensa antioxidante” y que impiden la formación de radicales o neutralizan a los mismos una vez generados. No obstante, estos sistemas defensivos no son infalibles, y cuando la producción de ROS supera la de las defensas antioxidantes se produce un estrés oxidativo con el consecuente daño celular (Fusco, Colloca et al. 2007).

Para conseguir un mayor grado de efectividad las defensas antioxidantes pueden, a su vez, actuar de manera concertada con los sistemas celulares de reparación y de recambio dedicados a restaurar las moléculas alteradas por la oxidación. Por ejemplo, las proteínas oxidadas son degradadas por el sistema lisosomal y preferentemente a través del proteasoma 20S (Szweda, Friguet et al. 2002).

Los sistemas antioxidantes pueden clasificarse según su origen en endógenos o exógenos. Los endógenos se encuentran en nuestras células para salvaguardar la existencia de unos niveles de ROS necesarios para el funcionamiento corporal, evitando la superproducción o acumulo de los mismos, como sucede en muchos procesos patológicos. Ante una disminución de los niveles de antioxidantes endógenos, por gasto de los mismos en la neutralización de un exceso de ROS, se pueden aumentar incorporándolos a nuestro organismo a través de la dieta o mediante la suplementación con cantidades apropiadas de antioxidantes exógenos (De la Fuente 2002).

1.2.2.1. Antioxidantes endógenos

Se pueden distinguir dos grupos de antioxidantes endógenos: aquellos que poseen actividad enzimática y aquellos que no la poseen.

● Sistemas enzimáticos

Diversos sistemas de enzimas han emergido a lo largo de la evolución, cuya función primaria es disminuir los niveles intracelulares de las ROS en el organismo y, por tanto, proporcionar una función protectora frente a los oxidantes biológicos. Los sistemas enzimáticos de defensa antioxidante consisten en una serie de enzimas que actúan coordinadamente, y entre las más destacadas se pueden citar la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPx) y la glutatión reductasa (GR) (figura 2).

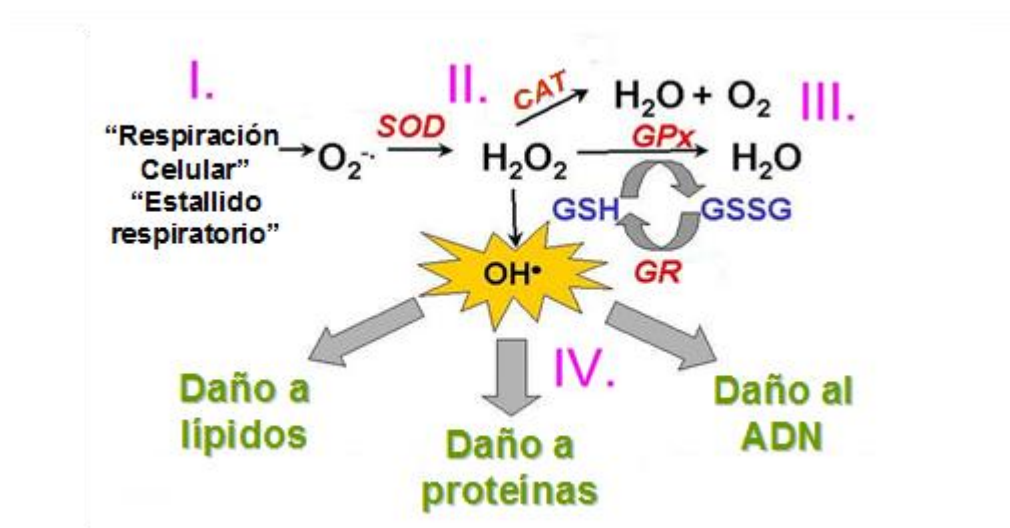


Figura 2. Antioxidantes endógenos enzimáticos. SOD: superóxido dismutasa; CAT: catalasa; GPx: glutatión peroxidasa; GR: glutatión reductasa.

– Superóxido dismutasa (SOD)

La superóxido dismutasa (SOD), descubierta por (McCord and Fridovich 1969) en eritrocitos, es una de las primeras enzimas implicadas en la defensa antioxidante. Cataliza la dismutación del anión superóxido a peróxido de hidrógeno. La familia SOD consiste en cuatro metaloenzimas: dos contienen cobre y zinc, una manganeso y otra

hierro (Okado and Fridovich 2001). Las formas con cobre y zinc (CuSOD y ZnSOD) se encuentran en el citosol de las células eucariotas, poseen un peso molecular de 32kDa y dos subunidades idénticas. La forma que contiene manganeso (MnSOD) se localiza en la matriz mitocondrial de eucariotas y en bacterias, tiene un peso molecular de 88 kDa y cuatro subunidades idénticas (Nordberg and Arner 2001). La SOD con hierro (FeSOD), posee dos subunidades y se encuentra en muchas bacterias aerobias (Barja 1997). Las formas dependientes de Mn y Fe comparten gran homología en sus aminoácidos y son muy diferentes de las formas dependientes de Cu y Zn.

A pesar del papel clave de la SOD, la actuación de esta enzima de forma aislada no serviría como defensa antioxidante, ya que aunque elimina el anión superóxido da lugar a la formación de H_2O_2 , una especie reactiva de oxígeno. Por tanto, otras enzimas deben eliminar este producto, y ese es precisamente el papel de la enzima catalasa.

– Catalasa (CAT)

La función de la catalasa (CAT) es catalizar la conversión del peróxido de hidrógeno en agua. En ausencia de esta enzima el peróxido de hidrógeno se acumularía, y en presencia de metales de transición tales como hierro o cobre, generaría el radical hidroxilo, que como ya se ha descrito posee una reactividad muy elevada y daría lugar al daño en las diferentes macromoléculas. La catalasa se une al NADPH, que la protege de su inactivación a la vez que aumenta su eficacia catalítica (Kirkman, Rolfo et al. 1999). A concentraciones elevadas destruye rápidamente el peróxido de hidrógeno pero, debido a su baja afinidad por el sustrato, es poco efectiva a bajas concentraciones (Halliwell 1999) (Goth 2000).

Esta enzima está presente en casi todas las células aerobias, apareciendo especialmente concentrada en células hepáticas, renales y eritrocitos. A nivel subcelular, el 80% se encuentra dentro de los peroxisomas y el 20% se distribuye en el citosol. Posee un peso molecular de 240 kDa y consiste en cuatro subunidades, cada una de las cuales contiene un grupo hemo (Fe^{3+} , protoporfirina) unido a su grupo activo. La disociación de la molécula en cuatro subunidades causa la pérdida de la actividad enzimática (Cascales 1999).

– Glutation Peroxidasa (GPx)

La acción de la enzima glutathion peroxidasa (GPx) es complementaria a la de la catalasa, puesto que descompone el H_2O_2 de forma lenta pero con gran afinidad. Por tanto, es muy útil para descomponer las pequeñas cantidades de H_2O_2 que se forman de manera prácticamente continua en todas las células. De este modo, cataliza la oxidación del glutathion reducido (GSH) a glutathion oxidado (GSSG) a expensas de peróxido de hidrógeno y de peróxidos orgánicos (ROOH). Su peso molecular son 84 kDa y posee una estructura tetramérica, de modo que cada subunidad contiene un residuo de selenocisteína en cada uno de los sitios activos, que es reducido por el GSH (Ursini, Maiorino et al. 1995). Se localiza principalmente en el citosol (70%) aunque también está presente en la mitocondria (30%). Existe otra forma enzimática independiente de selenio, que tiene un peso molecular menor, es dimérica y actúa sobre peróxidos orgánicos pero no puede hacerlo sobre el peróxido de hidrógeno (Cascales 1999).

– Glutation Reductasa (GR)

La enzima glutathion reductasa (GR) cataliza la reacción que restaura el glutathion en su forma reducida a expensas de equivalentes reductores en forma de NADPH, manteniendo así elevada la relación GSH/GSSG en las células normales, e impidiendo de este modo unos niveles de glutathion oxidado que podrían resultar muy tóxicos para la célula (Haddad 2002). Su peso molecular son 120 kDa, y contiene dos subunidades, cada una de ellas con un grupo FAD en su sitio activo. Se encuentra localizada en el citosol y en la mitocondria (Cascales 1999).

Existe mucha controversia acerca de cómo se modifican estas enzimas antioxidantes con el envejecimiento, y en parte de debe a las diferencias entre los diseños experimentales abordados (en cuanto a los órganos estudiados, la edad de los animales, la especie y la cepa de éstos, etc). La mayoría de los trabajos han sugerido que la actividad de enzimas antioxidantes como la CAT, la GPx, la GR y la SOD está disminuía al envejecer (Harman 1998) (Reiter, Guerrero et al. 1998) (Sandhu and Kaur 2002) (De la Fuente, Hernanz et al. 2004), aunque hay algunos autores que han observado un aumento con la edad, o incluso no han detectado ningún cambio en dichas actividades (Kasapoglu and Ozben 2001) (Inal, Kanbak et al. 2001) (Martínez-Romero,

Canuelo et al. 2006). En relación a estas discrepancias en los resultados encontrados, algunos autores apuntan a que lo más razonable sería hablar en términos de eficiencia global antioxidante, incluyendo diversos componentes enzimáticos y no enzimáticos, puesto que todos ellos, como ya se ha comentado, se encuentran sometidos a un complejo control homeostático donde la disminución de un antioxidante puede ser compensada por el aumento en los niveles de otros (Kasapoglu and Ozben 2001).

● Sistemas no enzimáticos

Además de los ya citados antioxidantes de tipo enzimático, en las células están presentes otros tipos de antioxidantes endógenos de tipo no enzimático. Aunque se consumen cuando reaccionan con las ROS, sus formas oxidadas normalmente se vuelven a reciclar a forma reducida (y con capacidad antioxidante, por tanto), de modo que pueden reutilizarse de nuevo. Su bajo peso molecular les permite eliminar ROS en lugares a los que las enzimas, por ser de mayor tamaño, no pueden acceder.

– Glutation

El glutatión reducido (GSH) es el principal tiol no proteico celular. Es un tripéptido que se sintetiza a partir de L-glutamato, L-cisteína y glicina mediante la γ -glutamyl cisteína sintetasa y la GSH sintetasa en dos etapas consecutivas. Es el tiol de bajo peso molecular más abundante en la mayoría de las células de mamíferos. En el estado redox normal de la célula, menos de un 5% del glutatión total existe en su forma oxidada (GSSG). El GSH está presente en el citoplasma, en la mitocondria y en el núcleo, lo que le permite proteger al ADN frente al daño oxidativo (Sandstrom and Marklund 1990), aunque los niveles son más elevados en el citoplasma. Cuando las células se ven sometidas a una situación de estrés, primero se consumen las reservas citosólicas, y es la mitocondria la que conserva las últimas reservas de GSH en células estresadas. El GSH no se sintetiza en la mitocondria (Griffith and Meister 1985) pero se transporta hacia ella con elevada afinidad. Por este motivo, siempre puede captar ciertos niveles de GSH aunque éstos sean bajos en el citosol (Martensson, Lai et al. 1990).

En términos generales, el glutatión juega un papel clave en el mantenimiento del equilibrio redox celular (Cnubben, Rietjens et al. 2001) mediante el mantenimiento de

la relación GSSG/GSH. Desglosando un poco más las acciones celulares de este compuesto, se podría decir que el glutatión sirve como forma no tóxica de almacenar cisteína, como cofactor de un gran número de enzimas (formaldehído deshidrogenasa, glicosilasa, maleilacetoacetato isomerasa, dehidroclorinasa, entre otras) y como componente de vías metabólicas. Además, ejerce de protector frente a ROS y xenobióticos potencialmente dañinos, mantiene la integridad estructural y funcional de las membranas, así como la conformación de proteínas, la iniciación y elongación de éstas y la síntesis de ARN y ADN.

Su capacidad antioxidante se debe a la actividad reductora del grupo tiólico de su cisteína, que protege de la oxidación a los grupos -SH- de las proteínas. La reacción del GSH con el oxígeno da lugar a la forma oxidada (GSSG), la cual contiene puentes disulfuro. El GSSG puede ser reducido por la glutatión reductasa o ser exportado a través de la membrana; así, la proporción GSH/GSSG debe ser alta, puesto que el GSSG es muy tóxico para la célula pudiendo llegar a inactivar enzimas. El GSH puede reducir los radicales superóxido, hidroxilo y realizar reacciones de "extinción" del oxígeno singlete, devolviéndolo a su estado basal no reactivo o triplete. El GSH también juega un papel importante neutralizando los peroxinitritos, protegiendo de esta forma la cadena de transporte electrónico y concretamente la citocromo oxidasa (Heales and Bolaños 2002). Se sabe que el GSH juega un papel crucial en la mitocondria ayudando a mantener una función y estructura normal, evitando el daño irreversible con la alteración del potencial de membrana y la muerte celular (Tatton and Olanow 1999).

El mantenimiento de unos niveles adecuados de GSH es esencial para procesos como la síntesis de ADN y proteínas, numerosas reacciones enzimáticas, liberación de neurotransmisores y detoxificación de carcinógenos (Viña. J.R., Sáez et al. 1989) (Miquel and Weber 1990). Además, debido al papel que juega el glutatión en la protección de proteínas y lipoproteínas contra el ataque de radicales libres del oxígeno, un déficit en este antioxidante o en cualquier otro aportador de grupos tioles puede conducir a un aumento de la peroxidación lipídica, lo que implica una serie de alteraciones en la permeabilidad de las membranas y finalmente la muerte celular (Vladimirov 1986) (García de La Asunción, Millán et al. 1996).

Al igual que otros sistemas antioxidantes, los niveles de GSH fluctúan en diversas condiciones fisiológicas, incluyendo el envejecimiento y algunas enfermedades neoplásicas. Aunque existen trabajos que muestran disminuciones en los niveles de este antioxidante con la edad (Liu and Choi 2000) (Sasaki, Senda et al. 2001) (Liu 2002), la mayor parte de los estudios llevados a cabo por diferentes autores, entre los que se encuentra nuestro grupo de investigación, han observado cambios significativos de carácter pro-oxidante en los niveles de glutatión asociados al envejecimiento, con un aumento de la relación GSSG/GSH debido principalmente al aumento de GSSG y no tanto a la pérdida de GSH (Rebrin, Kamzalov et al. 2003) (Wang, Liu et al. 2003) (Gho, Kim et al. 2003). Parece ser que una disminución en la actividad de la enzima glutamato cisteína ligasa, enzima que cataliza la etapa limitante en la síntesis del glutatión, sería en parte responsable del menor contenido en GSH que se encuentra con el envejecimiento (Choi, Opalenik et al. 2000) (Wang, Liu et al. 2003) (Liu, Wang et al. 2004).

– Ubiquinol

El Ubiquinol o coenzima Q reducido (QH₂) se considera que ejerce funciones antioxidantes a pesar de encontrarse implicado en el metabolismo energético mitocondrial. Su forma reducida, ubiquinol QH₂, actúa como un antioxidante natural ya que, al contrario de lo que sucede con otros antioxidantes, su capacidad no puede agotarse como resultado del estrés oxidativo. Esta peculiaridad se debe a su intervención en actividades biológicas de transferencia de equivalentes reductores, las cuales reciclan los productos antioxidantes derivados del QH₂ a la forma antioxidante activa. Además, el coenzima Q existe en la mitocondria de 5 a 10 veces en exceso estequiométrico con respecto a otros compuestos que transfieren electrones en la cadena electrónica. Por esto se considera al ubiquinol como un reservorio de actividad antioxidante (Cascales 1999).

– Proteínas de unión a metales

Algunas proteínas que poseen la capacidad de unirse a metales reducen la concentración efectiva de los metales de transición capaces de reaccionar con los peróxidos y generar así radicales libres. La transferrina, por ejemplo, posee mucha afinidad por el hierro, lo que hace que la concentración de hierro libre en el plasma

humano permanezca en niveles muy bajos. La lactoferrina, que se sintetiza en los neutrófilos y que se libera al plasma, posee propiedades muy similares a la transferrina. La ceruloplasmina parece que posee dos propiedades antioxidantes: la primera, se une a los iones de cobre y previene que este metal de transición catalice la descomposición de los hidroperóxidos a radicales; la segunda, oxida el Fe^{2+} a Fe^{3+} y convierte el oxígeno en agua. La albúmina puede también unirse a los iones de cobre, previniendo que se inicien reacciones generadoras de radicales (Cascales 1999).

– Hormonas

Por otra parte, se ha descrito que distintas hormonas, como la hormona del crecimiento, la melatonina y los estrógenos, modulan el estado de los mecanismos antioxidantes en el organismo (Brown-Borg and Rakoczy 2003) (Kilanczyk and Bryszewska 2003) (Strehlow, Rotter et al. 2003) (Viña, Sastre et al. 2008).

1.2.2.2. Antioxidantes exógenos

Entre los antioxidantes exógenos más típicos y biológicamente conocidos se pueden citar las vitaminas E y C, los carotenoides, los polifenoles y la N-acetilcisteína (NAC).

– Vitaminas (C, E)

La vitamina C o ácido ascórbico es el antioxidante hidrosoluble más abundante en el plasma de los humanos y en las células de los mamíferos, y constituye un micronutriente esencial para los humanos, primates, cobayas y otros animales, que han perdido la capacidad de sintetizar este compuesto como resultado de una mutación en una de las enzimas de la ruta de síntesis (Woodall and Ames 1997). Por tanto, en estos animales debe ser obtenida a través de la dieta. Se encuentra fundamentalmente en la fruta fresca (sobre todo en los cítricos) y en los vegetales (Bendich 1997). Se ha comprobado que es eficaz frente al anión superóxido, el peróxido de hidrógeno, el radical hidroxilo y el oxígeno singlete (Sies 1993). Sin embargo, se ha observado que a altas concentraciones (no fisiológicas) y en presencia de metales como el hierro puede ser prooxidante, estimulando la peroxidación de lípidos (Dagupta and Zdunek 1992) y de proteínas (Stadman 1991).

Con respecto a los tocoferoles, la vitamina E o α -tocoferol es la forma predominante en los tejidos (Bron and Asmis 2001) y destaca por su papel antioxidante como protección frente a la oxidación de lípidos, evitando la propagación del proceso de peroxidación lipídica (Sies and Murphy 1981).

– Carotenoides

Dentro de este grupo se pueden incluir más de 600 pigmentos coloreados de origen vegetal, entre los que destacan el β -caroteno, el licopeno y la luteína porque se pueden presentar en concentraciones relevantes en el plasma y los tejidos (Krinski 1993). En bacterias son capaces de proteger frente al daño oxidativo inducido por la luz, y en plantas fotosintéticas pueden secuestrar el oxígeno singlete y otras ROS. En animales se ha comprobado que los carotenoides protegen a los lípidos del daño peroxidativo (Lim, Nagao et al. 1992) (Cascales 1999). El β -caroteno muestra una eficiente actividad antioxidante y atrapadora de radicales libres mediante la inhibición de la peroxidación lipídica inducida por la enzima xantina oxidasa. La solubilidad influye en la capacidad antioxidante de los carotenoides, pues al ser poco solubles en agua su actuación está limitada a las regiones hidrofóbicas de los sistemas biológicos (Young and Lowe 2001). Diferentes estudios han demostrado que los carotenoides juegan un papel relevante como agentes antiinflamatorios (Schweigert 2001), antimutagénicos y anticarcinogénicos (Ziegler, Colavito et al. 1996) (Comerci, Runowicz et al. 1997).

– Polifenoles

Los polifenoles son un grupo de sustancias químicas ampliamente distribuidas en el reino vegetal que se caracterizan por la presencia en su estructura de más de un grupo fenólico, y son responsables de proporcionar color a algunas plantas. Se encuentran tradicionalmente presentes en la dieta de los seres humanos (Cheynier 2005) (Scalbert, Manach et al. 2005), siendo las principales fuentes en la dieta las frutas, las verduras y también las bebidas tales como el vino, el té, el café y el chocolate.

Los flavonoides constituyen uno de los subgrupos de polifenoles que más han sido estudiados en cuanto a su carácter antioxidante. Dentro de ellos, destaca el papel de

las isoflavonas, que contienen un anillo fenólico en su estructura (Dugas, Castaneda-Acosta et al. 2000). Estos compuestos son capaces de donar un electrón, y de esta manera se ha comprobado que actúan como antioxidantes de forma directa eliminando radicales libres. No obstante, también pueden ejercer su papel antioxidante de forma indirecta, uniéndose al receptor de estrógenos ER β e induciendo la transcripción de genes de detoxificación (Bianco, Chaplin et al. 2005), disminuyendo la expresión de genes de respuesta al estrés (Ruiz-Larrea, Mohan et al. 1997) (Zhou and Lee 1998) e incrementando la expresión y actividad de enzimas implicadas en la respuesta antioxidante tales como la glutatión peroxidasa (GPx), la catalasa (CAT) y la superóxido dismutasa (SOD) (Borrás, Gambini et al. 2006) (Valsecchi, Franchi et al. 2008) (Kampkötter, Chovolou et al. 2008).

Asimismo, las catequinas de la planta del té verde son flavonoides y además la fuente predominante de los polifenoles que contiene la hoja de dicha planta, los cuales poseen propiedades antioxidantes (Mukhtar and Ahmad 2000). Estudios recientes señalan que mejoran el estado oxidativo celular y protegen frente al daño oxidativo (Erba, Riso et al. 2005) gracias a que dichos polifenoles neutralizan los radicales libres (tales como el anión superóxido, el radical hidroxilo, el óxido nítrico, el peroxinitrito, etc), quelan iones metálicos e inhiben la activación de enzimas pro-oxidantes (como la iNOS) (Frei and Higdon 2003). En consecuencia, reducen el daño a lípidos de membrana, a proteínas y a ácidos nucleicos. De entre todos los tipos de catequinas que contiene el té verde, es la EGCG la que se muestra más efectiva en reaccionar y neutralizar a los radicales libres (Rah, Han et al. 2005) (Coimbra, Castro et al. 2006) (Khan and Mukhtar 2007).

– Aportadores de glutatión

El principal aportador de glutatión es la N-acetilcisteína (NAC), una forma acetilada del aminoácido cisteína que se sintetiza de forma natural en el organismo (Borgström, Kagedal et al. 1986). Su acción es incrementar la disponibilidad del GSH, ya que actúa como reservorio de la cisteína y precursor del GSH (De la Flora 1995).

1.2.3. La respuesta inflamatoria

Ante cualquier agresión que amenace la integridad del organismo, como un agente infeccioso o extraño (antígeno), así como una lesión por un agente físico, el organismo responde generando una respuesta inmunitaria e inflamatoria. De hecho, la respuesta inmunitaria, que se comentará en el siguiente apartado, pone en marcha la inflamación en el tejido al cual accede un antígeno. Se puede definir la inflamación como la reacción de un tejido vivo al daño celular causado por agresiones, con objeto de limitar dicho daño, eliminar el agente causal y procurar la reparación del tejido dañado. Existen dos tipos de respuesta inflamatoria, la aguda y la crónica (Pastrana and García-Casasola 2013).

– Inflamación aguda

Caracterizada por su aparición de forma inmediata a la agresión y con una duración corta (días o semanas). Las causas que la provocan pueden ser: agentes físicos (traumatismos, heridas, lesiones por frío o calor, etc), agentes químicos (quemaduras o lesiones cutáneas o de mucosas por productos cáusticos), infecciones (víricas, bacterianas o parasitarias), reacciones de hipersensibilidad (mediadas por un mecanismo inmunológico) o infarto tisular, por falta de irrigación de un tejido. Este tipo de inflamación presenta una respuesta vascular prominente con signos inflamatorios muy marcados y está mediada fundamentalmente por leucocitos polimorfonucleares.

– Inflamación crónica

Se caracteriza por una reacción mantenida o persistente del proceso inflamatorio, que puede durar semanas, meses o incluso años. Presenta una reacción vascular mucho más moderada, y está mediada fundamentalmente por la inmunidad celular (linfocitos, macrófagos y células plasmáticas). Las causas de la inflamación crónica vendrán determinadas por aquellas situaciones en las que persiste en el tiempo el agente causante del proceso inflamatorio y, por tanto, el daño celular. Dentro de ellas destacan: la infección por microorganismos resistentes a la fagocitosis, enfermedades inmunológicas (como la artritis reumatoide o la enfermedad de Crohn, en las que el organismo, mediante mecanismos inmunes, daña de forma persistente los propios tejidos), y enfermedades como la arteriosclerosis.

– Fases del proceso inflamatorio

La inflamación es un proceso dinámico y continuo en el que se distinguen tres fases (Pastrana and García-Casasola 2013).

Fase vascular

Cuando el agente causal entra en contacto con el tejido y provoca un daño celular, la primera respuesta que se produce es una vasoconstricción refleja de las arteriolas que lo nutren, seguida de una vasodilatación inmediata originada por la apertura de los esfínteres precapilares. Esta primera reacción es la causante de calor y rubor. La vasodilatación condiciona un aumento del flujo y de la presión hidrostática en los lechos capilares del tejido afectado y, por tanto, una tendencia a la exudación de plasma al tejido intersticial. Asimismo, favorece el enlentecimiento del flujo sanguíneo y la redistribución de las células sanguíneas con disposición de los leucocitos en las zonas más periféricas del vaso. Al mismo tiempo, los mediadores químicos liberados en el foco inflamatorio por las células lesionadas, generan una modificación en el endotelio vascular que condiciona, entre otros efectos, un aumento de su permeabilidad. Todo ello va a permitir el paso de plasma y proteínas al espacio intersticial con aparición de edema local y de los signos inflamatorios de tumor y dolor.

Fase celular

La fase celular persigue la llegada al foco inflamatorio de células sanguíneas (en las fases iniciales leucocitos polimorfonucleares y monocitos) que puedan luchar frente al agente lesivo y la liberación de sustancias proteicas que tienen como objeto activar el proceso inflamatorio y al mismo tiempo delimitarlo para evitar la propagación del daño celular. De forma secuencial se pueden diferenciar los siguientes estadios: a) quimiotaxis y migración de los leucocitos. Mediado por sustancias químicas denominadas quimiotaxinas (fracciones del complemento, proteínas bacterianas, etc.) generadas en el foco inflamatorio. b) Rodamiento de los leucocitos a lo largo del endotelio vascular. Este hecho está provocado por la aparición en las paredes del endotelio activado y en la membrana celular leucocitaria, de moléculas específicas de adhesión denominadas selectinas. c) Unión firme de los leucocitos a las paredes vasculares. Mediado por moléculas de fijación endoteliales y leucocitarias denominadas

genéricamente integrinas. d) Transmigración o diapédesis de los leucocitos a través de las células endoteliales modificadas hacia el espacio intersticial donde se encuentra el agente lesivo o la lesión tisular.

Fagocitosis

Una vez situados en el foco inflamatorio, los leucocitos polimorfonucleares y los monocitos activados (macrófagos) emiten pseudópodos que incluyen las partículas extrañas en una vesícula intracelular llamada “fagosoma”. Este proceso se ve favorecido por sustancias químicas denominadas opsoninas (inmunoglobulinas o fracciones del complemento) que se unen a las partículas extrañas favoreciendo su fagocitosis (opsonización). Una vez formado el fagosoma se liberan en él enzimas lisosomales, así como radicales libres, que habitualmente consiguen la destrucción del agente agresor.

– Mediadores químicos de la inflamación

Como se ha comentado, el proceso inflamatorio conlleva la liberación en el foco inflamatorio de múltiples sustancias químicas producidas por la propia célula lesionada, leucocitos, plaquetas y otras células, cuyo último objetivo es limitar el proceso inflamatorio, favorecer la eliminación del agente causal y promover la reparación del tejido dañado. Dentro de estos mediadores se encuentran: a) aminas vasoactivas. Las más conocidas son la histamina, producida por los mastocitos con efecto vasodilatador y de aumento de la permeabilidad vascular, y la serotonina. b) Citoquinas. Constituyen una familia de proteínas producidas predominantemente por las células del sistema mononuclear fagocítico (macrófagos, células NK, etc.), fundamentales en el desarrollo del proceso inflamatorio. Entre ellas destacan las interleuquinas, de gran importancia en la activación del proceso inflamatorio como la IL-1 y la IL-6; el interferón (IFN) α , β , y γ ; factores de crecimiento como el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), y el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF); así como el TNF- α . c) Biolípidos como los eicosanoides (moléculas de carácter lipídico, originadas por la acción de la fosfolipasa A sobre las membranas celulares de bacterias, neutrófilos y mastocitos. De ellos se deriva la producción de prostaglandinas y leucotrienos, con acción vasodilatadora y de aumento de la permeabilidad vascular) y el factor activador de plaquetas (PAF) producido por los mastocitos y neutrófilos y que

favorece la agregación y la desgranulación plaquetaria. d) Cininas, que son pequeños péptidos vasoactivos que provocan un aumento de la permeabilidad vascular y dolor por activación de las terminaciones nerviosas. e) Óxido nítrico, potente vasodilatador producido por las células endoteliales y macrófagos que regula la inflamación reduciendo el efecto de otras sustancias proinflamatorias. El TNF- α contribuye a su síntesis. f) Sistema del complemento. Constituido por un conjunto de proteínas presentes en el plasma en forma inactiva, y que se activan en cascada por tres vías diferentes, clásica, alternativa y de la lectina, las cuales convergen en una vía común o lítica que genera un complejo de ataque a la membrana, que forma poros en las membranas de las células atacadas originando su lisis. g) Radicales libres de oxígeno y enzimas lisosómicas que destruyen las células en el interior de los fagocitos. h) Reactantes de fase aguda. Son proteínas producidas en el hígado como respuesta a la acción de las citoquinas generadas en el foco inflamatorio. Tienen una acción inflamatoria liberándose a la circulación sistémica, y su incremento o descenso indica el grado de actividad del proceso inflamatorio. Entre ellos destaca la proteína C reactiva (PCR) y el fibrinógeno.

Como ya se ha señalado, la inflamación, aun siendo un proceso eminentemente local, también se acompaña de una respuesta sistémica, y en su génesis intervienen fundamentalmente las citoquinas proinflamatorias IL-1, IL-6 y el TNF- α , que favorecen la síntesis hepática de los reactantes de fase aguda. Concretamente la IL-1 y el TNF- α poseen otras propiedades en común, desde el punto de vista de la reacción inflamatoria y actúan sinérgicamente. Entre estas acciones destacan la facilitación de la quimiotaxis y la estimulación de la expresión de moléculas de adhesión en las células del endotelio, y con ello la adherencia de los leucocitos a la pared del vaso.

La respuesta proinflamatoria inicial es controlada por moléculas inmunorreguladoras como los inhibidores específicos y los receptores solubles de las citoquinas. Entre estos compuestos anti-inflamatorios se encuentran el antagonista del receptor de la IL-1 (IL-1 ra), el factor transformador del crecimiento β (TGF- β) y las interleuquinas IL-4, IL-10 e IL-13, que inhiben el TNF- α , IL-1 e IL-6. También, los receptores específicos para el TNF- α se comportan como inhibidores del mismo. En

condiciones fisiológicas, todas estas moléculas sirven como inmunomoduladoras, y por lo tanto limitan el efecto potencialmente dañino de la reacción inflamatoria. Por otra parte, la inflamación también puede ser controlada por la activación de otros compuestos anti-inflamatorios como los glucocorticoides (De Pablo, Monserrat et al. 2005) (De Oliveira, Sakata et al. 2011).

Habitualmente, el proceso inflamatorio consigue eliminar el agente causal y los tejidos lesionados produciéndose una sustitución de los mismos por un tejido de granulación rico en fibroblastos, células epiteliales y neoformaciones vasculares que condicionan la producción de un nuevo tejido sano. En aquellas situaciones en las que la respuesta inflamatoria aguda no consigue eliminar el agente causal, se mantiene un ciclo de inflamación persistente con necrosis celular y reparaciones sucesivas, que caracteriza a la inflamación crónica (Pastrana and García-Casasola 2013).

1.3. EL SISTEMA INMUNITARIO Y EL ENVEJECIMIENTO

1.3.1. Introducción al funcionamiento del sistema inmunitario

El sistema inmunitario es el sistema fisiológico que protege al organismo de los agentes extraños, los antígenos, ya sean microorganismos invasores o células que se malignizan. Está constituido por una gran variedad de células (leucocitos) y moléculas capaces de reconocer y eliminar un número ilimitado de diferentes antígenos. El conjunto de mecanismos que se ponen en marcha para llevar a cabo esa función se conoce como “respuesta inmunitaria”, la cual puede dividirse en tres fases: 1) el reconocimiento de lo extraño; 2) la activación y regulación de dicha activación; 3) la fase efectora para la destrucción del antígeno, que implica la generación de un proceso de inflamación y oxidación que va a permitir esa eliminación antigénica. Tan importante como generar una buena respuesta inmunitaria capaz de eliminar los agentes infecciosos y las células malignizadas, lo es el poder cortar esa respuesta una vez ha cumplido su misión. De no conseguirse, se generaría un estado inflamatorio que podría conducir a una patología.

El sistema inmunitario se divide funcionalmente en a) innato o inespecífico y b) adquirido, adaptativo o específico. Estos dos grandes tipos de inmunidad no operan independientemente en el organismo, están interrelacionadas entre sí mediante múltiples conexiones, llegando a constituir un todo integrado para luchar frente a los agentes extraños. Así, la inmunidad innata estimula a la adquirida y ésta utiliza los mecanismos efectores de la primera para eliminar los microorganismos. Para hacer frente a los patógenos no es necesaria la utilización de todo el potencial inmunitario en cada momento. La mayoría de los agentes infecciosos no logran atravesar las barreras “físicas”, “químicas” y “biológicas” que representan la primera defensa para impedir la infección. Así, para que comience a actuar la respuesta inespecífica, se requiere que el agente extraño haya conseguido pasar las barreras naturales del cuerpo, tanto las “físicas” (superficies epiteliales), como las “químicas” (moléculas con función defensiva que liberan las células de tales superficies), sin olvidar la barrera “biológica” que representa la flora microbiana normal de esas localizaciones mencionadas.

– Respuesta inmunitaria innata o inespecífica

La respuesta innata se desarrolla y actúa de forma indiscriminada e inmediata frente a cualquier agente extraño que ha conseguido atravesar las barreras naturales mencionadas, y haciendo frente a los patógenos externos y a toda célula del organismo que se ha transformado en cancerosa. Esta respuesta se lleva a cabo por una serie de células y factores solubles. Entre las células se encuentran los fagocitos (neutrófilos, monocitos y macrófagos) y las células “Natural Killer” (NK) o asesinas naturales; y como factores solubles las proteínas del complemento, la lisozima, algunas citoquinas, mediadores de la inflamación y proteínas de fase aguda. La respuesta innata que llevan a cabo los fagocitos se realiza mediante la ingestión y destrucción de los agentes infecciosos, mientras que las células NK se unen directamente a células tumorales e infectadas por virus y las programan para su destrucción por apoptosis.

Si estos mecanismos no consiguen neutralizar al antígeno, se desarrollan otros mecanismos, los adaptativos.

– Respuesta inmunitaria adquirida, adaptativa o específica

La respuesta específica es responsabilidad de los linfocitos, considerados por tal motivo como “células principales” del sistema inmunitario. Tanto los linfocitos B como los T reconocen los antígenos. En el caso de los B, estos antígenos se encuentran libres, mientras que en el caso de los linfocitos T, si son CD4 o colaboradores (“T helper”), el antígeno tiene que estar siendo presentado por una célula presentadora. Las células dendríticas, los propios fagocitos y los linfocitos B pueden actuar de células presentadoras. Si los linfocitos T son T CD8 o citotóxicos reconocen el antígeno mostrado por cualquier célula diana que ha sido infectada o trasformada en cancerosa. Tras el reconocimiento del antígeno se producen factores que permiten neutralizarlo, como hacen los anticuerpos específicos que generan los linfocitos B tras transformarse en células plasmáticas, o factores que regulan la respuesta inmunitaria, como lo hacen las diferentes citoquinas que liberan los leucocitos. La inmunidad adquirida o adaptativa posee un sistema de autorregulación perfectamente diseñado para evitar que la respuesta de activación que realiza frente a los antígenos se extienda en el tiempo. También posee una gran especificidad, diversidad, capacidad de discriminación y dispone de memoria. Los linfocitos pueden reconocer, gracias a sus receptores específicos, millones de moléculas antigénicas diferentes, distinguiendo incluso entre aquellas que tienen un enorme parecido estructural, y lo hacen con gran precisión, con especificidad.

Cuando se generan (los B en médula ósea y los T en el timo) se van dando toda una serie de combinaciones genéticas que permiten expresar en la membrana de los mismos, al madurar, millones de posibles receptores diferentes. Estos receptores (TCR en los linfocitos T y BCR en los B, distintos para cada uno de los millones de clones de linfocitos, reconocerán de forma muy específica a los millones de diversos antígenos con los que se pueda contactar a lo largo de la vida. Además, con estos receptores se discrimina entre lo propio y lo extraño, decidiendo si se tolera, en el primer caso, o se destruye, en el segundo. Los linfocitos tienen memoria, gracias a la cual pueden recordar, cuando reconocen a un antígeno, si es la primera vez que entran en contacto con él, o si ya ha habido una interacción previa. Los linfocitos que nunca han contactado con el antígeno se denominan “vírgenes” y cuando aparece un antígeno interaccionan con él aquellos linfocitos que poseen el receptor específico para el mismo, activándose. Este hecho se manifiesta mediante una proliferación, para de este modo,

expandir ese clon linfoide. Unos cuantos de esos linfocitos activados pasan a ser células que llevan a cabo la respuesta de destrucción del antígeno, son los “efectores”, mientras que otros pasan a ser linfocitos “memoria”, que no actúan en esa ocasión, pero que ante la nueva aparición de ese antígeno específico responderá más rápidamente y con mayor fuerza frente al mismo (De la Fuente 2010) (De la Fuente 2011).

La respuesta inmunitaria también se puede dividir en respuesta inmunitaria celular y humoral, atendiendo a que la ejerzan fundamentalmente las células inmunitarias o los factores solubles liberados por las mismas.

1.3.2. La inmunosenescencia

El envejecimiento implica la aparición de cambios morfológicos y de la integridad funcional de todos los órganos y sistemas, incluyendo las funciones inmunológicas humoral y celular (Allmar and Miller 2005 (a)) (Gomez, Boehmer et al. 2005) (Weng 2006). Sin embargo, no toda la funcionalidad inmunológica disminuye al envejecer, hay aspectos que se activan, posiblemente en exceso, por lo que se habla de una “reestructuración” del sistema inmunitario con la edad (Pawelec, Barnett et al. 2002).

Esos cambios con la edad en el sistema inmunitario es lo que se denomina “inmunosenescencia”, la cual supone una disminución en la eficacia funcional del sistema defensivo, así como en su capacidad de respuesta. Este proceso de deterioro de la función inmunitaria asociada a la edad, implica una mayor incidencia de infecciones, enfermedades autoinmunes y cánceres. Además, el hecho de que este sistema homeostático se deteriore con la edad, es determinante en la mayor morbilidad y mortalidad asociada al envejecimiento (Wayne, Rhyne et al. 1990) (Pawelec 1999) (Ginaldi, De Martinis et al. 1999) (Katz, Plowden et al. 2004).

En el sistema inmunitario los principales cambios que acontecen con la edad son los siguientes: a) Involución tímica, lo que deriva en un menor número de células linfoides precursoras de células T; b) Disminución de la capacidad proliferativa de los linfocitos T por acortamiento de los telómeros, y pérdida de alguna de sus

subpoblaciones; c) Déficit cualitativo de linfocitos B, que conlleva una menor respuesta de éstos frente a antígenos exógenos; d) Disminución de las respuestas fagocítica y quimiotáctica de las células accesorias que, además, aumentan su producción de prostaglandinas, lo que inhibe la proliferación de las células T; e) Alteraciones en la producción y secreción de varias citoquinas (Malaguarnera, Ferlito et al. 2001).

Un hecho evidente que tiene lugar al envejecer es el deterioro de la respuesta inmunitaria adaptativa, con una menor proliferación de linfocitos T y B y los cambios en sus subpoblaciones y producción de citoquinas (Straub, Cutolo et al. 2001). Aunque las funciones de los linfocitos T y B se ven afectadas por la edad, los cambios más profundos corresponden a las funciones efectoras y de regulación de los linfocitos T. En concreto, las células T periféricas muestran a menudo signos de reactividad disminuida frente a antígenos *in vivo*. Incluso la respuesta de células T frente a antígenos o estímulos policlonales *in vitro* muestra cambios relacionados con la edad en la transducción de señales y la expresión de genes tempranos (Thoman and Weigle 1989) (Candore, Di Lorenzo et al. 1992) (Pawelec, Solana et al. 1998).

Sin embargo, la capacidad de hacer frente a los agentes infecciosos y a las células cancerosas reside no sólo en la respuesta inmune adaptativa, sino también en reacciones de la inmunidad innata, entre las que se incluyen los mecanismos de adherencia celular, quimiotaxis, fagocitosis, citotoxicidad natural y producción de factores solubles o citoquinas. La inmunosenescencia, por tanto, parece estar también relacionada con cambios en la inmunidad no específica (Sebastian, Espia et al. 2005) (Solana, Pawelec et al. 2006) (Agrawal, Agrawal et al. 2008) (Gomez, Nomellini et al. 2008). Así, en los ancianos se ha observado un deterioro en la funcionalidad de los neutrófilos, en procesos como la actividad fagocítica, la producción de ROS y la capacidad microbicida (Fulop, Larbi et al. 2004) (Tortorella, Simone et al. 2007). La edad avanzada también afecta a los macrófagos, incluyendo su actividad fagocítica, la producción de quimioquinas y citoquinas, la defensa antibacteriana y la presentación antigénica (Sebastian, Espia et al. 2005). En relación a la actividad “Natural Killer”, aunque hay resultados contradictorios, la mayoría de los estudios apuntan a una disminución de esta actividad con la edad (Mocchegiani, Muzzioli et al. 2003) (Peralbo,

Alonso et al. 2007). A pesar de que los estudios en mastocitos y en eosinófilos son mucho menos numerosos, también existe un deterioro relacionado con el envejecimiento de su número y funcionalidad (Yagi, Sato et al. 1997) (Nguyen, Pace et al. 2005).

Por todo lo comentado anteriormente, parece evidente que tanto los mecanismos de inmunidad innata como los de la específica (que actúan estrechamente unidos para proporcionar al organismo la defensa primaria frente a los agentes patógenos) se modifican al envejecer. A continuación se comentan aspectos de la inmunosenescencia con mayor detalle.

● Cambios en el número y la función de las células T

Una de las manifestaciones más claras y mejor estudiadas de la inmunosenescencia se refiere a los cambios que acontecen en la composición de las poblaciones leucocitarias con la edad, así como en la expresión de sus marcadores de superficie. Entre los cambios más evidentes en este sentido se encuentra el que experimentan las células T.

Cambios cuantitativos

En general, se puede afirmar que el número de linfocitos T CD3⁺ disminuye con la edad de forma significativa, probablemente como consecuencia del proceso de involución tímica (Pawelec, Barnett et al. 2002). Este proceso de involución alcanza su máximo nivel alrededor de los 50 años. Por otro lado, la pérdida de las funciones del timo con la edad da lugar a una disminución del número de precursores linfoides T, así como a una menor capacidad de diferenciación de éstos (Weng 2006). Este hecho parece llevar a una reducción en la eficacia del sistema inmunitario, por lo que hay un mayor grado de manifestaciones neoplásicas al envejecer, así como patologías autoinmunes, dada la regulación de las células T sobre la función de las células B (Shanker 2004).

No obstante, se ha observado que no todas las subpoblaciones de células T se comportan de la misma manera. Así, los linfocitos CD4⁺ de sangre periférica

disminuyen con la edad de forma más acusada que los CD8+. Además, en ambas subpoblaciones, las células vírgenes son las que principalmente van desapareciendo al envejecer, mientras que las células de memoria se ven proporcionalmente aumentadas (Chen, Flurkey et al. 2002). En este sentido, otros autores han indicado una expansión clonal con el envejecimiento de estos tipos celulares, principalmente de los linfocitos CD8+, pero también de los CD4+ (Maini, Casorati et al. 1999), siendo la mayoría de ellos negativos para el marcador CD28 (Boucher, Dufeu-Duchesne et al. 1998). La pérdida de este marcador coestimulador, supone que la mayoría de estos linfocitos están en estado de reposo, en el caso de los CD8+ (Franceschi, Valensin et al. 1999), o son incapaces, en el caso de los CD4+, de promover la diferenciación y la secreción de anticuerpos por parte de los linfocitos B. Estas células CD4+CD28- son además potentes secretoras de citoquinas proinflamatorias como el IFN- γ (Weyand, Brandes et al. 1998).

Por otro lado, se ha comprobado también que los linfocitos T $\gamma\delta$ disminuyen con el envejecimiento, si bien sufren un aumento de la expresión del marcador de activación CD69 (Colonna-Romano, Potestio et al. 2002). Asimismo, se ha mostrado que las células T reguladoras, de carácter supresor, aumentan en número con la edad, mientras que parecen mantener su capacidad funcional, lo que podría explicar, al menos en parte, la mayor actividad supresora en los individuos ancianos (Gregg, Smith et al. 2005) (Trzonkowski, Szmit et al. 2006).

Otro de los cambios más llamativos que se produce en la población de células T con la edad es la expansión clonal de células NKT CD8+ (Posnett, Sinha et al. 1994) (Globerson and Effros 2000), que son células T citotóxicas que expresan el receptor para células NK. Sin embargo, el hecho de si son células activadas, de memoria, citolíticas o senescentes es aún motivo de controversia, ya que comparten muchos antígenos de diferenciación que contribuyen a hacer más difícil la determinación del fenotipo de estas células (Tarazona, De la Rosa et al. 2000). Los resultados de varios estudios sugieren que las células T CD8+ CD28- en sujetos viejos representan una subpoblación de células senescentes que sufren un proceso de senescencia replicativa, de modo que la longitud de sus telómeros es más corta que en otras subpoblaciones y

tienen una menor capacidad de proliferación (Batliwalla, Monteiro et al. 1996) (Monteiro, Batliwalla et al. 1996).

Cambios cualitativos

La funcionalidad de los linfocitos T y en especial la de los linfocitos T helper, es la más afectada por el proceso de envejecimiento (Miller 1996) (Castle 2000) (Pawelec, Barnett et al. 2002) (Aw, Silva et al. 2007) (Gruver, Hudson et al. 2007). Una de las funciones más importantes de los linfocitos T es la proliferación en respuesta a un antígeno específico o expansión clonal. Con la edad, la capacidad proliferativa en respuesta a mitógenos va disminuyendo, tanto en humanos como en ratones, y también en modelos de envejecimiento prematuro en ratón (Pawelec, Barnett et al. 2002) (Guayerbas, Catalán et al. 2002) (De la Fuente 2008 (a)) (De la Fuente 2008 (b)) (Arranz, Caamaño et al. 2010) (Maté 2015).

En los linfocitos incubados con mitógenos ocurren muchos procesos bioquímicos complejos que llevan a la secreción de IL-2 y finalmente a la proliferación, y dichos procesos incluyen fases tempranas y tardías (Clements and Koretzky 1999) (Kane, Lin et al. 2000) (Zhang and Samelson 2000). Entre las tempranas se encuentran la activación de la proteína tirosina quinasa (PTK), la ruptura de fosfoinositol y el incremento en la permeabilidad a cationes divalentes (Douziech, Seres et al. 2002). Las posibles razones de la menor capacidad linfoproliferativa con la edad son los cambios en las subpoblaciones celulares (Bruunsgaard, Pedersen et al. 2000) (Effros 2000) y las alteraciones en las rutas de transducción de señales (Pawelec, Hirokawa et al. 2001). Así, parece que los acontecimientos de la fase temprana de transducción de señales son los responsables de la alterada respuesta linfocítica, y en concreto se relacionan con la transducción de señales a través del complejo TCR/CD3 (Miller 2000) (Pawelec, Hirokawa et al. 2001) (Douziech, Seres et al. 2002) (Damjanovich, Gaspar et al. 2003). Por otro lado, también se encontró que la alterada respuesta proliferativa a través de receptores específicos no podía revertirse con una combinación de ésteres de forbol y un ionóforo de calcio (Douziech, Seres et al. 2002). Esto implica que, aun activando directamente la proteína quinasa C (PKC) y el flujo de calcio, los linfocitos de individuos viejos no eran capaces de proliferar del mismo modo en que lo hacían los de

jóvenes. Esto puede explicarse por el hecho de que, con la edad, hay una alteración en la distribución de las isoenzimas de PKC de células T en estado no estimulado (Fulop, Leblanc et al. 1995).

Por otra parte, hay varios estudios que indican que ocurren cambios con la edad en las propiedades físico-químicas de la membrana plasmática, lo que genera como consecuencia una disminución en la transducción de señales. Así, se producen cambios en la composición lipídica de la membrana de los linfocitos T (Stulnig, Buhler et al. 1995) como por ejemplo un aumento en el contenido de colesterol en ésta (Denisova, Erat et al. 1998) (Fulop, Douziech et al. 2001). De este modo, se incrementa mucho la rigidez de la membrana con el envejecimiento, y los linfocitos son incapaces de responder a señales de activación que se transmiten a través de ella (Gorgas, Butch et al. 1997).

Otro aspecto importante a tener en cuenta es que el envejecimiento modifica la producción, liberación y actividad biológica de las citoquinas, que están implicadas en todos los aspectos de la respuesta inmunitaria y juegan un papel fundamental en el inicio de la función inmunitaria adaptativa en respuesta a agentes patógenos (Clerici and Shearer 1993). Por tanto, cualquier alteración en la respuesta de células T debido a la edad se refleja en las citoquinas implicadas (Kurashima, Utsuyama et al. 1995).

La interleuquina 2 (IL-2) es una de las citoquinas más estudiadas por su importancia en los procesos de linfoproliferación (Pahlavani and Richardson 1996). La mayoría de los autores coinciden en señalar que la liberación de esta citoquina disminuye con la edad en humanos y roedores, al igual que en modelos murinos de envejecimiento prematuro (Pawelec, Barnett et al. 2002) (De la Fuente 2008 (a)) (De la Fuente 2008 (b)) (Arranz, Lord et al. 2010) (Maté 2015). También se ha encontrado que al avanzar la edad existe una menor expresión del receptor de IL-2 (Nagelkerken, Hertogh-Huijbregts et al. 1991) (Pahlavani and Richardson 1996) (Rea, Stewart et al. 1996) (Engwerda, Fox et al. 1996).

Se ha propuesto que con el envejecimiento se produce una disregulación entre las poblaciones de células Th1 y Th2, con el predominio de éstas últimas en los procesos de respuesta inmunitaria (Cakman, Rowher et al. 1996). En general, toda esta información

sugiere que lo que ocurre es que, o bien la respuesta inmunitaria adaptativa en sujetos ancianos está limitada debido a una falta de señalización de citoquinas sobre células T cooperadoras, o bien existe un predominio de de citoquinas que disregula las respuestas inmunitarias de forma que dejan de ser efectivas (McArthur 2000).

Como paso previo a la proliferación, los linfocitos deben migrar hacia el foco de infección. Este tráfico linfocitario está mediado por las interacciones secuenciales entre distintas moléculas de adhesión de los linfocitos y el endotelio, que permiten a los linfocitos abandonar el torrente sanguíneo para infiltrar los tejidos dañados. En general, se ha observado que las moléculas de adhesión aumentan con la edad. Concretamente, los linfocitos T de individuos viejos sobre-expresan las moléculas de adhesión CD49d, CD50 y CD62L, si bien, el número de células que lo hacen es menor que en los individuos adultos (De Martinis, Modesti et al. 2000). Consecuentemente, la adherencia de los linfocitos de sangre periférica en humanos y de los procedentes de ratón es mayor en individuos de edades avanzadas que en adultos, y en ratones que presentan un envejecimiento prematuro con respecto a sus controles de edad (De la Fuente 2008 (a)) (De la Fuente 2008 (b)) (De la Fuente, Hernanz et al. 2008) (De la Fuente and Miquel 2009) (De la Fuente 2014 (a)).

Por otra parte, en trabajos previos de nuestro grupo de investigación se ha comprobado que la quimiotaxis de linfocitos peritoneales de ratón o de sangre periférica en humanos de edades avanzadas se encuentra disminuida, así como la de linfocitos peritoneales de ratones prematuramente envejecidos respecto a sus controles de edad (De la Fuente 2008 (a)) (De la Fuente 2008 (b)) (De la Fuente, Hernanz et al. 2008).

● Cambios en el número y la función de las células B

La evolución de los linfocitos B durante la inmunosenescencia juega un papel muy importante en el desarrollo de alteraciones de tipo humoral en el sujeto anciano tales como hipergammaglobulinemias, producción de autoanticuerpos, manifestaciones autoinmunes y alteraciones linfoproliferativas (Allmar and Miller 2005 (b)) (Riley, Blomberg et al. 2005).

Cambios cuantitativos

A pesar de que la médula ósea no sufre un proceso de involución como el timo, se ha observado una disminución con la edad en el número de células B y de todos sus precursores en esta localización (Szabo, Shen et al. 1999) (Weksler and Szabo 2000), lo que podría explicar el descenso de células B observado en la sangre periférica de individuos viejos (Huppert, Solomou et al. 1998). Al igual que en humanos, en ratones la producción de células B en la médula ósea se reduce de forma severa con la edad (Riley, Kruger et al. 1991) (Rolink, Haasner et al. 1993) (Stephan, Sanders et al. 1996) (Sherwood, Blomberg et al. 1998). De forma similar a lo que sucede con los linfocitos T, algunos autores, han descrito un aumento de los linfocitos B de memoria (CD27+) y un descenso de los vírgenes (CD27-) en sangre periférica de ancianos (Colonna-Romano, Bulati et al. 2003). CD27 es un marcador implicado en los procesos de diferenciación de la célula B hacia célula plasmática. Así, al tener menos células B vírgenes, la respuesta de los individuos viejos frente a nuevos antígenos estará disminuida.

Cambios cualitativos

La manifestación más clara de las alteraciones que se producen en la inmunidad humoral es la deficiente generación de anticuerpos específicos a medida que avanza la edad del individuo (Malaguarnera, Ferlito et al. 2001). Algunos autores postularon que los defectos funcionales de los linfocitos B que se observan con la edad, se deben más a las alteraciones en las células T que cooperan con ellos que al descenso en su número (Weksler 2000). No obstante, numerosos trabajos (Whisler, Newhouse et al. 1991) (Reyes, Prieto et al. 1997) (Colonna-Romano, Bulati et al. 2008), además de los que seguidamente se relacionan, han revelado que las alteraciones funcionales que sufren las células B con la edad pueden ser de carácter intrínseco, y se podrían enumerar de la siguiente forma: 1) Descenso en la densidad de antígenos de superficie. 2) Disminución de la síntesis y la producción de inmunoglobulinas. Esto se debe al descenso de mRNA específicos para éstas, que da lugar a una menor respuesta de anticuerpos en sujetos ancianos con respecto a individuos más jóvenes (Klinman 1994) (Miller 1995) (Malaguarnera, Ferlito et al. 2001). Posiblemente esto sea debido a que las células B de individuos ancianos requieren una mayor concentración de citoquinas para activarse y

producir anticuerpos (Ritcher and Jodouin 1993). 3) Los linfocitos B en sujetos envejecidos contienen muchas copias de ADN circular extracromosómico inestable (Malaguarnera, Ferlito et al. 2001). 4) Con la edad tiene lugar un aumento en la producción de autoanticuerpos polirreactivos tanto en humanos (Hijmans, Radl et al. 1984) como en ratones (Weigle and Chu 1994). La razón de este hecho es una elevada proporción de linfocitos CD5⁺, una determinada subpoblación de células B que tienen la capacidad de producir anticuerpos frente a antígenos propios (Chen and Kearney 1996) (Miller 1996) (Malaguarnera, Ferlito et al. 2001).

El déficit en la inmunidad de tipo humoral en sujetos ancianos también parece deberse a déficits extrínsecos, en concreto a un cambio en las actividades necesarias por parte de los linfocitos T para promover la activación y diferenciación de los B (Malaguarnera, Ferlito et al. 2001), incluyendo la expresión sobre células T de CD40L, que mediante el contacto con la proteína de superficie CD40 situada sobre los linfocitos B, es capaz de activarlos (Yang, Stedra et al. 1996). Esto se ha podido confirmar mediante evidencias experimentales que muestran que linfocitos B purificados de individuos ancianos proliferan de forma normal bajo el efecto de mitógenos de células B que son independientes de la presencia de células T (tales como el *Staphylococcus aureus* Cowan I o el virus de Epstein Barr), mientras que su respuesta a mitógenos dependientes de células T (como el mitógeno pokeweed, por ejemplo) está disminuida (Malaguarnera, Ferlito et al. 2001). Todas estas evidencias muestran que, efectivamente, la cooperación entre linfocitos T y B es un punto muy importante a tener en cuenta en la evolución del sistema inmunitario con el envejecimiento.

Por otra parte, la capacidad proliferativa de los linfocitos B, como sucede con los T, está reducida. Se ha comprobado que la respuesta proliferativa frente al lipopolisacárido bacteriano (LPS), anti-IgM o anti-CD40 de células B esplénicas de ratones viejos, es significativamente menor que la de los animales jóvenes (Frasca, Nguyen et al. 2003).

Las células pre-B de animales viejos, además de estar en menor número, presentan una capacidad disminuida para madurar hacia células B y una elevada susceptibilidad de sufrir apoptosis (Szabo, Shen et al. 1999) (Weksler and Szabo 2000).

● Cambios en la función de las células “Natural Killer” (NK)

A pesar de que las alteraciones asociadas a la edad en las células de la inmunidad innata han sido menos estudiadas que las que se producen en linfocitos, las evidencias científicas acumuladas durante la última década muestran también un fuerte impacto del envejecimiento sobre este tipo de inmunidad. En lo que respecta a los cambios asociados a la edad en las células NK, los cuales han sido los más extensamente estudiados dentro de la inmunidad innata, se considera que sus alteraciones funcionales pueden contribuir de manera determinante a la mayor incidencia de enfermedades infecciosas y, especialmente, neoplásicas en el envejecimiento. Esto es debido a que estas células constituyen la primera línea de defensa implicada en el reconocimiento y la lisis de células tumorales e infectadas por virus (McArthur 2000).

Las células NK representan una población de linfocitos granulares grandes, cuyo fenotipo en humanos viene definido por la expresión de CD16 (un receptor para el fragmento Fc de las inmunoglobulinas de tipo IgG) y CD56 (una isoforma de la molécula de adhesión neural N-CAM), así como por la ausencia del complejo CD3, y la presencia de marcadores como CD57 y CD94.

Numerosos autores han señalado un aumento en el número de células NK con la edad en sangre periférica (Borrego, Alonso et al. 1999) (Solana, Alonso et al. 1999) (Solana and Mariani 2000) (Ginaldi, De Martinis et al. 2001). Sin embargo, a pesar de este aumento, sufren un claro declive en su capacidad citotóxica tumoral y en la producción de citoquinas (Solana and Pawelec 1998) (Di Lorenzo, Balistreri et al. 1999) (Ferrández, Correa et al. 1999) (Pawelec 1999) (Pawelec, Barnett et al. 2002) (Solana, Pawelec et al. 2006) (De la Fuente, Hernanz et al. 2008) (Arranz, Caamaño et al. 2010) (Maté 2015); hechos que se ven reflejados en modelos murinos de envejecimiento prematuro (Viveros, Arranz et al. 2007) (De la Fuente 2008 (a)) (De la Fuente 2008 (b)). La disminución en la actividad de estas células se ha atribuido a varios factores: al aumento en la viscosidad de la membrana celular con la edad, a la menor respuesta frente a factores moduladores positivos como IFN- γ e IL-2, a la mayor sensibilidad frente a moduladores negativos como el ATP, y a una menor hidrólisis de fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PIP₂) tras interaccionar con la célula diana, unida a una menor

capacidad para liberar inositol trifosfato (IP₃), lo que indica que la ruta dependiente de PKC se ve alterada con la edad (Krishnaraj 1992) (Mariani, Mariani et al. 1998).

Por otra parte, las células NK, las cuales expresan constitutivamente el receptor de IL-2 (Voss, Sondel et al. 1992) y dependen en gran medida para sus funciones de la liberación de esta citoquina, que favorece su actividad citotóxica antitumoral y antiviral, y la capacidad de proliferación (Borrego, Alonso et al. 1999) (Solana, Alonso et al. 1999), pueden ver disminuida su actividad citotóxica al envejecer, debido a la menor secreción de IL-2 y la menor capacidad de activación de estas células (Kutza and Murasko 1994) (Kutza and Murasko 1996).

● Cambios en la función de las células accesorias: macrófagos, monocitos, células polimorfonucleares y dendríticas

Las principales células fagocíticas son los macrófagos tisulares, así como los monocitos y neutrófilos polimorfonucleares circulantes en la sangre. Estos tipos celulares llevan a cabo una función de defensa no específica, que comienza con la adherencia a tejidos, para posteriormente moverse hacia el foco infeccioso, y finaliza con la destrucción del patógeno. Estas funciones (adherencia, quimiotaxis, ingestión y digestión del material fagocitado) se llevan a cabo de una forma secuencial y constituyen lo que se conoce como “proceso fagocítico”. Tras el procesamiento del material extraño, los fagocitos pueden presentar los determinantes antigénicos a los linfocitos, y además producir una gran cantidad de factores y citoquinas que regulan la respuesta inmunitaria.

A pesar de que en el pasado se creía que los fagocitos jugaban un papel poco crucial en la disfunción inmunológica que se produce en la vejez, investigaciones más recientes apuntan al declive general en las actividades funcionales de estas células como una razón fundamental que explica la susceptibilidad y vulnerabilidad a infecciones bacterianas y víricas, siendo éstas las causas más comunes de enfermedad y muerte en ancianos (Ginaldi, De Martinis et al. 1999) (Lord, Butcher et al. 2001) (Fulop, Larbi et al. 2004) (De la Fuente, Hernanz et al. 2004) (De la Fuente, Hernanz et al. 2005) (De la Fuente, Hernanz et al. 2008) (Alonso-Fernández and De la Fuente 2011).

En general, en células polimorfonucleares de sangre periférica se ha encontrado una mayor adherencia, una menor quimiotaxis y capacidad fagocítica, y alteraciones en la capacidad microbicida con el envejecimiento (Mohacsi, Fülöp et al. 1992) (Malaguarnera, Ferlito et al. 2001). Nuestro grupo también ha comprobado que existe una mayor adherencia de los neutrófilos de sangre periférica en individuos de edades avanzadas (Alonso-Fernández, Puerto et al. 2008) (De la Fuente, Hernanz et al. 2008).

En el envejecimiento se ha descrito una menor capacidad migratoria o quimiotaxis (Izgüt-Uysal, Agac et al. 2003) (Alonso-Fernández, Puerto et al. 2008) (De la Fuente, Hernanz et al. 2008) y fagocitosis de los neutrófilos (Wenish, Patruta et al. 2000) (Butcher, Chahal et al. 2001) (Izgüt-Uysal, Agac et al. 2003) (Alonso-Fernández, Puerto et al. 2008) (De la Fuente, Hernanz et al. 2008) (Maté 2015). Algunos autores han indicado que el reclutamiento de los neutrófilos hacia el foco infeccioso está preservado en la vejez (Esparza, Sánchez et al. 1996) (Lord, Butcher et al. 2001) o incluso aumentado (Wenish, Patruta et al. 2000), pero una vez en dicho foco, el principal fallo de los neutrófilos sería su reducida capacidad fagocítica (Lord, Butcher et al. 2001). En cuanto a la función microbicida, se ha observado que la degranulación de enzimas líticas en respuesta a péptido formilado (fMLP) está disminuida en sujetos viejos (Lord, Butcher et al. 2001), mientras que en relación a la producción de radicales libres como el anión superóxido parece haber resultados contradictorios, debidos, en parte, a las diferentes condiciones de estimulación de los neutrófilos. Así, algunos autores han observado que tras la estimulación con fMLP, los niveles de este anión en células de individuos viejos se mantienen o aumentan ligeramente (Esparza, Sánchez et al. 1996) (Lord, Butcher et al. 2001), mientras que otros han descrito una disminución de los mismos (Biasi, Carletto et al. 1996) (Tortorella, Piazzolla et al. 2000) (Izgüt-Uysal, Agac et al. 2003). De forma similar, tras la estimulación con PMA o partículas de látex se han descrito aumentos en la producción de anión superóxido por parte de los neutrófilos de individuos viejos (Izgüt-Uysal, Agac et al. 2003) (Alonso-Fernández, Puerto et al. 2008) (Arranz, Fernández et al. 2008) (Maté 2015), así como niveles similares a los de adultos en respuesta a PMA (Tortorella, Piazzolla et al. 2000).

En cuanto a los monocitos y los macrófagos, los resultados son también heterogéneos dependiendo, entre otras cosas, de la localización de la que se hayan

obtenido. Estas células juegan un papel crucial en la respuesta inmunitaria y actúan a través de distintos mecanismos (Lloberas and Celada 2002): 1) Directamente, destruyendo las bacterias, los parásitos, los virus y las células tumorales. 2) Indirectamente, gracias a la liberación de mediadores como IL-1 o TNF- α , que activan a otras células. 3) Procesando los antígenos y presentando los péptidos digeridos a los linfocitos T. 4) Reparando el tejido dañado. Algunos autores han comprobado que los monocitos de individuos adultos y viejos producen las mismas cantidades de RANTES y MIP-1 α en ausencia de estimulación, pero tras estimular las células con lipopolisacárido (LPS), los niveles de estas quimioquinas son mayores en los viejos (Mariani, Pulsatelli et al. 2002). Sin embargo, otros estudios han demostrado una menor producción de GM-CSF, G-CSF, IL-8, MIP-1 α y TNF- β en monocitos de individuos viejos estimulados con LPS (Gon, Hashimoto et al. 1996) (Sadeghi, Schnelle et al. 1999).

En el caso de los macrófagos, parece ser que la producción de IL-1 aumenta con la edad (De la Fuente, Del Río et al. 2001) (Arranz, Lord et al. 2010). En cuanto al TNF- α , se ha descrito tanto un aumento (Pedersen, Bruunsgaard et al. 2000) (Tang, Di Pietro et al. 2000) como una disminución en sus niveles al envejecer (Corsini, Battaini et al. 1999), con dependencia del estímulo empleado. Concretamente en los macrófagos alveolares, se ha comprobado que la liberación espontánea de TNF- α , TGF- β e IL-6 es similar entre adultos y viejos (Zissel, Schlaak et al. 1999). No obstante, en estos macrófagos la producción de óxido nítrico (NO) disminuye con la edad (Koike, Kobayashi et al. 1999). Por otro lado, se ha señalado que la producción de metabolitos derivados del ácido araquidónico, como el leucotrieno B4 (LTB4) o la PGE2, no cambia con la edad, pero sí la capacidad fagocítica de estas células frente a *K. pneumoniae*, que resultó ser mayor que en los animales adultos (Mancuso, McNish et al. 2001).

En relación a los macrófagos peritoneales, se han observado cambios en la mayoría de sus funciones. Así, se ha descrito una disminución de la quimiotaxis y la fagocitosis con la edad, y también en modelos murinos de envejecimiento prematuro, en los que el deterioro de la funcionalidad de estas células se ha relacionado específicamente con la muerte temprana de los individuos (Guayerbas, Catalán et al. 2002) (Guayerbas and De la Fuente 2003) (De la Fuente 2008 (a)) (De la Fuente 2008

(b)). Además, también se ha señalado una mayor capacidad de adherencia y una menor producción de anión superóxido intracelular en los macrófagos peritoneales de animales viejos (De la Fuente, Medina et al. 2000) (De la Fuente, Del Río et al. 2001) (Arranz, Caamaño et al. 2010) o prematuramente envejecidos (Alvarado, Álvarez et al. 2006) (Álvarez, Alvarado et al. 2006).

Los sistemas inmunitarios innato y adaptativo cooperan para asegurar una respuesta inmunológica óptima, de modo que los cambios que se produzcan con la edad en la inmunidad innata van a tener un impacto sobre el sistema inmunitario adaptativo, y viceversa (Lord, Butcher et al. 2001) (Solana, Pawelec et al. 2006) (De la Fuente 2008 (a)) (De la Fuente 2008 (b)). Distintos estudios han mostrado que los defectos a lo largo de la edad en la activación de las células T por LPS pueden deberse al requerimiento de contactos celulares con células presentadoras de antígeno viables, fundamentalmente macrófagos y células dendríticas, cuya capacidad para inducir proliferación de células T se encuentra disminuida en humanos y ratones de edad avanzada (Stout and Suttles 2005) (De la Rosa, Pawelec et al. 2006) (Solana, Pawelec et al. 2006). Además se ha comprobado que en individuos ancianos las células dendríticas no son capaces de atravesar barreras tisulares y van perdiendo su capacidad para provocar la producción de IFN- γ e IL-10 por parte de las células T (Steger, Maczek et al. 1997) (Wick and Grubeck-Loebenstein 1997) (Plackett, Boehmer et al. 2004). En ratones también hay estudios que indican que la capacidad de las células dendríticas para transportar el antígeno a nódulos linfáticos y para procesar y presentar el antígeno disminuye con la edad, y puede estar implicada en la deteriorada respuesta inmunitaria que tienen los animales viejos (Burnton, Kosco et al. 1991).

De todas estas evidencias se puede concluir que la menor capacidad de respuesta de los linfocitos T con el envejecimiento se debe tanto a la menor capacidad funcional de los propios linfocitos, como de las células accesorias (Malaguarnera, Ferlito et al. 2001).

• Cambios en la liberación de citoquinas

Los cambios que acontecen al avanzar la edad en la liberación de la IL-2, ya se comentaron anteriormente. En cuanto a lo que ocurre con otras citoquinas, se presentan

datos muy contradictorios. En el caso de la interleuquina 1 (IL-1), según diferentes trabajos, aumenta, decrece o permanece invariable con la edad (Malaguarnera, Ferlito et al. 2001) (Di Iorio, Ferrucci et al. 2003) (Chang and LoCicero 2004). En relación al IFN- γ , se han descrito tanto mayores niveles de esta citoquina con la edad (Hobbs and Ernst 1997) (Weyand, Brandes et al. 1998) (Globerson and Effros 2000) como disminuciones de la misma (Candore, Di Lorenzo et al. 1993) (Cakman, Rowher et al. 1996). Otras citoquinas como la IL-4, IL-5, IL-10 e IL-8 parecen aumentar al envejecer (Cakman, Rowher et al. 1996) (Hobbs and Ernst 1997) (Mariani, Pulsatelli et al. 2001), aunque también se han descrito descensos o ninguna modificación en sus niveles (Candore, Di Lorenzo et al. 1993) (Kirman, Zhao et al. 1996). Estos resultados contradictorios pueden deberse a diferencias en la edad cronológica de los individuos estudiados, en la localización de la que se han obtenido los linfocitos, en el sexo considerado o en las condiciones experimentales y de cultivo de los mismos (Maté 2015). Respecto al TNF- α parece haber más unanimidad sobre el aumento que experimenta esta citoquina con la edad (Peterson, Chao et al. 1994) (Cohen, Pieper et al. 1997) (De la Fuente, Hernanz et al. 2004). Finalmente, en un estudio realizado en células peritoneales de ratones viejos y muy viejos en cultivo, se comprobó que la liberación basal de citoquinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6, IL-12, IFN- γ y TNF- α estaba incrementada, sin embargo la de IL-10 estaba disminuida. En condiciones de estimulación con mitógenos, los leucocitos mostraron una respuesta deteriorada respecto a la secreción de las citoquinas Th1, como IL-3, IFN- γ y TNF- α ; de las Th2 como IL-6, IL-4, IL-13 e IL-10; así como de las citoquinas reguladoras IL-2, IL-5 e IL-17 (Arranz, Lord et al. 2010).

En vista de todo lo comentado anteriormente, y a pesar de la rápida acumulación de nuevos datos en torno a la inmunosenescencia, todavía no se conocen con seguridad todos los cambios a los que conduce el proceso de envejecimiento en los diferentes aspectos de la función inmunitaria, ni se comprende en su totalidad el papel específico que juega el sistema inmunológico en dicho proceso.

1.3.3. El sistema inmunitario como marcador de edad biológica y predictor de longevidad

Dado el papel del sistema inmunitario en el organismo, se ha propuesto que el mantenimiento de su buen estado funcional es un predictor no sólo de salud sino también de longevidad (Wayne, Rhyne et al. 1990). En base a ello, se ha sugerido la valoración de diversas funciones inmunitarias como marcadores de edad biológica (De la Fuente 2014 (a)). Todo esto se ha confirmado al comprobar que los individuos que presentan inmunosenescencia prematura, a nivel de diversos parámetros, mueren de manera temprana, y que los sujetos longevos son capaces de preservar tales parámetros, con valores propios de la edad adulta (Guayerbas, Catalán et al. 2002) (Guayerbas and De la Fuente 2003) (Puerto, Guayerbas et al. 2005) (Alonso-Fernández, Puerto et al. 2008) (De la Fuente and Miquel 2009) (De la Fuente 2014 (a)) (Maté 2015).

Los individuos que alcanzan una elevada longevidad han sido, por tanto, fundamentales para confirmar la idea propuesta. Los centenarios, por su parte, muestran una serie de parámetros inmunitarios bien preservados (Paganelli, Quinti et al. 1992) (Fagiolo, Cossarizza et al. 1993) (Sansoni, Fagnoni et al. 1997) (Bagnara, Bonsi et al. 2000) (Alonso-Fernández, Puerto et al. 2008), al igual que lo hacen los animales de experimentación que alcanzan una edad elevada (Puerto, Guayerbas et al. 2005) (Arranz, Caamaño et al. 2010) (Arranz, Lord et al. 2010). Por este motivo, se propuso la teoría del remodelamiento, según la cual, la inmunosenescencia es el resultado neto de una adaptación continua por parte del organismo frente a los cambios deletéreos que se producen con el tiempo. La inmunosenescencia sería, por tanto, un proceso dinámico que incluiría tanto pérdidas como ganancias (Franceschi, Bonafè et al. 2000 (a)). La clave, en este contexto, es la adaptación y, según esto, los individuos centenarios serían aquellos con la mejor capacidad de adaptación a las agresiones internas y externas, y en particular a las que inciden en el sistema inmunitario (Franceschi, Valensin et al. 2000). Dentro de esta teoría del remodelamiento, hay que tener en cuenta el punto de vista evolutivo, lo que Franceschi y sus colaboradores han denominado “teoría evolutiva de la inmunosenescencia” (Ottaviani and Franceschi 1997). Según ella, el sistema inmunitario ha sido seleccionado para preservar la homeostasis corporal hasta la reproducción, manifestándose así hasta la edad adulta sus efectos beneficiosos frente a

patógenos, tumores, etc (Franceschi, Valensin et al. 1999). En la actualidad, la esperanza de vida se ha incrementado notablemente y por lo tanto el sistema inmunitario tiene que seguir enfrentándose con toda una serie de retos inmunológicos, no previstos por la evolución. Desde este punto de vista, la mayoría de los trabajos indican que la inmunidad adquirida, más especializada y más reciente en términos evolutivos, es la que sufre el mayor deterioro con la edad, mientras que los mecanismos de la inmunidad innata, más antiguos y menos específicos, están más preservados o incluso en ocasiones aumentados (Franceschi, Bonafè et al. 2000 (a)) (De la Fuente 2008 (b)) (De la Fuente and Miquel 2009).

Así pues, parece que la clave para alcanzar una mayor longevidad está, no tanto en una respuesta inmunitaria excesiva, sino en unas capacidades inmunitarias suficientes y preservadas (menores en intensidad, pero igualmente eficaces), que permitan la adaptación a largo plazo. No obstante, en la actualidad, los mecanismos que permiten esta mejor adaptación por parte del sistema inmunitario en los individuos longevos permanecen sin esclarecer en su totalidad.

1.3.4. Causas de la inmunosenescencia. El estrés oxidativo

En la base de la inmunosenescencia se encuentra la misma causa responsable de la senescencia de las demás células del organismo, esto es, el estrés oxidativo asociado al inevitable uso del oxígeno para la realización de las funciones celulares (De la Fuente 2008 (b)) (De la Fuente and Miquel 2009) (De la Fuente 2014 (a)). No obstante, se debe considerar que las células inmunitarias necesitan de la producción de radicales libres y otros compuestos oxidantes e inflamatorios para llevar a cabo sus funciones defensivas en el organismo, y tales compuestos en exceso pueden resultar dañinos no sólo para los propios leucocitos sino también para las células y tejidos próximos (Knight 2000) (Yoon, Yun et al. 2002) (De la Fuente, Hernanz et al. 2005) (De la Fuente 2008 (a)). Por lo tanto, si todas las células del organismo necesitan mantener un equilibrio entre la producción de oxidantes y las defensas antioxidantes para prevenir un exceso en los niveles de los primeros y el consecuente estrés oxidativo, el mantenimiento de este equilibrio es incluso más importante para las células inmunitarias, puesto que supone la preservación de su capacidad funcional, y por tanto, de la salud.

A este respecto, nuestro grupo ha comprobado que las células inmunitarias peritoneales de ratón sufren un declive en defensas antioxidantes, tales como los niveles de glutathione reducido y la actividad de las enzimas glutathione peroxidasa, glutathione reductasa, superóxido dismutasa, y catalasa, mientras que los compuestos oxidantes, como el glutathione oxidado, el anión superóxido extracelular, y la xantina oxidasa, así como el daño a sus biomoléculas tales como lípidos y ADN, aumentan a lo largo del envejecimiento (De la Fuente, Hernanz et al. 2004) (De la Fuente, Hernanz et al. 2005) (De la Fuente 2008 (a)) (De la Fuente 2008 (b)) (De la Fuente 2014 (a)) (Vida, González et al. 2014). Además, también se ha encontrado un aumento del estrés oxidativo en células inmunitarias de diferentes localizaciones, en ratones prematuramente envejecidos que sufren de ansiedad crónica, en ratones macho en comparación con las hembras, así como en ratas y ratones ovariectomizados (Alvarado, Álvarez et al. 2006) (Viveros, Arranz et al. 2007) (De la Fuente and Miquel 2009) (Baeza I., Fdez-Tresguerres et al. 2010) (Baeza I., De Castro et al. 2011).

El estrés oxidativo y la inflamación se encuentran estrechamente relacionados, puesto que el exceso de radicales libres puede inducir la respuesta inflamatoria, y más aún, los radicales libres en sí mismos son efectores de la inflamación (Kulinsky 2007) (Vida, González et al. 2014). De hecho, en la actualidad se considera que muchas patologías asociadas al envejecimiento, como la hipertensión y la disfunción endotelial (De la Fuente, Hernanz et al. 2005) (Csiszar, Wang et al. 2008), la aterosclerosis (Lobby 2007) y las enfermedades neurodegenerativas (Yuan, Zheng et al. 2007), incluyen en su patogénesis no solo procesos oxidativos, sino también un componente inflamatorio. De esta manera, el equilibrio entre los componentes proinflamatorios, necesarios para hacer frente a los agentes patógenos y cruciales para la supervivencia del organismo, y los marcadores antiinflamatorios, se hace también fundamental para una respuesta inmunitaria adecuada, el mantenimiento de la salud y el envejecimiento saludable (Franceschi 2007) (Ostan, Bucci et al. 2008).

1.4. LA COMUNICACIÓN NEUROINMUNOENDOCRINA Y EL ENVEJECIMIENTO

1.4.1. Conceptos generales de la comunicación entre los sistemas homeostáticos

La homeostasis corporal es imprescindible para la supervivencia de los organismos. Para el mantenimiento de la misma, los sistemas reguladores nervioso, endocrino e inmunitario coordinan sus actividades con el fin de obtener una respuesta eficaz ante cualquier variación en el medio interno o externo. Los primeros descubrimientos que apuntaron la existencia de esta comunicación neuroinmunoendocrina se remontan a los estudios de Sir Thomas Lewis, que señalaron una interconexión entre los tres sistemas (Lewis 1927). Asimismo, los estudios realizados por Hans Selye, demuestran como el estrés causa atrofia del timo e hipertrofia de las glándulas adrenales (Selye 1936). A estos primeros estudios les siguen toda una serie de trabajos en los que se confirman tales interacciones y se abandona la idea inicial de una actividad reguladora autónoma propia de cada sistema (Besedovsky, Sorkin et al. 1975) (Besedovsky, Sorkin et al. 1977). Desde los años 80 se ha avanzado considerablemente en el estudio de la “relación neuro-inmuno-endocrina”, demostrándose que el sistema inmunitario, nervioso y endocrino juegan un papel clave en la adaptación biológica, contribuyendo al mantenimiento de la homeostasis y al establecimiento de la integridad corporal (Besedovsky and Rey 2007).

Dentro del contexto de una red neuro-inmuno-endocrina, el funcionamiento del sistema inmunitario está basado en los siguientes argumentos:

1. Las células inmunitarias, endocrinas y nerviosas expresan receptores para los productos secretados por los tres sistemas (Besedovsky and del Rey 1996). Por tanto, muchas sustancias de origen nervioso y endocrino tienen efectos sobre el sistema inmunitario, puesto que a través de sus receptores situados sobre células inmunitarias amplifican las señales de activación y modulan la respuesta inmunitaria (Blalock, Harbour-McMenamin et al. 1985) (Blalock 1994 (a)) (Mocchegiani, Perissin et al. 1999) (Solerte, Fioravanti et al. 1999) (Malaguarnera, Ferlito et al. 2001) (Xu 2001).

2. Los tejidos linfoides, endocrino y nervioso son capaces de sintetizar y liberar citoquinas, hormonas y neurotransmisores (Besedovsky and del Rey 1996). El sistema inmunitario puede considerarse como un órgano neuroendocrino, puesto que no solo es capaz de producir citoquinas, sino que también produce hormonas y neurotransmisores (Blalock 1992) (Homo-Delarche and Dardenne 1993). Por su parte, el sistema nervioso secreta neuropéptidos, sus mediadores típicos, así como citoquinas que tienen efectos sobre el propio sistema nervioso y sobre la integración sistema nervioso-sistema inmunitario (Serafeim and Gordon 2001) (Besedovsky and Rey 2007) (Besedovsky and del Rey 2011). Además, se ha detectado la presencia de citoquinas en glándulas endocrinas (Besedovsky and del Rey 1996).

3. La funcionalidad de los tres sistemas se encuentra modulada por citoquinas, hormonas y neurotransmisores. El sistema inmunitario ejerce diversos efectos, mediante la producción de citoquinas, sobre el sistema nervioso (a través una variedad de circuitos neuronales implicados en mecanismos de termorregulación, ingesta de alimentos, patrones de sueño y comportamentales) y el sistema endocrino (Bacon and Harrison 2000) (Szelényi 2001) (Besedovsky and Rey 2007). El sistema nervioso autónomo (SNA), por su parte, inerva todos los órganos linfoides, tanto primarios como secundarios (Felten, Felten et al. 1987) (Felten and Felten 1991) (Friedman and Irwin 1997), y éstos reciben la información aportada por el sistema nervioso mediante receptores específicos (Felten and Felten 1991) (Madden and Livnat 1991) (Berczi, Chalmers et al. 1996), lo que lleva en última instancia a la modulación de la función inmunitaria. La importancia de dicha inervación se ve reflejada en el hecho de que lesiones en el ámbito nervioso provocan alteraciones en la función inmunitaria (Roszman, Jackson et al. 1985) (del Rey, Kabiersch et al. 2002). Concretamente, el sistema nervioso simpático, a través de los neurotransmisores noradrenérgicos, actúa sobre las células inmunitarias mediante la estimulación de receptores adrenérgicos, modulando muchas de sus funciones (Heijnen and Kavelaars 1999) (Elenkov, Wilder et al. 2000) (Sanders 2006). También los mediadores del sistema endocrino pueden ejercer sus efectos sobre el sistema inmunitario. De esta manera, distintas hormonas pueden alcanzar a las células inmunitarias y modificar su funcionalidad (Kaschka 1997). Una localización endocrina muy investigada en este sentido es la hipófisis, habiéndose

comprobado que lesiones en la misma dan lugar a respuestas inmunitarias alteradas (Madden and Felten 1995). Los mediadores de los ejes neuroendocrinos están muy implicados en el funcionamiento inmunitario. Uno de los más estudiados es el eje HPA (hipotálamo-hipófisis-adrenal), esencial para controlar los procesos inflamatorios y autoinmunes. Así, una respuesta deprimida del eje HPA agrava la patología de diferentes enfermedades autoinmunes tales como la esclerosis múltiple, la artritis reumatoide, el Síndrome de Sjögren, la enfermedad inflamatoria intestinal, etc. (Besedovsky and del Rey 2006) (Sternberg 2006).

Considerando todo ello, se puede afirmar que las interacciones inmuno-neuroendocrinas son bidireccionales (Blalock, Harbour-McMenamin et al. 1985) (Blalock 1989) (Blalock 1992) (Blalock 1994 (b)) (Blalock 1994 (c)) (Spangelo and Macleod 1990) (Besedovsky and del Rey 1996), es decir, que los sistemas inmunitario y neuroendocrino se encuentran relacionados de tal forma que hormonas y neuropéptidos afectan a la función inmunitaria y viceversa, la respuesta inmunitaria se refleja en cambios neuroendocrinos (Wrona 2006) (De la Fuente 2014 (b)). Todas aquellas situaciones capaces de alterar la homeostasis corporal serán reconocidas, en este contexto de bidireccionalidad, por uno u otro sistema, comunicando los cambios recibidos a los demás, para poder recuperar el equilibrio perdido. Así, el sistema inmunitario se puede considerar como un sistema capaz de percibir estímulos “no cognoscitivos”, como virus, bacterias o células tumorales, entre otros, creando una respuesta inmunitaria que se traduce en forma de citoquinas, modulando éstas la funcionalidad no solo del propio sistema inmunitario sino también del neuroendocrino. De igual manera, el reconocimiento de los estímulos “cognoscitivos” por parte del sistema nervioso y endocrino, da lugar a una información que es transmitida mediante neurotransmisores y hormonas a células inmunocompetentes, sucediéndose una serie de cambios en la respuesta inmunitaria (Blalock 1984).

Por tanto, el sistema neuroinmunoendocrino es capaz de percibir cualquier estímulo, integrarlo y dar lugar finalmente a una cascada de señales que provocan la respuesta del organismo con objeto de mantener la homeostasis y preservar la salud y la supervivencia de éste.

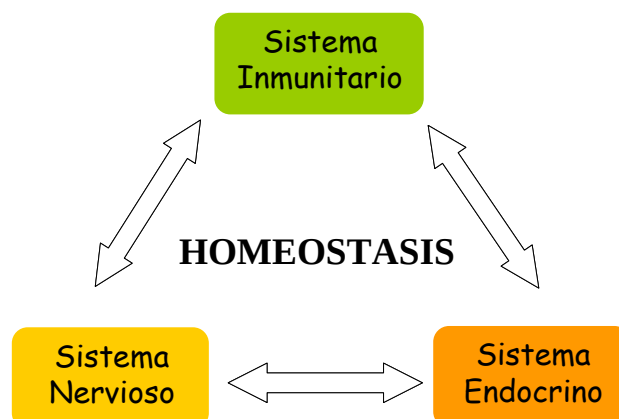


Figura 3. Relaciones bidireccionales entre los sistemas inmunitario, nervioso y endocrino.

1.4.2. Comunicación neuroinmunoendocrina en el envejecimiento

Con el paso del tiempo, se producen alteraciones en cada uno de los sistemas reguladores y en su comunicación, lo que contribuye a una pérdida de la homeostasis, disfunciones en los sistemas fisiológicos, y una menor resistencia al estrés, hechos característicos del proceso de envejecimiento (Fabris 1990) (Fabris 1991) (Bellinger, Madden et al. 2001).

La teoría neuroendocrina del envejecimiento (Everitt and Burgess 1976) (Frolkis 1982) (Meites, Goya et al. 1986) se apoya en tres conceptos principales: (1) la mayoría de las funciones del organismo están reguladas por el sistema neuroendocrino; (2) este sistema sufre un deterioro progresivo a medida que avanza la edad, hecho comprobado por la alteración en el *turnover* de varias hormonas y neurotransmisores (Meites 1983); (3) este deterioro es intrínseco, y cualquier fallo del mismo es perjudicial y crítico para la longevidad, dada la gran importancia de este sistema. De hecho, se han observado una serie de alteraciones asociadas con la edad en la función neuroendocrina, como la actividad reducida de las células neurosecretoras hipotalámicas (Frolkis 1982), el aumento del umbral hipotalámico en los mecanismos de feed-back negativos (Dilman

1986), así como una sensibilidad periférica reducida ante la estimulación por parte de hormonas y neurotransmisores (Meites 1983).

Con el envejecimiento, los tipos y niveles de citoquinas que entran en contacto con las células de los sistemas nervioso y endocrino cambian. No sería de extrañar por tanto que el aumento asociado a la edad en las citoquinas proinflamatorias y compuestos oxidantes producidos por las células inmunitarias (De la Fuente, Hernanz et al. 2005), pudiera tener un fuerte impacto sobre la función nerviosa (Merrill 2001). En relación al sistema endocrino, se producen alteraciones en prácticamente todas las hormonas, que incluyen tanto aumentos como disminuciones de las mismas (Parker 1999) (Perry 1999) (Straub, Miller et al. 2000) (Straub, Cutolo et al. 2001). Por otra parte, con la edad se producen cambios en la innervación e irrigación de los órganos inmunitarios, en la afinidad y en el número de receptores para hormonas y neurotransmisores presentes en los leucocitos, así como en las señales intracelulares que desencadenan, dando lugar a cambios en la respuesta por parte de las células inmunitarias (Bellinger, Madden et al. 2001) (De la Fuente, Del Río et al. 2001) (Puerto, Guayerbas et al. 2005).

De este modo, las alteraciones que se producen al envejecer en la red de comunicación formada por los tres sistemas; nervioso, endocrino, e inmunitario, conducen a un deterioro progresivo y sistemático, que afecta a la capacidad de los mismos para mantener la homeostasis, pudiendo contribuir así al progreso del envejecimiento y a la mayor morbilidad y mortalidad asociadas a la edad (De la Fuente, Hernanz et al. 2005) (De la Fuente 2008 (a)) (De la Fuente 2014 (a)).

Una de las manifestaciones más evidentes de esta pérdida de capacidad homeostática consiste en diversas anomalías en la respuesta frente a las situaciones de estrés, tanto físico como psicológico, que se producen durante el envejecimiento (Pedersen, Wan et al. 2001). Parece ser que el principal responsable de este fenómeno es el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, puesto que su capacidad de respuesta frente a los estímulos estresantes está alterada y también lo están los mecanismos de retroalimentación que se encargan de la regulación de este eje (Gust, Wilson et al. 2000) (Revskey and Redei 2000) (Pedersen, Wan et al. 2001). Por otro lado, se ha comprobado que una respuesta inadecuada frente al estrés es un factor importante que

conduce a una aceleración del proceso de envejecimiento, y se acompaña de una funcionalidad pobre tanto del sistema inmunitario como de los otros sistemas fisiológicos (McEwen 2006) (Bauer 2008) (Gouin, Hantsoo et al. 2008). En este sentido, nuestro grupo ha podido comprobar que los ratones que muestran un exceso de reactividad a situaciones de estrés y una ansiedad crónica, sufren de una inmunosenescencia prematura, así como de un deterioro en la respuesta conductual y endocrina, y envejecen y mueren prematuramente (Guayerbas, Catalán et al. 2002) (Guayerbas, Catalán et al. 2002) (Guayerbas and De la Fuente 2003) (Viveros, Arranz et al. 2007) (De la Fuente and Gimenez-Llort 2010) (Vida and De la Fuente 2013).

Es difícil determinar si a lo largo del envejecimiento los cambios neuroendocrinos conducen al deterioro inmunológico o si el proceso se produce a la inversa, de modo que un sistema inmunitario alterado induce los cambios neuroendocrinos. Algunos autores opinan que lo más probable es que ambos mecanismos acontezcan simultáneamente (Bellinger, Madden et al. 2001). No obstante, teniendo en cuenta que la capacidad para mantener la homeostasis es fundamental para lograr un buen estado de salud, el estudio de las alteraciones en la red que forman los tres sistemas reguladores con el envejecimiento, es de gran interés a la hora de abordar cualquier intervención terapéutica dirigida a mejorar la calidad de vida de los individuos.

1.5. LA OBESIDAD Y EL SISTEMA INMUNITARIO

1.5.1. Conceptos generales de la obesidad y el síndrome metabólico

La prevalencia de la obesidad se ha incrementado de manera alarmante en la mayor parte de los países, alcanzando proporciones epidémicas en los últimos años (Friedman 2000), por lo que representa uno de los problemas de salud más importantes.

La obesidad se puede definir como un estado de desequilibrio entre la ingestión y el gasto de calorías que conlleva una excesiva o anormal acumulación de grasa corporal. En función de la grasa corporal acumulada, se pueden definir como individuos obesos

los que presentan porcentajes de grasa por encima de los valores considerados normales, que son del 20 al 30% en mujeres y del 12 al 20% en varones adultos (Salas-Salvado, Rubio et al. 2007). El parámetro más aceptado para definir clínicamente el sobrepeso y la obesidad es el Índice de masa corporal (IMC) que se calcula con la siguiente operación: peso en kilogramos/(estatura en metros)² (Nammi, Koka et al. 2004). Aunque este índice no es un excelente indicador de adiposidad en ancianos, o en individuos con una elevada masa muscular, como los deportistas, es el que se emplea en la mayoría de estudios epidemiológicos y el recomendado para su uso clínico por diversas sociedades médicas y organizaciones internacionales de salud, dada su facilidad de utilización, reproducibilidad y capacidad de reflejar la adiposidad en la mayoría de la población (Salas-Salvado, Rubio et al. 2007). Se acepta como punto de corte un valor de IMC de 30 Kg/m² para definir la obesidad. La Sociedad Española para el estudio de la obesidad (SEEDO), introdujo algunas modificaciones a la clasificación propuesta por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para definir la obesidad de acuerdo al IMC, tales como subdividir el sobrepeso en dos categorías e introducir un grado adicional de obesidad para los pacientes con un IMC de 50 Kg/m² o superior (**tabla 1**) (Salas-Salvado, Rubio et al. 2007).

Tabla 1. Criterios SEEDO para definir la obesidad en grados de acuerdo al IMC en adultos (Med Clin (Barc). 2007 Feb 10; 128 (5):184-96).

Categoría	Valores límite de IMC (Kg/m²)
Peso insuficiente	<18,5
Peso normal	18,5-24,9
Sobrepeso grado I	25,0-26,9
Sobrepeso grado II (preobesidad)	27,0-29,9
Obesidad de tipo I	30,0-34,9
Obesidad de tipo II	35,0-39,9
Obesidad de tipo III (mórbida)	40,0-49,9
Obesidad de tipo IV (extrema)	≥50

La etiología de la obesidad es multifactorial, en ella están implicados factores genéticos, metabólicos, medioambientales y de estilo de vida, además de psico-sociales (Nammi, Koka et al. 2004). En la actualidad, los agentes medioambientales están teniendo una importancia considerable en el enorme incremento de la prevalencia de esta enfermedad en poblaciones cuyos antecedentes genéticos han permanecido relativamente estables. El proceso de modernización y reestructuración económica en los diferentes países ha modificado los modelos nutricionales y de actividad física, por lo que los sistemas de alimentación han mejorado la disponibilidad de alimentos de alta densidad energética, y además el estilo de vida sedentario se está extendiendo constantemente (Martínez, Moreno et al. 2002). Mientras que es clara la influencia que los factores ambientales juegan en el desarrollo de la obesidad, numerosas investigaciones realizadas también ponen de manifiesto una notoria contribución genética (Alfredo Martínez, Enríquez et al. 2007). En definitiva, el establecimiento de la obesidad implica la interacción entre factores genéticos y ambientales (Marti, Martínez-González et al. 2008).

A nivel genético, se conocen diferentes variantes que pueden ser la causa de distintos tipos de obesidad. En algunos síndromes de transmisión hereditaria mendeliana como el de Prader-Willi o Cohen, la obesidad es una de las manifestaciones clínicas. Existen causas de obesidad monogénica, donde la mutación de un único gen puede ser el desencadenante de esta enfermedad en un individuo, como ocurre en el caso de los genes que codifican para la leptina y su receptor, la proopiomelanocortina (POMC) y el receptor de melanocortina 4 (MC4R). Sin embargo, en la mayoría de los casos la etiología de la obesidad es de origen poligénico. Entre los genes implicados en este origen se incluyen los genes de las proteínas desacoplantes, los receptores β -adrenérgicos, los receptores activados por el proliferador de peroxisomas (PPAR), y otros que pueden estar relacionados con el control de la ingesta, adipogenia o gasto energético (Ochoa, Martí et al. 2004).

La leptina participa en la regulación del peso corporal a través del control del apetito y del gasto energético. Las mutaciones encontradas en los genes de la leptina y su receptor están asociadas con la obesidad, como se comentará más adelante. Por su

parte, MC4R está altamente expresado en el hipotálamo, órgano que participa en la regulación de la ingesta de nutrientes. La POMC es una hormona polipeptídica que se expresa principalmente en el cerebro y que genera entre otros péptidos la hormona estimulante de melanocitos (MSH)- α , que es un ligando endógeno del MC4R. La obesidad temprana de algunos pacientes se puede explicar por la ausencia de este ligando (Macho, Martí et al. 2000).

Las proteínas desacoplantes (UCP) son transportadores de protones localizados en la membrana interna de la mitocondria que disipan el gradiente de protones en forma de calor (Rodríguez, Macarulla et al. 2002). Se han descrito tres tipos diferentes, UCP1 que se expresa exclusivamente en tejido adiposo marrón, UCP2 localizada en cerebro, músculo y tejido adiposo blanco, y UCP3 en músculo esquelético. La termogenia contribuye al aumento del gasto energético y, si es deficiente debido a mutaciones en estas proteínas que les haga perder su función desacoplante, puede provocar un desequilibrio energético positivo que puede conducir al desarrollo de la obesidad (Ochoa, Martí et al. 2004).

Los genes relacionados con la función y actividad de las catecolaminas tienen un interés particular en la obesidad debido a la importancia que tienen estas moléculas en el gasto energético. Los genes que codifican los receptores betaadrenérgicos ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$) comparten un 50% de la secuencia. Los receptores $\beta 1$ y $\beta 2$ están distribuidos por todo el organismo, mientras que $\beta 3$ se localiza principalmente en el tejido adiposo y está relacionado con la regulación de la lipólisis y la termogenia. Cualquier mutación genética implicada en la formación de estos receptores β -adrenérgicos podría considerarse como una posible causa de obesidad, al alterar la actividad lipolítica de los mismos (Macho, Martí et al. 2000) (Ochoa, Martí et al. 2004).

Los PPAR pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares capaces de regular la expresión de diversos genes. Los subtipos conocidos son PPAR- α , PPAR- δ y PPAR- γ . Éste último es codificado por tres genes diferentes; PPAR- $\gamma 1$, PPAR- $\gamma 2$ y PPAR- $\gamma 3$. El PPAR- $\gamma 2$ se expresa predominantemente en adipocitos y parece que juega un papel en la homeostasis energética, la adipogenia y la sensibilidad a la insulina. Se han encontrado algunos polimorfismos en el gen PPAR- γ , que han sido relacionados con rasgos fenotípicos de obesidad (Ochoa, Martí et al. 2004).

Enfermedades asociadas a la obesidad

La obesidad es uno de los principales factores de riesgo para la aparición de múltiples enfermedades crónicas. La morbilidad asociada a esta enfermedad se manifiesta en muchas alteraciones, entre las que destacan desórdenes metabólicos como resistencia a la insulina, diabetes mellitus tipo II y dislipidemia; enfermedades cardiovasculares como la hipertensión, aterosclerosis, insuficiencia cardíaca y la enfermedad cerebrovascular; enfermedades respiratorias tales como la insuficiencia ventilatoria y la apnea obstructiva del sueño; desórdenes gastrointestinales entre los que destacan la esteatosis hepática y la cirrosis; alteraciones musculo-esqueléticas como lesiones articulares y artrosis, además de ciertas formas de cáncer (Kopelman 2000) (Nammi, Koka et al. 2004) (Salas-Salvado, Rubio et al. 2007) (Hjartaker, Langseth et al. 2008) (Marinou, Tousoulis et al. 2010).

• Síndrome Metabólico

El síndrome metabólico, conocido también como síndrome X es una alteración del organismo producida por la combinación de distintos factores de riesgo asociados a la obesidad abdominal. Los individuos que padecen esta enfermedad se caracterizan por presentar un desorden metabólico que resulta de la prevalencia de la obesidad y que incluye alguna o la mayoría de las siguientes alteraciones: resistencia a la insulina, dislipidemia, hipertensión e hiperglucemia (Eckel, Grundy et al. 2005) (Vitale, Marazzi et al. 2006). Esta patología confiere un alto riesgo de padecer enfermedad cardiovascular, aterosclerosis y diabetes mellitus tipo II.

El síndrome X fue descrito por primera vez por Reaven en 1998, basándose en evidencias previas sobre el papel etiopatológico de la resistencia a la insulina en la diabetes mellitus tipo II. Dicho autor postuló que la resistencia a la insulina era un trastorno fisiopatológico que determinaba un mayor riesgo que el promedio general a desarrollar, no solo diabetes mellitus tipo II, sino también enfermedades cardiovasculares. Esto, junto con la existencia de desregulación glucémica, lipídica y hemodinámica, hizo proponer a este autor que la resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia secundaria son el sustrato para desarrollar hiperglucemia, hipertrigliceridemia e hipertensión arterial, y que dichas alteraciones explican el

incremento del riesgo a padecer diabetes o enfermedad cardiovascular (Reaven 1998). De manera sorprendente, Reaven no incluyó la obesidad en la descripción de este síndrome; sin embargo, la obesidad se ha recogido en el concepto de síndrome metabólico en todas las definiciones posteriores.

En 1999, aunque el concepto de síndrome metabólico era aceptado, existía controversia respecto a su causa. La Organización Mundial de la Salud (OMS) realizó el primer intento para desarrollar una definición de “Síndrome Metabólico” internacionalmente reconocida (World Health Organization. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Report of a WHO consultation. Geneva: WHO; 1999). Posteriormente, se propusieron diversas definiciones alternativas, siendo las más aceptadas aquellas elaboradas por el “European Group for the study of Insulin Resistance” (EGIR) (Balkau and Charles 1999), y por el “Adult Treatment Panel III (ATP-III) of National Cholesterol Education Program” (NCEP) (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. 2001; 285(19):2486-97). Estas distintas definiciones no solo presentaron diferencias en los componentes propuestos, sino también en los valores umbral utilizados para definir cada uno de los componentes. Por esta razón, la “International Diabetes Federation” (IDF) solicitó a su grupo de trabajo epidemiológico la creación de un grupo de expertos de las distintas regiones del mundo y representantes de distintas organizaciones profesionales, para establecer una nueva definición mundial del síndrome metabólico (Zimmet, M M Alberti et al. 2005).

La definición propuesta según los criterios del ATP-III se actualizó en 2005 (Grundy, Cleeman et al. 2005) y resulta más simple y útil desde el punto de vista clínico que la de la OMS, ya que esta última requiere un test de sobrecarga oral de glucosa y la determinación de insulina. Recientemente, están tomando mayor fuerza los criterios establecidos por la IDF, ya que en ellos se especifican puntos de corte para el perímetro de la cintura propios de las distintas poblaciones, y es además una clasificación de uso clínico fácil y asequible (Alberti, Zimmet et al. 2005) (Salas-Salvado, Rubio et al.

2007). De acuerdo a estos criterios, en el año 2005 se definió el término “Síndrome Metabólico” para condiciones en las cuales exista la presencia de múltiples factores de riesgo metabólico para enfermedades cardiovasculares y diabetes, siendo estos factores de riesgo la obesidad (adiposidad particularmente central), los niveles elevados de glucemia, triglicéridos y presión sanguínea, así como niveles bajos de colesterol HDL (lipoproteínas de alta densidad) (**tablas 2 y 3**) (Salas-Salvado, Rubio et al. 2007) (Alberti, Eckel et al. 2009).

Tabla 2. Criterios del “Adult Treatment Panel III” (ATP-III) para definir el diagnóstico clínico del síndrome metabólico (Med Clin (Barc). 2007 Feb 10; 128 (5):184-96).

“Adult Treatment Panel III” (ATP-III)
Tres o más de los siguientes factores:
Obesidad central, definida por una medición del perímetro de la cintura ≥ 102 cm en varones y ≥ 88 cm en mujeres
Aumento de los triglicéridos: ≥ 150 mg/dl (1,7 mmol/l)
cHDL (colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad) reducido: < 40 mg/dl (1,03 mmol/l) en varones < 50 mg/dl (1,3 mmol/l) en mujeres
Aumento de la presión arterial: Sistólica ≥ 130 y/o diastólica ≥ 85 mmHg, o toma de tratamiento antihipertensivo
Aumento de la glucosa plasmática en ayuno: glucemia ≥ 100 mg/l (5,6 mmol/l)

Tabla 3. Criterios de la “International Diabetes Federation” (IDF) para definir el diagnóstico clínico del síndrome metabólico (Med Clin (Barc). 2007 Feb 10; 128 (5):184-96).

“International Diabetes Federation” (IDF)
Presencia de obesidad central, definida por la medida del perímetro de la cintura en población europea de ≥ 94 cm en varones y ≥ 80 cm en mujeres Junto a dos o más de los siguientes factores: Aumento de los triglicéridos (≥ 150 mg/dl o $1,7$ mmol/l) o tratamiento específico para la reducción de los triglicéridos cHDL (colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad) reducido (< 40 mg/dl o $1,03$ mmol/l en varones y < 50 mg/dl o $1,29$ mmol/l en mujeres) o tratamiento específico para esta alteración en el cHDL Aumento de la presión arterial: sistólica ≥ 130 y/o diastólica ≥ 85 mmHg, o tratamiento de hipertensión previa diagnosticada Aumento de la glucosa plasmática en ayuno: glucemia ≥ 100 mg/l ($5,6$ mmol/l), o diabetes tipo II anteriormente diagnosticada

El requerimiento para presentar obesidad de acuerdo a los criterios de la IDF está definido por los puntos de corte específicos de cada población en concreto, lo cual considera el hecho de que las distintas poblaciones, etnias y nacionalidades tienen diferentes normas para la distribución del peso del cuerpo, así como de la circunferencia de la cintura. Esta definición también pone de manifiesto que la relación entre estos valores y el riesgo de padecer diabetes mellitus tipo II o enfermedades cardiovasculares difiere en las distintas poblaciones. Además, aborda las necesidades clínicas y de investigación asequibles e idóneas para su aplicación en los distintos grupos de población en todo el mundo, incluyendo una lista de posibles criterios que deberán ser incluidos en estudios epidemiológicos y de investigación que se realicen acerca del síndrome metabólico (Zimmet, M M Alberti et al. 2005). Sin embargo, aunque esta definición incluye los mismos criterios generales que las anteriores, requiere que esté presente la obesidad, pero no necesariamente la resistencia a la insulina. Por este motivo, a pesar de que la obesidad visceral está reconocida como un factor importante

en la aparición del síndrome metabólico, la definición de la IDF ha sido criticada por su énfasis en la obesidad, más que en la resistencia a la insulina (Reaven 2006) (Huang 2009). En la actualidad, se considera que tanto la obesidad como la resistencia a la insulina son necesarias para expresar el fenotipo del síndrome metabólico (Salas-Salvado, Rubio et al. 2007) (Huang 2009).

El síndrome metabólico es un concepto complejo, su etiología no está completamente clara, pero las evidencias indican que la resistencia a la insulina, la inflamación y la obesidad son los tres factores que convergen para dar lugar a todos los cambios metabólicos que intervienen en el desarrollo del mismo. A continuación, se destacan los aspectos más importantes de las alteraciones metabólicas implicadas en este síndrome:

- Obesidad central o visceral: es la forma de obesidad más fuertemente asociada al desarrollo del síndrome metabólico (Aguilera, Olza et al. 2013), y se presenta como un incremento del perímetro de cintura que puede ser debido a la grasa visceral o a un aumento del tejido adiposo subcutáneo (Eckel, Grundy et al. 2005). La obesidad abdominal contribuye en el desarrollo de la hipertensión, hiperglicemia, disminución de los niveles de colesterol HDL y de un alto riesgo de enfermedad cardiovascular. El exceso de tejido adiposo está especialmente correlacionado con factores de riesgo metabólicos. La liberación de ácidos grasos no esterificados (NEFA), citoquinas, adiponectina y PAI-1 (inhibidor del activador del plasminógeno tipo-1) desde el tejido adiposo exacerbarían estos factores de riesgo. Niveles elevados de NEFA en plasma sobrecargan el músculo y el hígado de lípidos, lo que aumenta el riesgo de resistencia a la insulina. El exceso de PAI-1 contribuye al estado protrombótico, los niveles bajos de adiponectina característicos de la obesidad empeoran los factores de riesgo metabólicos y además, la elevación de la proteína C reactiva (PCR) acompañando a la obesidad puede significar un exceso de citoquinas y un estado pro-inflamatorio (Grundy, Brewer et al. 2004).
- Resistencia a la insulina: en la patología del síndrome metabólico, la resistencia a la insulina parece ser una de las alteraciones más ampliamente aceptada y unificada. La

insulina es una hormona peptídica que se sintetiza en las células beta del páncreas y se segrega a la sangre ejerciendo sus acciones al unirse a su receptor. Los principales tejidos diana de la insulina son el músculo esquelético y el tejido adiposo, donde ejerce sus efectos metabólicos, siendo el más importante el transporte intracelular de glucosa. En el músculo esquelético, la insulina estimula la captación de glucosa, favoreciendo la síntesis de glucógeno. En tejido adiposo la insulina promueve la captación de glucosa además de la lipogénesis, mientras que reprime la lipólisis y por tanto el flujo de liberación de ácidos grasos libres al torrente sanguíneo (Wilcox 2005). La resistencia a la insulina es un defecto en la acción de la insulina que puede conllevar a hiperinsulinemia (exceso de insulina en sangre), lo que podría dar lugar a una hiperglucemia (elevados niveles de glucosa en sangre). En el caso de la obesidad, el tejido adiposo visceral incrementa el flujo de ácidos grasos en sangre como se ha comentado anteriormente, lo que facilita la acumulación de triglicéridos en el hígado y en el músculo, promoviendo el desarrollo de resistencia a la insulina (Wilcox 2005).

- Intolerancia a la glucosa/ Diabetes mellitus tipo II (DMII): se caracteriza por hiperglucemia, debido a la resistencia celular en las acciones de la insulina, combinada con una respuesta compensatoria insuficiente en la secreción de insulina por del páncreas (Wilcox 2005). El hecho de que se produzca este aumento de glucosa en sangre, constituye uno de los mayores factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares.
- Dislipidemia: se trata de un desorden lipídico característico del síndrome metabólico asociado a la resistencia a la insulina. Está caracterizado por elevados niveles de triglicéridos en plasma, niveles bajos de colesterol HDL y un incremento de partículas LDL (lipoproteínas de baja densidad) pequeñas y densas. En respuesta a los ácidos grasos liberados como consecuencia de la lipólisis debida a la resistencia a la insulina, se produce una mayor síntesis de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (Wilcox 2005) (Huang 2009).
- Hipertensión: está fuertemente asociada con la obesidad. A pesar de que la implicación de la resistencia a la insulina en la elevación de la presión sanguínea es controvertida, se

ha propuesto la retención de sodio renal como mecanismo compensatorio a la hiperinsulinemia (Wilcox 2005).

- Estado pro-inflamatorio: acompaña a la obesidad y se caracteriza por un incremento de citoquinas pro-inflamatorias en la circulación, como la interleuquina-6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), y la PCR entre otros marcadores de inflamación (Bastard, Maachi et al. 2006). La asociación de la obesidad y el síndrome metabólico con la inflamación está ampliamente documentada, por lo que se desarrollará en detalle en otro apartado.
- Estado pro-trombótico: caracterizado por un aumento plasmático de la concentración del PAI-1 y del fibrinógeno, que se eleva en respuesta a un alto nivel de citoquinas (Grundy, Brewer et al. 2004). De esta manera, el estado pro-inflamatorio y pro-trombótico deben estar metabólicamente interconectados.
- Disfunción endotelial: es el mecanismo por el cual el endotelio vascular no es capaz de responder correctamente a los estímulos fisiológicos ni patológicos. Es por tanto, el proceso final desencadenante de la aterosclerosis, junto con la participación de los distintos factores de riesgo cardiovascular (Huang 2005) (Kim, Montagnani et al. 2006) (Huang 2009). La obesidad visceral causa disfunción endotelial a través de los efectos de la IL-6, la resistina y el TNF- α en la disminución de la fosforilación de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), resultando en una menor producción de óxido nítrico (Huang 2009).

Con todos estos datos, podemos afirmar que el síndrome metabólico se caracteriza por un conjunto de factores de riesgo metabólicos interrelacionados entre sí, y que está asociado con padecer aterosclerosis y en consecuencia enfermedades cardiovasculares.

1.5.2. El tejido adiposo como órgano de almacenamiento y órgano endocrino

El tejido adiposo blanco es el órgano que constituye el principal reservorio de energía del organismo. La formación de este tejido comienza antes del nacimiento y su

mayor expansión tiene lugar rápidamente después del mismo, siendo su desarrollo un proceso continuo a lo largo de la vida. La diferenciación de los adipocitos es un proceso complejo en el que los preadipocitos interrumpen su crecimiento y salen del ciclo celular previamente a su conversión terminal en adipocitos. Este proceso de diferenciación supone cambios cronológicos en la expresión de numerosos genes. De esta manera, se van adquiriendo aquellos genes característicos de los adipocitos y se reprimen aquellos que son inhibitorios para la adipogénesis o innecesarios para la función del adipocito maduro. Todos los cambios que acontecen en la función y expresión de estos genes conducen finalmente a la adquisición del fenotipo característico del adipocito (Moreno and Martínez 2002).

Los adipocitos muestran una forma variable, aunque predominantemente esférica y con tamaño de entre 25 y 200 μm de diámetro. Tienen un núcleo periférico y plano y un citoplasma delgado que contiene una única gota lipídica de gran tamaño que ocupa el 90% del volumen. Presentan escasas mitocondrias y un retículo endoplasmático liso y rugoso. El tejido adiposo blanco es un órgano heterogéneo que se compone de los adipocitos que se mantienen unidos por un tejido conectivo laxo vascularizado e innervado, y además contiene otros tipos celulares como macrófagos, preadipocitos, leucocitos, fibroblastos y células endoteliales (Wood, de Heredia et al. 2009) (Gómez-Hernández, Perdomo et al. 2013).

El tejido adiposo posee un papel fundamental en el mantenimiento del balance energético. Durante los periodos de alta ingesta, la energía es almacenada en los adipocitos en forma de triglicéridos gracias al proceso de lipogénesis. La fuente principal de triglicéridos procede de los quilomicrones y las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) circulantes. Los triglicéridos de estas lipoproteínas son hidrolizados hasta ácidos grasos libres y monoglicerol por la lipoproteína lipasa (LPL) que se localiza en la pared de los capilares del tejido adiposo. Estos ácidos grasos libres son captados por los adipocitos a través de procesos de transporte activo mediado por proteínas transportadoras específicas de ácidos grasos. Una vez en el interior celular, los ácidos grasos son reesterificados para formar triglicéridos. En periodos de restricción calórica, el proceso que se produce en el tejido adiposo es la lipólisis, donde los

triglicéridos almacenados son hidrolizados a ácidos grasos y glicerol (Moreno and Martínez 2002).

Durante mucho tiempo se consideró al tejido adiposo blanco como un órgano pasivo de almacenamiento de energía, sin embargo desde que se identificó en 1994 que los adipocitos sintetizaban y secretaban la hormona leptina, el tejido adiposo fue reconocido como un gran órgano endocrino (Trayhurn and Beattie 2001) (Gimeno and Klamann 2005) (Wood, de Heredia et al. 2009) (Martos-Moreno, Kopchick et al. 2013). Numerosas investigaciones realizadas demuestran que este tejido es un órgano metabólicamente activo que desempeña un papel central en la homeostasis energética. Tras el descubrimiento de la leptina, se identificaron una extensa familia de proteínas, hormonas y factores de crecimiento que eran liberados desde los adipocitos y que se denominaron adipoquinas (Frühbeck, Gómez-Ambrosi et al. 2001) (Trayhurn and Wood 2004) (Kershaw and Flier 2004) (Heber 2010). Por tanto, el tejido adiposo no es solo un órgano de reserva de energía, sino que es un órgano secretor involucrado activamente en la regulación de la función celular a través de ciertas moléculas que poseen una acción endocrina, paracrina y autocrina. Así, el tejido adiposo influye en la respuesta de muchos otros tejidos tales como el hipotálamo, páncreas, hígado, músculo esquelético, riñones, endotelio, y del sistema inmunitario (Frühbeck, Gómez-Ambrosi et al. 2001).

Las adipoquinas secretadas por el tejido adiposo están implicadas en distintas funciones entre las que se incluyen el equilibrio energético y la regulación del peso corporal (leptina y adiponectina), la función vascular (PAI-1 y angiotensinógeno), el metabolismo de lipoproteínas (LPL, apolipoproteína E (apoE), proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP)), la respuesta inflamatoria (como IL-6 o el TNF- α , entre otras citoquinas), la función inmune (adipsina), la angiogénesis (factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)), así como la función reproductora (estrógenos). Los adipocitos también secretan distintos factores como son el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-I), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), así como el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF). El tejido adiposo es, por tanto, un órgano capaz de autorregular el crecimiento y desarrollo de los adipocitos y de modificar sus propias características morfológicas y funcionales adaptándose a las

condiciones fisiológicas o patológicas predominantes (Kim and Moustaid-Moussa 2000) (Trayhurn and Beattie 2001) (Frühbeck, Gómez-Ambrosi et al. 2001) (Wood, de Heredia et al. 2009) (Gómez-Hernández, Perdomo et al. 2013).

1.5.3. Estado inflamatorio y oxidativo en la obesidad

El desequilibrio energético característico de la obesidad lleva consigo un incremento en el número de adipocitos (hiperplasia) y un aumento en el tamaño de los mismos (hipertrofia), permitiendo almacenar así el exceso de energía en forma de triglicéridos (de Ferranti and Mozaffarian 2008). La expansión del tejido adiposo se relaciona además con un aumento en la liberación de ácidos grasos a la circulación (Arner 2005), lo que permite una acumulación de lípidos en múltiples tejidos como el hígado, músculo esquelético, corazón y células β del páncreas (de Ferranti and Mozaffarian 2008).

Trayhurn y sus colaboradores propusieron que la expansión del tejido adiposo durante el desarrollo de la obesidad, genera un estado de hipoxia en el tejido que conlleva la adaptación metabólica y funcional de los adipocitos a las condiciones de baja oxigenación (Trayhurn and Wood 2004). En este estado se activan factores de transcripción específicos como el factor nuclear de transcripción κB (NF- κB) y el factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1), que es el que tiene un papel principal en la respuesta a las condiciones de baja presión de oxígeno. Este factor de transcripción modula la respuesta molecular a la hipoxia, activando la expresión de ciertos genes que están implicados en diferentes funciones tales como angiogénesis, apoptosis, estrés celular, metabolismo de la glucosa, proliferación celular e inflamación. Uno de los genes que se activa principalmente es el que codifica para el transportador de glucosa tipo 1 (GLUT-1), lo que conlleva un incremento del metabolismo de la glucosa a través de la glicolisis anaerobia, y un aumento de la producción y liberación de lactato (Trayhurn, Wang et al. 2008 (a)) (Trayhurn, Wang et al. 2008 (b)) (Wood, de Heredia et al. 2009) (Trayhurn 2013) (Tahergorabi and Khazaei 2013).

También se ha reconocido que no solo el estado de hipoxia puede que esté implicado en la disfunción celular del tejido adiposo en la obesidad. Se han propuesto

mecanismos alternativos causantes de anomalías en la función de los adipocitos, como son el estrés oxidativo a nivel del retículo endoplásmico y la mitocondria, con la generación de ROS (Ozcan, Cao et al. 2004) (de Ferranti and Mozaffarian 2008) (Karalis, Giannogonas et al. 2009) (Wood, de Heredia et al. 2009) (Hummasti and Hotamisligil 2010). Por otra parte, se ha demostrado que la hipoxia estimula estos procesos de estrés oxidativo, lo que sugiere que todos estos mecanismos están implicados en la disfunción de los adipocitos y que ninguno de ellos es excluyente (Wood, de Heredia et al. 2009). Además, se ha comprobado que en este estado donde la suplementación de oxígeno al tejido adiposo está comprometida, se induce la expresión de la proteína de unión homóloga a C/EBP (CHOP), marcador de estrés característico del retículo endoplásmico (Hosogai, Fukuhara et al. 2007). El estrés celular ocasionado induce la activación de la respuesta a proteínas no plegadas (unfolded protein response-UPR), proceso que está ligado a las vías de señalización inflamatorias y de estrés, activando el factor nuclear de transcripción κ B (NF- κ B) y la vía de las quinasas c-jun N-terminal (JNK) entre otras, con la consiguiente producción de ROS (Gregor and Hotamisligil 2007) (Gil, María Aguilera et al. 2007) (Baker, Hayden et al. 2011).

La obesidad está asociada también a un estado de inflamación crónica moderada o de bajo grado caracterizado por un incremento en la producción intracelular y en la liberación sistémica de adipoquinas relacionadas con la inflamación (Trayhurn and Wood 2005) (Bastard, Maachi et al. 2006) (Calder, Ahluwalia et al. 2011) (Alam, Ng et al. 2012) (de Oliveira Leal and Mafra 2013). La hipoxia que experimentan los adipocitos también se ha considerado un factor clave en la inducción de esta respuesta inflamatoria, que conduce a la desregulación de adipoquinas secretadas por los adipocitos (Wood, de Heredia et al. 2009) (Trayhurn 2013).

• Biomarcadores del estado inflamatorio

La patogenia de la obesidad está asociada a la producción desregulada de moléculas biológicamente activas; es decir, la secreción de adipoquinas proinflamatorias está elevada, mientras que la de anti-inflamatorias se encuentra reducida (Maury and Brichard 2010). Entre los marcadores inflamatorios liberados por

el tejido adiposo en la obesidad se encuentran diferentes citoquinas y proteínas de fase aguda (Trayhurn and Wood 2004). A continuación se detallan las más relevantes:

– TNF- α : la primera citoquina que se identificó secretada por los adipocitos fue el factor de necrosis tumoral alfa. Se demostró inicialmente su sobreexpresión en el tejido adiposo de roedores obesos (Hotamisligil, Shargill et al. 1993) y posteriormente de humanos obesos (Hotamisligil, Arner et al. 1995). Por otro lado, Bastard y sus colaboradores sugieren que los adipocitos del tejido adiposo no están directamente implicados en el aumento en la circulación de los niveles de TNF- α observados en individuos obesos, proponiendo como hipótesis que otros mecanismos que involucran un efecto sistémico de la leptina o de otras adipoquinas, pueden inducir la liberación de TNF- α por otros tipos celulares como los macrófagos (Bastard, Maachi et al. 2006). Además, un estudio llevado a cabo por Fain y sus colaboradores concluye que la liberación de TNF- α por el tejido adiposo de individuos obesos es principalmente a través de células no grasas presentes en el tejido (Fain, Bahouth et al. 2004). En la actualidad se admite que la mayoría del TNF- α es secretado por los macrófagos residentes en el tejido adiposo (Weisberg, McCann et al. 2003), y actúa reduciendo la secreción de adiponectina del tejido adiposo (Hector, Schwarzloh et al. 2007). Los niveles elevados de TNF- α también se han asociado al desarrollo de alteraciones metabólicas como la resistencia a la insulina. En este sentido, se ha demostrado que el TNF- α inhibe la ruta de señalización del receptor de la insulina a través de la vía de las quinasas c-jun N-terminal (JNK) en una acción autocrina o paracrina (Hotamisligil, Shargill et al. 1993) (Hotamisligil 2000) (Coppack 2001) (Maury and Brichard 2010). Por otra parte, esta citoquina inflamatoria inhibe la conversión de los preadipocitos a adipocitos maduros (Makki, Froguel et al. 2013) y también incrementa la apoptosis en ambos tipos celulares (Coppack 2001) (Maury and Brichard 2010). Por último, el TNF- α estimula la expresión y secreción de varias adipoquinas como la IL-6 (Trayhurn and Wood 2004), así como la expresión de la molécula de adhesión intracelular-1 (ICAM-1), la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1), y la molécula de adhesión vascular-1 (VCAM-1) en las células endoteliales, aumentando la disfunción vascular (Maury and Brichard 2010).

- IL-6: esta citoquina inflamatoria es producida por distintos tipos de células como fibroblastos, células endoteliales, monocitos y también adipocitos (Maury and Brichard 2010). La expresión y secreción de IL-6 por el tejido adiposo, así como los niveles circulantes de esta citoquina están incrementados en la obesidad (Trayhurn and Wood 2004). Al igual que ocurre con el TNF- α , la mayor parte de la IL-6 secretada es producida por los macrófagos del tejido adiposo, y su expresión en plasma se correlaciona con el incremento de masa corporal y ácidos grasos libres ya que estimula la lipólisis (Makki, Froguel et al. 2013). Uno de los principales efectos de la IL-6 es inducir la respuesta de fase aguda hepática, estimulando la producción de la proteína C reactiva (PCR), que constituye el factor de riesgo principal de las complicaciones vasculares (Ridker 2003) (Bastard, Maachi et al. 2006). Además, se ha propuesto que la IL-6 contribuye a la resistencia a la insulina (Bastard, Maachi et al. 2002) (Fernández-Real and Ricart 2003).

- La IL-1 β , IL-8, IL-18, TGF- β , MIF y MCP-1 son otras de las citoquinas y quimioquinas implicadas en la respuesta inflamatoria, que son sintetizadas y secretadas por los adipocitos (Trayhurn and Wood 2004) (Trayhurn, Wang et al. 2008 (a)) (Trayhurn 2013). El TGF- β es una citoquina multifuncional que regula el crecimiento y la diferenciación de diversos tipos celulares, además de ser un inductor de la síntesis de PAI-1 en tejido adiposo humano (Birgel, Gottschling-Zeller et al. 2000) (Zulet, Puchau et al. 2007). La IL-18 es una citoquina proinflamatoria que se ha propuesto como un mediador clave en la inflamación y como nexo de unión entre la obesidad y complicaciones asociadas como enfermedad cardiovascular, intolerancia a la glucosa y diabetes (Zulet, Puchau et al. 2007).

- PAI-1: se trata de una proteína de fase aguda, importante en el mantenimiento de la hemostasis vascular, ya que actúa inhibiendo la activación del plasminógeno, precursor de la plasmina, la cual está implicada en la fibrinólisis (Mutch, Wilson et al. 2001). Entre los factores que estimulan la producción del PAI-1 por los adipocitos se incluyen el TGF- β como se ha mencionado, y también el TNF- α (Birgel, Gottschling-Zeller et al. 2000). La síntesis de PAI-1 en el tejido adiposo y los niveles circulantes están incrementados en la obesidad favoreciendo el estado protrombótico, contribuyendo

directamente con complicaciones como la enfermedad cardiovascular, resistencia a la insulina y diabetes (Alessi, Bastelica et al. 2000) (Alessi, Poggi et al. 2007).

- PCR: los elevados niveles circulantes de esta proteína de fase aguda en la obesidad parece que son sintetizados en su mayor parte por el hígado, como consecuencia de la IL-6 secretada por los adipocitos, que es la principal citoquina que regula la producción hepática de esta proteína (Yudkin, Kumari et al. 2000) (Trayhurn and Wood 2004). Los niveles plasmáticos de PCR están directamente relacionados con el índice de masa corporal (Bulló, García-Lorda et al. 2003) y son un factor de riesgo cardiovascular independiente (Ridker 2003) ya que la PCR participa directamente en el proceso de aterogénesis modulando la función endotelial, induciendo la expresión de ICAM-1, VCAM-1 y PAI-1 (Pasceri, Willerson et al. 2000) (Devaraj, Xu et al. 2003) (Lau, Dhillon et al. 2005).
- Haptoglobina: es una proteína de fase aguda que está incrementada en la obesidad (Wellen and Hotamisligil 2005). Además de su síntesis hepática durante la inflamación (Trayhurn 2005), se ha demostrado su expresión génica en tejido adiposo humano (do Nascimento, Hunter et al. 2004) y de ratón (Friedrichs, Navarajo-Ashbaugh et al. 1995). Entre los factores que regulan la secreción de haptoglobina se encuentra el TNF- α y la IL-6 (do Nascimento, Hunter et al. 2004) (Taes, De Bacquer et al. 2005).
- Proteína amiloide A sérica: la expresión de este reactante de fase aguda en respuesta a la inflamación es predominante en el hígado, sin embargo, también se expresa y libera en adipocitos y su producción está regulada por factores nutricionales (Lin, Rajala et al. 2001) (Trayhurn and Wood 2004) (Poitou, Viguerie et al. 2005). Los niveles de esta proteína están asociados a la inflamación sistémica y son predictores de enfermedad arterial coronaria y cardiovascular (Johnson, Kip et al. 2004).
- Angiotensinógeno: el tejido adiposo está considerado como la principal fuente extrahepática de angiotensinógeno (Van Harmelen, Ariapart et al. 2000), precursor del péptido vasoactivo angiotensina II, que es un componente del sistema vasoconstrictor renina-angiotensina. La angiotensina II posee un efecto estimulante sobre la

diferenciación del tejido adiposo y está implicada en la regulación de la adiposidad debido a sus acciones lipogénicas (Jones, Standridge et al. 1997). Además, la angiotensina II estimula directamente la expresión de ICAM-1, VCAM-1 y MCP-1 en las células vasculares (Tham, Martin-McNulty et al. 2002). La expresión génica (Van Harmelen, Ariapart et al. 2000) y los niveles circulantes (Engeli, Negrel et al. 2000) del angiotensinógeno están aumentados en la obesidad y promueven la angiogénesis y el desarrollo de la hipertensión, teniendo un efecto deletéreo sobre la función vascular (Lau, Dhillon et al. 2005).

–Resistina: es una adipoquina secretada por los adipocitos, perteneciente a una familia de proteínas rica en cisteína (Zulet, Puchau et al. 2007), y que podría ser el nexo de unión entre la obesidad y el desarrollo de la resistencia a la insulina (Steppan, Bailey et al. 2001). En roedores parece estar clara su implicación en la resistencia a la insulina. Sus niveles circulantes se incrementan en la obesidad, su bloqueo mejora la homeostasis de la glucosa y su administración ejerce efectos negativos sobre los tejidos diana de la insulina (Steppan, Bailey et al. 2001) (Gómez-Hernández, Perdomo et al. 2013). En humanos, sin embargo, el papel de la resistina en la resistencia a la insulina no está esclarecido y son necesarios nuevos estudios, ya que los trabajos publicados son contradictorios. Por otra parte, se ha propuesto a esta hormona como un factor de riesgo cardiovascular y potencial responsable en la disfunción endotelial. Así, se ha sugerido su papel en la inflamación vascular, puesto que puede inducir significativamente la expresión de moléculas de adhesión tales como ICAM-1 y VCAM-1, así como la quimioquina MCP-1, en las células endoteliales (Lau, Dhillon et al. 2005) (Zulet, Puchau et al. 2007) .

–Proteína transportadora de retinol-4 (RBP4): ha sido descrita como una adipoquina que reduce la sensibilidad periférica y hepática a la insulina. Esta proteína se ha propuesto como un nuevo nexo de unión entre la obesidad y la resistencia a la insulina, presentando niveles séricos elevados de RBP4 sujetos obesos con insulino resistencia y diabetes tipo II (Yang, Graham et al. 2005) (Zulet, Puchau et al. 2007). Sin embargo, la asociación positiva de los niveles séricos de RBP4 con la sensibilidad a la insulina también se ha demostrado en individuos sin obesidad (Lee, Lee et al. 2007), por lo que

es necesario profundizar en su papel fisiológico y en las consecuencias derivadas del aumento de sus niveles.

–Otras de las adipoquinas relacionadas con la respuesta inflamatoria que se expresan en el tejido adiposo son la osteopontina, chemerina, apelina, visfatina, vaspina, factor de crecimiento nervioso (NGF), así como VEGF y algunas metaloproteinasas como factores proangiogénicos (Zulet, Puchau et al. 2007) (Trayhurn, Wang et al. 2008 (a)) (Maury and Brichard 2010) (Makki, Froguel et al. 2013).

De la gran familia de adipoquinas que son sintetizadas y secretadas por el tejido adiposo, dos de las hormonas predominantes son la leptina y la adiponectina. En la obesidad, también se presenta una desregulación de estas dos adipoquinas, ya que los niveles circulantes de leptina se encuentran aumentados, mientras que los de la adiponectina están disminuidos (Gómez-Hernández, Perdomo et al. 2013).

– Leptina: esta hormona está ampliamente reconocida como la adipoquina más importante secretada por el tejido adiposo (Friedman and Halaas 1998) (Trayhurn, Hoggard et al. 1999) (Harris 2000), y sus concentraciones en plasma están correlacionadas con la cantidad total de masa celular grasa, y el índice de masa corporal (Frühbeck 2001). La leptina se expresa principalmente en las células grasas del tejido adiposo, pero también en otros tejidos como la placenta, glándula mamaria, estómago, músculo, cerebro, ovario y tejido linfoide (Frühbeck 2001) (Park and Ahima 2015). Esta hormona peptídica, codificada por el gen ob, es liberada desde el tejido adiposo a la circulación y actúa como señal endocrina en el hipotálamo regulando la ingesta y el gasto energético (Harris 2000) (Friedman 2011) (Friedman and Mantzoros 2015). Cuando se produce un incremento de la cantidad de tejido adiposo, los niveles de leptina circulantes aumentan e interaccionan con un complejo circuito neuronal, activando neuronas anorexigénicas e inhibiendo las orexigénicas, disminuyendo el apetito e incrementando el gasto energético. Por el contrario, una reducción de la masa grasa provoca una disminución de los niveles de leptina, que estimula la ingesta y disminuye el gasto energético. Este sistema mantiene el control homeostático del tejido

adiposo (Ahima and Flier 2000) (Ahima 2008) (Friedman 2011) (Park and Ahima 2015).

El receptor de la leptina (Ob-R), que se puede expresar en distintas formas alternativas, fue identificado en el hipotálamo y en regiones cerebrales adyacentes, lo que inicialmente hizo pensar que las acciones de la leptina estaban restringidas exclusivamente al sistema nervioso central. Sin embargo, el receptor funcional de la leptina está presente en diferentes órganos como el páncreas, músculo esquelético, estómago, intestino e hígado. También se expresa en órganos reproductores como los ovarios, útero y testículos, y en tejidos inmunes como el bazo, timo, nódulos linfáticos, en células hematopoyéticas y en células T. Otras localizaciones incluyen el endotelio, riñones, adrenales y corazón (Frühbeck 2001). Esta amplia distribución del receptor, refleja la gran cantidad de efectos biológicos que tiene la leptina en tejidos no neurales, por lo que se pone de manifiesto su función pleiotrópica (Frühbeck 2001). Así, la leptina no solo está implicada en la regulación del peso corporal y la homeostasis energética, sino que también posee un papel regulador en la inmunidad, inflamación y hematopoyesis. Esta hormona actúa como nexo de unión entre el sistema neuroendocrino e inmunitario, regula el eje hipotalámico-pituitario-adrenal, y participa en la maduración del sistema reproductivo. Además está implicada en angiogénesis, desarrollo fetal (Fantuzzi and Faggioni 2000), control de la presión sanguínea (Frühbeck 2001), el metabolismo lipídico (Gallardo, Bonzón-Kulichenko et al. 2007) (Buettnner, Muse et al. 2008) y la formación del hueso (Frühbeck 2001).

Debido a que las mutaciones en el gen Ob son poco frecuentes, no es común que la obesidad se relacione con una deficiencia genética de leptina, por lo que la mayoría de los sujetos obesos expresan dicha hormona (Marti and Martínez 1999) (Matarese 2000). En este sentido, en general, los individuos obesos presentan un aumento de su expresión en tejido adiposo y unos niveles elevados circulantes de leptina (Friedman 2011) (Park and Ahima 2015). Esta hiperleptinemia es debida a una reducida sensibilidad a los efectos fisiológicos de la leptina, que se correlaciona con una resistencia a esta hormona, lo que da lugar a un incremento compensatorio de las concentraciones circulantes (Frühbeck 2001) (Friedman 2011).

La leptina induce la expresión de citoquinas proinflamatorias como el TNF- α o la IL-6 por monocitos y macrófagos y actúa directamente sobre los hepatocitos promoviendo la expresión de la PCR, contribuyendo así a la inflamación crónica en la obesidad (Loffreda, Yang et al. 1998) (Makki, Froguel et al. 2013). La hiperleptinemia también se ha asociado a la patofisiología de la aterosclerosis, ya que algunos estudios señalan que la leptina, en elevadas concentraciones, puede aumentar la agregación plaquetaria y la trombosis arterial (Nakata, Yada et al. 1999) (Konstantinides, Schäfer et al. 2001) (Li, Li et al. 2006). Además, la leptina induce la formación de ROS en las células endoteliales y también incrementa la expresión de moléculas de adhesión (Cooke and Oka 2002).

– Adiponectina: se expresa casi exclusivamente en el tejido adiposo. Al contrario que la mayoría de las adipoquinas, la expresión génica en los adipocitos y los niveles circulantes de adiponectina se correlacionan negativamente con el índice de masa corporal y están disminuidos en sujetos obesos (Arita, Kihara et al. 1999) (Ouchi and Walsh 2007). Esta hipoadiponectinemia también se asocia con complicaciones como la diabetes tipo II, la hipertensión y la enfermedad cardiovascular (Ouchi and Walsh 2007). La adiponectina ejerce acciones anti-inflamatorias en diferentes tipos celulares. Distintos estudios sugieren que la adiponectina puede actuar como un factor de protección frente a la resistencia a la insulina y la enfermedad cardiovascular (Ouchi, Kihara et al. 2000) (Ouchi and Walsh 2007). Esta adipoquina tiene un efecto protector sobre la pared vascular actuando en los distintos estadios del proceso aterogénico, a través de los siguientes mecanismos moleculares: 1) disminución de la expresión de moléculas de adhesión en las células del endotelio vascular (Ouchi, Kihara et al. 1999) (Ouchi, Kihara et al. 2000) (Kobashi, Urakaze et al. 2005) (Ouedraogo, Gong et al. 2007); 2) supresión de la proliferación y la migración de las células del músculo liso vasculares (Arita, Kihara et al. 2002); 3) inhibición de la transformación de los macrófagos a células espumosas (Ouchi, Kihara et al. 2001) (Yamauchi, Kamon et al. 2003). Además, la adiponectina inhibe la activación del NF- κ B inducida por el TNF- α en las células endoteliales (Ouchi, Kihara et al. 2000) (Kobashi, Urakaze et al. 2005). También se han descrito distintos efectos metabólicos de la adiponectina. En el hígado, esta adipoquina mejora la sensibilidad a la insulina, incrementa la oxidación de ácidos

grasos y reduce la producción de glucosa hepática. En el músculo esquelético también estimula la oxidación de ácidos grasos, así como la utilización de la glucosa (Kershaw and Flier 2004) (Stofkova 2009). Las citoquinas proinflamatorias, como el TNF- α y la IL-6, liberadas por el tejido adiposo en el estado inflamatorio que acompaña a la obesidad, son potentes inhibidores de la expresión génica de la adiponectina (Ouchi and Walsh 2007).

● Infiltración de macrófagos en el tejido adiposo

La obesidad se caracteriza por la acumulación de diversas células inmunitarias en el tejido adiposo, y entre ellas se encuentran los macrófagos, como ya se mencionó anteriormente, implicados en la expresión de genes relacionados con la inflamación (Weisberg, McCann et al. 2003) (Xu, Barnes et al. 2003) (Patel, Buras et al. 2013). El contenido en macrófagos del tejido adiposo se correlaciona positivamente con dos índices de adiposidad: el índice de masa corporal y el tamaño de los adipocitos. Además, los macrófagos del tejido adiposo son los responsables de prácticamente la totalidad de la expresión del TNF- α y la IL-6 en este tejido, así como de otras moléculas proinflamatorias (Weisberg, McCann et al. 2003), contribuyendo así a la inflamación sistémica. Por tanto, los macrófagos son particularmente importantes en la respuesta inflamatoria que ocurre en el tejido adiposo durante el desarrollo de la obesidad (Zeyda and Stulnig 2009), estado que se asocia con un mayor reclutamiento de estas células.

La infiltración de macrófagos en el tejido adiposo proviene del flujo de monocitos circulantes, los cuales derivan esencialmente de la médula ósea (Weisberg, McCann et al. 2003). Entre las moléculas proinflamatorias secretadas por el tejido adiposo se encuentra la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1), que juega un papel fundamental en el reclutamiento de los monocitos desde la circulación al propio tejido adiposo (Xu, Barnes et al. 2003) (Weisberg, McCann et al. 2003) (Wellen and Hotamisligil 2003). Los niveles en el tejido adiposo y circulantes de MCP-1 están elevados en la obesidad (Bruun, Lihn et al. 2005), lo que sugiere que MCP-1 podría contribuir a las alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad y a la resistencia a la insulina (Takahashi, Mizuarai et al. 2003) (Sartipy and Loskutoff 2003). La infiltración de monocitos circulantes es un fenómeno complejo que incluye diferentes etapas, entre

las que se incluye un aumento en la expresión de moléculas de adhesión endotelial como ICAM-1 y VCAM-1, las cuales favorecen la adhesión de los monocitos al endotelio activado, su migración a través del mismo, y el reclutamiento final de estas células en el tejido adiposo (Ferrante 2007). Los monocitos una vez en el interior, se diferencian a macrófagos y amplifican la respuesta inflamatoria (Ferrante 2007) (Gómez-Hernández, Perdomo et al. 2013). La secreción aumentada de leptina por los adipocitos podría contribuir también a la infiltración de macrófagos mediante la estimulación del transporte de monocitos, promoviendo la diapédesis de estas células desde el torrente circulatorio al tejido adiposo (Wellen and Hotamisligil 2003) (Curat, Miranville et al. 2004). De igual modo, se ha sugerido que el infiltrado de linfocitos T en el tejido adiposo podría desempeñar un papel importante en el reclutamiento de macrófagos al tejido graso y en la producción de citoquinas proinflamatorias (Nishimura, Manabe et al. 2009) (Gómez-Hernández, Perdomo et al. 2013).

Además de la infiltración en el tejido adiposo, durante la obesidad los macrófagos cambian fenotípicamente. Mientras que en individuos delgados los macrófagos que residen en el tejido adiposo son anti-inflamatorios y se denominan M2, en el tejido adiposo de individuos obesos los macrófagos predominantes son proinflamatorios y se denominan M1 (Olefsky and Glass 2010) (Johnson, Milner et al. 2012) (Makki, Froguel et al. 2013) (Tateya, Kim et al. 2013). Estos dos tipos de macrófagos no solo difieren en su fenotipo, sino que también son diferentes funcionalmente. Los macrófagos M2 expresan CD11b, F4/80, CD301 y CD206, y promueven la sensibilidad local a la insulina a través de la producción de citoquinas anti-inflamatorias como IL-10 (Olefsky and Glass 2010). Por el contrario, los M1 activados, que expresan CD11b, F4/80 y CD11c, son una fuente predominante de citoquinas proinflamatorias como el TNF- α , la IL-6, así como la IL-1 β (Lumeng, Deyoung et al. 2007).

Por último, cabe destacar el papel de CD36 en los macrófagos, molécula que pertenece a la familia de los receptores B en estas células, y un elemento clave en el reconocimiento, la captación y la internalización de moléculas oxidadas de LDL en los macrófagos durante las primeras etapas del proceso aterogénico (Febbraio, Podrez et al.

2000) (Febbraio, Hajjar et al. 2001) (Gómez-Hernández, Perdomo et al. 2013). Así, en un modelo murino con obesidad genética, se observó aumento de CD36, además de un incremento en la captación de las LDL oxidadas por parte de los macrófagos, y una resistencia en la vía de señalización de la insulina. Por tanto, CD36 puede vincularse con la resistencia a la insulina y el desarrollo de placas ateroscleróticas, ya que está implicado en el reconocimiento de las LDL oxidadas y su posterior procesamiento para producir células espumosas, hecho clave en la progresión de la placa aterosclerótica (Liang, Han et al. 2004) (Gómez-Hernández, Perdomo et al. 2013).

En conclusión, en una situación de obesidad se crea un estado de inflamación con la consiguiente producción de citoquinas y otros mediadores inflamatorios, que no solo son producidos por los adipocitos, sino que también los secretan otras células como los preadipocitos, linfocitos, y especialmente macrófagos. Esto induce la síntesis y la liberación de factores quimioatrayentes, lo que favorece una infiltración del tejido adiposo visceral por los macrófagos (Gómez-Hernández, Perdomo et al. 2013). Por su parte, las células endoteliales del tejido adiposo aumentan la expresión de proteínas de adhesión como ICAM-1, VCAM-1, E-selectina y P-selectina en respuesta a la expansión del tejido adiposo, con lo que se favorece la adhesión de células inflamatorias como linfocitos T y monocitos (Sengenès, Miranville et al. 2007) (Gómez-Hernández, Perdomo et al. 2013). Esto permite un mayor reclutamiento de macrófagos (Weisberg, McCann et al. 2003) (Wellen and Hotamisligil 2005), y en consecuencia la exacerbación y la perpetuación del estado inflamatorio del tejido adiposo (**figuras 4 y 5**).

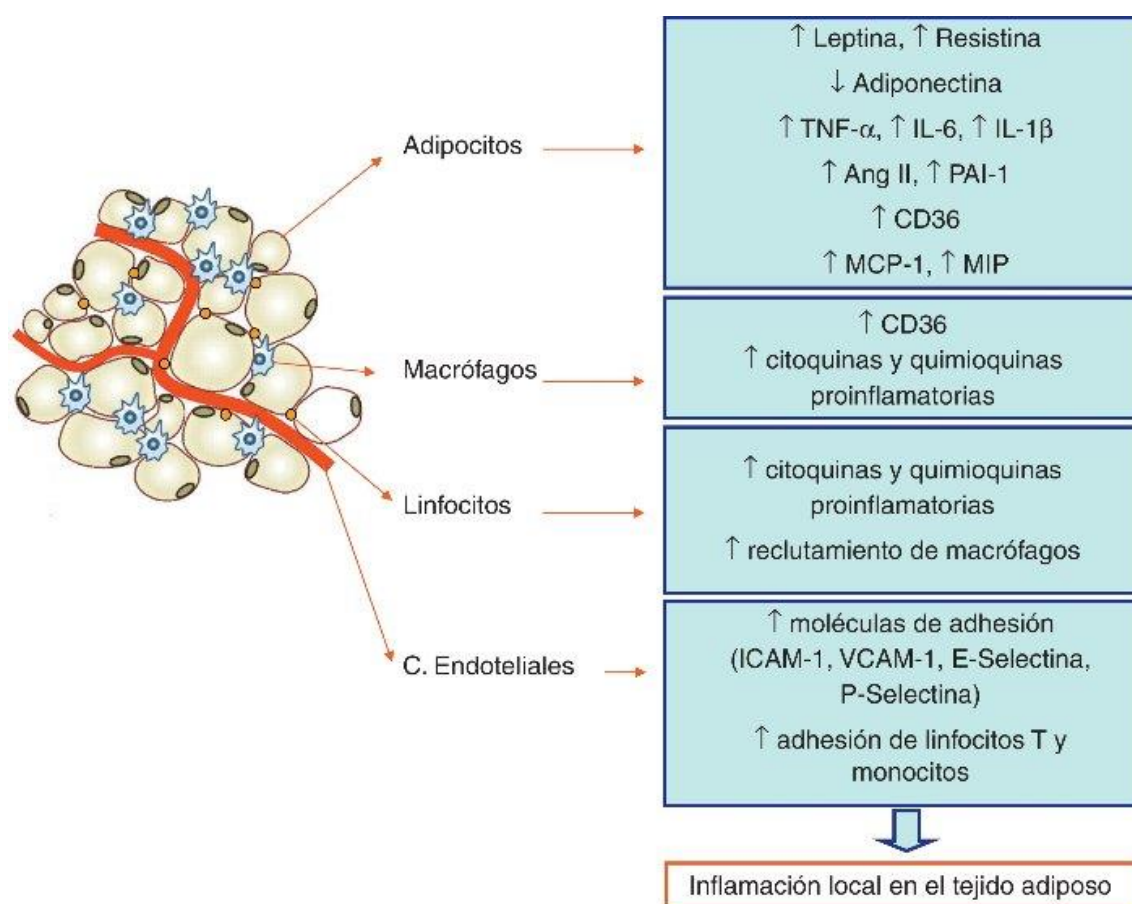


Figura 4. Contribución de los distintos tipos celulares a la inflamación local del tejido adiposo. La obesidad es un estado de inflamación crónica de bajo grado en el que tanto los adipocitos como los macrófagos y linfocitos infiltrados, así como las células endoteliales de los capilares próximos a los adipocitos, están contribuyendo a la inflamación local. (Tomado de Gómez-Hernández, Perdomo et al. 2013).

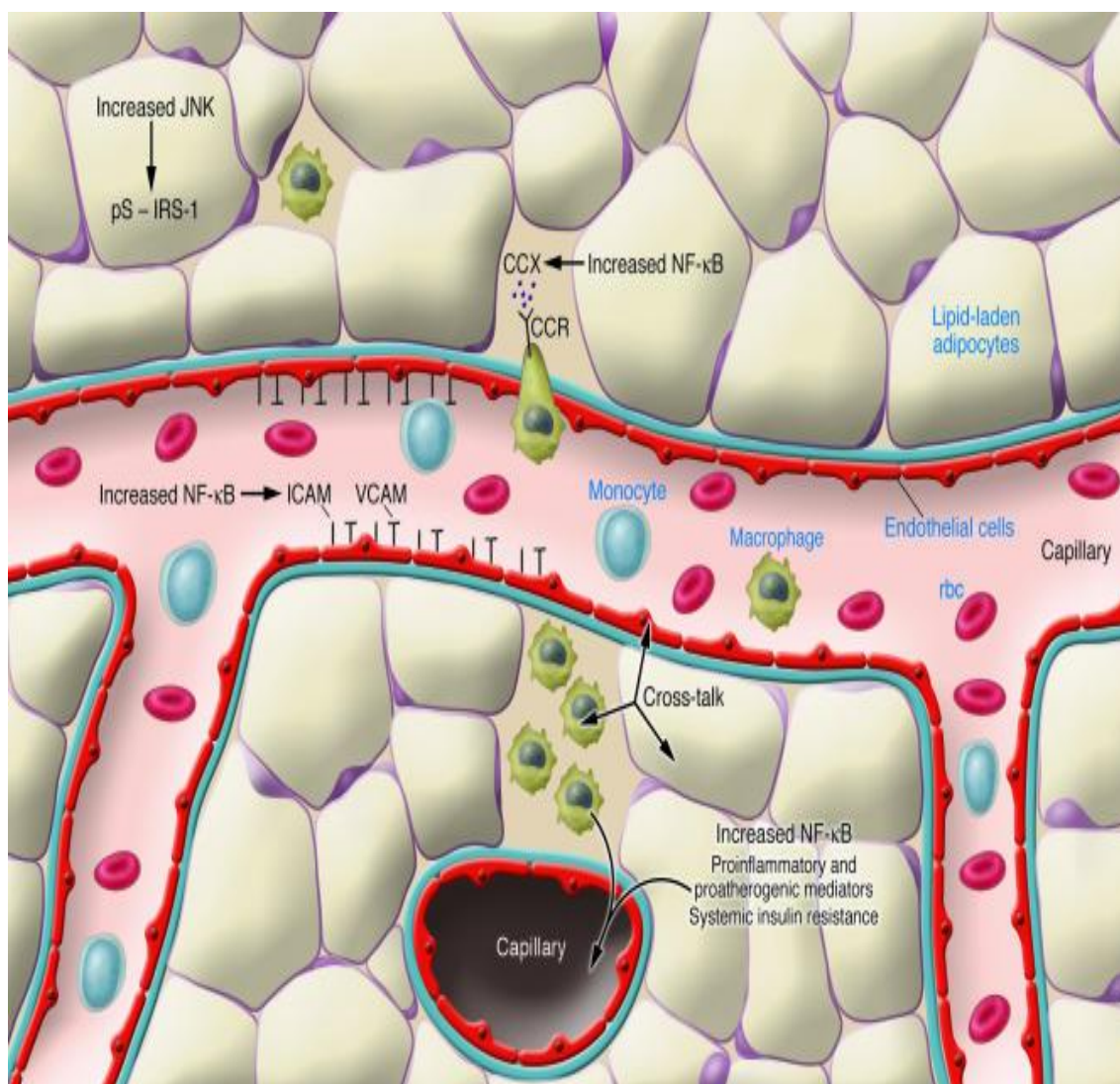


Figura 5. Mecanismos de la activación de la inflamación en el tejido adiposo. La acumulación de lípidos en los adipocitos durante la obesidad, origina un estado de estrés celular con la activación de las JNK y del NF-κB, que permiten un aumento en la producción de citoquinas proinflamatorias por los adipocitos, entre las que se incluyen la IL-6, TNF-α, leptina, resistina, y quimioquinas como MCP-1, además de otros mediadores proaterogénicos tales como PAI-1. Moléculas de adhesión endotelial (VCAM-1, ICAM-1) y moléculas quimioatrayentes (designadas como CCX) se unen a integrinas y a receptores de quimioquinas (CCR), respectivamente, en la superficie de los monocitos para su reclutamiento al tejido adiposo. Los monocitos que se diferencian a macrófagos producen gran cantidad de citoquinas y quimioquinas inflamatorias, que amplifican la inflamación local y propagan la inflamación de forma sistémica. (Ps: phosphoserine. Fosfoserina) (Tomado de Shoelson, Lee et al. 2006).

● Efectos sistémicos de la inflamación por adiposidad

La obesidad puede causar inflamación además de en los adipocitos, en otros tejidos como el hígado (Lanthier, Molendi-Coste et al. 2011) (Osborn and Olefsky 2012) y el músculo. En el caso del hígado, la esteatosis o acumulación de lípidos en los hepatocitos podría inducir una respuesta inflamatoria. Las moléculas proinflamatorias producidas por el tejido adiposo a través de la circulación portal podrían ser las responsables del inicio de esa inflamación hepática. Así, en el mismo hepatocito graso se produce la activación del NF- κ B y un incremento de la expresión de la IL-6, IL-1 β , y el TNF- α (Cai, Yuan et al. 2005) (Gómez-Hernández, Perdomo et al. 2013). Por tanto, la situación en el hígado es similar a la del tejido adiposo en un estado de obesidad, y se asocia a un incremento en el reclutamiento de macrófagos (Obstfeld, Sugaru et al. 2010) (Johnson and Olefsky 2013) y en su activación, así como una mayor señalización inflamatoria y producción local de citoquinas y quimioquinas (McNelis and Olefsky 2014). Estas citoquinas proinflamatorias aumentan la activación de los macrófagos hepáticos residentes o células de Kupffer, y participan en el desarrollo de la resistencia a la insulina (Cai, Yuan et al. 2005) (Gómez-Hernández, Perdomo et al. 2013). De la misma manera que en el tejido adiposo, en el hígado hay diferentes tipos de células como son las células inmunes y las endoteliales que participan en la inflamación y en la resistencia a la insulina a nivel local en el hepatocito (Racanelli and Rehermann 2006). Los mediadores proinflamatorios y proaterogénicos que son producidos por el tejido adiposo y el hígado, y están asociados a las células inmunes, generan una inflamación sistémica que produce resistencia a la insulina en el músculo esquelético y otros tejidos periféricos (Gómez-Hernández, Perdomo et al. 2013). En el tejido vascular, además de producir resistencia insulínica vascular, podrían contribuir a iniciar el proceso aterogénico (Shoelson, Lee et al. 2006) (**figuras 6 y 7**).

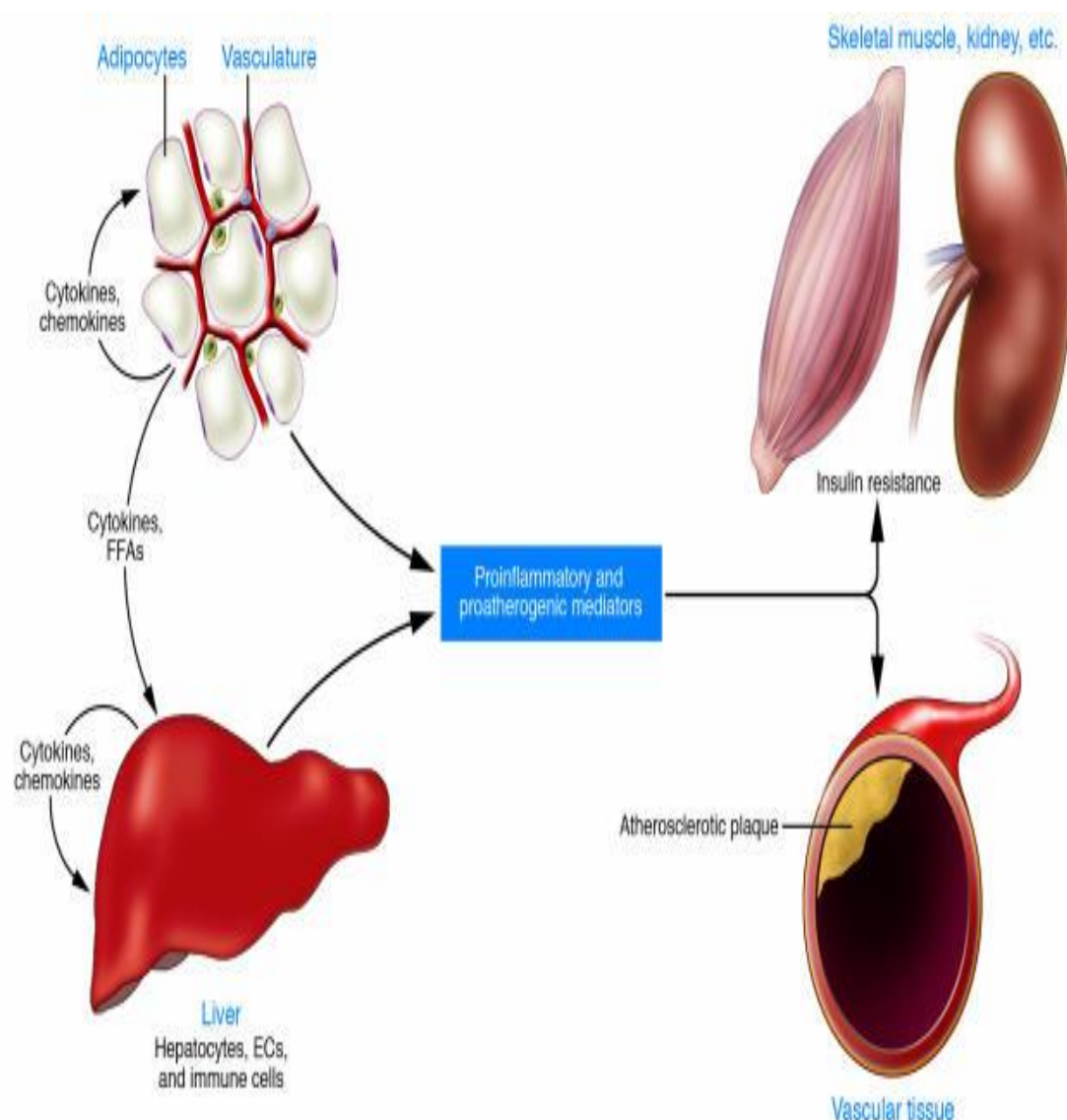


Figura 6. Efectos locales y sistémicos de la inflamación en la resistencia a la insulina y la aterogénesis. El incremento de adiposidad activa respuestas inflamatorias en el tejido adiposo y en el hígado, lo cual está asociado al incremento en la producción de citoquinas y quimioquinas. Las células inmunes incluyendo monocitos y macrófagos se reclutan y se activan, causando resistencia a la insulina local. La liberación portal de las citoquinas derivadas de la grasa abdominal, y los lípidos contribuyen a la inflamación hepática y la resistencia a la insulina. Los mediadores proinflamatorios y proaterogénicos se producen en el tejido adiposo y en el hígado, así como en las células inmunes asociadas. Esto permite crear una inflamación sistémica que promueve la resistencia a la insulina en el músculo esquelético y otros tejidos, además de aterogénesis en la vasculatura. (ECs: Endothelial cells. Células endoteliales) (FFAs: free fatty acids. Ácidos grasos libres) (Tomado de Shoelson, Lee et al. 2006).

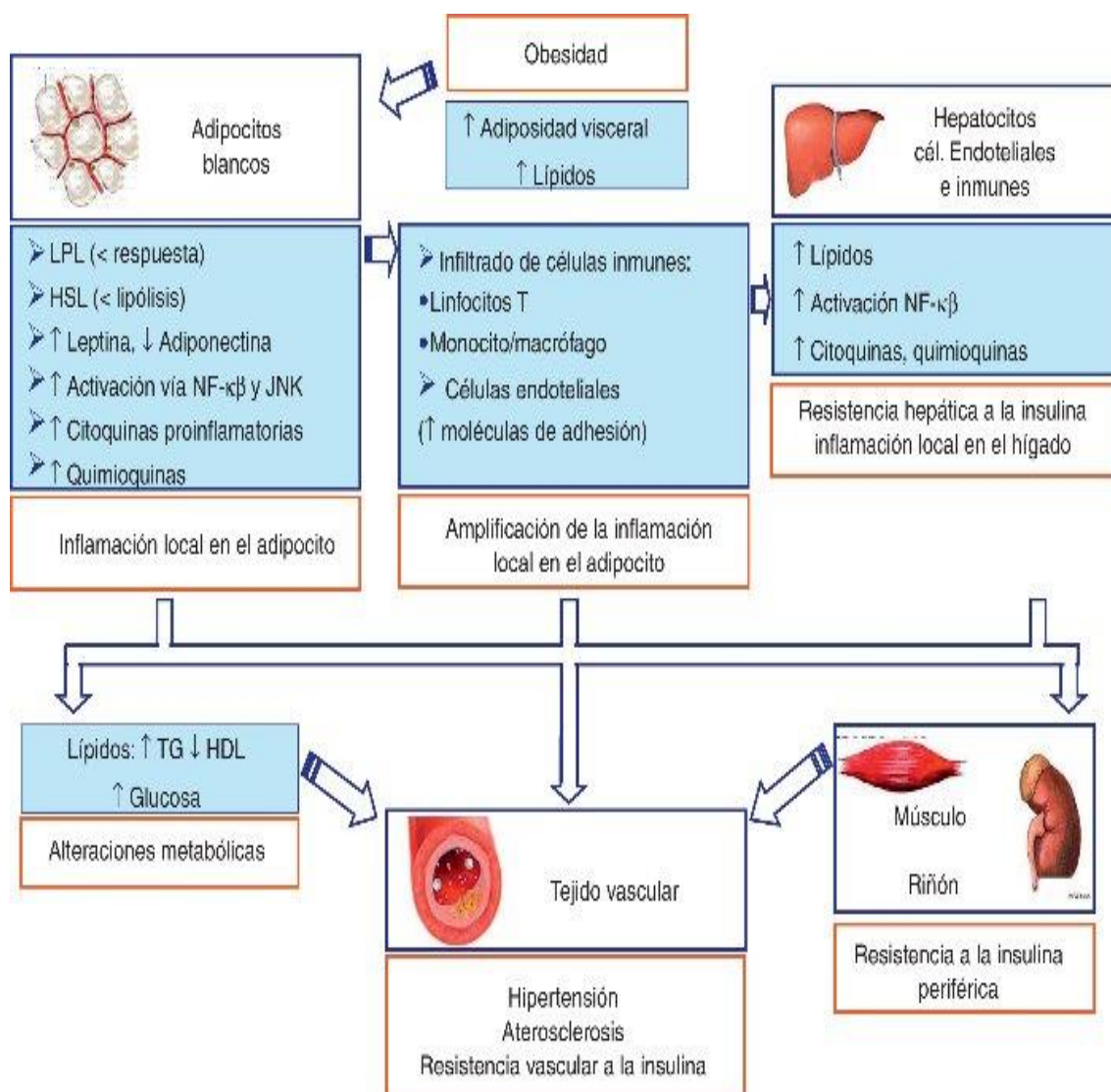


Figura 7. Contribución del tejido adiposo a la obesidad y las complicaciones metabólicas y vasculares asociadas. En una situación de obesidad se produce una acumulación de lípidos en los adipocitos, iniciándose un estrés en la célula y la activación de la vía de las JNK y del NF- κ B, generándose una inflamación local en el adipocito. Esta inflamación puede exportarse a través de la vía portal al hígado y, finalmente, a otros tejidos periféricos como el vascular, donde podría producir aterosclerosis, hipertensión y resistencia vascular a la insulina (Tomado de Gómez-Hernández, Perdomo et al. 2013).

En conclusión, la comunicación entre los adipocitos y los macrófagos está asociada a un incremento de rutas de señalización inflamatorias que resulta en un aumento de citoquinas proinflamatorias, factores angiogénicos y desórdenes metabólicos sistémicos (Cancello and Clément 2006).

La obesidad, por tanto, como un estado inflamatorio crónico de bajo grado, asociado a una producción alterada de citoquinas y un incremento de reactantes de fase aguda, provee una relación directa con otros componentes del síndrome metabólico. La vía final común es la aterosclerosis, causante de enfermedad vascular generalizada que conduce a hipertensión arterial, enfermedad coronaria y enfermedad vascular periférica (Gómez-Hernández, Perdomo et al. 2013) (**figura 7**).

1.5.4. Modelos animales para el estudio de la obesidad

Distintos modelos murinos se han desarrollado para la investigación en obesidad y para comprender los mecanismos implicados en la homeostasis energética, debido a que las ratas y los ratones son animales de fácil manejo y mantenimiento. Los modelos animales de obesidad son también importantes para el desarrollo de futuros tratamientos para esta patología.

• Modelos de obesidad genética

Diversas mutaciones en genes concretos han sido identificadas en roedores como causantes de obesidad. A continuación se exponen las más estudiadas.

La mutación *agouti* en ratones resulta en un modelo animal obeso y de color amarillo. El gen *agouti* codifica para una proteína (*agouti* signaling protein-ASP) que se expresa en el melanocito folicular, donde actúa bloqueando la acción de la hormona estimulante del melanocito (melanocyte-stimulating hormone- MSH) a nivel del receptor de melanocortina 1 (MC1-R). También estimula la producción del pigmento amarillo feomelanina e inhibe el pigmento negro eumelanina inducido por la MSH. Además, la proteína ASP es un antagonista de los receptores subtipo 4 de melanocortina (MC4-R), los cuales se expresan en el hipotálamo y tienen un papel importante en la regulación del peso corporal. Ratones homocigotos para la mutación amarillo letal (A^y) y para la mutación amarillo viable (A^{vy}) en el gen *agouti* muestran un pelaje de color amarillo, fenotipo obeso, diabetes tipo II, hiperleptinemia, resistencia a la insulina, infertilidad y susceptibilidad a tumores (Miltnerberger, Mynatt et al. 1997) (Carroll, Voisey et al. 2004) (Imai and Ahima 2005).

Los modelos de obesidad genética en ratón más frecuentemente estudiados son el ratón *ob/ob* y *db/db*. El ratón *ob/ob* fue descubierto en 1949 en un grupo de ratones genéticamente heterogéneos, en el laboratorio Roscoe B. Jackson Memorial, Bar Harbor, Maine, y fue transferido a la colonia de ratones C57BL, que está ampliamente caracterizada. La sustitución de una base en el codón 105 del gen que codifica para la leptina (*ob*) resulta en un codón stop prematuro y por consiguiente en una proteína truncada. El ratón *ob/ob* que porta la mutación en homocigosis en el gen que codifica para la proteína leptina, carece de leptina funcional y desarrolla hiperfagia, obesidad desde la temprana edad de 4 semanas, hiperglicemia, hipoactividad, un incremento de corticosterona sérica, esteatosis, resistencia a la insulina y una alterada termogénesis.

Alrededor de las 8 semanas, el peso de los ratones *ob/ob* es dos veces superior al de los ratones salvajes. Por otra parte, los ratones *ob/ob* son infértiles y presentan una función inmune deteriorada, así como respuestas inflamatorias. Este modelo animal de obesidad es indistinguible de sus controles salvajes tras el nacimiento, pero transcurridas 2 semanas los ratones *ob/ob* desarrollan hiperinsulinemia. Los niveles de glucosa en sangre se incrementan y alcanzan un pico después de los 3-5 meses cuando los animales muestran una elevada ingesta. Este modelo animal de obesidad genética y diabetes es apropiado para los estudios acerca de la interacción entre la leptina y la insulina (Lindström 2007) (Shore 2007).

Los ratones homocigotos *db/db* deficientes en el receptor de la leptina fueron identificados inicialmente en 1966 en los laboratorios Jackson como ratones obesos. Una mutación puntual en la secuencia de bases que codifica para la isoforma larga del receptor de leptina (*Ob-Rb*), hace que éste sea defectuoso, permitiendo que la señalización de la leptina sea no funcional. Este modelo animal que porta en homocigosis dicha mutación, al igual que los ratones *ob/ob* manifiesta una obesidad severa, alcanzando un peso dos veces superior al de los ratones salvajes a las 8 semanas de edad, hiperinsulinemia, hiperglicemia, hiperlipidemia, desequilibrios hormonales, una marcada atrofia tímica, así como respuestas inmunitarias defectuosas y una alterada termorregulación. Estos ratones son un modelo de obesidad y también de diabetes (Sharma, McCue et al. 2003) (Palmer, Aurrand-Lions et al. 2006).

Tanto los ratones *ob/ob*, como los *db/db* presentan una considerable reducción del tamaño y celularidad del timo, además de múltiples alteraciones metabólicas y neuroendocrinas (Palmer, Aurrand-Lions et al. 2006).

Un modelo animal similar al de los ratones *db/db*, lo constituyen las ratas Zucker *fa/fa*, que es el modelo mejor conocido y más ampliamente utilizado para el estudio de la obesidad. La rata Zucker *fa/fa*, también denominada *Lepr^{fa}*, resulta de una mutación autosómica recesiva del gen *fa* en el cromosoma 5. La mutación espontánea fue descubierta por Zucker, concretamente en el laboratorio de Harriet Bird Memorial, Stow, Massachusetts, USA, en 1961 (Srinivasan and Ramarao 2007). Estas ratas portan en homocigosis la mutación recesiva del gen que codifica para el receptor de leptina (son homocigotas para el alelo *fa*) por lo que expresan un receptor de leptina no funcional, y por tanto son hiperleptinémicas. Como consecuencia de esta resistencia a la leptina, estos animales presentan obesidad ya a la edad juvenil de 3-5 semanas de edad, hiperfagia, hiperglicemia variable, intolerancia a la glucosa, hipertensión, resistencia a la insulina, esteatosis, hiperlipidemia, hipertrofia e hiperplasia de los adipocitos, así como un disminuido gasto energético. La hipertrigliceridemia característica de estas ratas, es debida a la producción hepática incrementada de lipoproteínas de muy baja densidad. También las ratas Zucker *fa/fa* muestran un aumento de tamaño en órganos como el hígado (hepatomegalia), el bazo (esplenomegalia) y el corazón (cardiomegalia). Las alteraciones endocrinas que presentan estas ratas incluyen hiperinsulinemia, hipercorticosteronemia, hipotiroidismo, y una función reproductiva alterada (Bray 1977) (White and Martin 1997) (Srinivasan and Ramarao 2007) (Aleixandre de Artiñano and Miguel Castro 2009). Las ratas Zucker lean que portan la mutación en heterocigosis para el receptor de leptina (*fa/+*) no manifiestan obesidad y actúan como controles de las ratas *fa/fa*. Además, las ratas Zucker *fa/fa* también se emplean para el estudio del síndrome metabólico.

Otros modelos murinos de obesidad genética son los siguientes:

El ratón *tubby*, que desarrolla obesidad, presenta una mutación asociada con degeneración retiniana. El gen *tubby* está implicado en la regulación hipotalámica del

peso corporal en ratones. Las mutaciones en este gen en humanos no se manifiestan con obesidad (Kleyn, Fan et al. 1996) (Carroll, Voisey et al. 2004).

El ratón KK (Kuo Kondo) es un modelo poligénico de obesidad genética y diabetes tipo II, obtenido en Japón mediante selección endogámica atendiendo al tamaño corporal incrementado. Estos animales son hiperfágicos, hiperinsulinémicos, resistentes a la insulina, y muestran una obesidad moderada a los dos meses de edad, que alcanza el máximo a la edad de 4-5 meses. En este modelo animal la resistencia a la insulina precede al inicio de la obesidad (Srinivasan and Ramarao 2007).

El ratón de Nueva Zelanda (The New Zeland Obese mouse-NZO) es otro modelo poligénico de obesidad y diabetes, obtenido mediante endogamia en varias generaciones cuyos parentales se seleccionaron por su color *agouti* del pelaje. Estos animales presentan hiperfagia, moderada hiperinsulinemia, hiperglicemia, intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina. El peso corporal se eleva en los primeros dos meses de vida debido a la hiperfagia. La hiperglicemia y la disminución de la tolerancia a la glucosa se incrementan de forma continua al avanzar la edad en estos ratones (Srinivasan and Ramarao 2007).

Por último, las ratas OLETF (Otsuka Long Evans Tokushima Fatty) fueron obtenidas de la crianza selectiva de ratas diabéticas por mutación espontánea, procedentes de la colonia heterogénea Long Evans, y mantenidas en la farmacéutica Otsuka, Tokushima, Japón. Este modelo animal poligénico desarrollan diabetes a las 18-25 semanas, y exhiben polifagia innata, obesidad moderada, hipertrigliceridemia, hiperinsulinemia, hipercolesterolemia, e hiperglicemia, además de tener afectada la tolerancia a la glucosa a la edad de 16 semanas de vida (Srinivasan and Ramarao 2007).

• Modelos de obesidad por dieta

Otros modelos de obesidad son los inducidos mediante la administración de dietas ricas en grasa (denominadas diet induced obesity- DIO), que se han utilizado en rata y ratón (Matarese and La Cava 2005). Estas dietas pueden tratarse de dietas hipercalóricas estandarizadas o sin una composición nutricional estándar (coloquialmente denominada como “dieta de cafetería”), ya que ésta aporta una mezcla de comida comercial de supermercado, siendo una dieta similar a la que genera la obesidad en humanos. Diferentes estudios muestran como ratones de la cepa C57BL/6

alimentados con una dieta hipercalórica desarrollaron obesidad (Ikemoto, Takahashi et al. 1996) (Van Heek, Compton et al. 1997) (Shore 2007). Así, en uno de los estudios, estos ratones tras 51 días de ingestión con la dieta, en la que el 45% de las calorías derivaban de grasa, incrementaron su peso corporal un 25% más que animales alimentados únicamente con una dieta donde solo el 10% de las calorías derivaban de grasa (Van Heek, Compton et al. 1997). Asimismo, ratones ICR-CD1 alimentados con una dieta rica en grasa (60%) desarrollaron obesidad (Hunsche, Hernandez et al. 2015).

• Ventajas e inconvenientes de los modelos murinos de obesidad genética y los modelos de obesidad inducida por dieta

Los resultados obtenidos en modelos murinos de obesidad genética, aunque son muy reproducibles ya que estos animales son relativamente homogéneos, representan un porcentaje minoritario de los casos de obesidad en la población humana. En cambio, los modelos animales obtenidos a partir de una dieta hipercalórica podrían ser más similares en cuanto a los mecanismos mayoritarios que conducen a la obesidad en humanos. Sin embargo, se sabe que es difícil obtener estos modelos animales por dieta hipercalórica, debido a que los roedores presentan un control de la ingesta muy regulado y además no manifiestan un exacerbado componente emocional que incremente la ingesta de manera incontrolable, como ocurre en humanos (De la Fuente and De Castro 2012).

1.5.5. Obesidad y sistema inmunitario

El tejido adiposo es un órgano endocrino inmunológicamente activo (Johnson, Milner et al. 2012) (Cildir, Akincilar et al. 2013) (McArdle, Finucane et al. 2013) (Grant and Dixit 2015). Como se comentó anteriormente, el tejido adiposo está compuesto por diversos tipos celulares entre los que se incluyen los adipocitos, fibroblastos, células endoteliales y varias células inmunitarias. Entre las células inmunes innatas que componen el tejido adiposo se encuentran los macrófagos, neutrófilos, eosinófilos y mastocitos, mientras que varios subtipos de células B y T son las células inmunes adaptativas que forman parte de dicho tejido. También, se ha apuntado recientemente que las células NK son reguladoras de la inflamación del tejido adiposo en la obesidad. La infiltración y acumulación de células inmunes en el tejido adiposo hipertrofiado promueve la secreción de citoquinas inflamatorias, contribuyendo al daño

en órganos diana (Ghigliotti, Barisione et al. 2014). En el progreso de la obesidad, cambios en el número y la actividad de las distintas células inmunitarias juegan un papel importante en la progresión de la resistencia a la insulina a través de la producción de los mediadores proinflamatorios (Huh, Park et al. 2014).

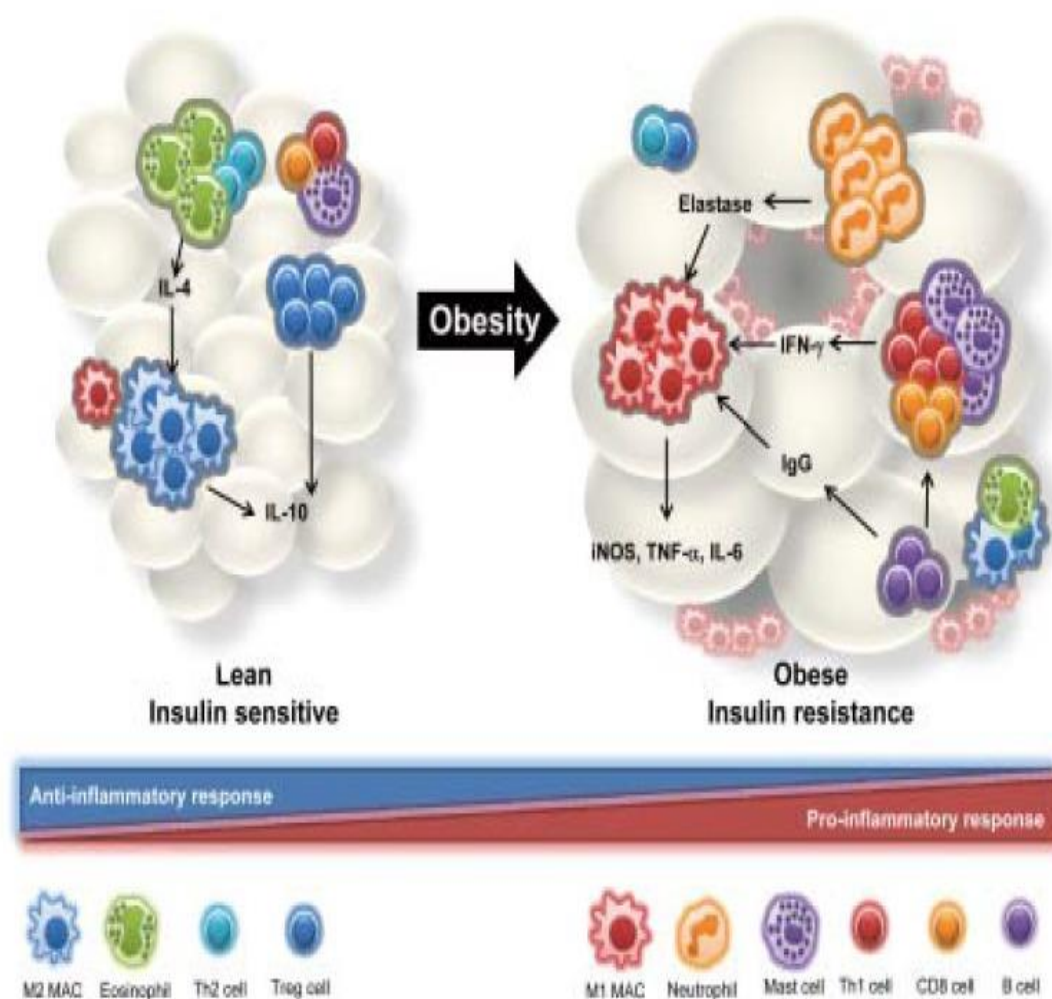


Figura 8. Interacción de las células inmunes del tejido adiposo. En el tejido adiposo no obeso o delgado (lean), la IL-4 secretada por los eosinófilos y las células Th2 activan a los macrófagos tipo M2, los cuales expresan citoquinas anti-inflamatorias como la IL-10. Las células T reguladoras (Treg) también tienen un papel importante en la respuesta anti-inflamatoria mediante el contacto célula-célula o participando de la secreción de IL-10. Por el contrario, en el tejido adiposo obeso (obese), el número de células inmunes pro-inflamatorias infiltradas se incrementa, mientras que el de anti-inflamatorias disminuye. Los neutrófilos, que son respondedores tempranos a la respuesta inflamatoria, infiltran el tejido adiposo donde secretan elastasa y estimulan la infiltración de macrófagos, además de la secreción de citoquinas proinflamatorias por parte de los macrófagos tipo M1. Los niveles de IFN- γ secretados por los mastocitos, las células Th1 y las T CD8 están elevados en el tejido adiposo obeso. Las células B también tienen un papel proinflamatorio a través de la secreción de Ig-G (Tomado de Huh, Park et al. 2014).

● Leptina y sistema inmunitario

Aunque existen numerosas citoquinas asociadas a la obesidad, muchas de las cuales ya se han mencionado, la leptina está considerada como la principal citoquina implicada en la relación entre la obesidad y el sistema inmune. Aunque la mayor parte de las acciones de esta hormona tienen lugar en las neuronas hipotálamicas, el receptor de la leptina también se encuentra en precursores hematopoyéticos CD34⁺ de médula ósea, y en todos en los tipos de células de la inmunidad innata y adaptativa (Matarese 2000), por lo que la leptina tiene una función moduladora en ambos tipos de inmunidad (Bernotiene, Palmer et al. 2006). Entre los principales efectos de esta hormona en la inmunidad innata, se encuentra su importante papel regulador en la función de monocitos y macrófagos, activando la proliferación y la fagocitosis, e induciendo la secreción de IL-6 y TNF- α (Matarese, Moschos et al. 2005) (Stofkova 2009). La leptina también está implicada en el desarrollo, la activación, diferenciación, proliferación, así como en la función citotóxica de las células NK (Tian, Sun et al. 2002). Así, Laue y sus colaboradores observaron que las células NK de individuos obesos mostraban defectos funcionales y respuestas alteradas cuando se estimulaban con leptina *in vitro* (Laue, Wrann et al. 2015). Otro de los efectos de la leptina en la inmunidad innata es la inducción de la quimiotaxis de los neutrófilos y la producción de especies reactivas de oxígeno (Stofkova 2009).

En cuanto a la inmunidad adaptativa, la leptina estimula la proliferación de células T naïve y la secreción de IL-2 por estas células, pero inhibe la proliferación de células T de memoria (Stofkova 2009) (Matarese, Procaccini et al. 2010). En un estudio realizado por Martín-Romero y sus colaboradores, encontraron que, en humanos, la leptina aumenta la proliferación y la activación de linfocitos T humanos maduros de sangre periférica, en cultivo, cuando se co-estimulan con concanavalina A (Con A) o fitohemaglutinina (PHA), ya que la leptina por sí sola no es capaz de activar los linfocitos T *in vitro*. Así, la leptina induce la activación temprana del marcador CD69 y la tardía de CD25 y CD71 en los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺. Asimismo, demostraron que a nivel funcional la leptina es capaz de modular la activación de los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ hacia el fenotipo T helper 1 (Th1) a través de sus receptores en estas células, estimulando la síntesis de citoquinas como IL-2 e IFN- γ , mientras que disminuye la

activación de las células CD4⁺ y CD8⁺ hacia el fenotipo T helper 2 (Th2) y en consecuencia la producción de IL-4 y de IL-10 (Martín-Romero, Santos-Alvarez et al. 2000). Otros estudios ratificaron que en células T de memoria, la leptina promueve las respuestas inmunes hacia el fenotipo Th1 (Sánchez-Margalet, Martín-Romero et al. 2003) (Stofkova 2009) (Procaccini, Jirillo et al. 2012). Por otra parte, la leptina está implicada en la supresión de la proliferación de células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ (De Rosa, Procaccini et al. 2007). Otra de las funciones a destacar de la leptina es la prevención de la apoptosis de células T, a través de los receptores de la leptina en estas células, que se acompaña de un incremento en la proteína anti-apoptótica bcl-xL (La Cava and Matarese 2004) (Stofkova 2009).

Los resultados obtenidos en distintos modelos animales de obesidad confirman el papel inmunomodulador de la leptina. Los ratones obesos (*ob/ob*), deficiente en leptina, así como los ratones (*db/db*), carente de receptor funcional de leptina, además de desarrollar obesidad, se caracterizan por altos niveles de atrofia en los linfocitos, y afectación en el tamaño del timo y en su celularidad (Dardenne, Savino et al. 1983) (Howard, Lord et al. 1999) (Matarese 2000). La administración de leptina en el ratón (*ob/ob*), es capaz de restablecer la función tímica normal, aumentar el número de linfocitos T CD4⁺/CD8⁺, promover la diferenciación a Th1 y reducir la apoptosis tímica (Howard, Lord et al. 1999). Estas observaciones demuestran que la leptina juega un papel crítico en el mantenimiento de la maduración tímica de las células dobles-positivas CD4⁺/CD8⁺, y la prevención de la apoptosis de células T.

Los niveles de leptina tienen que ser adecuados para mantener una apropiada función inmunitaria (Matarese, Moschos et al. 2005) (Stofkova 2009). Así, en individuos obesos, los altos niveles de esta hormona inducen un estado inflamatorio crónico, el cual es la razón de la alteración en el equilibrio Th1/Th2, con la consiguiente susceptibilidad a enfermedades autoinmunes e infecciones. Por el contrario, en estados de malnutrición o ayuno, un tejido adiposo escaso causa una disminución en los niveles de leptina y el consecuente deterioro en la respuesta Th1, además de la supresión de la respuesta linfoproliferativa y una mayor susceptibilidad a infecciones. La leptina, por tanto, funciona como nexo de unión entre el estado nutricional y el sistema inmunitario,

siendo una hormona que crea un microambiente adecuado que permite la correcta funcionalidad de las células inmunitarias.

• Cambios en la función inmunitaria en la obesidad

Evidencias clínicas y epidemiológicas han demostrado que la inmunocompetencia depende del estado nutricional (Chandra 1997) (Marti, Marcos et al. 2001) (Chandra 2002) (Marcos, Nova et al. 2003) (Cunningham-Rundles, McNeeley et al. 2005). Hoy en día disponemos de una información limitada frecuentemente controvertida sobre la competencia inmunitaria en la obesidad, sin embargo, la mayoría de los estudios apoyan la existencia de un nexo de unión entre el metabolismo del tejido adiposo y la función inmune (Lamas, Marti et al. 2002). En este contexto, se exponen a continuación los distintos datos obtenidos acerca de cómo afecta la obesidad a la funcionalidad de las células inmunitarias.

– Estudios en individuos con obesidad

En un estudio realizado en células de sangre periférica de personas obesas se observó una linfopenia de células T y una menor capacidad de proliferación de los linfocitos T y B en respuesta a mitógenos, en comparación con individuos no obesos (Tanaka, Inoue et al. 1993). Estos resultados fueron posteriormente confirmados en otro trabajo con mujeres obesas adultas, en las que, aunque se detectó una elevación de los leucocitos circulantes, y concretamente de los linfocitos, la capacidad de proliferación de estas células en respuesta a mitógenos estaba disminuida. También se comprobó que existía una mayor fagocitosis y estallido oxidativo de monocitos y granulocitos, y una función normal de las células NK respecto al grupo de mujeres no obesas (Nieman, Henson et al. 1999).

En un estudio realizado en sujetos adultos con obesidad “sana” y “no sana”, clasificados de esta manera atendiendo a su perfil metabólico, el primero donde se describen diferencias cuantitativas en células inmunes circulantes de pacientes obesos con un IMC similar pero diferentes perfiles metabólicos, se observó que mostraban menor cantidad de células NK y linfocitos T citotóxicos circulantes en comparación con los sujetos sin obesidad. Por su parte, los individuos con obesidad “sana” mostraron un

número significativamente mayor de células NK y linfocitos T citotóxicos respecto a los que tenían obesidad “no sana”, independientemente de la edad y el IMC, y esas células NK estaban también menos activadas en los individuos con obesidad “sana”. Para considerar obesidad “sana” se establecieron los siguientes puntos de corte: presión sanguínea $\leq 130/85$, ratio triglicéridos/ HDL $\leq 1,65$ en hombres y 1,32 en mujeres y glucosa en ayunas $\leq 5,6$ mmol/l (Lynch, O'Connell et al. 2009). En otra investigación realizada en sujetos adultos con obesidad severa, se comprobó que los niveles de células NK circulantes estaban más disminuidos y además tenían una actividad citotóxica deteriorada, en comparación con los sujetos sin obesidad (O'Shea, Cawood et al. 2010).

Investigaciones realizadas en niños y adolescentes obesos, mostraron un deterioro en la respuesta inmune que se manifestó en una alterada linfoproliferación en respuesta a mitógenos y una menor capacidad bactericida de leucocitos polimorfonucleares (Chandra and Kutty 1980) (Marti, Marcos et al. 2001). Además, la obesidad también parece disminuir la proliferación de los linfocitos de sangre periférica y la actividad de células NK en personas mayores de 60 años, por lo que la edad está considerada como otro factor de riesgo adicional para los sujetos obesos en relación a la inmunocompetencia (Moriguchi, Oonishi et al. 1995).

Todo lo indicado explica que se haya observado una mayor susceptibilidad de los individuos obesos a las infecciones (Falagas and Kompoti 2006) (Milner and Beck 2012). Así, distintas evidencias muestran que la obesidad es un factor de riesgo para infecciones post-quirúrgicas o nosocomiales, periodontitis e infecciones respiratorias (Milner and Beck 2012) (Bandaru, Rajkumar et al. 2013). Además, la producción de anticuerpos y la activación de células CD8⁺ después de la vacunación están disminuidas en sujetos obesos respecto a individuos sanos (Sheridan, Paich et al. 2012).

– Estudios en modelos animales de obesidad

Toda una serie de modelos animales de obesidad genética y de obesidad inducida por dieta se han utilizado para analizar cómo la obesidad influye en la función inmunitaria.

Con respecto a las valoraciones llevadas a cabo en rata, en una investigación realizada en ratas obesas Zucker, se observó que mostraban linfopenia (bajos niveles de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺) en sangre periférica, timo y bazo. Además, la proliferación en respuesta a mitógenos de los esplenocitos estaba significativamente disminuida en estos animales respecto a ratas Zucker controles no obesas (Tanaka, Isoda et al. 1998). En otro estudio también se comprobó que la respuesta proliferativa a mitógenos de los linfocitos esplénicos estaba reducida, lo que se asoció a una expresión disminuida del transportador de glucosa 1 (GLUT-1), y por tanto a una baja captación de glucosa (Moriguchi, Kato et al. 1998 (a)). En un estudio realizado por Ruth y sus colaboradores, observaron que las ratas Zucker mostraban linfopenia de células T en bazo, que afectaba principalmente a los linfocitos T helper, y una menor producción de IL-2, acompañada de una mayor producción de citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6 e IL-1 β por los linfocitos esplénicos, cuando se estimulaban con concanavalina A (Con A) (Ruth, Taylor et al. 2008). Por otro lado, también se ha observado que las ratas obesas Zucker, aunque no parecían tener afectada la función fagocítica, sí mostraban una menor capacidad para destruir las levaduras fagocitadas en comparación con las ratas lean no obesas (Plotkin, Paulson et al. 1996). Asimismo, la actividad NK de los esplenocitos también se ha comprobado que está disminuida en estas ratas obesas (Moriguchi, Kato et al. 1998 (b)). Todo ello explica la mayor susceptibilidad de las ratas Zucker frente a infecciones, como la observada con *Candida albicans* (Plotkin, Paulson et al. 1996).

Por otra parte, en un modelo genético de obesidad y diabetes en rata Wistar se observó una disminución significativa de timocitos CD4⁺ y CD8⁺, y de células T circulantes, así como una menor respuesta proliferativa de esplenocitos, y también un incremento significativo de los niveles de TNF- α circulantes, en comparación con sus controles (Tanaka, Isoda et al. 2000).

Lamas y sus colaboradores examinaron la función inmunitaria en un modelo de obesidad en rata inducido por dieta de cafetería durante cinco semanas, y observaron que las células T helper del bazo estaban disminuidas, pero no existían cambios en las células T citotóxicas. También encontraron que la respuesta proliferativa de los esplenocitos en respuesta a LPS y PHA resultó ser significativamente menor que la

encontrada en animales control. Aunque no se observaron diferencias en la función fagocítica, la producción de ROS resultó ser menor en ratas obesas. Asimismo, la producción de IL-2 por los esplenocitos en respuesta a la estimulación con mitógenos fue menor en ratas obesas, sin embargo, la de producción de IL-10 fue mayor en comparación con las ratas control (Lamas, Martínez et al. 2002). En un estudio posterior realizado en un modelo de sobrepeso inducido por dieta hipercalórica en rata Wistar, se comprobó que la proliferación en respuesta a Con A estaba algo disminuida en linfocitos de bazo, y que la actividad citotóxica NK de células esplénicas tendía a ser menor, en comparación con los animales control sin sobrepeso (Lamas, Martínez et al. 2004).

En cuanto a las investigaciones realizadas en ratones, en modelos de obesidad genética, concretamente en los (*ob/ob*), se ha observado una atrofia de los órganos linfoides de estos animales, la cual afecta principalmente al tamaño del timo y a su cantidad de células (Matarese 2000). También se ha comprobado que estos animales tienen un menor número de linfocitos y células NK, así como una disminuida actividad citotóxica (Marti, Marcos et al. 2001). Además, se han identificado distintas anomalías fenotípicas en macrófagos de ratones (*ob/ob*), entre las que destaca un incremento en la producción mitocondrial de superóxido y peróxido de hidrógeno (Lee, Li et al. 1999). Dada la importancia de los macrófagos en la regulación general de la inflamación y la inmunidad, las alteraciones en la función de los macrófagos podrían contribuir a la patofisiología asociada a la obesidad. Otro estudio ha demostrado una disminución en el número y un deterioro en la funcionalidad de las células dendríticas de estos ratones (*ob/ob*) (Macia, Delacre et al. 2006). En los ratones (*db/db*) se ha observado una linfopenia de células T (Boillot, Assan et al. 1986) (Kimura, Tanaka et al. 1998), así como un deterioro en la quimiotaxis de neutrófilos aislados de médula ósea (Kordonowy, Burg et al. 2012) y una alterada actividad NK de los esplenocitos (Tian, Sun et al. 2002). Por otro lado, los macrófagos obtenidos de ratones (*ob/ob*) y (*db/db*) tienen una menor capacidad de fagocitosis (Marti, Marcos et al. 2001) (Lindström 2007) y son menos activos destruyendo levaduras (*Candida albicans*) que los aislados de animales control (Loffreda, Yang et al. 1998) (Marti, Marcos et al. 2001). Así, tanto los ratones (*ob/ob*) como (*db/db*) muestran una susceptibilidad aumentada a las infecciones

bacterianas (Milner and Beck 2012). En el caso del ratón (*ob/ob*) se ha encontrado susceptibilidad a *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pneumonia* y *Klebsiella pneumonia*, mientras que en el ratón (*db/db*) la susceptibilidad se ha detectado frente a infecciones por *Staphylococcus aureus* y *Helicobacter pylori* (Bandaru, Rajkumar et al. 2013).

En modelos de obesidad inducida por una dieta rica en grasa, en ratón, se ha observado una disminución en el número y una reducción en la funcionalidad de células Natural Killer T (NKT) hepáticas, así como un deterioro en la función de células dendríticas y en la respuesta de las células T a la presentación de antígenos (Li, Soloski et al. 2005) (Verwaerde, Delanoye et al. 2006) (Bandaru, Rajkumar et al. 2013). También se ha comprobado que existen mayores niveles de la proteína MCP-1 en plasma, y un mayor número de macrófagos/monocitos CD11b positivos en esos animales (Takahashi, Mizuarai et al. 2003). En un estudio llevado a cabo en un modelo de obesidad inducida por dieta rica grasa durante 7 meses en ratón, se encontró que la proliferación de los linfocitos de bazo en respuesta a Con A, PHA y LPS era significativamente menor respecto a los valores observados en ratones control (Sato Mito, Suzui et al. 2009). En otra investigación, ratones obesos alimentados con una dieta rica en grasa durante 13 semanas mostraron una mayor producción de TNF- α por los adipocitos y una proliferación incrementada en respuesta a LPS por leucocitos de bazo, los cuales también mostraron una mayor secreción de IFN- γ e IL-4, aunque la de IL-2 estaba disminuida, en comparación con los animales alimentados con una dieta control (Mito, Hosoda et al. 2000). En ratones alimentados con una dieta rica en grasa durante 8 semanas se observó un incremento en el número de macrófagos presentes en el tejido adiposo, así como en los niveles séricos de IL-1 β . No obstante, la proporción y la capacidad fagocítica de los granulocitos, así como la producción de ROS por células peritoneales estaban disminuidas en estos ratones, en comparación con los ratones control (Strandberg, Verdrengh et al. 2009).

Recientemente, se ha llevado a cabo un estudio en células peritoneales de ratones adultos obesos, que fueron alimentados con una dieta rica en grasa durante la adolescencia. Estos animales mostraron que, en leucocitos peritoneales, la fagocitosis de los macrófagos, la quimiotaxis de linfocitos y macrófagos, la actividad de las células

NK, así como la respuesta proliferativa de los linfocitos en respuesta a los mitógenos Con A y LPS se encontraban significativamente disminuidas respecto a los animales adultos control alimentados con una dieta estándar. Por otro lado, la liberación de IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-2 e IL-10 por los leucocitos en cultivo resultó ser significativamente menor en ratones obesos respecto a los animales control. En cuanto a los parámetros de estrés oxidativo valorados, se observó que los ratones obesos presentaban significativamente menores niveles de glutathion total y una disminuida actividad catalasa, en cambio la actividad xantina oxidasa estaba incrementada respecto a sus controles (Hunsche, Hernandez et al. 2015).

Todos estos estudios muestran que la obesidad provoca un deterioro de las células inmunitarias alterando el número de las mismas, así como su respuesta funcional (de Heredia, Gómez-Martínez et al. 2012).

1.6. EL EJERCICIO FÍSICO COMO ESTRATEGIA PARA EL CONTROL DE LA OBESIDAD Y EL SÍNDROME METABÓLICO

1.6.1. Conceptos generales

En la actualidad el ejercicio físico se está empleando como una intervención, no farmacológica, efectiva en individuos obesos, con resistencia a la insulina o con diabetes mellitus tipo II. Distintos trabajos han confirmado que el ejercicio aeróbico regular disminuye la presión sanguínea (Blair, Goodyear et al. 1984) (Carroll and Kyser 2002) (Xiang, Naik et al. 2005), y mejora la sensibilidad a la insulina y la homeostasis de la glucosa en roedores y humanos (Henriksen 2002) (Wojtaszewski, Nielsen et al. 2002) (Xiang, Naik et al. 2005) (Klimcakova, Polak et al. 2006). En este sentido, se ha comprobado también, que un ejercicio aeróbico además de facilitar la pérdida de peso, mejora la dislipidemia y la sensibilidad a la insulina, permitiendo así una reducción en la incidencia de diabetes (Zinman, Ruderman et al. 2003) (de Lemos, Reis et al. 2007). Asimismo, diferentes estudios han señalado que el ejercicio físico, acompañado de una dieta saludable, mejora factores de riesgo como la hipertensión, hiperlipidemia y

resistencia a la insulina, asociados a enfermedades coronarias (Roberts and Barnard 2005) (Roberts, Won et al. 2006).

El ejercicio físico disminuye la grasa visceral (Després, Bouchard et al. 1985) (Treuth, Ryan et al. 1994) (Trøseid, Lappegård et al. 2004), teniendo efectos beneficiosos en distintos aspectos del síndrome metabólico (Torjesen, Birkeland et al. 1997) (Trøseid, Lappegård et al. 2004). El tipo de ejercicio, así como la temprana intervención, su duración, intensidad, el gasto de energía durante el mismo, además del género y la aptitud de cada individuo frente al mismo, son factores que influyen en la cantidad de grasa oxidada (Hansen, Shriver et al. 2005) (Misigoj-Duraković and Duraković 2009).

Por todo lo indicado, y debido a la relación existente entre la obesidad y la inflamación, y entre el ejercicio y la respuesta inflamatoria, es necesario poder evaluar si los beneficios atribuidos al ejercicio físico se podrían explicar por sus efectos sobre dicha respuesta (de Lemos, Reis et al. 2007) (Wärnberg, Cunningham et al. 2010).

1.6.2. El ejercicio físico como terapia para el control de la inflamación de bajo grado: hipótesis anti-inflamatoria del ejercicio

Está ampliamente documentado que el ejercicio, tanto el intenso como el moderado, activa la respuesta inflamatoria en animales de experimentación y en el ser humano, tanto sedentarios como entrenados, a través de la activación fagocítica (Ortega, Barriga et al. 1993) (Ortega, Collazos et al. 1993) (Forner, Barriga et al. 1995) (Ortega, Forner et al. 1997) (Ortega Rincón, Marchena et al. 2001) y la liberación de citoquinas (Suzuki, Nakaji et al. 2002) (Meksawan, Venkatraman et al. 2004) (Peake, Nosaka et al. 2005) (Giraldo, Garcia et al. 2009).

En base a distintos estudios en deportistas, en los que se comprobó que las concentraciones de TNF- α e IL-1 β circulantes no se modificaban de manera relevante tras el ejercicio físico, o que se incrementaban levemente (Suzuki, Nakaji et al. 2002), y debido que el ejercicio regular ofrece protección frente a todas las causas de mortalidad, actuando en primer lugar, frente a la aterosclerosis y la resistencia a la insulina, Petersen y Pedersen propusieron que el ejercicio podría ejercer dichos beneficios a través de

acciones anti-inflamatorias (Petersen and Pedersen 2005). Durante el ejercicio, la IL-6 es producida por las fibras del músculo esquelético, lo cual estimula la aparición en la circulación de otras citoquinas anti-inflamatorias como IL-10 e IL-1ra, e inhibe la producción de TNF- α (Petersen and Pedersen 2005). Estos autores sugirieron que las citoquinas liberadas por el músculo o mioquinas, podrían ser las mediadoras de los beneficios del ejercicio mediante efectos anti-inflamatorios locales y sistémicos, y a su vez estar implicadas en la protección frente a enfermedades crónicas asociadas a un estado inflamatorio crónico de bajo grado, proponiendo así la hipótesis anti-inflamatoria del ejercicio (Petersen and Pedersen 2005) (Brandt and Pedersen 2010) (Pedersen 2011).

No obstante, a pesar de que la IL-6 estimule la producción de IL-10 e IL-1ra, como ya se comentó, es un importante inductor de la PCR, marcador de inflamación sistémica, por lo que el efecto anti-inflamatorio de la IL-6 no está aclarado. Así, sobre el efecto del ejercicio en la PCR y otras citoquinas, Kasapis y Thompson observaron que el ejercicio produce una respuesta inflamatoria a corto plazo, mientras que tanto las comparaciones transversales como las longitudinales de los estudios del entrenamiento, demuestran un efecto anti-inflamatorio a largo plazo, sugiriendo, por consiguiente, que la respuesta anti-inflamatoria puede contribuir a los efectos beneficiosos de la actividad física habitual. Estos autores concluyen que la respuesta anti-inflamatoria del ejercicio habitual se manifiesta por la reducción de los niveles de la PCR, mejorando de esta manera el proceso inflamatorio (Kasapis and Thompson 2005).

Por otro lado, se acepta, de manera generalizada, que algunos efectos beneficiosos del ejercicio físico implican la activación de la respuesta innata/inflamatoria para proteger al organismo contra la infección, sin embargo, en la actualidad algunos investigadores apoyan la idea de que los mecanismos que subyacen a los efectos beneficiosos del ejercicio están mediados por respuestas anti-inflamatorias. Este hecho está tomando importancia en la utilización del ejercicio como terapia en individuos con patologías inflamatorias. Hoy en día, una de las principales cuestiones a resolver es si las respuestas al ejercicio en los marcadores inflamatorios presentan semejanzas tanto en personas sedentarias, como en las que realizan algún tipo de entrenamiento físico habitual. Existen estudios que apoyan la hipótesis de que el

ejercicio habitual ofrece protección frente a enfermedades crónicas asociadas a inflamación sistémica (Ortega, García et al. 2009). Así, y de acuerdo a la hipótesis anti-inflamatoria del ejercicio, en la actualidad, los programas de ejercicio físico pueden ser empleados como una estrategia para el control de la inflamación sistémica de bajo grado (Woods, Vieira et al. 2006) (Mathur and Pedersen 2008) (Pedersen 2011).

1.6.3. El ejercicio físico y la inflamación en el síndrome metabólico

Puesto que en la obesidad y el síndrome metabólico subyace una condición de inflamación sistémica de bajo grado, y teniendo en cuenta la hipótesis anti-inflamatoria del ejercicio, un adecuado programa de ejercicio físico necesario para lograr un buen balance de liberación de citoquinas pro y anti-inflamatorias, puede ser de gran importancia como estrategia para el control de la inflamación. En este sentido, la actividad física está asociada a una disminución en el riesgo de enfermedad cardiovascular y una mejora en la diabetes mellitus tipo II, reduciendo el riesgo de mortalidad debida a estos factores (Tanasescu, Leitzmann et al. 2003) (Oberbach, Tönjes et al. 2006). En pacientes con deficiencias cardíacas se ha observado que un ejercicio moderado es capaz de reducir los niveles de marcadores inflamatorios como la MCP-1 (Adamopoulos, Parissis et al. 2001), lo que también es aplicable a personas con síndrome metabólico (Trøseid, Lappégård et al. 2004). De este modo, el ejercicio tiene un efecto anti-inflamatorio a través de la disminución de los niveles plasmáticos de quimioquinas, por lo que el efecto beneficioso del ejercicio puede ser debido, en parte, al control de los procesos inflamatorios. Asimismo, distintos estudios demuestran que el entrenamiento regular induce una disminución en los niveles de la PCR (Fallon, Fallon et al. 2001) (Oberbach, Tönjes et al. 2006). Por otro lado, Balducci y sus colaboradores demostraron que el ejercicio físico intenso tiene un efecto anti-inflamatorio en sí mismo, con independencia de la pérdida de peso, mediante la inhibición de algunas respuestas inflamatorias, disminuyendo las concentraciones de la PCR, IL-6 y la leptina plasmáticas, e incrementando la concentración de adiponectina (Balducci, Zanuso et al. 2010). Estos autores también apuntan que para conseguir un efecto significativo anti-inflamatorio en individuos diabéticos con síndrome metabólico es necesario, junto con la actividad física diaria, un entrenamiento que combine ejercicio de alta intensidad con ejercicio de resistencia.

Por el contrario, otro estudio pone de manifiesto que un entrenamiento de duración moderada no mejora los niveles de la PCR ni de la adiponectina en plasma (Marcell, McAuley et al. 2005). Además, Nicklas y sus colaboradores también mostraron que el entrenamiento no tiene un efecto significativo en las concentraciones plasmáticas de la IL-6 y la PCR (Nicklas, Ambrosius et al. 2004). Por su parte, You y Nicklas concluyen que ciertos estudios muestran que un programa de entrenamiento no influye significativamente en la expresión de adipoquinas por el tejido adiposo, pero sí que puede influir en la secreción de citoquinas por células mononucleares circulantes, otra fuente importante en la respuesta inflamatoria. Futuros estudios son necesarios para investigar los mecanismos celulares por los cuales el ejercicio físico afecta a la inflamación, y si las alteraciones en la inflamación son un mecanismo por el cual el ejercicio mejora los componentes del síndrome metabólico en individuos de riesgo (You and Nicklas 2008). Existen, por tanto, discrepancias sobre los cambios que produce el ejercicio físico en la fisiología de los individuos. Una posible explicación a todos estos resultados controvertidos sería que la influencia de la actividad física en los marcadores inflamatorios dependería del tipo y la intensidad del ejercicio físico (Klimcakova, Polak et al. 2006). En concreto, se podría proponer que las diferencias en la intensidad y duración del entrenamiento, y con mayor probabilidad en el tipo poblacional valorado, es decir, pacientes con diabetes mellitus tipo II (Oberbach, Tönjes et al. 2006), individuos no diabéticos (Marcell, McAuley et al. 2005), o sujetos obesos o con sobrepeso (Nicklas, Ambrosius et al. 2004), podrían explicar los resultados discordantes (Oberbach, Tönjes et al. 2006). Por todo ello, se requieren más estudios para conocer los mecanismos celulares por los cuales el ejercicio físico afecta a la inflamación, y si las alteraciones en la inflamación son un mecanismo por el cual el ejercicio mejora los componentes del síndrome metabólico en individuos de riesgo (You and Nicklas 2008).

Como se ha ido comentando, una respuesta inflamatoria controlada es beneficiosa para proteger al organismo frente a la infección, sin embargo, una inflamación desregulada puede ser la causa de enfermedades inflamatorias (Medzhitov 2008). En este sentido, no se conoce con exactitud el nivel óptimo de ejercicio necesario para que no se produzca una sobre-estimulación de la respuesta inflamatoria, que puede ser perjudicial para individuos que de antemano padecen enfermedades inflamatorias

(Elenkov and Chrousos 2002) (Ortega, García et al. 2009). Por lo tanto, es muy relevante la recomendación de programas de ejercicio físico con la intensidad, duración y regularidad adecuadas, hecho que cobra mayor importancia cuando se trata de personas que padecen enfermedades inflamatorias (Ortega, García et al. 2009) (Ortega, Bote et al. 2012), como la obesidad o el síndrome metabólico.

1.6.4. El ejercicio físico y el sistema inmunitario

La actividad física modula los sistemas reguladores del organismo. Los efectos que el ejercicio físico ejerce sobre la respuesta inmunitaria dependen del tipo, la intensidad y la frecuencia del ejercicio, así como del estado del propio sistema defensivo. Aun así, se considera que la actividad física tiene efectos beneficiosos en la salud, y está asociada con una baja susceptibilidad a las infecciones y otras patologías relacionadas con el sistema inmune. Además, los efectos del ejercicio en el sistema inmunitario se llevan a cabo en el contexto de la comunicación neuroinmunoendocrina, y más concretamente en la situación de estrés que acontece con la actividad física. Así, tanto el ejercicio como el estrés influyen en la respuesta inmunitaria a través de cambios en el sistema nervioso simpático y en el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (De la Fuente, Cruces et al. 2011). También, los neurotransmisores y las hormonas de estrés han sido propuestos como mediadores o señales de peligro en los efectos del ejercicio sobre el sistema inmune (Ortega, Giraldo et al. 2007), por lo que en este contexto existe discusión acerca del reconocimiento de los efectos beneficiosos del ejercicio. Sin embargo, debe aceptarse que el ejercicio físico, incluso si es moderado, es una situación de estrés, y que no necesariamente tiene que ser bueno o malo para el organismo, sino que en sí mismo provoca una respuesta adecuada o adaptación a los cambios homeostáticos que acontecen (Ortega, Bote et al. 2012).

En cuanto a los efectos del ejercicio sobre la función inmunitaria, está aceptado que un entrenamiento agudo e intenso parece inducir una respuesta inflamatoria (Giraldo, Garcia et al. 2009), que se acompaña de neutrofilia y de linfocitopenia, que puede ser atribuida a la apoptosis de los linfocitos (Krüger and Mooren 2014), así como de una disminución de varias funciones inmunitarias, como la proliferación en respuesta a mitógenos o la actividad citotóxica de células NK (Pedersen and Hoffman-Goetz

2000) (De la Fuente, Hernanz et al. 2005). Por el contrario, el ejercicio moderado conlleva beneficios para el sistema inmunitario, ya que mejora la función de células T, la producción de anticuerpos, la respuesta de los macrófagos, y modula la secreción de citoquinas (Pedersen and Hoffman-Goetz 2000) (Giraldo, Garcia et al. 2009). En un estudio realizado por nuestro grupo de investigación en estudiantes del Instituto Nacional de Educación Física (INEF) se comprobó que el ejercicio habitual moderado mejoraba las funciones de linfocitos y neutrófilos de sangre periférica, como la capacidad fagocítica y la proliferación en respuesta al mitógeno PHA, respectivamente, y también incrementaba los niveles de defensas antioxidantes como la vitamina C y E, y la actividad superóxido dismutasa (SOD), respecto a individuos sedentarios (De la Fuente, Hernanz et al. 2005). Además, en un estudio reciente en mujeres postmenopáusicas con obesidad abdominal, también se ha observado como el ejercicio combinado es capaz de mejorar la función inmune (Park, Kwak et al. 2015). En una investigación realizada en rata Wistar, también se han observado los efectos positivos del ejercicio moderado sobre la función inmunitaria, comprobándose que tras dicha actividad física las pequeñas elevaciones en la IL-6 no estaban acompañadas por incrementos en el TNF- α . Asimismo, se apuntó una disminución de la susceptibilidad a infecciones, gracias a la inducción reforzada de un perfil de citoquinas Th1, tras el ejercicio moderado (Gholamnezhad, Boskabady et al. 2014).

A pesar de la idea generalizada de que el ejercicio moderado es beneficioso para el sistema inmunitario y el intenso es perjudicial, los últimos estudios revelan que esta generalización es aplicable a los linfocitos, pero no puede extenderse a la inmunidad innata, concretamente a los fagocitos. A este respecto, tanto el ejercicio intenso como moderado activa la respuesta innata y/o inflamatoria en individuos sedentarios y entrenados sanos (Northoff, Weinstock et al. 1994) (Ortega Rincón, Marchena et al. 2001) (Suzuki, Nakaji et al. 2002) (Giraldo, Garcia et al. 2009). Así, en animales de experimentación, tanto el ejercicio moderado como intenso, aumenta algunas de las funciones de los macrófagos, entre ellas la adherencia, la quimiotaxis hacia el foco infeccioso, la fagocitosis y la actividad microbicida (Forner, Barriga et al. 1995) (Ortega, Forner et al. 1997) (Ortega 2003). También se ha apuntado que el ejercicio regular produce un aumento en la fagocitosis y la producción de anión superóxido por

los macrófagos, cuyas magnitudes dependen de la duración del propio ejercicio (Sugiura, Nishida et al. 2001).

La estimulación de los fagocitos durante el ejercicio físico agudo podría estar compensando la disminuida actividad linfoide, por lo que podría considerarse como una adaptación de las células fagocíticas a las situaciones de estrés por ejercicio. Por tanto, los fagocitos y la respuesta innata en general, tienen un papel fundamental en la defensa contra la infección durante el estrés inducido por el ejercicio, previniendo la entrada de antígenos, como los microorganismos, en situaciones en las que la respuesta inmune adaptativa parece estar suprimida (Ortega Rincón 1994) (Ortega 2003).

Como ya se ha comentado, mientras que una respuesta inflamatoria controlada es beneficiosa por conferir protección frente a infecciones, una inadecuada regulación inflamatoria, puede ser la causa de enfermedades inflamatorias (Medzhitov 2008). El estrés inducido por la actividad física aguda o extenuante se acompaña de la generación de ROS (Gomez-Cabrera, Martínez et al. 2006) y citoquinas proinflamatorias y de respuesta a la inflamación como IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10, IL-1ra o IL-8 (Pedersen, Ostrowski et al. 1998) (Pedersen 2000). Sin embargo, se acepta que algunos de los efectos beneficiosos del ejercicio están mediados principalmente por sus propiedades anti-inflamatorias (Petersen and Pedersen 2005). De acuerdo con esto, una estimulación bien regulada del sistema inmunitario por el ejercicio puede ayudar a prevenir infecciones, sin embargo, cuando el ejercicio se lleva a cabo de forma inapropiada podría exacerbar los síntomas en pacientes con enfermedades autoinmunes o inflamatorias (Giraldo, Garcia et al. 2009) (Ortega, Bote et al. 2012). En la actualidad, todavía no se sabe con certeza cuál es el nivel óptimo de ejercicio que mejora, pero no sobre-estimula o empeora una función inmune saludable.

Además, los beneficios del ejercicio respecto al estado redox se han atribuido a sus propiedades antioxidantes, principalmente cuando los individuos se han adaptado al ejercicio mediante un entrenamiento regular (Niess, Dickhuth et al. 1999), y cuando el ejercicio es moderado (De la Fuente, Hernanz et al. 2005) (Gomez-Cabrera, Domenech et al. 2008), aunque también se ha sugerido, que el incremento de ROS por los fagocitos debido a la actividad física, que ayuda al organismo a prevenir enfermedades

infecciosas, puede mostrar efectos perjudiciales (De la Fuente, Cruces et al. 2011). Todas estas observaciones frecuentemente conducen a interpretaciones fisiológicas controvertidas, y por tanto no se han confirmado las condiciones en las que el ejercicio de entrenamiento muestra propiedades anti-inflamatorias y antioxidantes, hecho que es importante cuando se emplea la actividad física como intervención terapéutica en pacientes con patologías inflamatorias (De la Fuente, Cruces et al. 2011). Así, desde este punto de vista, es razonable pensar que un programa de ejercicio con una intensidad y duración que produzca una elevada respuesta inflamatoria y oxidativa, tendrá efectos muy perjudiciales en estos individuos con un alto estado inflamatorio. Por el contrario, niveles de ejercicio con efectos anti-inflamatorios y antioxidantes serían muy positivos para este tipo de pacientes que sufren de enfermedades asociadas a inflamación crónica, como se ha comprobado recientemente en patologías con un bajo grado de inflamación (Ortega, Bote et al. 2012).

En conclusión, si el ejercicio se realiza como una intervención de hormesis, podría ser una buena estrategia preventiva, ya que la actividad física puede producir una resistencia al daño oxidativo debido a un incremento en la producción de enzimas antioxidantes en el músculo esquelético, que está reconocido como la principal fuente generadora de radicales libres (Powers, Ji et al. 1999). Respecto a las células inmunitarias, la disminución en la liberación de ROS y la adaptación de los mecanismos antioxidantes al ejercicio regular se ha observado en células fagocíticas (De la Fuente, Hernanz et al. 2005), pudiéndose tratar de un mecanismo de la inmunidad innata que ayudaría a prevenir infecciones en respuesta a un ejercicio de entrenamiento gradual.

2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La obesidad es una enfermedad que en los últimos años se ha extendido de manera alarmante en la mayoría de las poblaciones, constituyendo un factor de riesgo importante para la aparición de múltiples desórdenes metabólicos y enfermedades crónicas, contribuyendo así, en gran medida, al empeoramiento de la salud y la calidad de vida de los individuos. Para conservar un adecuado estado de salud es necesario el mantenimiento de la homeostasis del organismo, lo que se consigue gracias al correcto funcionamiento de los sistemas reguladores, el nervioso, el inmunitario y el endocrino y la comunicación entre los mismos. Concretamente, se ha comprobado que el sistema inmunitario es un excelente marcador de salud. El proceso de envejecimiento se debe a una oxidación e inflamación, que supone el deterioro de dichos sistemas reguladores, lo que hace aumentar la morbilidad y mortalidad con el avance de la edad. Por otra parte, la obesidad es un estado de inflamación y oxidación, situaciones en las que el sistema inmunitario se encuentra muy implicado, dada la necesaria producción de compuestos inflamatorios y oxidantes que lleva a cabo en el desarrollo de su labor defensiva. Puesto que el sistema inmunitario parece encontrarse implicado en la velocidad a la que se lleva a cabo el proceso de envejecimiento, esto es, en la edad biológica de cada individuo y consecuentemente su longevidad, es relevante comprobar si sujetos con obesidad muestran una inmunosenescencia y alteración del estado redox y conductual que les haga manifestar un envejecimiento prematuro.

Un problema existente en los estudios sobre cómo la obesidad afecta al sistema inmunitario, es que la población obesa humana es demasiado heterogénea en cuanto a patrones dietéticos y de estilo de vida. En este sentido, la utilización de modelos animales puede resultar de utilidad al ser más controlables y homogéneos, y en este sentido, los modelos de obesidad genética lo son todavía en mayor grado que los obtenidos por dieta. Hasta el momento, no se han caracterizado parámetros de capacidad funcional y estado redox indicadores de edad biológica y longevidad, en diferentes edades cronológicas de animales genéticamente obesos, y, por tanto, en distintos estadios de la enfermedad. Asimismo, no se ha realizado ningún estudio longitudinal en este sentido que permita relacionar tales parámetros, desde edades tempranas, con la longevidad de los animales.

Por otra parte, el efecto del ejercicio físico, que en determinadas circunstancias ha resultado ser muy beneficioso para los sistemas reguladores, y concretamente para el sistema inmunitario, ha sido muy poco estudiado en relación a los parámetros antes comentados, en animales genéticamente obesos.

Por lo tanto, la **hipótesis** de este trabajo es que la obesidad es una enfermedad que se acompaña de cambios en la función inmunitaria y en parámetros de estrés oxidativo e inflamatorio, así como conductuales, que podrían manifestar un deterioro a nivel de los sistemas homeostáticos, lo que conduciría a un estado de envejecimiento prematuro. Además, el ejercicio regular y de intensidad moderada, que tiene efectos beneficios para el sistema inmunitario, puede constituir una estrategia útil para restaurar el equilibrio funcional y redox en la obesidad, que permitirá poder hacer frente al estrés asociado a la realización de un ejercicio agudo.

Para dar respuesta a la hipótesis indicada, se han planteado una serie de **objetivos** que se han sido desarrollados en animales de experimentación:

1. Caracterizar en un modelo de obesidad genética, la rata Zucker, diversos parámetros de función inmunitaria y estrés oxidativo.

Este objetivo a su vez fue subdividido en los siguientes dos sub-objetivos:

1.a. Valorar una serie de funciones inmunitarias y parámetros de estrés oxidativo a la edad adulta (seis meses), en la rata Zucker, tanto “fa/fa” como “lean” y comparar con la cepa de rata Wistar.

1.b. Comparar distintas funciones inmunitarias, parámetros de estrés oxidativo y perfil metabólico en la rata Zucker de edad juvenil (dos meses) y adulta (seis meses).

- 2. Estudiar los cambios en parámetros de función inmunitaria y estrés oxidativo en un modelo de obesidad genética, la rata Zucker, a la edad adulta (seis meses), tras llevar a cabo un programa de ejercicio físico con entrenamiento, así como valorar el efecto del mismo ante la realización de un ejercicio físico agudo.**

- 3. Analizar en un modelo de obesidad genética en ratón, ratones *db/db*, mediante un estudio longitudinal iniciado a la edad juvenil (dos meses), los cambios en diversos parámetros conductuales, de funcionalidad y estado antioxidante en los leucocitos peritoneales, así como su relación con la longevidad de los animales.**

- 4. Realizar un estudio preliminar sobre el estado de algunos parámetros (actividad “Natural Killer”, capacidad proliferativa de linfocitos y capacidad antioxidante total) en un modelo de sobrepeso inducido por dieta hipercalórica, en rata Wistar adulta (seis meses).**

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. Material biológico

3.1.1.1. Animales

Los animales utilizados en el presente trabajo fueron los siguientes:

- Ratas macho de la cepa Zucker lean (HsdOla:ZUCKER-Lepr^{fa}/Lepr⁺) y Zucker *fa/fa* (HsdOla:ZUCKER-Lepr^{fa}) y ratas Wistar macho (HsdHan:WIST). Ambas cepas de rata procedentes de Harlan Ibérica (Barcelona) fueron mantenidas en el animalario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid, a una temperatura de 22±2°C y con un fotoperiodo invertido de 12 horas de luz blanca:12 horas de oscuridad, con cambio horario a las 8:00 horas. Los animales se alimentaron con una dieta estándar (A 04) procedente de PANLAB, S.L. (Barcelona) y agua “ad libitum”.

Las ratas Zucker *fa/fa* portan en homocigosis la mutación del gen que codifica para el receptor de leptina (Lepr *fa* es una mutación autosómica recesiva en el cromosoma 5), por lo que desarrollan hiperleptinemia y son un modelo animal de obesidad genética. Las ratas Zucker lean (*fa/+*) portan en heterocigosis la mutación del gen que codifica para el receptor de leptina, por lo que no desarrollan obesidad y actúan como controles de las ratas *fa/fa*.

- Ratas macho de la cepa Zucker *fa/fa* (HsdOla:ZUCKER-Lepr^{fa}) procedentes de Harlan (United Kingdom) fueron mantenidas en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, a una temperatura de 22±2°C y con un fotoperiodo (luz: 01:30-13:30h; oscuridad: 13:30-01:30h). Los animales se alimentaron con una dieta estándar (A04, SAFE, Francia) y agua “ad libitum”.

- Ratones hembra (C57BL/6J $OlaHsd$; BKS.Cg-+Lepr^{db}/+Lepr⁺/ $OlaHsd$; BKS.Cg-+Lepr^{db}/+Lepr^{db}/ $OlaHsd$) procedentes de Harlan (United Kingdom) mantenidos en el animalario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid, a una temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ y con un fotoperiodo invertido de 12 horas de luz blanca:12 horas de oscuridad, con cambio horario a las 8:00 horas. Los animales se alimentaron con una dieta estándar (A 04) procedente de PANLAB, S.L. (Barcelona) y agua “ad libitum”.
- Ratas de la cepa Wistar (HsdHan: WIST) macho, procedentes de Harlan Ibérica (Barcelona) mantenidas en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, a una temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ y con un fotoperiodo invertido de 12 horas de luz blanca:12 horas de oscuridad, con cambio horario a las 8:00 horas. El grupo de animales control fue alimentado con una dieta estándar procedente de Harlan Teklad que contenía un 5% de grasa. Por el contrario, el grupo de animales objeto de estudio fue alimentado con una dieta procedente de Harlan Teklad (TD97366) que contenía un 25,5% de grasa.

Todos los experimentos realizados con los animales a lo largo de la presente tesis se realizaron siguiendo las directrices dictadas en el Real Decreto 1201/2005, de 10 de Octubre de 2005 (BOE nº252), acerca de la protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

3.1.1.2. Línea celular

Para los ensayos de la actividad citotóxica “Natural Killer” se utilizó como célula diana de los leucocitos, una línea celular tumoral (YAC- 1) procedente de un linfoma murino de células T, inducido por el virus de Moloney. Dicha línea celular fue cedida por el Servicio de Inmunología del Hospital Clínico de Madrid y mantenida hasta su utilización a -80°C en condiciones de esterilidad y en alícuotas de 2×10^6 células/ml de medio completo (RPMI 1640 con 1% de gentamicina (0,1 mg/ml) y suplementado con

10% de suero fetal de ternera descomplementarizado) y 10% de dimetil sulfóxido (DMSO) como agente crioprotector.

3.1.2. Medios

3.1.2.1. Medios preparados en el laboratorio

- Solución Salina tamponada de fosfatos (PBS), con la siguiente composición por litro de disolución: Cloruro sódico 123,2 mM (NaCl, PANREAC); fosfato disódico 10,84 mM (Na₂HPO₄, PANREAC), fosfato monopotásico 3,23 mM (KH₂PO₄, PANREAC) y agua ultrapura.
- Solución de Hank, que consta de la siguiente composición por litro de disolución: D (+)-glucosa 5,55 mM (C₆H₁₂O₆, PANREAC), cloruro magnésico 1 mM (MgCl₂, PANREAC), cloruro sódico 136,89 mM (NaCl, PANREAC), cloruro potásico 5,36 mM (KCl, PANREAC), cloruro cálcico 1,26 mM (CaCl₂, PANREAC), fosfato magnésico 0,80 mM (MgHPO₄, PANREAC), fosfato monopotásico 0,44 mM (KH₂PO₄, PANREAC), fosfato disódico 0,42 mM (Na₂HPO₄, PANREAC), bicarbonato sódico 4,16 mM (NaHCO₃, PANREAC) y agua ultrapura.
- Medio completo, que se compone de medio comercial RPMI 1640 con rojo fenol, HEPES (25 mM) y L-glutamina (20 mM) (PAA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (GIBCO BRL) (descomplementarizado mediante calentamiento en baño a 56°C durante 30 minutos y esterilizado por filtración, utilizando una membrana de 0,22 µm de diámetro de poro (MILLIPORE)) y 1% de gentamicina (0,1 mg/ml) (GIBCO BRL).
- Tampón fosfato 50 mM, conteniendo fosfato disódico (Na₂HPO₄) (PANREAC) y fosfato monopotásico (KH₂PO₄) (PANREAC) en relación 1,5:1, pH=7-7,4.

El medio PBS se esterilizó en autoclave durante 60 minutos a 1 atmósfera de presión y 120° C de temperatura. En el caso del Hank, la esterilización se llevó a cabo

mediante filtración a través de una membrana de 0,22 μm de diámetro de poro (MILLIPORE). Una vez completada la esterilización, los medios se almacenaron a 4° C hasta el momento de su utilización.

3.1.2.2. Medios comerciales

- RPMI 1640 con rojo fenol, HEPES (25 mM) y L-glutamina (20 mM) (PAA). En cultivos celulares se emplea para la preparación del medio completo anteriormente descrito.
- RPMI 1640 sin rojo fenol y con L-glutamina (PAA). Se utiliza en aquellos ensayos en los que el rojo fenol interfiere con las mediciones espectrofotométricas de los parámetros de estudio.

Estos medios se mantuvieron a 4° C y en condiciones de esterilidad durante todo el tiempo en que se llevaron a cabo los experimentos.

3.1.3. Reactivos y kits comerciales

- Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) (SIGMA).
- Ácido clorhídrico (HCl) (PANREAC), formando parte de la solución de ácido tricloroacético (TCA), y utilizado para ajustes de pH.
- Ácido etilendiaminotetracético (EDTA) (SIGMA).
- Ácido tricloroacético (TCA) (PANREAC).
- Agua destilada.
- Agua ultrapura.
- Anestesia gaseosa con isoflurano (Aerrane, BAXTER).
- Azida sódica (SIGMA).
- Azul tripán, solución al 0,4% estéril (SIGMA).
- β -Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, forma reducida (β -NADPH) (SIGMA).
- Bicarbonato sódico (NaHCO_3) (PANREAC).
- Cloruro cálcico (CaCl_2) (PANREAC).
- Cloruro magnésico (MgCl_2) (PANREAC).

- Cloruro potásico (KCl) (PANREAC).
- Cloruro sódico (NaCl) (PANREAC).
- Concanavalina A (Con A) (SIGMA), alicuotada a una concentración de 200 µg/ml en PBS estéril y almacenada a -20°C hasta el momento de su utilización.
- D (+)-glucosa (C₆H₁₂O₆) (PANREAC).
- Dimetil sulfóxido (DMSO) (SIGMA).
- Eosina - azul de metileno (SIGMA).
- Etanol 96% (PANREAC).
- Fitohemaglutinina (PHA) (SIGMA), alicuotada a una concentración de 2500 µg/ml en PBS estéril y almacenada a -20°C hasta el momento de su utilización.
- Fosfato disódico (Na₂HPO₄) (PANREAC).
- Fosfato magnésico (MgHPO₄) (PANREAC).
- Fosfato monopotásico (KH₂PO₄) (PANREAC).
- Gentamicina (GIBCO BRL).
- Glutation oxidado (GSSG) (SIGMA).
- Glutation reducido (GSH) (SIGMA).
- Glutation reductasa (GR) (SIGMA).
- Heparina sódica (HOSPIRA).
- Hidroperóxido de cumeno (SIGMA).
- Hidróxido de potasio (KOH) (MERCK) utilizado para ajustes de pH.
- Histopaque de densidad 1,077 g/ml (SIGMA). Medio separador de las células sanguíneas que se presenta en botellas de 100 ml y se conserva a 2-8°C en oscuridad.
- Kit colorimétrico para valorar la actividad citotóxica (Cytotox 96, PROMEGA).
- Kit colorimétrico para valorar la capacidad antioxidante total (NANJING JIANCHENG BIOENGINEERING INSTITUTE).
- Kit ELISA para valorar niveles de TNF-α en rata (DIACLONE).
- Kit fluorométrico para la valoración de la actividad xantina oxidasa (MOLECULAR PROBES).
- Kit para la valoración de citoquinas por luminometría (MILLIPLEXTM MAP; Millipore Corporation).

- Lipopolisacárido (LPS) de *E.coli* (055:B5) (SIGMA), alicuotado a 100 µg/ml en PBS estéril y almacenado a -20°C hasta el momento de su utilización.
- Líquido de centelleo (CITOSCINT).
- Metanol (grado HPLC) utilizado en resonancia magnética nuclear (FISHER SCIENTIFIC).
- Metanol (PANREAC).
- Óxido de deuterio (D₂O) con grado de deuterización 9,99%, y conteniendo un 1% de sal sódica 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato-d₆ (DSS-d₆) (SIGMA).
- Óxido de deuterio (D₂O), con grado de deuterización 9,99% (SIGMA).
- Partículas de látex, de 1,091±0,0082 µm de diámetro (SIGMA), diluidas al 1% en solución de Hank estéril y conservadas a temperatura ambiente hasta su uso.
- Solución desinfectante de superficies Derquim DSF 11 (PANREAC).
- Suero fetal bovino (GIBCO BRL).
- Timidina tritiada (ICN) con una actividad específica de 35 Ci/mmol, diluida a 0,1 mCi/ml en PBS estéril y almacenada a 4°C.

3.1.4. Material de laboratorio

- Aceite de inmersión (PANREAC) para la observación microscópica.
- Agujas.
- Cartulina de color negro (para el estudio de los reflejos en conducta).
- Contador de células manual (REXEL).
- Cronómetros.
- Cubetas de vidrio óptico de 1 cm de paso óptico (HELLMA).
- Cuerda de cáñamo (para la realización de las pruebas de conducta).
- Falcon de plástico (NUNC).
- Filtros (MILLIPORE) de 25 mm de diámetro y 0,22 µm de poro, para la esterilización de medios.
- *Flask* de cultivo (NUNC).
- Gradillas para tubos y eppendorfs.
- Hemocitómetro de Neubauer (BLAU BRAND).
- Jaulas para la estabulación de los animales (PANLAB).

- Material de disección: tijeras, pinzas, etc.
- Material de plástico: jeringuillas desechables (con capacidad de 1,5 y 10 ml), tubos, tubos eppendorf de 1,5 ml, guantes, puntas de pipetas automáticas, parafilm, crioviales de congelación de 2 ml, etc.
- Material de vidrio: tubos graduados, viales, botellas, pipetas Pasteur, placas Petri, cubreobjetos, vasos de precipitado, probetas, termómetros, etc.
- Papel de filtro (ALBET).
- Papel de filtro de 102x256 mm para la recolección automática de células (12 well cell Harvesters, FilterMAT, SKATRON INSTRUMENTS).
- Placas M.I.F. (KARTELL) de 8 pocillos (1,5 cm de diámetro) para el ensayo de fagocitosis.
- Placas opacas de 96 pocillos de fondo plano (COSTAR).
- Placas transparentes de 96 pocillos, con fondo plano y fondo en U (NUNC).
- Tubos para resonancia magnética nuclear (NORELL[®]).
- Videocámara (PANASONIC SDH-H40).

La esterilización del material se llevó a cabo en autoclave a 120°C y 1 atmósfera de presión durante 1 hora.

3.1.5. Aparataje

- Agitador de placas (LABNET).
- Autoclave (SELECTA).
- Bala de nitrógeno (BOC).
- Balanzas de precisión (SAUTER, SARTORIUS y OHAUS).
- Balas de CO₂ y de helio (PRAXAIR).
- Baño termostatzado (PRECISION SCIENTIFIC).
- Bomba de vacío (MILLIPORE).
- Cabinas de flujo laminar vertical (TELSTAR AV-100, TELSTAR MICRO-H).
- Campo abierto con pared.
- Centrífuga omnífuga refrigerada (2.0 RS HERAEUS).
- Cinta rodante Li 870 (LETICA SCIENTIFIC INSTRUMENTS).

- Concentrador de muestras (TECHNE), utilizado en las muestras de resonancia magnética nuclear para evaporar el metanol, mediante un flujo de nitrógeno.
- Congelador de -20°C (LIEBHERR).
- Congelador de -80°C (HERAEUS, BOROLABS).
- Contador β automático (PERKIN-ELMER).
- Destilador de agua (MILLIPORE).
- Destilador de agua ultrapura (MILLIPORE).
- Dispensador de hielo picado (SCOTSMAN).
- Espectrofotómetro (ESPECTRONICS GENESIS 5).
- Espectrofotómetro y Fluorímetro de placas (TECAN).
- Espectrómetro de resonancia magnética nuclear (Bruker Avance DRX 700 MHz) (BRUKER BioSpin).
- Frigoríficos (FAGOR y LIEBHERR).
- Glucómetro (G+ GlucocardTM meter) y tiras reactivas (G GlucocardTM sensor) para la valoración de la glucemia (A. MENARINI diagnostics).
- Guillotina.
- Homogeneizador automático TissueLyser LT (QIAGEN) y bolas para la homogeneización de 3mm de diámetro (Tungsten carbide beads) (QIAGEN).
- Homogeneizador eléctrico con émbolo metálico, R W 16 Basic (IKA-Werke).
- Incubador termostatzado con atmósfera de CO₂ regulable (KOWELL y HERAEUS).
- Laberinto en T.
- Liofilizador (freeze-drier) (International Equipment Company) (IEC).
- Luminómetro (LUMINEX 200 XMAPTM Technology).
- Microfuga 5415R (EPPENDORF).
- Microfuga refrigerada Biofuge Pico (HERAEUS).
- Microscopio invertido (PLEUGER).
- Microscopios ópticos de contraste de fase (NIKON).
- pH-metro con electrodo (CRISON).
- Pipetas automáticas y multidispensadoras (GILSON y BOECO).
- Recolector semiautomático de células (SKATRON).

- Sonificador (BANDELIN SONOPULS).
- Sonificador (ultrasonic cleaner) (BRANSON), para la sonicación de los anticuerpos empleados en luminometría.
- Tabla de madera para la realización de pruebas de conducta.
- Tablero de agujeros para ratón.
- Vórtex (PACISA, BUNSEN y OVAN).

3.2. ESTUDIOS REALIZADOS EN RATAS ZUCKER GENÉTICAMENTE OBESAS

3.2.1. ESTUDIO INMUNOLÓGICO, DE ESTRÉS OXIDATIVO Y DEL PERFIL METABÓLICO EN RATAS MACHO GENÉTICAMENTE OBESAS, JÓVENES Y ADULTAS

3.2.1.1. Diseño experimental

Para este primer objetivo se han utilizado ratas Zucker genéticamente obesas, y se han realizado dos diseños experimentales. En primer lugar, se compararon las ratas adultas Zucker obesas (*fa/fa*) con sus correspondientes controles de la misma cepa (ratas Zucker lean), así como con la cepa de ratas Wistar adultas, ampliamente utilizada en nuestro laboratorio. En segundo lugar, se realizó el estudio comparativo correspondiente a las ratas Zucker *fa/fa* y lean jóvenes y adultas.

1. Estudio de varias funciones inmunitarias y de parámetros de estrés oxidativo en ratas Zucker genéticamente obesas adultas. Estudio comparativo con ratas de la cepa Wistar.

En este objetivo se utilizaron ratas macho Zucker lean (HsdOla:ZUCKER-Lepr^{fa}/Lepr⁺) y Zucker *fa/fa* (HsdOla:ZUCKER-Lepr^{fa}) obtenidas con cinco semanas de edad, que se mantuvieron en el animalario de la Facultad de Ciencias Biológicas (UCM) durante 19 semanas a una temperatura de 22±2°C y con un fotoperiodo invertido de 12 horas de luz blanca:12 horas de oscuridad. Al mismo tiempo, se adquirió un grupo de

ratas Wistar macho a la edad de cinco semanas y fueron mantenidas también durante 19 semanas en las mismas condiciones.

Todos los animales se alimentaron con una dieta estándar y agua “ad libitum” y se sacrificaron simultáneamente por decapitación a la edad adulta (24 semanas). El grupo de ratas Wistar fue utilizado como control de cepa respecto a las ratas de la cepa Zucker adultas. En el transcurso de este estudio, se anotó la evolución del peso de cada animal semanalmente.

Las muestras biológicas empleadas en este estudio se detallan a continuación:

- Leucocitos peritoneales, donde se valoró la actividad “Natural Killer” y la capacidad fagocítica de los macrófagos.
- Leucocitos del bazo, en los que se estudió la actividad “Natural Killer”, la respuesta proliferativa de los linfocitos y los niveles de liberación de citoquinas de dichos linfocitos, tras 48 horas de cultivo.
- Leucocitos del timo donde se analizó la actividad “Natural Killer” y la respuesta proliferativa de los linfocitos.
- Homogenados de bazo e hígado, para la valoración de la capacidad antioxidante total, los niveles de glutathion (GSH) total y las actividades de las enzimas glutathion reductasa (GR), glutathion peroxidasa (GPx) y xantina oxidasa (XO).
- Homogenados de timo, donde se estudiaron los niveles de glutathion (GSH) total, así como las actividades de las enzimas glutathion reductasa (GR) y xantina oxidasa (XO).
- Homogenados de cerebro (cerebelo y telencéfalo) para el estudio de la actividad de la enzima xantina oxidasa.

- Plasma, que fue obtenido a partir de sangre periférica para la valoración de la actividad de la enzima xantina oxidasa.

2. Estudio de varias funciones inmunitarias, de parámetros de estrés oxidativo y del perfil metabólico en ratas Zucker genéticamente obesas jóvenes y adultas.

En este objetivo se utilizaron las ratas macho Zucker lean y Zucker *fa/fa* del estudio anterior, obtenidas con cinco semanas de edad, que se mantuvieron en el animalario durante 19 semanas a una temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, con un fotoperiodo invertido de 12 horas de luz blanca:12 horas de oscuridad y alimentadas con dieta estándar y agua “ad libitum”. Posteriormente se adquirió otro grupo de ratas que se mantuvo en las mismas condiciones durante tres semanas. Las ratas Zucker lean (*fa/+*) y obesas (*fa/fa*) fueron sacrificadas simultáneamente a la edad de 8 semanas (ratas jóvenes) y a la edad de 24 semanas (ratas adultas del estudio anterior) por decapitación.

Las muestras biológicas empleadas en este estudio se detallan a continuación:

- Leucocitos del bazo, para la valoración de la actividad “Natural Killer”, la respuesta proliferativa de los linfocitos y los niveles de liberación de citoquinas de dichos linfocitos, tras 48 horas de cultivo.
- Leucocitos del timo, donde se analizó la actividad “Natural Killer” y la respuesta proliferativa de los linfocitos.
- Homogenados de bazo, donde se estudió la capacidad antioxidante total, los niveles de glutathion (GSH) total y las actividades de las enzimas glutathion reductasa (GR) y glutathion peroxidasa (GPx).
- Homogenados de timo, para la valoración de los niveles de glutathion (GSH) total y la actividad de la enzima glutathion reductasa (GR).

- Homogenados de hígado para el estudio del perfil metabólico, los niveles relativos de glutathion (GSH) total e hipotaurina, la capacidad antioxidante total y las actividades de las enzimas glutathion reductasa (GR) y glutathion peroxidasa (GPx).
- Homogenados de corazón y de tejido adiposo abdominal subcutáneo para el estudio del perfil metabólico.

3.2.1.2. Toma de muestras biológicas: plasma y suspensión peritoneal. Extracción y procesamiento de los órganos

En primer lugar, antes del momento del sacrificio, se controló el peso corporal de cada uno de los animales. Una vez sacrificados por decapitación, en la fase oscura de su ciclo vital, se recogió sangre periférica en un eppendorf heparinizado y se obtuvo el plasma mediante centrifugación durante 20 minutos a 1000g. Dichas muestras fueron mantenidas a -20°C hasta el momento de la valoración de la actividad de la enzima xantina oxidasa.

Para la obtención de los leucocitos del peritoneo, se desinfectó la piel del abdomen con alcohol, y se inyectó intraperitonealmente un volumen de 3 ml de solución de Hank estéril (atemperada a 37°C) y se masajeó suavemente el abdomen. A continuación se abrió la piel y el músculo abdominal del animal y con ayuda de una jeringa se recogió la suspensión peritoneal prácticamente en su totalidad.

Dicha suspensión se depositó en un tubo de vidrio estéril y se mantuvo en hielo durante todo el proceso de obtención, con objeto de evitar la adhesión de los leucocitos a las paredes del tubo.

Finalmente, se extrajeron distintos órganos, tanto inmunitarios (bazo y timo) como no inmunitarios (hígado, corazón, tejido adiposo abdominal subcutáneo, tejido adiposo epididimal, cerebro y riñones), se pesaron y se depositaron en tubos estériles con medio PBS. En el estudio correspondiente a la comparación entre ratas Zucker lean y (*fa/fa*) jóvenes y adultas no se consideró el peso del cerebro.

El procesamiento de los distintos órganos extraídos se llevó a cabo según el siguiente protocolo:

- Bazo: se dividió en dos partes, de modo que una de ellas se utilizó en fresco para el estudio de la funcionalidad inmunitaria y la otra se congeló a -80°C con objeto de emplearla en el estudio del estado de estrés oxidativo.

El procesamiento de la fracción de bazo utilizada en fresco se realizó como se describe a continuación: el primer paso consistió en macerar el órgano en medio PBS estéril. Seguidamente, se llevó a cabo un aislamiento mediante gradiente de densidad con objeto de extraer los leucocitos mononucleares separadamente de otros tipos celulares, principalmente del elevado número de hematíes presentes en el macerado. Para ello, se depositó el macerado en un tubo de vidrio estéril que contenía 3 ml de Histopaque de densidad 1,077 g/ml. Se centrifugó durante 20 minutos a 2500 rpm y, con ayuda de una pipeta Pasteur estéril, se recogió el halo de leucocitos mononucleares. Dicho halo se depositó en otro tubo de vidrio con PBS estéril, y se realizó un lavado de 10 minutos a 1500 rpm (este paso puede realizarse varias veces, en función del número de lavados que se consideren necesarios). Finalmente, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular en 800 μl de medio PBS estéril.

- Timo: se dividió en dos partes, y al igual que en el caso del bazo, una de ellas se utilizó en fresco para el estudio de la funcionalidad inmunitaria y la otra se congeló a -80°C y se empleó en el estudio del estado de estrés oxidativo. El procedimiento a seguir fue el mismo que en el caso del bazo, con la excepción de que al no existir una contaminación tan grande de hematíes no fue necesario aislar las células mediante gradiente de densidad. Por tanto, se maceró el órgano, se depositó el macerado en un tubo de vidrio con 3 ml de PBS estéril y se centrifugó durante 10 minutos

a 1500 rpm. Tras el lavado, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 800 µl de medio PBS estéril.

- Hígado: tras la extracción de este órgano se procedió a congelarlo a -80°C, para emplear las muestras en el estudio de parámetros de estrés oxidativo y en el perfil metabólico.
- Corazón, tejido adiposo abdominal subcutáneo: una vez extraídos estos órganos se procedió a congelarlos a -80°C, para emplear las muestras en el estudio del perfil metabólico.
- Cerebro: después de la extracción del mismo se congeló a -80°C, para emplear las muestras en el estudio de la actividad de la enzima xantina oxidasa.

El tejido adiposo epididimal y los riñones, únicamente fueron utilizados para el control del peso.

3.2.1.3. Recuento y análisis de la viabilidad celular

El recuento del número de células vivas por ml se realizó empleando un hemocitómetro de Neubauer y un microscopio óptico de contraste de fase. La viabilidad de los leucocitos extraídos en fresco del bazo y del timo se analizó con el método de exclusión del colorante vital azul tripán. Este colorante, diluido previamente al 0,4% en medio PBS estéril, se añadió a una pequeña alícuota (10 µl) de la suspensión celular en un volumen 1:1 y a continuación se llevó a cabo el recuento en el hemocitómetro de células muertas (aquellas que aparecían teñidas de azul) y vivas (aquellas que no aparecían teñidas). Solo se emplearon en los estudios aquellas muestras cuya viabilidad fue superior al 95%.

3.2.1.4. Mantenimiento de la línea tumoral murina YAC-1

Las células de la línea tumoral YAC-1 que se emplean para el ensayo de actividad “Natural Killer” se mantienen congeladas en crioviales estériles, en alícuotas

de 2 millones de células/ml. En ellos se incluyen las células tumorales, el medio completo y el agente DMSO, que preserva la integridad de las membranas celulares.

Un par de semanas antes de realizar el ensayo se descongela un vial de células YAC-1 y se transfiere todo el volumen de células tumorales a un tubo de plástico estéril. A continuación se realiza un lavado (1500 rpm, 5 minutos) para eliminar el DMSO. Tras la centrifugación se elimina el sobrenadante, se añade más medio completo y se lleva a cabo un segundo lavado (1500 rpm, 10 minutos). De nuevo se decanta el sobrenadante, y el pellet de células tumorales se resuspende en medio completo fresco. Finalmente, se transfiere todo el volumen a un falcon estéril y se mantiene en condiciones de esterilidad en un incubador (a 37°C y con 5% de CO₂) para permitir el crecimiento de la línea tumoral y obtener de este modo un número de células suficiente en el momento en que se vaya a comenzar el ensayo. Mientras tanto, cada 2 días se comprueba la viabilidad de dichas células tumorales (mediante el análisis de viabilidad celular descrito en el apartado 3.2.1.3.) y se renueva periódicamente el medio completo para permitir el crecimiento celular. Al cabo de pocos días, cuando las células comienzan a mostrar un crecimiento exponencial, se transfieren alícuotas de 2-3 millones a otros falcon en los que se añade medio completo fresco. Así nos aseguramos que de las células tienen nutrientes suficientes para seguir creciendo y se mantiene intacta su viabilidad.

En el momento del ensayo, se transfiere todo el volumen del falcon (donde han crecido las células) de nuevo a un tubo estéril, se realiza un lavado (1500 rpm, 10 minutos) y se decanta el sobrenadante. El pellet se resuspende en 1 ml de RPMI sin rojo fenol (un medio que no tiene color, y que es el que se emplea en el ensayo de la actividad “Natural Killer”). A continuación se lleva a cabo el recuento celular (junto con el análisis de viabilidad descrito en el apartado anterior, 3.2.1.3.) y se ajusta una alícuota a la concentración de 100.000 células/ml, que es la concentración a la que se necesitan las células tumorales para el ensayo de la actividad “Natural Killer” de las muestras.

Finalmente, una vez realizados los ensayos, las células YAC-1 que no se han utilizado se vuelven a congelar en crioviales estériles. En ellos se añade un volumen de aproximadamente 500 µl que contenga 2 millones de células YAC-1, se completa hasta

un volumen de 900 μ l con medio completo, y por último se añaden 100 μ l de DMSO. Estos crioviales se mantienen congelados a -80° C hasta el momento que se necesiten para un futuro ensayo.

3.2.1.5. Valoración de parámetros de funcionalidad inmunitaria

Capacidad fagocítica de macrófagos

Los macrófagos obtenidos en la suspensión peritoneal se ajustaron a 5×10^5 macrófagos/ml en solución de Hank.

Se valoró la capacidad de los macrófagos para ingerir agentes patógenos (o “capacidad fagocítica”), en este caso representados por partículas de látex en forma de bolas de 1,091 μ m de diámetro y diluidas al 1% en solución de Hank, siguiendo la técnica descrita por (De La Fuente 1985). Se dispensaron alícuotas de 200 μ l de la suspensión peritoneal, ajustada a 5×10^5 macrófagos/ml, en cada pocillo de las placas M.I.F y éstas se incubaron durante 30 minutos a una temperatura de 37° C y en una atmósfera con un 5% de CO_2 . Pasado este tiempo (suficiente para conseguir que las células se adhirieran en monocapa a la superficie plástica), se lavaron las placas con PBS (previamente atemperado a 37° C) para eliminar las células no adheridas y se añadieron en cada pocillo 200 μ l de solución de Hank y 20 μ l de la suspensión de látex al 1% en PBS. Las placas se incubaron de nuevo durante 30 minutos en las mismas condiciones del paso anterior y, una vez transcurrido ese tiempo, se lavaron exhaustivamente con PBS para arrastrar el látex no fagocitado. Se procedió a la fijación de las células con metanol al 50% durante 5 minutos, y se tiñeron con eosina-azul de metileno durante 15 minutos. Finalmente, se lavó con abundante agua ultrapura para eliminar el exceso de colorante. Una vez secas las placas, se procedió al recuento en el microscopio óptico, con objetivo de 100 aumentos, del número de partículas ingeridas por cada 100 macrófagos tomados al azar, obteniéndose así el Índice de Fagocitosis (I.F.). Además, se determinó el porcentaje de células, de las 100 contabilizadas, que fagocitaron al menos una partícula, lo que se denomina Eficacia Fagocítica (E.F.).

Actividad citotóxica “Natural Killer” (NK) de los leucocitos

Este ensayo consistió en la valoración de la capacidad citotóxica natural que, frente a células tumorales, poseen los leucocitos de las muestras. Para ello se utilizaron como células diana las de la línea YAC-1 de linfoma murino. Estas células se mantienen almacenadas a -80°C y para el ensayo se descongelaron e hicieron crecer en cultivo. Dicho cultivo se realizó en frascos estériles con medio completo (compuesto por medio RPMI con rojo fenol con glutamina, enriquecido con un 10% de suero fetal bovino descomplementarizado y suplementado con un 1% de gentamicina) mantenidos a una temperatura de 37°C y con una atmósfera del 5% de CO_2 , además de humedad a saturación. El medio completo se renovó cada 48 horas. En todo momento se controló la evolución del cultivo de las células del linfoma con la ayuda del microscopio invertido para detectar cualquier tipo de contaminación microbiológica que pudiera producirse.

El ensayo se realizó mediante un Kit comercial colorimétrico para valorar citotoxicidad (Cytotox 96. PROMEGA) siguiendo la metodología previamente descrita por (Ferrández, Correa et al. 1999), cuyo fundamento consiste en valorar la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) liberada al sobrenadante por parte de las células lisadas. Antes de comenzar el ensayo, las células diana (células tumorales) previamente cultivadas, se lavaron durante 10 minutos a 1500 rpm. El precipitado obtenido se resuspendió en 800 μl de RPMI sin rojo fenol (para evitar así interferencias en la posterior detección colorimétrica) y se comprobó su viabilidad mediante el test del azul tripán (ver apartado 3.2.1.3.). A continuación, se ajustó el número de dichas células a una concentración de 10^5 células vivas/ml en RPMI sin rojo fenol. Las células efectoras (leucocitos de bazo, timo y peritoneales) se ajustaron a 10^6 células/ml en RPMI sin rojo fenol, para obtener así una relación de 10:1 (10 células efectoras: 1 célula diana).

Una vez ajustadas las suspensiones, se dispensaron 100 μl de la suspensión de células efectoras en placas de 96 pocillos con fondo en “U”, a los que se añadieron 100 μl de la suspensión de células diana. Además se incluyeron pocillos en los que únicamente se adicionaron células diana, con objeto de cuantificar la lisis espontánea y total de las mismas. Del mismo modo, se incluyeron otros pocillos que contenían

únicamente células efectoras, para obtener así su lisis espontánea. Estos pocillos se completaron con 100 µl de medio RPMI sin rojo fenol. Las placas se centrifugaron a 1250 rpm (250g) durante 5 minutos para favorecer los contactos celulares y se incubaron durante 3 horas y 15 minutos a 37° C de temperatura y 5% de CO₂. Transcurrido ese tiempo, se añadieron 20 µl de solución de lisis (HCl) en los pocillos destinados a cuantificar la lisis total de las células diana. Tras 45 minutos, se volvieron a centrifugar las placas en las mismas condiciones anteriores y se recogieron 50 µl de los sobrenadantes de todos los pocillos, que se transfirieron a una placa de 96 pocillos con fondo plano, que permite la posterior medida en el lector de placas. A continuación, a cada pocillo se añadieron 50 µl de una mezcla de sustratos de la enzima lactato deshidrogenasa (lactato, diaforasa y NAD⁺) y se incubó la placa durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Pasado ese tiempo, se paró la reacción añadiendo a los pocillos 50 µl de una solución de parada y se midió la absorbancia a 490 nm, lo cual nos proporcionó la actividad de la LDH en los sobrenadantes.

Finalmente, se calcula el porcentaje de lisis con ayuda de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Lisis} = \frac{(\text{Lisis}_{\text{problema}} - \text{Lisis}_{\text{espontánea céls. efectoras}} - \text{Lisis}_{\text{espontánea céls diana}})}{(\text{Lisis}_{\text{total}} - \text{Lisis}_{\text{espontánea céls. diana}})} \times 100$$

siendo,

- Lisis problema: media de las absorbancias obtenidas en los pocillos donde se incuban células efectoras junto con células diana.
- Lisis espontánea: media de las absorbancias obtenidas en los pocillos sembrados solo con células diana o con células efectoras.
- Lisis total: media de las absorbancias obtenidas en los pocillos que contenían células diana, a los que se añadieron 20 µl de solución de lisis (HCl).

En cada experimento se realizaron los ensayos por triplicado, utilizándose en la ecuación el valor medio de las absorbancias obtenidas para cada tipo de lisis.

Capacidad proliferativa de los linfocitos

La actividad más característica de los linfocitos es su capacidad de respuesta proliferativa a antígenos o mitógenos. Para estudiarla se empleó el test de

transformación linfoblástica (TTL) en respuesta a los mitógenos Concanavalina A (Con A), Lipopolisacárido de *Escherichia coli* (LPS) y Fitohemaglutinina (PHA), siguiendo la metodología descrita por (Del Río, Hernanz et al. 1994) (De la Fuente, Baeza et al. 2004) (Alvarado, Álvarez et al. 2006). Este ensayo analiza *in vitro* la respuesta proliferativa frente a mitógenos que reproduce la que tiene lugar *in vivo* frente a antígenos. Su fundamento reside en la capacidad que poseen los linfocitos maduros para, en condiciones adecuadas, transformarse en células con capacidad de división o linfoblastos. Éstos sintetizan ADN para su división, por lo que si se añade un precursor de la síntesis marcado radiactivamente (timidina marcada con tritio, en este caso) puede cuantificarse la proliferación.

Para el estudio de la respuesta proliferativa en linfocitos de bazo y timo, se sembraron alícuotas de 200 μ l (10^6 células/ml de medio completo) en placas de cultivo de 96 pocillos con fondo plano. En los pocillos destinados a determinar la respuesta proliferativa de los linfocitos, se adicionaron 20 μ l del mitógeno. Las concentraciones de mitógeno empleadas para el estudio en ratas Zucker y Wistar adultas fueron las siguientes: Con A y LPS (1, 3 y 5 μ g/ml en el pocillo) y PHA (5, 25 y 50 μ g/ml en el pocillo). En el estudio comparativo entre ratas Zucker jóvenes y adultas, las concentraciones de mitógeno utilizadas fueron las siguientes: Con A y LPS (1 μ g/ml en el pocillo) y PHA (25 μ g/ml en el pocillo). En los pocillos para la valoración de la proliferación espontánea, se añadieron 20 μ l de medio completo. Las placas se incubaron durante 48 horas, a una temperatura de 37° C, en una atmósfera al 5% de CO₂ y una humedad de saturación. Transcurrido ese tiempo, se observó al microscopio óptico invertido la aparición de blastos. En todo momento se trabajó en condiciones de esterilidad. A continuación, se recogieron 100 μ l del sobrenadante de cada pocillo y se congelaron a una temperatura de -20°C (para la valoración posterior, en el caso del bazo, de los niveles de citoquinas). Seguidamente, se añadieron en cada pocillo 5 μ l de timidina tritiada (0,5 μ Ci/pocillo) y se renovó el medio completo adicionando 100 μ l de medio fresco. La incubación se prolongó durante 24 horas más, tras las que se recolectaron las células de cada pocillo en filtros con un recolector de células semiautomático, lavando los pocillos tres veces con agua ultrapura. Los filtros se dejaron secar y se colocaron a continuación en viales que contenían 5 ml de líquido de

centelleo. La timidina incorporada por los linfocitos se midió en un contador β de centelleo líquido, del que se obtuvieron las cuentas por minuto (cpm) de cada filtro.

En todos los experimentos se realizaron los ensayos por triplicado, utilizándose el valor promedio de cada triplicado para la obtención de los datos. Los resultados se expresan como la media aritmética de cpm en cada triplicado y también mediante el % de estimulación (en el que el valor de 100 corresponde a las cuentas por minuto de los pocillos en los que se ha valorado la proliferación espontánea).

Valoración de los niveles de citoquinas por Luminometría

Todos los sobrenadantes de cultivo destinados a la valoración de los niveles de citoquinas fueron mantenidos a -20°C , descongelados en frío y centrifugados 10 minutos a 1000g antes de su valoración, para eliminar partículas y agregados.

En esta determinación, se emplearon alícuotas de 25 μl de los sobrenadantes de cultivo de 48 horas de linfocitos de bazo, tanto en condiciones basales, como estimulados con los mitógenos Con A y LPS a la concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$. Los niveles de citoquinas se valoraron mediante la técnica de inmunoensayo, utilizando el sistema Luminex[®] 200[™] y el kit comercial MILLIPLEX[™] MAP (Millipore Corporation, Billerica, MA 01821, USA) para rata. Dicho kit permite la detección simultánea en una misma muestra de cuatro citoquinas diferentes, que incluyen citoquinas reguladoras de la proliferación pro- y anti-inflamatorias: interleuquina-2 (IL-2), interleuquina-1 β (IL-1 β), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleuquina- 10 (IL-10).

Sistema Luminex

El sistema Luminex[®] 200[™] es un analizador basado en los principios de la citometría de flujo, que presenta la combinación de 3 tecnologías. La primera está constituida por microesferas de poliestireno (5,6 micras de diámetro), 100 microesferas donde cada una posee diferente fluorescencia, que actúan como el identificador, y la superficie sólida para construir el ensayo. La segunda es la citometría de flujo basada en el analizador Luminex 200, que integra los componentes de la detección como el láser, la óptica, fluidos de alta velocidad y procesadores de señal digital. El tercer componente

es el software Xponent[®], que está diseñado para el protocolo de adquisición de datos basado en un análisis sólido de regresión de datos.

Fundamento de la técnica

El método se basa en la utilización de microesferas, cada una con un color específico interno, el cual varía de un rojo hasta llegar a la tonalidad verde. Se han definido 100 colores diferentes de microesferas, permitiendo así, que cada esfera se encuentre identificada por su color interno. Cada microesfera lleva unidos anticuerpos específicos para un analito. Cuando el analito presente en la muestra es capturado por la microesfera, se añade un anticuerpo marcado con biotina, que al ser incubado con streptavidina-ficoeritrina, genera una reacción sobre la superficie de la esfera, que emite fluorescencia. Para obtener las concentraciones de citoquinas, las microesferas pasan una a una, a través de dos tipos de láser. El primero de ellos posee la función de excitar el color interno, identificando así la microesfera, y un segundo láser excita la ficoeritrina unida a la microesfera, obteniendo así la fluorescencia media. Esta fluorescencia obtenida es convertida en concentración, haciendo uso de la curva estándar específica de cada analito.

Preparación de reactivos

Para la preparación de los anticuerpos, se sonica durante 30 segundos el vial que contiene las microesferas con los anticuerpos específicos para las 4 citoquinas a estudiar, y se agita en vórtex durante 1 minuto. Se añaden 60 µl a otro tubo y se lleva a un volumen final de 3 ml con reactivo diluyente proporcionado por el kit.

El estándar se prepara reconstituyendo el vial con 250 µl de agua ultrapura (milli-Q) y transcurridos 10 minutos de hidratación, se transfiere a un eppendorf y se realizan diluciones seriadas para preparar los diferentes estándares de la curva patrón.

Los controles de calidad se reconstituyen en 250 µl de agua ultrapura, se agitan en vórtex y tras 10 minutos de hidratación, se transfieren a tubos eppendorf.

Por último, el tampón de lavado se prepara a partir de una concentración 10x, diluyendo 30 ml con 270 µl de agua ultrapura.

Procedimiento del inmunoensayo

El ensayo se realizó de acuerdo a las instrucciones y protocolos establecidos según el kit comercial de Millipore. Se empleó una placa de 96 pocillos, cada uno de los cuales fue previamente humedecido con 200 µl de tampón de ensayo, y se mantuvo la placa en agitación. Transcurridos 10 minutos, se eliminó el líquido con una bomba de vacío. A continuación, se añadieron 25 µl de las muestras, de tampón de ensayo (blanco de la curva patrón), de los estándares y de los controles de calidad a los pocillos correspondientes. Además, a los pocillos que contienen las muestras se les añadió 25 µl de tampón de ensayo. También se adicionaron 25 µl de solución matriz de la muestra (medio completo), a los pocillos correspondientes al blanco, los estándares y los controles de calidad. La placa se incubó con 25 µl de la mezcla de microesferas con los anticuerpos, en agitación, durante 16-19 horas a 4°C. Posteriormente, se realizaron dos lavados en la placa y 25 µl del detector de anticuerpos marcado con biotina se añadió a cada pocillo y se incubó durante 2 horas, a temperatura ambiente y en agitación constante. Sin lavar la placa, se añadieron 25 µl de estreptavidina-ficoeritrina a cada pocillo y se incubó durante 30 minutos en agitación, a temperatura ambiente. Por último, se realizaron 2 lavados en la placa y se añadieron en cada pocillo 150 µl de fluido apropiado para el sistema. Transcurridos 5 minutos en agitación, se analizó la placa en el luminómetro (Luminex 200) aplicando las especificaciones y el protocolo según el proveedor.

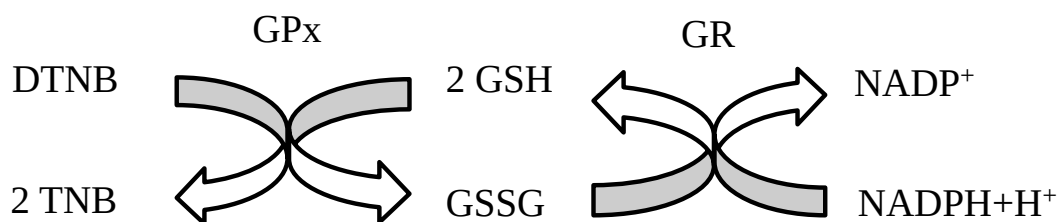
Los resultados se expresaron como pg/ml con ayuda del software de análisis de datos.

3.2.1.6. Valoración de parámetros de estrés oxidativo

Contenido intracelular de glutathion (GSH) total

El glutathion es el antioxidante más potente en el organismo, gracias a la acción reductora del grupo tiol de su cisteína. La valoración del glutathion total, se llevó a cabo siguiendo la técnica descrita previamente por (Tietze 1969), con ligeras modificaciones realizadas en nuestro laboratorio (De la Fuente, Hernanz et al. 2004). El procedimiento consiste en el reciclado enzimático del glutathion, el cual es secuencialmente oxidado por

el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) y reducido por el NADPH en presencia de la enzima glutathion reductasa (GR) (ver el siguiente esquema):



Las muestras empleadas para la determinación del contenido en glutathion total fueron homogenados de bazo, timo e hígado obtenidos a partir de muestras previamente almacenadas a -80°C . Los homogenados fueron resuspendidos en ácido tricloroacético (TCA) al 5% con HCl 0.01N. Se empleó este medio porque proporciona el pH ácido necesario para evitar la oxidación del GSH. Los homogenados de los distintos órganos se ajustaron a las concentraciones que se citan a continuación: bazo (25 mg/ml), timo (50 mg/ml), hígado (10 mg/ml), requiriéndose una dilución 1/10 de las muestras de cada órgano en el ensayo.

Antes de comenzar el ensayo se desoxigenó la solución de TCA burbujeándola con helio comprimido durante un tiempo mínimo de 10 minutos. Todo el protocolo de homogeneización se llevó a cabo en cámara fría (a una temperatura de 4°C), y las muestras se mantuvieron en hielo en todo momento. Se utilizó un homogeneizador eléctrico a un número bajo de revoluciones (aproximadamente 300 rpm) con el fin de evitar el calentamiento de las muestras y prevenir así su posible oxidación.

A continuación, las muestras se centrifugaron a 3200g durante 5 minutos y a 4°C de temperatura, y se procedió a llevar a cabo el análisis en los sobrenadantes. La absorbancia se midió en espectrofotómetro a 412 nm, durante 4 minutos cada 20 segundos y con 60 segundos de retardo inicial, (dado que la forma reducida del DTNB, el 2-nitro-5-tiobenzoico (TNB), tiene un máximo de absorción a esta longitud de onda) y en presencia de DTNB 6 mM, NADPH 0,3 mM y GR 10 U/ml en tampón fosfato 50 mM con EDTA 6,3 mM burbujeado; soluciones preparadas en el momento del ensayo. También se realizaron medidas de la reacción sin muestra (sustituyendo ésta por

solución de TCA) para evitar sobrevalorar el contenido de glutatión. Los valores obtenidos se restaron como factor de corrección. Así, se usaron microcubetas de vidrio óptico de 1 cm de paso de luz conteniendo:

1) Reacción con muestra:

500 µl NADPH, 70 µl DTNB, 70 µl muestra y 70 µl GR.

2) Reacción sin muestra:

500 µl NADPH, 70 µl DTNB, 70 µl solución de TCA y 70 µl GR.

3) Blanco:

500 µl NADPH, 70 µl DTNB, 70 µl muestra y 70 µl solución de TCA.

Se realizó la curva patrón, en las mismas condiciones que las muestras, a partir de una solución madre que contenía 16 mg de GSH en 250 ml de solución de TCA al 5% con HCl 0.01N. Los resultados de GSH se expresaron como nanomol/mg tejido, con ayuda de la siguiente ecuación:

$$\text{nmol GSH/mg tejido} = [(\Delta\text{DO}/\text{min}) + 0,0021/0,3951] \times 1000/Y \times 1/Z \times F$$

siendo:

$\Delta\text{DO}/\text{min}$: $\Delta\text{DO}/\text{min}$ reacción con muestra - $\Delta\text{DO}/\text{min}$ reacción sin muestra.

1000/Y: nmol/ml, siendo Y el volumen de muestra que se añade a la cubeta del espectrofotómetro (70 µl).

1/Z: factor de corrección para expresar el resultado por miligramo de tejido, siendo Z la concentración inicial del homogenado, cuyo valor será 25 para el bazo, 50 para el timo y 10 en el caso del hígado.

F: factor de dilución de la muestra, cuyo valor es 10 para todos los órganos.

Capacidad antioxidante total

Los niveles de antioxidantes totales en el bazo y en el hígado fueron valorados mediante un kit comercial (Nanjing Jiancheng Bioengineering Institute). Se emplearon homogenados de bazo e hígado a una concentración de 100 mg/ml de tampón fosfato 50 mM. El fundamento del kit se basa en la reducción del Fe^{3+} a Fe^{2+} por la acción de

todos los antioxidantes presentes. La cantidad de Fe^{2+} es evaluada mediante la medida del compuesto coloreado formado por Fe^{2+} y fenantreno. Este complejo posee una absorción a 520 nm. Los resultados fueron expresados en unidades de capacidad antioxidante total por miligramo de tejido (U/mg tejido).

Valoración de diferentes enzimas implicadas en el estado redox celular

Actividad Xantina Oxidasa

La valoración de la actividad de esta enzima se llevó a cabo en homogenados de bazo, timo, hígado, cerebelo y telencéfalo obtenidos a partir de muestras previamente almacenadas a -80°C . Se utilizó un homogeneizador eléctrico a un número bajo de revoluciones (aproximadamente 300 rpm) con el fin de evitar el calentamiento de las muestras y prevenir así su posible oxidación. Además, todo el protocolo de homogeneización se llevó a cabo en cámara fría (a una temperatura de 4°C) y las muestras se mantuvieron en hielo en todo momento.

El homogeneizado se realizó en tampón fosfato 50 mM a $\text{pH}=7,4$ y todas las muestras de tejido se ajustaron a una concentración de 50 mg/ml. A continuación, se centrifugaron a 14.000 rpm durante 30 minutos y a una temperatura de 4°C . En los sobrenadantes obtenidos de esta centrifugación se llevó a cabo el análisis de la actividad de la enzima xantina oxidasa mediante un ensayo fluorimétrico, utilizando el kit comercial “Amplex Red Xanthine/ Xanthine Oxidase Assay Kit” (Molecular Probes). En el caso del bazo y del hígado fue necesario diluir la muestra 1/2. También se valoró la actividad xantina oxidasa en plasma una vez descongeladas las muestras y centrifugadas durante 10 minutos a 1500 rpm.

El kit se basa en la capacidad de la enzima xantina oxidasa (XO) de producir el radical libre anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) como consecuencia de su actividad normal en la ruta de catabolismo de las purinas, dando lugar, como productos de esta reacción, a xantina en un primer paso y ácido úrico en el paso final. Cuando se añade la mezcla de reacción, el anión superóxido producido por la XO se degrada espontáneamente, dando lugar a la aparición de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Éste, a su vez, en presencia de peroxidasa de rábano, reacciona estequiométricamente con el reactivo Amplex Red y

genera así un compuesto de oxidación fluorescente, la resofurina, cuya fluorescencia se mide en un lector de placas en un rango de excitación de 530 nm y emisión de 595 nm.

Para el análisis de los órganos y el plasma estudiados se realizaron curvas patrón con xantina a diferentes concentraciones. A partir de dichas rectas se obtuvieron las expresiones de los niveles de actividad de la enzima. Los resultados se expresaron en miliunidades de actividad enzimática por miligramo de tejido (mU XO/mg tejido) en el caso de los órganos. En el caso del plasma, los niveles de actividad enzimática se expresaron como (mU XO/ml plasma).

Actividad Glutation Peroxidasa (GPx)

La valoración de la actividad glutathion peroxidasa se realizó según la técnica de (Lawrence and Burk 1976) con pequeñas modificaciones, a través de la cual se mide la actividad total de la enzima utilizando hidroperóxido de cumeno (cumeno-OOH) como sustrato. Mediante este método se determina la tasa de oxidación del glutathion (GSH) producida por el cumeno-OOH, en una reacción catalizada por la enzima glutathion peroxidasa, gracias al descenso de la absorbancia a 340 nm por oxidación del NADPH, en presencia de un exceso de la enzima glutathion reductasa (GR):



Las muestras empleadas fueron homogenados de bazo e hígado obtenidos a partir de muestras previamente almacenadas a -80°C. Dichos homogenados se resuspendieron en tampón fosfato 50 mM a pH=7,0 y se ajustaron a las siguientes concentraciones: bazo (25 mg/ml), e hígado (10 mg/ml), requiriéndose una dilución 1/10 en las muestras de bazo y 1/6 en las muestras de hígado.

Antes de comenzar el ensayo se desoxigenó el tampón fosfato 50 mM burbujeándolo con helio comprimido durante un tiempo mínimo de 10 minutos. Todo el

protocolo de homogeneización se llevó a cabo en cámara fría (a una temperatura de 4°C), y las muestras se mantuvieron en hielo en todo momento. Se utilizó un homogeneizador eléctrico a un número bajo de revoluciones (aproximadamente 300 rpm) con el fin de evitar el calentamiento de las muestras y prevenir así su posible oxidación. A continuación, las muestras se centrifugaron a 3200g durante 20 minutos y a 4°C de temperatura, realizándose en los sobrenadantes los ensayos de la actividad enzimática.

Para el ensayo se prepararon, en el momento, las siguientes soluciones:

- 1) Solución reactiva (en tampón fosfato 50 mM): EDTA 1 mM, Azida sódica 4 mM, NADPH 0,2 mM, GSH 4 mM, GR 1 U/ml solución. Se burbujeó previo a su uso, manteniéndose en oscuridad.
- 2) Hidroperóxido de cumeno 0,71 mM en tampón fosfato.

Las soluciones fueron mantenidas en frío, y solo previo paso a la medida de la actividad enzimática fueron atemperadas a temperatura ambiente para permitir la activación de las enzimas.

Es necesario considerar que la reacción entre el hidroperóxido de cumeno y el glutatión puede producirse aún en ausencia de la enzima GPx. Por ello, para evitar una posible sobrevaloración de dicha actividad enzimática, se realizó una reacción en ausencia de muestra, que se denominó reacción no catalizada y permitió la cuantificación de la reacción espontánea.

La actividad GPx se valoró espectrofotométricamente, a temperatura ambiente. Las medidas se realizaron en microcubetas de vidrio óptico (región visible del espectro), con un paso de luz de 1 cm, conteniendo:

- 1) Reacción catalizada: 650 µl de solución reactiva, 25 µl de muestra y 25 µl de solución de hidroperóxido de cumeno.
Como blanco se empleó una mezcla formada por 675 µl de solución reactiva y 25 µl de muestra.

- 2) Reacción no catalizada: 650 µl de solución reactiva, 25 µl de tampón fosfato y 25 µl de solución de hidroperóxido de cumeno.

En este caso el blanco se obtuvo con 675 µl de solución reactiva y 25 µl de tampón fosfato.

Antes de añadir el hidroperóxido de cumeno, ambas reacciones se incubaron durante 4 minutos a 37°C. La reacción se inició en el momento de la adición del hidroperóxido de cumeno en la cubeta, monitorizándose el descenso de absorbancia a 340 nm a partir de ese momento cada 40 segundos y durante un total de 5 minutos.

El cálculo de la actividad GPx se realizó según la expresión que se indica a continuación, siendo los resultados expresados en mU.I./mg tejido [mU.I.= 1/(nmol NADPH/cm)]:

$$\text{mU.I. GPx/mg tejido} = [(\Delta\text{DO}/\text{min})/\epsilon] \times (V_t/V_m) \times 1/Y \times 1/Z \times F$$

siendo:

$\Delta\text{DO}/\text{min}$: $\Delta\text{DO}/\text{min}$ reacción catalizada - $\Delta\text{DO}/\text{min}$ reacción no catalizada.

ϵ : coeficiente de extinción molar del NADPH a 340 nm ($6,22 \times 10^{-3} \text{ nM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

(V_t/V_m) : factor de dilución de la muestra en la cubeta, (0,7 ml/0,025 ml), siendo V_t el volumen total en cubeta y V_m el volumen de muestra en cubeta.

$1/Y$: mU GPx/ml, siendo Y el volumen de muestra que se añade a la cubeta del espectrofotómetro (0,025 ml).

$1/Z$: factor de corrección para expresar el resultado por miligramo de tejido, siendo Z la concentración inicial del homogenado, cuyo valor será 25 para el bazo y 10 en el caso del hígado.

F : factor de dilución de la muestra, cuyo valor es 10 para el bazo y 6 en el caso del hígado.

Actividad Glutation Reductasa (GR)

La actividad glutathion reductasa se valoró según el método de (Massey and Williams 1965), basado en el seguimiento de la oxidación del NADPH medido

espectrofotométricamente a 340 nm. La enzima GR cataliza la reducción del glutathion oxidado utilizando NADPH como fuente de equivalentes de reducción.



Para llevar a cabo la valoración, las muestras empleadas fueron homogenados de bazo, timo e hígado obtenidos a partir de muestras previamente almacenadas a -80°C. Se resuspendieron los homogenados en tampón fosfato 50 mM con EDTA 6,3 mM y se ajustaron a las siguientes concentraciones: bazo (25 mg/ml), hígado (10 mg/ml), y timo (50 mg/ml). No se requirió diluir las muestras para la valoración.

Antes de comenzar el ensayo se desoxigenó el tampón fosfato 50 mM con EDTA 6,3 mM burbujeándolo con helio comprimido durante un tiempo mínimo de 10 minutos. Todo el protocolo de homogeneización se llevó a cabo en cámara fría (a una temperatura de 4°C), y las muestras se mantuvieron en hielo en todo momento. Se utilizó un homogeneizador eléctrico a un número bajo de revoluciones (aproximadamente 300 rpm) con el fin de evitar el calentamiento de las muestras y prevenir así su posible oxidación. A continuación, las muestras se centrifugaron a 3200g durante 20 minutos y a 4°C de temperatura, realizándose el ensayo de la actividad enzimática en los sobrenadantes.

Para el ensayo se prepararon en el momento las siguientes soluciones:

- 1) NADPH 6 mM (0,3 mM en cubeta).
- 2) GSSG (4 mM en cubeta).

Para la valoración de la actividad de esta enzima, también se realizó paralelamente una reacción en ausencia de muestra, que se denominó reacción no catalizada, para cuantificar la oxidación espontánea del NADPH, incluyendo esta medida como factor de corrección. La actividad GR se valoró espectrofotométricamente. Las medidas se realizaron en microcubetas de vidrio óptico, con un paso de luz de 1 cm, conteniendo:

- 1) Reacción catalizada: 580 µl de tampón fosfato 50 mM con EDTA 6,3 mM, 50 µl de muestra, 35 µl de GSSG y 35 µl de NADPH.
- 2) Como blanco se empleó una mezcla formada por 650 µl de tampón fosfato 50 mM con EDTA 6,3 mM y 50 µl de muestra.
- 3) Reacción no catalizada: 620 µl de tampón fosfato 50 mM con EDTA 6,3 mM, 35 µl de GSSG y 35 µl de NADPH.
- 4) En este caso el blanco se obtuvo con 700 µl de tampón fosfato 50 mM con EDTA 6,3 mM.

La reacción se valoró a temperatura ambiente durante 4 minutos con 30 segundos de retardo inicial, realizando medidas cada 40 segundos a 340 nm.

El cálculo de la actividad GR se realizó según la expresión que se indica a continuación, siendo los resultados expresados en mU.I./mg tejido [mU.I.= 1/(nmol NADPH/cm)]:

$$\text{mU.I. GR/mg tejido} = [(\Delta\text{DO}/\text{min})/\text{E}] \times (\text{Vt}/\text{Vm}) \times 1/\text{Y} \times 1/\text{Z}$$

siendo:

$\Delta\text{DO}/\text{min}$: $\Delta\text{DO}/\text{min}$ reacción catalizada - $\Delta\text{DO}/\text{min}$ reacción no catalizada.

E: coeficiente de extinción molar del NADPH a 340 nm ($6,22 \times 10^{-3} \text{ nM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

(Vt/Vm): factor de dilución de la muestra en la cubeta, (0,7 ml/0,05ml), siendo Vt el volumen total en cubeta y Vm el volumen de muestra en cubeta.

1/Y: mU GR/ml, siendo Y el volumen de muestra que se añade a la cubeta del espectrofotómetro (0,05 ml).

1/Z: factor de corrección para expresar el resultado por miligramo de tejido, siendo Z la concentración inicial del homogenado, cuyo valor será 25 para el bazo, 50 para el timo y 10 en el caso del hígado.

3.2.1.7. Estudio del perfil metabólico

El objetivo de este estudio fue investigar el impacto metabólico de la obesidad a nivel tisular en ratas Zucker lean (*fa/+*) y obesas (*fa/fa*), jóvenes y adultas. Para este propósito, se caracterizó el perfil metabólico de órganos clave del metabolismo como

son el hígado, el corazón y el tejido adiposo abdominal subcutáneo, mediante la tecnología de metabonomía, empleando como técnica analítica la resonancia magnética nuclear (RMN).

Preparación de las muestras

Las muestras de tejido (100 mg aproximadamente) fueron homogeneizadas en 1,5 ml de una solución de metanol/agua (1:1). Los homogenados se centrifugaron a 5000g durante 5 minutos, a 4°C de temperatura. Se recogieron los sobrenadantes y se evaporó el metanol contenido en los mismos mediante un flujo de nitrógeno. Finalmente, se liofilizaron las muestras mediante un liofilizador (aparato de secado por congelación) (freeze-dryer).

Una vez secos los extractos, fueron reconstituidos en 650 µl de óxido de deuterio (D₂O) y 0,02% DSS-d₆ (sal sódica de 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato-d₆) y centrifugados a 5000g durante 5 minutos a 4°C de temperatura. Se recogieron 550 µl de sobrenadante y se transfirieron a tubos de resonancia magnética de 5 mm para su análisis mediante RMN.

Espectroscopia de resonancia magnética nuclear

Todos los espectros de resonancia magnética nuclear fueron obtenidos en un espectrómetro de RMN (Bruker Avance DRX 700 MHz), operando a 700,19 MHz y equipado con una criosonda del mismo fabricante. Los espectros se adquirieron usando una secuencia de pulso unidimensional (1D) estándar [recycle delay (RD)-90°-t₁-90°-tm-90°- acquire free induction decay (FID)] con supresión de agua aplicada durante RD de 2 segundos, un tiempo de mezcla (mixing time -tm) de 100 milisegundos y un pulso de 90° fijado en 7,70 microsegundos.

Para cada espectro, se realizaron un total de 80 análisis (para el hígado) y 128 análisis (para el corazón y el tejido adiposo), acumulados en 64K puntos de datos con una anchura de espectral de 14 005 Hz. Se llevó a cabo un registro de espectros bidimensional (2D) en el mismo equipo para muestras seleccionadas, incluyendo espectroscopia de correlación (COSY) (Aue 1976), espectroscopia de correlación total (TOCSY) (Glaser, Schwalbe et al. 1996) y espectroscopia de RSM de coherencia

cuántica única heteronuclear (HSQC) (Marek, Králík et al. 1997). Los FIDs fueron multiplicados por una función exponencial correspondiente a 0,3 Hz de ancho de línea (broadening line). Todos los espectros fueron manualmente corregidos en fase, en su línea base y calibrados al desplazamiento químico del DSS (δ 0,00). Los metabolitos se asignaron utilizando la base de datos estándar (Nicholson, Foxall et al. 1995) (Fan 1996) (Garrod, Humphreys et al. 2001) (Waters, Holmes et al. 2002) (Bollard, Garrod et al. 2000), y se confirmaron a través de experimentos de RMN 2D.

Análisis de datos

Todas las regiones de los espectros comprendidas entre 0,5 y 10 partes por millón (ppm) se importaron en la versión R2010b de Matlab (Mathworks, U.K.) y los algoritmos estadísticos fueron proporcionados por Korrigan Sciences (Korrigan Sciences Ltd., U.K.). Con objeto de minimizar la variabilidad debida a la presaturación de la señal de agua, se eliminó la región de resonancia del agua (δ 4,70-5,05). Los datos se alinearon y se normalizaron al cociente probabilístico tal y como se describió previamente (Veselkov, Lindon et al. 2009) (Dieterle, Ross et al. 2006). Todos los modelos estadísticos se llevaron a cabo empleando una escala de unidad de varianza (unit variance scaling).

El diseño experimental sigue la regla de un diseño factorial 2x2, el cual posibilita un análisis sistemático de todas las posibles combinaciones de 2 factores, que en este experimento son la edad y la dotación genética (age and genetic background). En un principio, se adoptó una estrategia estadística simple, la cual consistió en una primera visión global de todos los datos en conjunto (los cuatro grupos de ratas juntos) empleando el análisis de componentes principales (Principal Component Analysis – PCA) no supervisado. Este método permite la detección de potenciales valores atípicos (outliers), los cuales se pueden eliminar del posterior análisis. A continuación, se llevó a cabo un análisis supervisado de comparaciones por pares, de acuerdo a la estrategia de análisis estadístico que se muestra en la figura 1. El objetivo de dichas comparaciones supervisadas por pares fue detectar modulaciones específicas asociadas con cada factor (edad y dotación genética). Para este propósito, se llevaron a cabo modelos de regresión de mínimos cuadrados parciales (CF-PLS: Cross- Fitted Projection on Latent Structure) (Cloarec 2011). La fiabilidad de cada modelo fue evaluada mediante el R^2Y (porcentaje

de la varianza explicada por el modelo) del componente latente y su p-valor asociado calculado como describió su autor (Cloarec 2011). Los parámetros específicos asociados con cada modelo se resumen en la tabla 1.

Para ayudar a visualizar el alcance de las diferencias en cuanto al glutathione en los extractos polares del hígado, el espectro múltiple del glutathione correspondiente a la señal de los protones γCH_2 de la fracción del glutamato, se integró entre δ 2,54-2,56, donde no solapa con otras resonancias. De igual manera, el triplete de hipotaurina correspondiente a la señal de los protones αCH_2 se integró entre δ 2,62-2,64.

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante ANOVA de dos vías (factores edad y dotación genética) seguido de test de comparación múltiple (test Tuckey HSD) en la versión R 2.11.1.

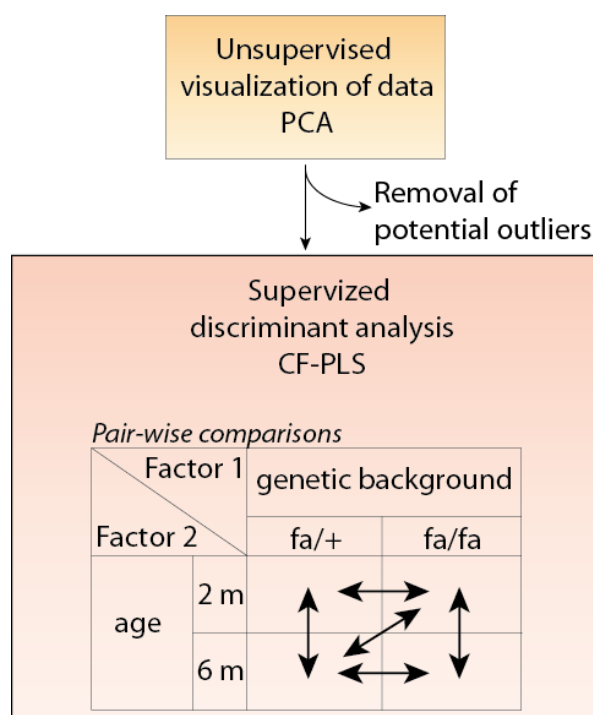


Figura 1. Estrategia de análisis de datos.

Los datos se visualizaron primeramente utilizando el análisis no supervisado PCA, seguido de comparaciones por pares, las cuales se emplearon para revelar variaciones asociadas específicamente con cada factor.

(PCA: Principal Component Analysis); (PLS: Cross Fitted Partial Least Squares).

Tabla 1. Modelos de regresión de mínimos cuadrados parciales (CF-PLS model parameters).

Modelo	Hígado		Corazón		Tejido adiposo	
	R^2Y	P valor	R^2Y	P valor	R^2Y	P valor
<i>fa/+</i> 2M vs 6M	0.39	0.03*	0.25	0.10	0.77	$3.11 \cdot 10^{-4}$ ***
<i>fa/fa</i> 2M vs 6M	0.56	0.005**	0.36	0.05	0.72	$6.94 \cdot 10^{-4}$ ***
<i>fa/+</i> vs <i>fa/fa</i> at 2M	0.79	$1.26 \cdot 10^{-4}$ ***	0.40	0.04*	0.86	$3.84 \cdot 10^{-5}$ ***
<i>fa/+</i> vs <i>fa/fa</i> at 6M	0.53	0.008**	~ 0	NS	0.64	0.002**
<i>fa/+</i> at 6M vs <i>fa/fa</i> at 2M	0.60	0.003**	0.11	NS	~ 0	NS

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. NS: no significativo.

(*fa/+*): ratas Zucker lean; (*fa/fa*): ratas Zucker obesas; 2M: 2 Meses; 6M: 6 Meses.

3.2.1.8. Análisis estadístico

El programa estadístico empleado para llevar a cabo los análisis fue el SPSS 19. Los resultados se expresaron como la media aritmética y error típico de los datos obtenidos en cada uno de los diferentes ensayos. De esta manera se encuentran representados en las gráficas y tablas del apartado de resultados.

La normalidad de los datos se comprobó mediante el test de Kolmogorov-Smirnov, y también la homogeneidad de las varianzas entre los grupos utilizando el test de Levene.

El análisis estadístico de los datos obtenidos en el primer estudio (comparando ratas Zucker obesas *fa/fa* y ratas Wistar adultas) se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA) de una vía (para estudiar el efecto de la cepa), seguido del test de Tuckey para las comparaciones posthoc, en el caso de varianzas homogéneas, o T2 de Tamhane, en el caso de que éstas no cumplieran la condición de homogeneidad.

El análisis de los datos obtenidos del segundo estudio (comparando ratas Zucker obesas *fa/fa* y Zucker lean jóvenes y adultas), se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías (para el estudio del efecto de la dotación genética y de la edad de los animales), seguido del test de Tuckey para las comparaciones posthoc, en el caso de varianzas homogéneas, o T2 de Tamhane, en el caso de que éstas no cumplieran la condición de homogeneidad.

En ambos estudios, se realizaron algunas comparaciones por grupos dos a dos, mediante la prueba “t” de Student para muestras independientes, y así se encuentra indicado en los casos que corresponda, en el apartado de resultados.

En el estudio correspondiente al perfil metabólico, el análisis de datos se realizó tal y como se describe previamente en el apartado 3.2.1.7. Los niveles relativos de glutatión e hipotaurina se analizaron mediante el análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías (dotación genética y edad de los animales), seguido del test de Tuckey.

Se consideró que no existía significación si el valor de la probabilidad de significación (p) era mayor de 0,05. Una diferencia de $p < 0,05$ se consideró como significativa, de $p < 0,01$ como muy significativa y de $p < 0,001$ como altamente significativa. En el caso de que la diferencia se encuentre en el límite de significación ($p = 0,05$), se indica en los casos que corresponda, en el apartado de resultados.

3.2.2. EFECTO DEL EJERCICIO FÍSICO EN RATAS MACHO GENÉTICAMENTE OBESAS ADULTAS. ESTUDIO INMUNOLÓGICO Y DE ESTRÉS OXIDATIVO

3.2.2.1. Diseño experimental

Los animales empleados en este estudio fueron ratas de la cepa Zucker macho (HsdOla:ZUCKER-Lepr^{fa}, *fa/fa*) obtenidas con 6-8 semanas de edad, mantenidas en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid a una temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, con un fotoperiodo (luz: 01:30-13:30h; oscuridad: 13:30-01:30h) y alimentadas con una dieta estándar y agua “ad libitum”. Las ratas obesas se dividieron en cuatro grupos experimentales: ratas sedentarias, ratas sedentarias que realizaron un golpe de ejercicio agudo, ratas entrenadas, y ratas entrenadas que realizaron un golpe de ejercicio agudo. Todos los animales de los diferentes grupos se sacrificaron a la edad adulta (6 meses).

Debido a que estas ratas son animales con actividad nocturna, el ciclo luz/oscuridad fue adaptado para que los animales realizaran el ejercicio durante su fase

activa, comenzando la fase de oscuridad aproximadamente 2 horas antes del inicio de las sesiones de entrenamiento: (luz: 01:30-13:30h; oscuridad: 13:30-01:30h). Los animales se entrenaron habitualmente entre las 15:00 y las 18:00 horas. Las ratas entrenadas se mantuvieron en periodo de descanso durante las 72 horas previas a la recolección de las muestras, o a la realización del golpe de ejercicio agudo. El día del sacrificio de los animales, se les retiró la comida a las 8:30 horas.

Las muestras biológicas empleadas en este estudio se detallan a continuación:

- Sangre periférica para la valoración de la glucemia.
- Leucocitos del bazo, para la valoración de la actividad “Natural Killer”, la respuesta proliferativa de los linfocitos y los niveles de liberación de la citoquina factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) de los mismos, tras 48 horas de cultivo.
- Homogenados de bazo e hígado, donde se estudió la capacidad antioxidante total, los niveles de glutathion (GSH) total y las actividades de las enzimas glutathion reductasa (GR), glutathion peroxidasa (GPx) y xantina oxidasa (XO).

3.2.2.2. Programa de ejercicio

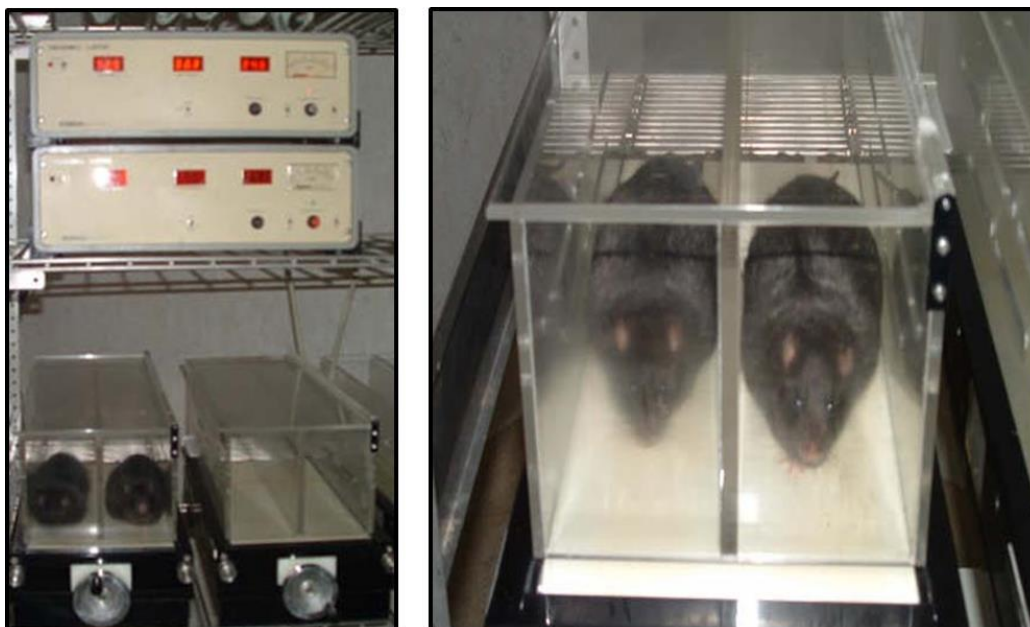
El ejercicio de entrenamiento habitual de los animales consistió en correr en una cinta rodante (Li 870, Letica Scientific Instruments, Barcelona, España), y estaba basado en distintas fases en cuanto a intensidad y duración: adaptación, progresión y mantenimiento. La intensidad y duración del mismo durante la primera semana fue de 25 cm/s durante 10 minutos, llegándose a alcanzar los 35cm/s durante 35 minutos en el último mes. El ejercicio se llevó a cabo durante 5 días por semana y tuvo una duración total de 14 semanas. El detalle de la programación del entrenamiento se resume en la tabla 2. El golpe de ejercicio agudo consistió en correr en la cinta rodante a 17cm/s durante los primeros 5 minutos hasta 35cm/s para completar 25-35 minutos previos al

sacrificio de los animales. La semana anterior a la realización del golpe de ejercicio agudo, los animales obesos sedentarios se acostumbraron al funcionamiento de la cinta rodante corriendo hasta 10 minutos a una velocidad creciente hasta 20 cm/s.

Tabla 2. Programación detallada del entrenamiento de los animales.

Semanas: Weeks; Días de entrenamiento: Training days; Sin actividad: Without activity; Sacrificio con o sin golpe de ejercicio agudo: Sacrifice with or without bout exercise.

WEEKS	TRAINING DAYS						
	1	2	3	4	5	6	7
1	10 min, 25 cm/s	10 min, 25 cm/s	10 min, 25 cm/s	10 min, 25 cm/s	10 min, 25 cm/s	Without activity	Without activity
2	10 min, 25 cm/s	10 min, 25 cm/s	10 min, 25 cm/s	10 min, 25 cm/s	10 min, 25 cm/s	Without activity	Without activity
3	15 min, 25 cm/s	15 min, 25 cm/s	Without activity	Without activity	Without activity	Without activity	Without activity
4	Without activity	Without activity	15 min, 25 cm/s	15 min, 25 cm/s	15 min, 25 cm/s	Without activity	Without activity
5	20 min, 30 cm/s	20 min, 30 cm/s	20 min, 30 cm/s	20 min, 30 cm/s	25 min, 30 cm/s	Without activity	Without activity
6	25 min, 30 cm/s	25 min, 30 cm/s	27 min, 31 cm/s	27 min, 31 cm/s	28 min, 31 cm/s	Without activity	Without activity
7	30 min, 31 cm/s	30 min, 31 cm/s	30 min, 31 cm/s	30 min, 31 cm/s	31 min, 32 cm/s	Without activity	Without activity
8	32 min, 32 cm/s	32 min, 32 cm/s	32 min, 32 cm/s	32 min, 32 cm/s	33 min, 32 cm/s	Without activity	Without activity
9	33 min, 33 cm/s	33 min, 33 cm/s	33 min, 33 cm/s	33 min, 33 cm/s	34 min, 33 cm/s	Without activity	Without activity
10	Without activity	34 min, 34 cm/s	34 min, 34 cm/s	34 min, 34 cm/s	34 min, 34 cm/s	Without activity	Without activity
11	35 min, 34 cm/s	35 min, 34 cm/s	35 min, 34 cm/s	35 min, 34 cm/s	35 min, 35 cm/s	Without activity	Without activity
12	35 min, 35 cm/s	35 min, 35 cm/s	35 min, 35 cm/s	35 min, 35 cm/s	35 min, 35 cm/s	Without activity	Without activity
13	35 min, 35 cm/s	35 min, 35 cm/s	35 min, 35 cm/s	35 min, 35 cm/s	35 min, 35 cm/s	Without activity	Without activity
14	35 min, 35 cm/s	35 min, 35 cm/s	35 min, 35 cm/s	35 min, 35 cm/s	35 min, 35 cm/s	Without activity	Without activity
15/16	Sacrifice with/ without bout exercise	Sacrifice with/ without bout exercise	Sacrifice with/ without bout exercise	Sacrifice with/ without bout exercise	Sacrifice with/ without bout exercise	Sacrifice with/ without bout exercise	Sacrifice with/ without bout exercise



Figuras 2 y 3. Entrenamiento de los animales en la cinta rodante.

3.2.2.3. Toma de muestras biológicas: sangre y órganos

Finalizado el periodo de entrenamiento, los animales se sacrificaron a la edad de 6 meses. En primer lugar, se controló el peso corporal de cada uno de los animales para posteriormente ser anestesiados mediante anestesia gaseosa con isoflurano (Aerrane, Baxter, Valencia, España). La dosis de partida de anestesia fue un 2% de oxígeno y 3,5% de isoflurano, para pasar a una dosis de mantenimiento de 1,5% de oxígeno y 3% de isoflurano.

A continuación, se recogió sangre de la arteria superior mesentérica para distintos estudios de otros grupos de investigación, y se aprovechó una pequeña parte de la sangre para la valoración de la glucemia mediante tiras reactivas y un glucómetro. Tras el desangrado de los animales, éstos se sacrificaron por decapitación y se procedió a la extracción del bazo, hígado, corazón y grasa epididimal y lumbar, que se recolectaron en condiciones asépticas y se depositaron en tubos estériles con medio PBS. Se obtuvo el peso del hígado, corazón y grasa epididimal y lumbar.

El bazo se dividió en dos partes, una de ellas se utilizó en fresco para los análisis de funcionalidad inmunitaria, y su procesamiento se llevó a cabo tal y como se describe

en el apartado 3.2.1.2. La otra parte, se congeló inmediatamente a -80°C y en diferentes homogenados se estudiaron los parámetros de estrés oxidativo.

El hígado se congeló a -80°C y sus homogenados se emplearon solo para el estudio del estado de estrés oxidativo. El corazón y la grasa únicamente se utilizaron para el control del peso.

3.2.2.4. Recuento y análisis de la viabilidad celular

El recuento y análisis de la viabilidad celular de los leucocitos esplénicos se realizó tal y como se describe en el apartado 3.2.1.3.

3.2.2.5. Valoración de parámetros de funcionalidad inmunitaria

Actividad citotóxica “Natural Killer” (NK) de los leucocitos

Se valoró la capacidad citotóxica “Natural Killer” de los leucocitos de bazo mediante la técnica previamente descrita en el apartado 3.2.1.5. Para ello se empleó el Kit comercial (Cytotox 96. PROMEGA), cuyo fundamento consiste en valorar la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) liberada al sobrenadante por parte de las células lisadas. Los leucocitos se ajustaron a 10^6 células/ml RPMI sin rojo fenol, obteniéndose en el pocillo una relación células efectoras:diana de 10:1. Los resultados se expresaron como % de lisis, realizando los experimentos por triplicado.

Capacidad proliferativa de los linfocitos

El ensayo de la respuesta proliferativa en linfocitos de bazo se llevó a cabo siguiendo el método previamente descrito en el apartado 3.2.1.5. La muestra se ajustó a 10^6 linfocitos/ml medio completo y los mitógenos que se utilizaron fueron LPS ($1\text{ }\mu\text{g/ml}$ en pocillo) y PHA ($25\text{ }\mu\text{g/ml}$ en pocillo). Transcurridas 48 horas de incubación de las placas de cultivo, se recogieron $100\text{ }\mu\text{l}$ del sobrenadante de cada pocillo y se congelaron a una temperatura de -20°C , para la valoración posterior de los niveles de $\text{TNF-}\alpha$.

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los resultados se expresan como % de linfoproliferación, dando en cada muestra el 100% al valor basal (cpm obtenidas en ausencia de estímulo mitogénico).

Valoración de los niveles de TNF- α

Todos los sobrenadantes de cultivo destinados a la valoración de los niveles de la citoquina TNF- α fueron mantenidos a -20°C, descongelados en frío y centrifugados 10 min a 1000g, para eliminar partículas y agregados.

El estudio de los niveles de TNF- α se llevó a cabo en los sobrenadantes de cultivo de linfocitos esplénicos, siguiendo el método descrito previamente por (Medina, Del Río et al. 2000) (De la Fuente, Baeza et al. 2004) (De la Fuente, Hernanz et al. 2004). Alícuotas de 100 μ l de sobrenadante, recogidas en los pocillos de las placas de cultivo de los linfocitos tras 48 horas de incubación en presencia de LPS, se almacenaron a -20°C hasta la valoración de las mismas mediante un kit ELISA comercial (DIACLONE, Francia), cuyos componentes fueron mantenidos a 4°C hasta el momento de la realización de los ensayos.

ELISA de fase sólida

Las muestras, los estándares y los controles de concentración conocida de la citoquina se incorporaron a una placa de ensayo absorbida con un anticuerpo específico frente a dicha citoquina de rata.

La técnica se resume brevemente en los siguientes pasos:

- 1) Anticuerpo frente a TNF- α de rata absorbido al fondo del pocillo.
- 2) Adición de los estándares, controles y muestras.
- 3) Incubación a temperatura ambiente durante 3 horas con anticuerpo frente a TNF- α de rata biotinilado. Lavado.
- 4) Incubación a temperatura ambiente con estreptavidina conjugada con peroxidasa durante 30 min. Lavado.
- 5) Incubación a temperatura ambiente y oscuridad con sustrato: solución de tetrametilbenzidina (TMB) durante 12-15 min.
- 6) Solución stop: H₂SO₄.

Una vez añadida la solución stop, las burbujas de aire fueron eliminadas y se midió la absorbancia a 450 nm. Los resultados se expresaron en pg/ml.

3.2.2.6. Valoración de parámetros de estrés oxidativo

Contenido intracelular de glutation (GSH) total

Este ensayo se llevó a cabo siguiendo el método previamente descrito en el apartado 3.2.1.6. Las muestras empleadas para la determinación del contenido en glutation total fueron homogenados de bazo e hígado obtenidos a partir de muestras previamente almacenadas a -80°C. Dichos homogenados se ajustaron a las concentraciones que se citan a continuación: bazo (25 mg/ml), hígado (10 mg/ml), requiriéndose una dilución 1/10 de las muestras de cada órgano en el ensayo. Los resultados de GSH fueron expresados como nanomol/mg tejido.

Capacidad antioxidante total

El estudio de la capacidad antioxidante total se realizó empleando homogenados de bazo e hígado obtenidos a partir de muestras almacenadas previamente a -80°C, y ajustados a una concentración de 100 mg/ml de tampón fosfato 50 mM, tal y como se describe en el apartado 3.2.1.6. Los resultados fueron expresados en unidades de capacidad antioxidante total por miligramo de tejido (U/mg tejido).

Valoración de diferentes enzimas implicadas en el estado redox celular

Actividad Xantina Oxidasa

El análisis de la actividad de la enzima xantina oxidasa (XO) se llevó a cabo mediante el ensayo fluorimétrico descrito previamente en el apartado 3.2.1.6. Para ello, se emplearon homogenados de bazo e hígado obtenidos a partir de muestras previamente almacenadas a -80°C. Todas las muestras de tejido se ajustaron a una concentración de 50 mg/ml. En el caso del hígado fue necesario diluir la muestra 1/2, mientras que las muestras de bazo no requirieron de dilución. Los resultados se expresaron en miliunidades de actividad enzimática por miligramo de tejido (mU XO/mg tejido).

Actividad Glutation Peroxidasa (GPx)

La valoración de la actividad glutatión peroxidasa se realizó mediante la técnica previamente descrita en el apartado 3.2.1.6. Las muestras utilizadas fueron homogenados de bazo e hígado obtenidos a partir de muestras previamente almacenadas a -80°C. Los homogenados fueron ajustados a las siguientes concentraciones: bazo (25 mg/ml), hígado (10 mg/ml), requiriéndose una dilución 1/10 en las muestras de bazo y 1/6 en las muestras de hígado. Los resultados fueron expresados en mU.I./mg tejido.

Actividad Glutation Reductasa (GR)

La determinación de la actividad glutatión reductasa se llevó a cabo siguiendo el método previamente descrito en el apartado 3.2.1.6. Para ello, se emplearon homogenados de bazo e hígado obtenidos a partir de muestras previamente almacenadas a -80°C, y se ajustaron a las siguientes concentraciones: bazo (25 mg/ml), hígado (10 mg/ml). No se requirió diluir las muestras para la valoración. Los resultados se expresaron en mU.I./mg tejido.

3.2.2.7. Análisis estadístico

El programa estadístico empleado para llevar a cabo los análisis fue el SPSS 19. Los resultados se expresaron como la media aritmética y error típico de los datos obtenidos en cada uno de los diferentes ensayos. De esta manera se encuentran representados en las gráficas y tablas del apartado de resultados.

La normalidad de los datos se comprobó mediante el test de Kolmogorov-Smirnov, y también la homogeneidad de las varianzas entre los grupos utilizando el test de Levene.

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías (para el estudio del entrenamiento y del golpe de ejercicio agudo), seguido del test de Tuckey para las comparaciones posthoc, en el caso de varianzas homogéneas, o T2 de Tamhane, en el caso de que éstas no cumplieran la condición de homogeneidad.

En algunos casos concretos, se realizaron comparaciones por grupos dos a dos, mediante la prueba “t” de Student para muestras independientes, y así se encuentra indicado en los casos que corresponda, en el apartado de resultados.

Se consideró que no existía significación si el valor de la probabilidad de significación (p) era mayor de 0,05. Una diferencia de $p < 0,05$ se consideró como significativa, de $p < 0,01$ como muy significativa y de $p < 0,001$ como altamente significativa. En el caso de que la diferencia se encuentre en el límite de significación ($p = 0,05$), se indica en los casos que corresponda, en el apartado de resultados.

3.3. ESTUDIOS EN RATONES HEMBRA GENÉTICAMENTE OBESOS: CONDUCTUAL, INMUNOLÓGICO Y DEL ESTADO ANTIOXIDANTE EN EL ENVEJECIMIENTO

3.3.1. Diseño experimental

Para llevar a cabo el presente objetivo los animales empleados fueron los siguientes:

- Ratones hembra BKS.Cg-+Lepr^{db}/+Lepr^{db}/OlaHsd (*db/db*), que portan en homocigosis la mutación del gen que codifica para el receptor de leptina (Lepr^{db} es una mutación autosómica recesiva en el cromosoma 4), por lo que desarrollan hiperleptinemia y son un modelo animal de obesidad genética.
- Ratones hembra BKS.Cg-+Lepr^{db}/+Lepr^{+/+}OlaHsd, que portan en heterocigosis (*db/+*) la mutación del gen que codifica para el receptor de leptina, por lo que no desarrollan obesidad y actúan como controles heterocigotos de los ratones obesos (*db/db*).

- Ratones hembra C57BL/6J OlaHsd, que son la cepa salvaje, no presentan ninguna modificación genética y actúan como controles de los ratones obesos (*db/db*).

Todos los grupos de animales fueron obtenidos con cinco semanas de edad, y mantenidos en el animalario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid, a una temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ y con un fotoperiodo invertido de 12 horas de luz blanca:12 horas de oscuridad, con cambio horario a las 8:00 horas. Los animales se alimentaron con una dieta estándar (A 04) procedente de PANLAB, S.L. (Barcelona) y agua “ad libitum”.

Este objetivo se realizó analizando a los tres grupos de animales a diferentes edades, jóvenes (2-3 meses), adultos (6 meses), y maduros (12 meses), ya que se trató de un estudio longitudinal en el que los animales no fueron sacrificados. En el transcurso del mismo, se anotó la evolución del peso y se registró la fecha de muerte natural de cada uno de los animales para el estudio de su longevidad, obteniéndose la curva de supervivencia.

Antes de comenzar la toma de muestras, a cada una de las edades indicadas, se realizó un estudio conductual.

Las muestras biológicas empleadas en este estudio fueron: sangre periférica para la valoración de la glucemia (a la edad de 6 y 12 meses), y leucocitos peritoneales. Los parámetros estudiados de funcionalidad inmunitaria y del estado antioxidante, se detallan a continuación:

- Valoración de la actividad “Natural Killer” de leucocitos peritoneales.
- Estudio de la respuesta proliferativa de linfocitos peritoneales.
- Medida de los niveles de secreción de citoquinas de linfocitos peritoneales, tras 24 horas de cultivo.
- Medida de los niveles de glutatión (GSH) total de leucocitos peritoneales.

- Valoración de la actividad de la enzima glutathion peroxidasa (GPx) de leucocitos peritoneales.

3.3.2. Estudio conductual

Se realizó una batería de pruebas destinadas a valorar parámetros comportamentales que se llevaron a cabo en horario de mañana (comenzando a las 9:00 horas) y se realizaron en luz blanca (75 W), excepto la prueba de neofobia que se realizó en luz roja. Basándonos en la experiencia previa de grupos de investigación expertos en análisis de parámetros conductuales en animales (Johansson, Halldner et al. 2001) (Giménez-Llort, Fernández-Teruel et al. 2002), las pruebas se realizaron en cuatro días consecutivos y siguiendo la secuencia que se especifica a continuación: el primer día los animales fueron sometidos a diferentes pruebas para evaluar su capacidad sensoriomotora (reflejo visual, reflejo de extensión posterior, prueba de la tabla de madera o “wood rod test” y prueba de la cuerda tirante); el segundo día se llevaron a cabo dos pruebas: la neofobia y el campo abierto con pared; durante la tercera jornada se realizó la prueba del tablero de agujeros; finalmente, el cuarto y último día los animales se sometieron a la prueba del laberinto en T.

Todas las sesiones fueron controladas por tres investigadores y se registraron con ayuda de una videocámara. Los animales fueron pesados antes de comenzar las pruebas para garantizar así que todos ellos se encontrasen activos de igual manera. En el intervalo de ensayo entre animales se limpiaron bien las superficies de los aparatos con objeto de eliminar el olor del animal anterior, así como la posible orina y las bolas fecales que éste hubiera podido dejar, y de este modo evitar posibles interferencias en el desarrollo de las pruebas con los siguientes animales.

3.3.2.1. Capacidad sensoriomotora

La evaluación de esta capacidad se llevó a cabo mediante la batería de pruebas que se especifican a continuación.

Reflejo visual

Esta prueba se realizó con objeto de evaluar el reflejo visual del animal. Para ello, se sujeta al ratón firmemente por la base de la cola, se suspende en el aire y se le aproxima lentamente a una superficie de apoyo de color oscuro (en este caso, la superficie empleada fue una cartulina de color negro). En el momento de aproximarse a la superficie, la extensión completa de las patas delanteras se considera una respuesta positiva e indicativa, por tanto, de que el animal conserva intacta su capacidad visual. Esta prueba se realizó por triplicado (ver figura 4).

Reflejo de extensión de las patas posteriores

Este reflejo se evaluó al mismo tiempo que el reflejo visual. Estudia la capacidad del animal de extender por completo las patas traseras cuando es suspendido en el aire. Si esto ocurre, la respuesta se considera positiva y nos indica que el animal mantiene intacta la capacidad de movimiento del tren trasero. Esta prueba se realizó por triplicado (ver figura 4).

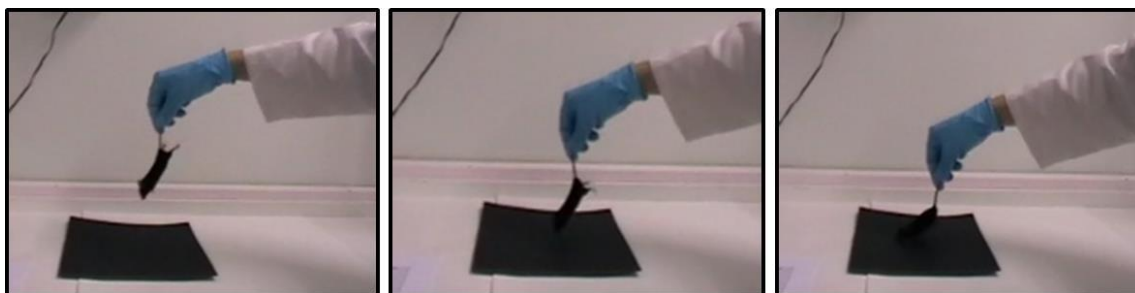


Figura 4. Reflejo visual y reflejo de extensión de las patas posteriores.

Prueba de la tabla de madera

Con objeto de estudiar el equilibrio y la coordinación motora de los animales se realizó la prueba de la tabla de madera o “Wood Rod Test”. Los ensayos se realizaron por duplicado y el tiempo máximo de duración de la prueba fue de 20 segundos.

La tabla (medidas: 2,9 cm ancho, 80 cm longitud, 22 cm altura) se sitúa elevada sobre un lecho de viruta y dividida en segmentos de 10 cm de longitud (lo que corresponde aproximadamente con la longitud media de los ratones empleados en el estudio) (ver figura 5). Se coloca al animal en la mitad de la tabla y se suelta una vez que nos aseguramos de que está estable.

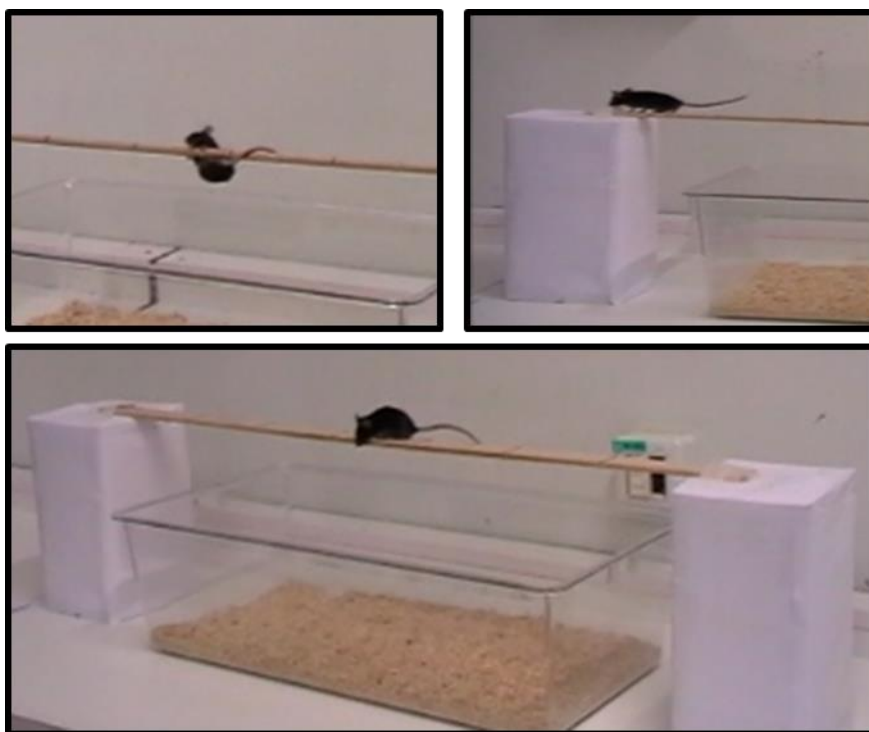


Figura 5. Prueba de la tabla de madera.

En esta prueba se estudió la capacidad de los animales de permanecer en el aparato como medida de equilibrio, analizando el porcentaje de animales de cada uno de los grupos que no se cayeron del aparato durante el tiempo de realización de la prueba, con respecto al total de animales de ese mismo grupo. Así mismo, se evaluó la latencia de caída (en segundos) o tiempo que tarda en caerse del aparato un animal, en cuyo caso fue incapaz de completar la prueba. La coordinación motora se estudió de acuerdo a distintos criterios previamente definidos: 1) porcentaje de animales que recorren al menos 1 o más segmentos de la tabla, 2) número de segmentos recorridos, 3) porcentaje de animales que completan la prueba, es decir, que llegan a uno de los dos extremos de la tabla (dentro de los 20 segundos establecidos como tiempo máximo de duración de la

prueba) y 4) latencia de llegada (en segundos) que es el tiempo que tarda el animal en llegar a uno de los extremos de la tabla sin caerse, es decir, el tiempo que tarda en completar la prueba.

Adicionalmente, se registró el porcentaje de animales que presentaron “freezing” o congelación al inicio de la prueba.

Prueba de la cuerda tirante

Esta prueba se realiza de acuerdo con la técnica previamente desarrollada por (Miquel and Blasco 1978) con ligeras modificaciones realizadas en nuestro laboratorio, y sirve para la valoración del vigor muscular, la coordinación motora y la tracción de los animales, entendida esta última como las partes del cuerpo que son capaces de emplear para sostenerse en la cuerda. Se trataría de una tracción óptima si el animal es capaz de emplear las tres partes de su cuerpo (patas delanteras, traseras y cola) para permanecer colgado en la cuerda.

El aparato consiste en una cuerda de cáñamo de 60 cm de longitud y dividida en segmentos de 10 cm que se sitúa elevada (a una altura de 40 cm) en posición horizontal sobre un lecho de viruta. Los animales se colocaron en el centro de la cuerda tirante, suspendidos solamente con ayuda de las patas delanteras. Todos los animales realizaron dos ensayos de 5 segundos y finalmente se realizó la prueba, cuya duración fue de 60 segundos (ver figura 6).

Como parámetros de vigor muscular se estudiaron: el porcentaje de animales que no se cae de la cuerda y la latencia de caída (el tiempo en segundos que tarda en caerse un animal, que por tanto no completa la prueba). En cuanto a la coordinación motora, se siguieron los criterios establecidos en la prueba anterior: 1) porcentaje de animales que recorren al menos 1 o más segmentos de la cuerda, 2) número de segmentos recorridos, 3) porcentaje de animales que completan la prueba (es decir, que alcanzan uno de los soportes situados en ambos extremos de la cuerda dentro del tiempo establecido) y 4) latencia de llegada (en segundos) que es el tiempo que tarda el animal en alcanzar uno de los soportes situados en ambos extremos de la cuerda sin caerse, es decir, el tiempo que tarda en completar la prueba.

Finalmente, para el estudio de la tracción se recogió el porcentaje de animales de cada grupo que empleaban tres partes de su cuerpo (prensilidad óptima) como herramienta para permanecer colgados (patas delanteras, traseras y cola).

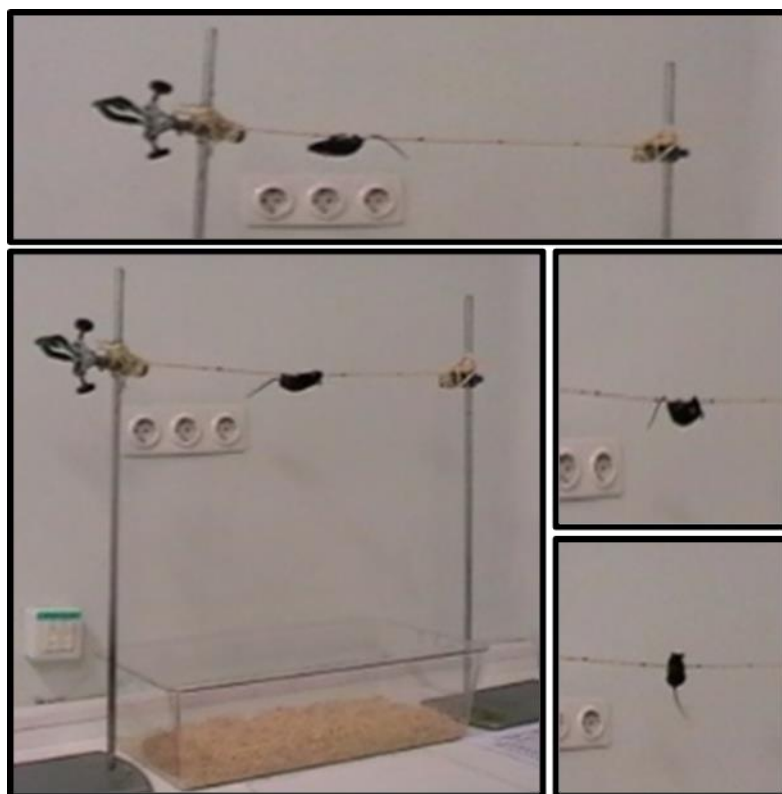


Figura 6. Prueba de la cuerda tirante.

3.3.2.2. Comportamiento exploratorio y respuestas de ansiedad

Para estos estudios se realizaron diferentes pruebas que valoran la capacidad exploratoria del animal y los comportamientos de ansiedad: la prueba de neofobia, el campo abierto, el tablero de agujeros y el laberinto en T.

Prueba de neofobia

Esta prueba estudia el comportamiento de los animales en un entorno nuevo, al sacarlos de la jaula donde se encuentran junto al resto de ratones y transferirlos a una nueva jaula (dimensiones: 220 cm de ancho, 220 cm de largo y 145 cm de altura) con 200 ml de viruta. La prueba dura 30 segundos, durante los cuales se estudia la actividad

exploratoria horizontal (representada como número de esquinas visitadas) y vertical (representada como porcentaje de animales que presentan conducta de “rearing” o postura erguida, número de “rearings” y porcentaje de animales que presentan conducta de “grooming” o acicalamiento). La conducta de “rearing” corresponde al alzamiento del animal sobre dos patas elevando el cuerpo al menos 90°, de modo que se sostiene con las patas traseras y mantiene las delanteras apoyadas en la pared del aparato o bien en el aire.

Prueba del campo abierto con pared

Inmediatamente después del test de neofobia se realiza la prueba del campo abierto, que consiste en un tablero con paredes (dimensiones: 80 cm de ancho, 80 cm de largo y 30 cm de altura) dividido en 16 cuadrantes de 10 x 10 cm. Los 12 cuadrantes que componen el perímetro del tablero se consideran “cuadrantes externos”, y los restantes “cuadrantes internos”. La duración de la prueba son 5 minutos y comienza cuando se coloca al animal en el centro del tablero, de espaldas al investigador (ver figura 7).

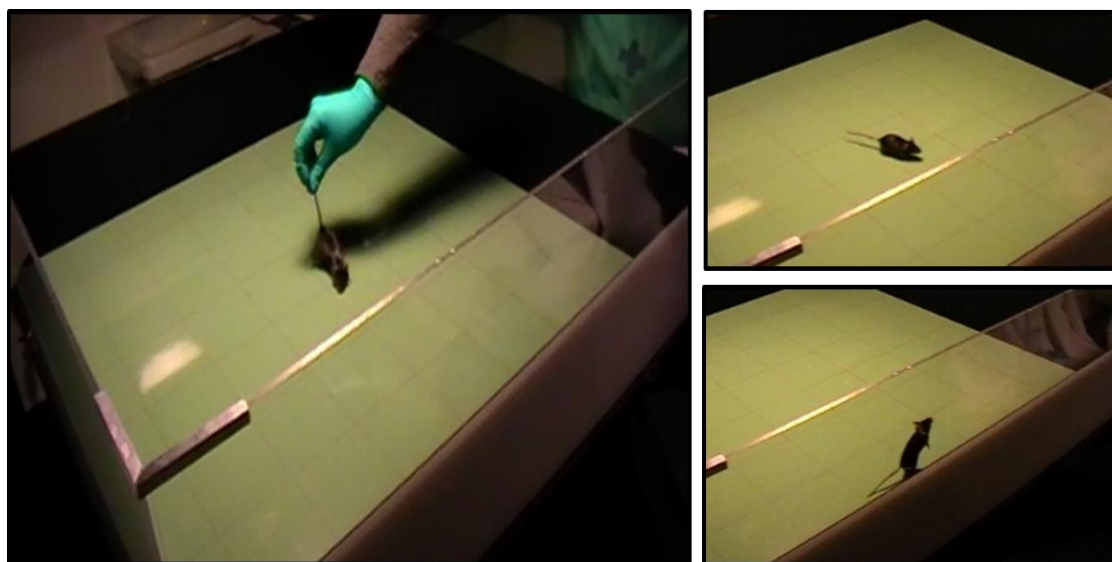


Figura 7. Prueba del campo abierto con pared.

Como actividad locomotora horizontal se estudiaron: 1) el tiempo en abandonar el punto central, es decir, el tiempo (en segundos) que tarda el animal en salir del centro del aparato, 2) el porcentaje de animales que abandona el centro del aparato, 3) el tiempo (en segundos) que tarda el animal en entrar en la periferia del aparato, 4) el porcentaje de animales que entra en la periferia del aparato y 5) las deambulaciones (total, externa, interna y el porcentaje de deambulación interna con respecto a la total).

La deambulación externa representa el número de “cuadrantes externos” recorridos por el animal, considerando que éste cruza un cuadrante cuando introduce en él sus cuatro patas. Los resultados se expresaron como número absoluto de cuadrantes.

La deambulación interna representa el número de “cuadrantes internos” que el animal cruza en la zona interna del aparato, considerando que el animal está dentro del cuadrante cuando ha introducido tres patas.

La deambulación total se obtiene como resultado de sumar la deambulación externa y la interna.

En la actividad locomotora vertical se incluyen: 1) el porcentaje de animales que presentan conducta de “rearing”, 2) el número total de “rearings” y 3) la latencia del primer “rearing”, es decir, el tiempo (en segundos) que tarda el animal en realizar el primer “rearing”. La conducta de acicalamiento comprende: 1) el porcentaje de animales que presentan conducta de “grooming”, 2) el número total de “groomings” y 3) el tiempo de latencia (en segundos) de aparición de la primera conducta de “grooming”.

Finalmente, se estudió la presencia de bolas fecales (como porcentaje de animales que defecan y número de bolas fecales) y orina (como porcentaje de animales que orinan y número de orinas).

Adicionalmente, a lo largo del tiempo de duración de la prueba, se registró el porcentaje de animales que presentaron “freezing” o congelación al inicio de la prueba y el tiempo total de inmovilidad (duración en segundos de los distintos tiempos de inmovilidad a lo largo de la prueba).

Prueba del tablero de agujeros

Esta prueba se llevó a cabo en un tablero de agujeros diseñado específicamente para ratón (dimensiones: 60 cm de ancho, 60 cm de largo y 45 cm de alto), con una

pared oscura de metacrilato y una base con cuatro agujeros de idéntico tamaño (3,8 cm de diámetro). En cada uno de los agujeros se introdujo un objeto de plástico para atraer la atención del animal. La base del tablero está dividida en 36 cuadrantes de 10 x 10 cm. De ellos, los 20 que componen el perímetro se consideran “cuadrantes externos”, y el resto son los “cuadrantes internos”. La prueba se realiza durante 5 minutos, y comienza cuando el animal es colocado en una de las esquinas del tablero, de espaldas al investigador (ver figura 8).

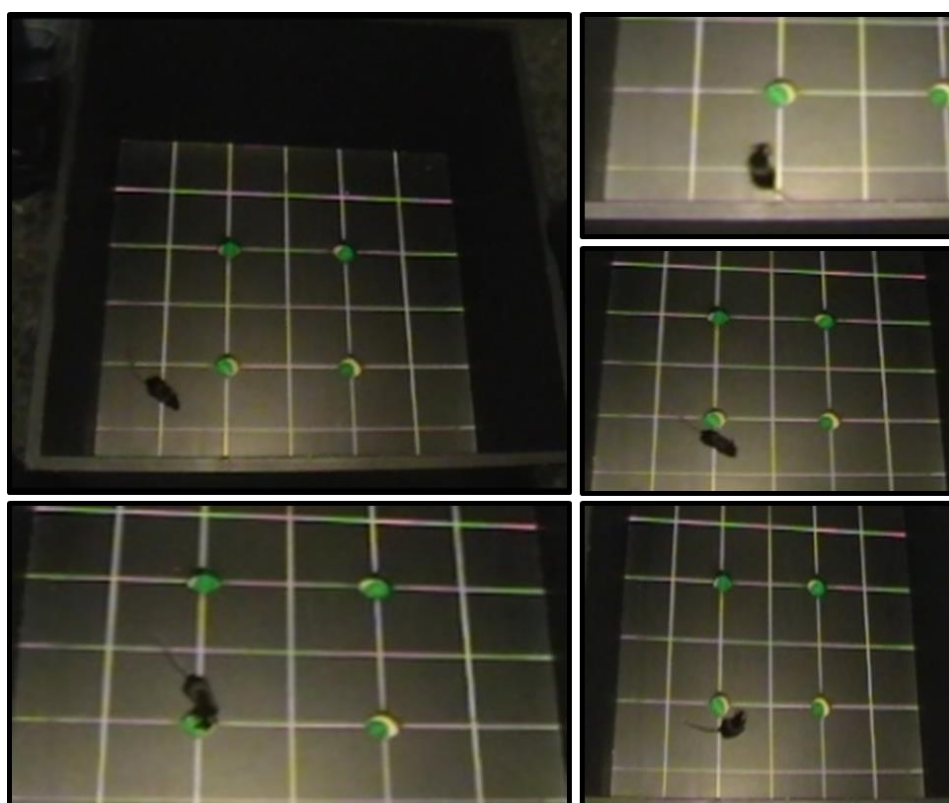


Figura 8. Prueba del tablero de agujeros.

Se valoraron parámetros de comportamiento exploratorio “no dirigido” como las deambulaciones total, externa, interna y porcentaje de deambulación interna con respecto a la total (entendidos como parámetros de actividad exploratoria horizontal).

La deambulación externa representa el número de “cuadrantes externos” recorridos por el animal, considerando que éste cruza un cuadrante cuando introduce en él sus cuatro patas. Los resultados se expresaron como número absoluto de cuadrantes.

La deambulaci3n interna representa el n3mero de “cuadrantes internos” que el animal cruza en la zona interna del aparato, considerando que el animal est1 dentro del cuadrante cuando ha introducido tres patas.

La deambulaci3n total se obtiene como resultado de sumar la deambulaci3n externa y la interna.

Tambi3n se registr3 la actividad exploratoria vertical, que incluye: 1) el porcentaje de animales que presentan conducta de “rearing”, 2) el n3mero total de “rearings” y 3) la latencia del primer “rearing”, es decir, el tiempo (en segundos) que tarda el animal en realizar el primer “rearing”.

Como medida del comportamiento exploratorio “dirigido” se analiz3: el n3mero de veces que el animal explora o introduce la cabeza en los agujeros del aparato (t3rmino conocido como “Head-dipping”), el porcentaje de animales que explora en los agujeros, y el tiempo de latencia (en segundos) hasta que el animal explora el primer agujero.

Adem1s, se analiz3 la conducta de acicalamiento que comprende: 1) el porcentaje de animales que presentan conducta de “grooming”, 2) el n3mero total de “groomings” y 3) el tiempo de latencia (en segundos) de aparici3n de la primera conducta de “grooming”. Finalmente, se estudi3 la presencia de bolas fecales (como porcentaje de animales que defecan y n3mero de bolas fecales) y orina (como porcentaje de animales que orinan).

Adicionalmente, a lo largo del tiempo de duraci3n de la prueba, se registr3 el porcentaje de animales que presentaron “freezing” o congelaci3n al inicio de la prueba y el tiempo total de inmovilidad (duraci3n en segundos de los distintos tiempos de inmovilidad a lo largo de la prueba).

Laberinto en T

El cuarto d1a se realiz3 la prueba del laberinto en T. El aparato consiste en un laberinto en forma de T, de madera, con paredes de 19 cm de altura, un brazo corto de 27 cm de largo x 10 cm de ancho y un brazo largo de 64 cm de largo x 10 cm de ancho. En el momento de iniciar la prueba se coloca al rat3n en el extremo del brazo corto y con la cabeza dirigida hacia la pared. No se emple3 ning3n tipo de refuerzo.

La prueba consistió en estudiar la actividad exploratoria horizontal de acuerdo a los siguientes criterios: 1) tiempo (en segundos) que el animal tarda en cruzar con las patas traseras la intersección de los dos brazos del aparato, 2) porcentaje de animales que cruzan dicha intersección, 3) tiempo (en segundos) que tarda el animal en explorar los tres brazos del laberinto (parámetro denominado “Eficiencia Exploratoria”), es decir, tiempo que tarda en completar la prueba y 4) porcentaje de animales que completan la prueba.

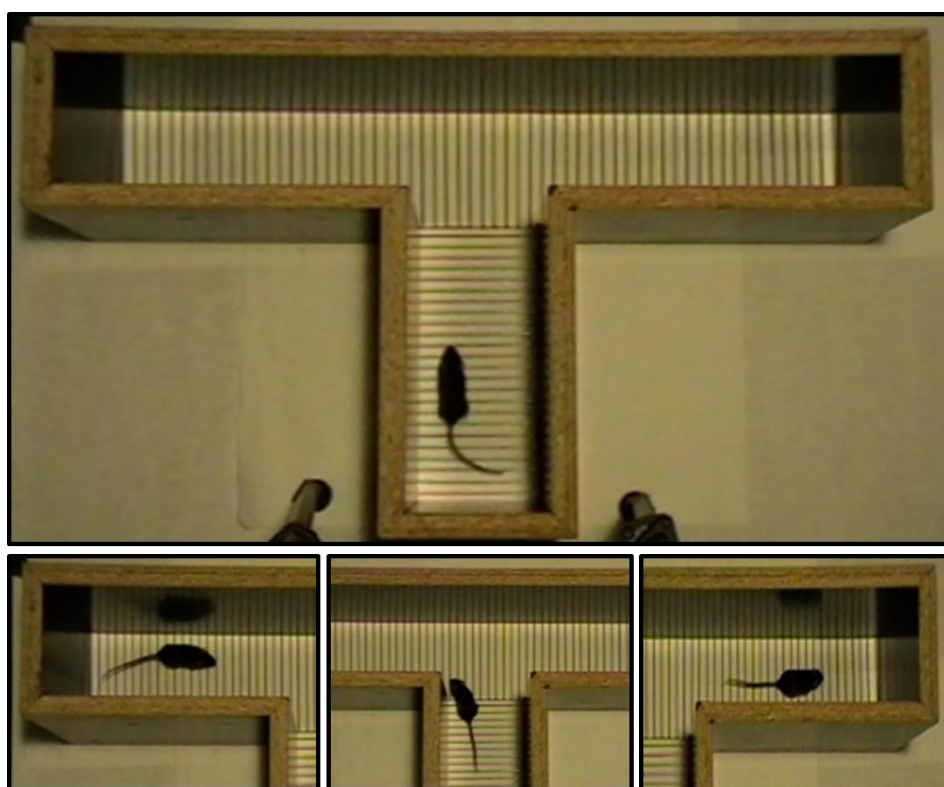


Figura 9. Prueba del laberinto en T.

También, se recoge la actividad exploratoria vertical (como porcentaje de animales que presentan conducta de “rearing” y número total de “rearings”). Además, se estudió el porcentaje de animales que presentan conducta de “grooming” y el número total de “groomings”. Por último, se analizó la presencia de bolas fecales (como porcentaje de animales que defecan y número de bolas fecales) y orina (como porcentaje de animales que orinan) (ver figura 9).

Adicionalmente, a lo largo del tiempo de duración de la prueba, se registró el porcentaje de animales que presentaron “freezing” o congelación al inicio de la prueba y el tiempo total de inmovilidad (duración en segundos de los distintos tiempos de inmovilidad a lo largo de la prueba).

3.3.3. Toma de muestras biológicas: suspensión peritoneal y sangre

Los leucocitos fueron obtenidos del peritoneo de los animales sin necesidad del sacrificio de los mismos, siempre a la misma hora y en la fase oscura de su ciclo vital, mediante el siguiente protocolo:

- 1) Sujeción del animal: con los dedos pulgar e índice se sujeta al ratón por la piel de la parte posterior de la cabeza; a continuación se le da la vuelta colocándolo boca arriba y se inmovilizan las extremidades inferiores sujetando la cola por su zona más anterior entre los dedos anular y meñique, y la palma de la mano.
- 2) Inyección de un medio salino: una vez inmovilizado el ratón, se desinfecta la piel del abdomen con alcohol. Se inyecta intraperitonealmente un volumen de 3 ml de solución de Hank estéril y atemperada a 37°C, y se masajea suavemente el abdomen.
- 3) Obtención de la suspensión peritoneal: la suspensión peritoneal va saliendo por el mismo orificio por el que fue introducida la solución de Hank. Se recogió hasta un 90% del volumen inyectado en los ratones de la cepa salvaje y en los heterocigotos (*db/+*), mientras que en los ratones obesos (*db/db*) se recogió un volumen menor. Esto fue debido a que la suspensión peritoneal, contenida ya en la solución de Hank, quedaba retenida alrededor de la gran masa de tejido adiposo abdominal que recubría la cavidad peritoneal. De ahí que en este grupo de ratones la cantidad de células obtenidas se vio limitada, por lo que no fueron muy numerosos los parámetros analizados en este objetivo.

Todo el volumen recogido se mantuvo en hielo durante todo el proceso con objeto de evitar la adhesión de los leucocitos a las paredes del tubo.

La sangre utilizada para medir la glucemia fue obtenida de la cola del ratón, la cual se calentó previamente en agua a 40°C. A continuación se desinfectó con alcohol, se cortaron unos 2 mm de la punta y se recogieron las gotas de sangre para la valoración mediante tiras reactivas y un glucómetro. Los resultados se expresaron como mg/dl.

3.3.4. Recuento y análisis de la viabilidad celular

El recuento y análisis de la viabilidad celular de los leucocitos peritoneales se llevó a cabo siguiendo el método previamente descrito en el apartado 3.2.1.3.

3.3.5. Valoración de parámetros de funcionalidad inmunitaria

Actividad citotóxica “Natural Killer” (NK) de los leucocitos peritoneales

Se valoró la capacidad citotóxica “Natural Killer” de los leucocitos peritoneales mediante la técnica previamente descrita en el apartado 3.2.1.5. Para ello se empleó el Kit comercial (Cytotox 96. PROMEGA), cuyo fundamento consiste en valorar la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) liberada al sobrenadante por parte de las células lisadas. Los leucocitos se ajustaron a 10^6 células/ml RPMI sin rojo fenol, obteniéndose en el pocillo una relación células efectoras:diana de 10:1. Los resultados se expresaron como % de lisis, realizando los experimentos por triplicado.

Capacidad proliferativa de los linfocitos peritoneales

El ensayo de la respuesta proliferativa en linfocitos peritoneales se llevó a cabo siguiendo el método previamente descrito en el apartado 3.2.1.5. La muestra se ajustó en este caso a 5×10^5 linfocitos/ml medio completo, debido al escaso número de células peritoneales obtenidas. Los mitógenos que se utilizaron fueron LPS (1 µg/ml en pocillo) y Con A (1 µg/ml en pocillo).

La placa de cultivo se incubó durante 48 horas, sin embargo en este experimento transcurridas las primeras 24 horas, se recolectaron 100 µl del sobrenadante de cada pocillo y se congelaron a una temperatura de -20°C, para la valoración posterior de los niveles de citoquinas. Seguidamente, se renovó el medio completo adicionando 100 µl de medio fresco. La incubación se prolongó durante 24 horas más, tras las que se

añadieron en cada pocillo 5 μ l de timidina tritiada, se recolectaron 100 μ l del sobrenadante, y se renovó de nuevo el medio completo adicionando 100 μ l de medio fresco. Tras 24 horas más de incubación, se continuó con el protocolo previamente descrito, recolectándose las células de cada pocillo en filtros con un recolector de células semiautomático. Los filtros se dejaron secar y se colocaron a continuación en viales que contenían 5 ml de líquido de centelleo. La timidina incorporada por los linfocitos se midió en un contador β de centelleo líquido, del que se obtuvieron las cuentas por minuto (cpm) de cada filtro.

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los resultados se expresan como % de linfoproliferación, dando en cada muestra el 100% al valor basal (en ausencia de estímulo mitogénico).

Valoración de los niveles de citoquinas por Luminometría

Todos los sobrenadantes de cultivo destinados a la valoración de los niveles de citoquinas fueron mantenidos a -20°C, descongelados en frío y centrifugados 10 min a 1000g antes de su valoración, para eliminar partículas y agregados.

En esta determinación, se emplearon alícuotas de 25 μ l de los sobrenadantes de cultivo de 24 horas de linfocitos peritoneales, estimulados con los mitógenos Con A y LPS. Los niveles de citoquinas se valoraron mediante la técnica de inmunoensayo (previamente descrita en el apartado 3.2.1.5.), utilizando el sistema Luminex[®] 200[™] y el kit comercial MILLIPLEX[™] MAP (Millipore Corporation, Billerica, MA 01821, USA) para ratón. Dicho kit permite la detección simultánea en una misma muestra de cuatro citoquinas diferentes, que incluyen citoquinas pro- y anti-inflamatorias: IL-10, IL-1 β , IL-2 y TNF- α .

El procedimiento del inmunoensayo fue el mismo descrito previamente para la detección de los niveles de citoquinas en sobrenadantes de cultivo de linfocitos esplénicos de rata, exceptuando la incubación con el detector de anticuerpos marcado con biotina, que en este caso fue de una hora para muestras de ratón, en vez de dos.

Los resultados se expresaron como pg/ml con ayuda del software de análisis de datos.

3.3.6. Valoración de parámetros de estado antioxidante

Contenido intracelular de glutation (GSH) total

Para la determinación del contenido en glutation total de los leucocitos peritoneales murinos, se siguió un método previamente descrito (Alvarado, Álvarez et al. 2006). El protocolo de valoración fue el mismo que el ya desarrollado en el apartado 3.2.1.6., en el que sin embargo se realizaron una serie de modificaciones para adaptarlo a la muestra de leucocitos peritoneales.

Las muestras fueron ajustadas a 10^6 células/ml en solución de Hank, se centrifugaron en frío (2500 rpm, 10 minutos, 4°C) y se desechó el sobrenadante. El sedimento de leucocitos se resuspendió en 100 μ l de solución de ácido tricloroacético (TCA) al 5% con HCl 0,01 N, previamente burbujeada con helio durante un tiempo mínimo de 10 minutos. A continuación, se sonicaron las células, manteniendo la muestra en frío, realizándose 3 ciclos de sonicación de 10 segundos, cada uno al 70% de la potencia máxima (70 W), y dejando 20 segundos de reposo entre ellos. Tras el sonicado, se añadieron 400 μ l de solución de TCA, se centrifugaron las muestras a 3200g durante 5 minutos y a 4°C de temperatura, y se procedió al análisis de los sobrenadantes.

La absorbancia se midió en espectrofotómetro a 412 nm, durante 4 minutos cada 20 segundos y con 60 segundos de retardo inicial, (dado que la forma reducida del DTNB, el 2-nitro-5-tiobenzoico (TNB), tiene un máximo de absorción a esta longitud de onda) y en presencia de DTNB 6 mM, NADPH 0,3 mM y GR 10 U/ml en tampón fosfato 50 mM con EDTA 6,3 mM burbujeado; soluciones preparadas en el momento del ensayo. También se realizaron medidas de la reacción sin muestra (sustituyendo ésta por solución de TCA) para evitar sobrevalorar el contenido de glutation. Los valores obtenidos se restaron como factor de corrección. Así, se usaron microcubetas de vidrio óptico de 1 cm de paso de luz conteniendo:

1) Reacción con muestra:

500 μ l NADPH, 70 μ l DTNB, 70 μ l muestra y 70 μ l GR.

2) Reacción sin muestra:

500 µl NADPH, 70 µl DTNB, 70 µl solución de TCA y 70 µl GR.

3) Blanco:

500 µl NADPH, 70 µl DTNB, 70 µl muestra y 70 µl solución de TCA.

Se realizó la curva patrón, en las mismas condiciones que las muestras, a partir de una solución madre que contenía 16 mg de GSH en 250 ml de solución de TCA al 5% con HCl 0.01N. Los resultados de GSH se expresaron como nanomol/10⁶ células, con ayuda de la siguiente ecuación:

$$\text{nmol GSH}/10^6 \text{ células} = [(\Delta\text{DO}/\text{min})/0,0003] \times (10^6/X)$$

siendo:

$\Delta\text{DO}/\text{min}$: $\Delta\text{DO}/\text{min}$ reacción con muestra - $\Delta\text{DO}/\text{min}$ reacción sin muestra.

$(\Delta\text{DO}/\text{min})/0,0003$: pmol GSH en cubeta

X: número de células equivalente a los 70 µl de muestra valorados ($1,4 \times 10^5$ células).

Actividad Glutation Peroxidasa (GPx)

La valoración de la actividad glutathion peroxidasa se realizó según la técnica de (Lawrence and Burk 1976) con ligeras modificaciones (Alvarado, Álvarez et al. 2006), a través de la cual se mide la actividad total de la enzima utilizando hidroperóxido de cumeno (cumeno-OOH) como sustrato.

Mediante este método se determina la tasa de oxidación del glutathion (GSH) producida por el cumeno-OOH, en una reacción catalizada por la enzima glutathion peroxidasa, gracias al descenso de la absorbancia a 340 nm por oxidación del NADPH, en presencia de un exceso de la enzima glutathion reductasa (GR). El protocolo de valoración fue el mismo que el ya descrito en el apartado 3.2.1.6., en el que se realizaron ligeras modificaciones para adaptarlo a la muestra de leucocitos peritoneales.

Para el análisis de la actividad enzimática, una vez obtenida la suspensión peritoneal, se ajustó a 10⁶ células totales/ml en solución de Hank. A continuación, se centrifugó (2500 rpm, 10 minutos, 4°C), se desechó el sobrenadante, y el pellet de células peritoneales de ratón se resuspendió en 100 µl de tampón fosfato 50 mM a pH= 7,0, previamente burbujeado con helio durante un tiempo mínimo de 10 minutos. Se

sonicaron las células en frío (3 ciclos de 10 segundos, al 70% de la potencia máxima (70 W) cada uno, separados por 20 segundos de reposo entre cada ciclo) y se centrifugaron a 3200g durante 20 minutos a 4°C, realizándose el ensayo con el sobrenadante.

Para el ensayo se prepararon en el momento las siguientes soluciones:

- 1) Solución reactiva (en tampón fosfato 50 mM): EDTA 1 mM, Azida sódica 4 mM, NADPH 0,2 mM, GSH 4 mM, GR 1 U/ml solución. Se burbujeó previo a su uso, manteniéndose en oscuridad.
- 2) Hidroperóxido de cumeno 0,71 mM en tampón fosfato.

Las soluciones fueron mantenidas en frío, y solo previo paso a la medida de la actividad enzimática fueron atemperadas a temperatura ambiente para permitir la activación de las enzimas.

Es necesario considerar que la reacción entre el hidroperóxido de cumeno y el GSH puede producirse aún en ausencia de la enzima GPx. Por ello, para evitar una posible sobrevaloración de dicha actividad enzimática, se realizó una reacción en ausencia de muestra, que se denominó reacción no catalizada y permitió la cuantificación de la reacción espontánea.

La actividad GPx se valoró espectrofotométricamente a temperatura ambiente. Las medidas se realizaron en microcubetas de vidrio óptico (región visible del espectro), con un paso de luz de 1 cm, conteniendo:

- 1) Reacción catalizada: 650 µl de solución reactiva, 25 µl de muestra y 25 µl de solución de hidroperóxido de cumeno.
Como blanco se empleó una mezcla formada por 675 µl de solución reactiva y 25 µl de muestra.
- 2) Reacción no catalizada: 650 µl de solución reactiva, 25 µl de tampón fosfato y 25 µl de solución de hidroperóxido de cumeno.
En este caso el blanco se obtuvo con 675 µl de solución reactiva y 25 µl de tampón fosfato.

Antes de añadir el hidropéroxido de cumeno, ambas reacciones se incubaron durante 4 minutos a 37°C. La reacción se inició en el momento de la adición del hidropéroxido de cumeno en la cubeta, monitorizándose el descenso de absorbancia a 340 nm a partir de ese momento cada 40 segundos y durante un total de 5 minutos.

El cálculo de la actividad GPx se realizó según la expresión que se indica a continuación, siendo los resultados expresados en mU.I./10⁶ células [mU.I.= 1/(nmol NADPH/cm)]:

$$\text{mU.I. GPx}/10^6 \text{ células} = [(\Delta\text{DO}/\text{min}) \times F/C] \times (10^6/X)$$

siendo:

$\Delta\text{DO}/\text{min}$: $\Delta\text{DO}/\text{min}$ reacción catalizada - $\Delta\text{DO}/\text{min}$ reacción no catalizada.

F: factor de dilución de la muestra en la cubeta (700/25=28).

C: coeficiente de extinción molar del NADPH a 340 nm ($6,22 \times 10^{-3} \text{ nM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

X: número de células equivalente a los 25 μl de muestra valorados ($2,5 \times 10^5$).

3.3.7. Análisis estadístico

El programa estadístico empleado para llevar a cabo los análisis fue el SPSS 19. Los resultados se expresaron como la media aritmética y error típico de los datos obtenidos en cada uno de los diferentes ensayos. De esta manera se encuentran representados en las gráficas y tablas del apartado de resultados.

La normalidad de los datos se comprobó mediante el test de Kolmogorov-Smirnov, y también la homogeneidad de las varianzas entre los grupos utilizando el test de Levene.

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías (para el estudio del efecto de la dotación genética y de la edad de los animales), seguido del test de Tuckey para las comparaciones posthoc, en el caso de varianzas homogéneas, o T2 de Tamhane, en el caso de que éstas no cumplieran la condición de homogeneidad.

En algunos casos concretos, se realizaron comparaciones por grupos dos a dos, mediante la prueba “t” de Student para muestras independientes, y así se encuentra indicado en los casos que corresponda, en el apartado de resultados.

En el apartado de las pruebas de conducta, en aquellos casos en los que los datos no seguían una distribución normal, se llevó a cabo el test de Kruskal-Wallis cuando se analizaban más de dos grupos, y la prueba de la U de Mann-Whitney cuando se comparaban solo dos grupos. El test de Chi cuadrado se empleó para analizar los datos cualitativos.

Finalmente, el estudio de la longevidad se realizó mediante el test de Kaplan-Meier.

Se consideró que no existía significación si el valor de la probabilidad de significación (p) era mayor de 0,05. Una diferencia de $p < 0,05$ se consideró como significativa, de $p < 0,01$ como muy significativa y de $p < 0,001$ como altamente significativa. En el caso de que la diferencia se encuentre en el límite de significación ($p = 0,05$), se indica en los casos que corresponda, en el apartado de resultados.

3.4. ACTIVIDAD NATURAL KILLER, CAPACIDAD PROLIFERATIVA Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL EN RATAS WISTAR MACHO ADULTAS CON SOBREPESO INDUCIDO POR DIETA HIPERCALÓRICA. ESTUDIO PRELIMINAR

3.4.1. Diseño experimental

Los animales empleados en este estudio preliminar fueron ratas de la cepa Wistar (HsdHan: WIST) macho, obtenidas con 5 semanas de edad, y mantenidas en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, a una temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ y con un fotoperiodo invertido de 12 horas de luz blanca:12 horas de oscuridad, con cambio horario a las 8:00 horas. El grupo de animales control fue alimentado con una dieta estándar procedente de Harlan Teklad que contenía un 5% de grasa. Por el contrario, el grupo de animales objeto de estudio fue alimentado con una dieta procedente de Harlan Teklad (TD97366) que contenía un 25,5% de grasa.

Ambos grupos de animales partieron de un peso inicial de aproximadamente 150 g antes de comenzar con la dieta, la cual tuvo una duración de 10 semanas.

La composición de la dieta hipercalórica se muestra en la tabla siguiente:

Proteínas, % por peso	22,0
Carbohidratos, % por peso	38,4
Grasa, % por peso	25,5
Kcal/g dieta	4,7

Tabla 3. Composición dieta hipercalórica (TD97366).

Los animales se sacrificaron por decapitación a las 22 semanas de edad, y previamente se registró el peso corporal de cada uno de ellos.

Las muestras biológicas empleadas en este estudio se detallan a continuación:

- Leucocitos del bazo, para la valoración de la actividad “Natural Killer” y la respuesta proliferativa de los linfocitos.
- Leucocitos de ganglios axilares, donde se analizó la actividad “Natural Killer” y la respuesta proliferativa de los linfocitos.
- Plasma, que fue obtenido a partir de sangre periférica para la valoración de la capacidad antioxidante total.

3.4.2. Toma de muestras biológicas: sangre y órganos

Inmediatamente antes del momento del sacrificio se controló el peso corporal de cada uno de los animales. Una vez sacrificados por decapitación, en la fase oscura de su ciclo vital, se recogió sangre periférica en un eppendorf heparinizado y se obtuvo el plasma mediante centrifugación durante 20 minutos a 1000g. Dichas muestras fueron mantenidas a -20°C hasta el momento de la valoración de la capacidad antioxidante total.

Posteriormente, se extrajeron los órganos inmunitarios (bazo y ganglios axilares) y se depositaron en tubos estériles con medio PBS. Las muestras de dichos órganos se

utilizaron en fresco, ya que solo se emplearon para estudios de funcionalidad inmunitaria en este estudio preliminar. El procesamiento de los órganos se llevó a cabo según el protocolo previamente descrito en el apartado 3.2.1.2. El método descrito para el timo se aplicó de igual manera para los ganglios en este experimento.

3.4.3. Recuento y análisis de la viabilidad celular

El recuento y análisis de la viabilidad celular de los leucocitos de bazo y ganglios se realizó tal y como se describe en el apartado 3.2.1.3.

3.4.4. Valoración de parámetros de funcionalidad inmunitaria

Actividad citotóxica “Natural Killer” (NK) de los leucocitos

Se valoró la capacidad citotóxica “Natural Killer” de los leucocitos de bazo y ganglios axilares mediante la técnica previamente descrita en el apartado 3.2.1.5. Para ello se empleó el Kit comercial (Cytotox 96. PROMEGA), cuyo fundamento consiste en valorar la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) liberada al sobrenadante por parte de las células lisadas. Los leucocitos se ajustaron a 10^6 células/ml RPMI sin rojo fenol, obteniéndose en el pocillo una relación células efectoras:diana de 10:1. Los resultados se expresaron como % de lisis, realizando los experimentos por triplicado.

Capacidad proliferativa de los linfocitos

El ensayo de la respuesta proliferativa en linfocitos de bazo y ganglios axilares se llevó a cabo siguiendo el método previamente descrito en el apartado 3.2.1.5. La muestra se ajustó a 10^6 linfocitos/ml medio completo y el mitógeno que se utilizó fue Con A (1 μ g/ml en pocillo).

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los resultados se expresan como % de linfoproliferación, dando en cada muestra el 100% al valor basal (en ausencia de estímulo mitogénico).

Capacidad antioxidante total plasmática

Los niveles de antioxidantes plasmáticos fueron valorados mediante un kit comercial (Nanjing Jiancheng Bioengineering Institute). El plasma almacenado a -20°C se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos, y se recogió el sobrenadante para realizar el ensayo. El fundamento del kit se basa en la reducción del Fe^{3+} a Fe^{2+} por la acción de todos los antioxidantes presentes. La cantidad de Fe^{2+} es evaluada mediante la medida del compuesto coloreado formado por Fe^{2+} y fenantreno. Este complejo posee una absorción a 520 nm. Los resultados fueron expresados en unidades de capacidad antioxidante total (U/ml plasma).

3.4.5. Análisis estadístico

El programa estadístico empleado para llevar a cabo los análisis fue el SPSS 19. Los resultados se expresaron como la media aritmética y error típico de los datos obtenidos en cada uno de los diferentes ensayos. De esta manera se encuentran representados en las gráficas y tablas del apartado de resultados.

La normalidad de los datos se comprobó mediante el test de Kolmogorov-Smirnov, y también la homogeneidad de las varianzas entre los grupos utilizando el test de Levene.

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA) de una vía (para estudiar el efecto de la dieta). Se realizaron también las comparaciones por grupos dos a dos, mediante la prueba “t” de Student para muestras independientes.

Se consideró que no existía significación si el valor de la probabilidad de significación (p) era mayor de 0,05. Una diferencia de $p < 0,05$ se consideró como significativa, de $p < 0,01$ como muy significativa y de $p < 0,001$ como altamente significativa. En el caso de que la diferencia se encuentre en el límite de significación ($p = 0,05$), se indica en los casos que corresponda, en el apartado de resultados.

4. RESULTADOS

4.1. ESTUDIOS REALIZADOS EN RATAS ZUCKER GENÉTICAMENTE OBESAS

4.1.1. ESTUDIO INMUNOLÓGICO, DE ESTRÉS OXIDATIVO Y DEL PERFIL METABÓLICO EN RATAS MACHO GENÉTICAMENTE OBESAS, JÓVENES Y ADULTAS

4.1.1.1. Estudio de varias funciones inmunitarias y de estrés oxidativo en ratas Zucker genéticamente obesas adultas. Estudio comparativo con ratas de la cepa Wistar.

En este primer apartado se exponen los resultados del estudio de varias funciones inmunitarias (capacidad fagocítica, actividad “Natural Killer”, respuesta proliferativa y niveles de liberación de citoquinas) analizadas en ratas Zucker lean y (*fa/fa*) así como en ratas Wistar adultas (6 meses). También se exponen los resultados del estudio de estrés oxidativo (capacidad antioxidante total, niveles de GSH, así como actividades de las enzimas XO, GPx y GR). Asimismo, se recoge la evolución del peso de los animales, así como los resultados del peso corporal en el momento del sacrificio, y de los distintos órganos extraídos.

Todos estos resultados se presentan en la **figuras 1-10** y en las **tablas 1-7**. En ellas se representa cada parámetro tomando como control las ratas Zucker lean. Asimismo, se analizan las diferencias respecto a la cepa de ratas Wistar.

Evolución del peso corporal

La **figura 1** recoge la evolución del peso corporal de los animales comenzando el registro a las 12 semanas de edad y finalizándolo a las 24 semanas.

El gráfico muestra como en líneas generales, las ratas Zucker lean y la cepa de ratas Wistar muestra una evolución similar en cuanto a la ganancia de peso corporal con la edad, sin embargo se observa como a partir de las 18 semanas el incremento de peso en ratas Wistar se hace significativamente superior respecto a las ratas lean.

En el caso de las ratas obesas, el peso corporal es significativamente superior respecto a sus controles lean y a la cepa de ratas Wistar, ya desde las 12 semanas de edad y en su evolución a lo largo de las distintas semanas.

En cuanto a las diferencias encontradas con 12 semanas de edad, ambas ratas Zucker lean y *fa/fa* muestran un aumento del peso corporal estadísticamente significativo ($p < 0,001$) respecto a la cepa de ratas Wistar. Las ratas obesas como se ha mencionado previamente, experimentan un incremento del peso altamente significativo ($p < 0,001$) en relación a sus controles lean. Los valores encontrados a las 18 semanas de edad, reflejan como las ratas obesas han incrementado el peso corporal y se mantienen las diferencias significativas ($p < 0,001$) de peso respecto a sus controles lean y las ratas Wistar. Es a esta edad cuando encontramos que las ratas Wistar aumentan significativamente ($p < 0,05$) de peso respecto a las ratas lean.

Finalmente, a edad de 24 semanas, las ratas Wistar son significativamente ($p < 0,001$) más pesadas corporalmente que las ratas lean. Nuevamente, las ratas obesas continúan presentando a esta edad valores de peso corporal altamente superiores ($p < 0,001$) respecto a sus controles lean y a la cepa de ratas Wistar.

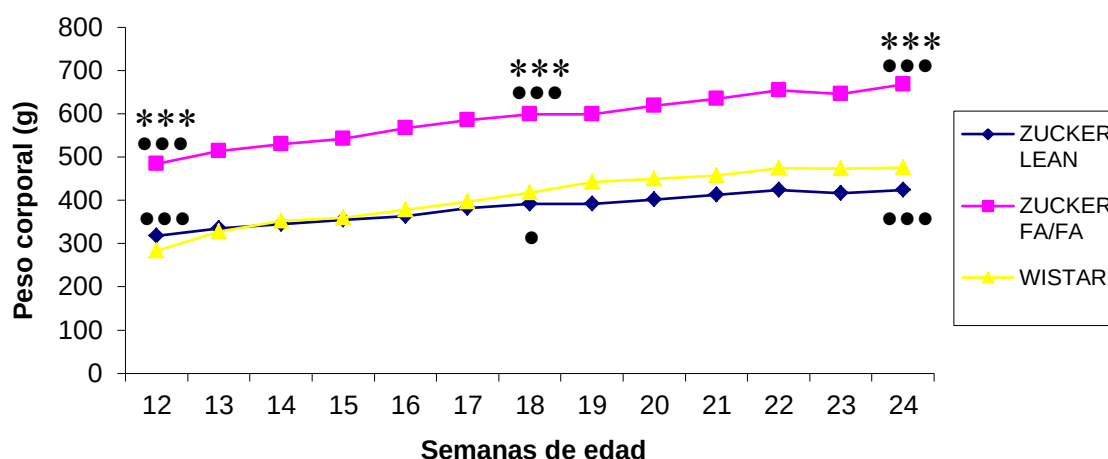


Figura 1. Evolución del peso corporal (g) en ratas Zucker lean y (*fa/fa*) y ratas Wistar adultas.

Cada punto de las diferentes curvas representa la media $\pm$ E.E. de los animales de cada grupo. *** $p < 0,001$ con respecto a los correspondientes valores en ratas Zucker lean. ●●● $p < 0,001$, ● $p < 0,05$ con respecto a los correspondientes valores en ratas Wistar.

Peso corporal en el momento del sacrificio

Los resultados del peso corporal de los animales en el momento del sacrificio (**figura 2**) muestran como las ratas Zucker obesas (*fa/fa*) alcanzaron un peso corporal significativamente mayor ($p<0,01$) que sus respectivos controles, las ratas Zucker lean, y que la cepa de ratas Wistar.

Las ratas Zucker lean presentaron un peso corporal significativamente menor ($p<0,01$) a su vez que las ratas Wistar.

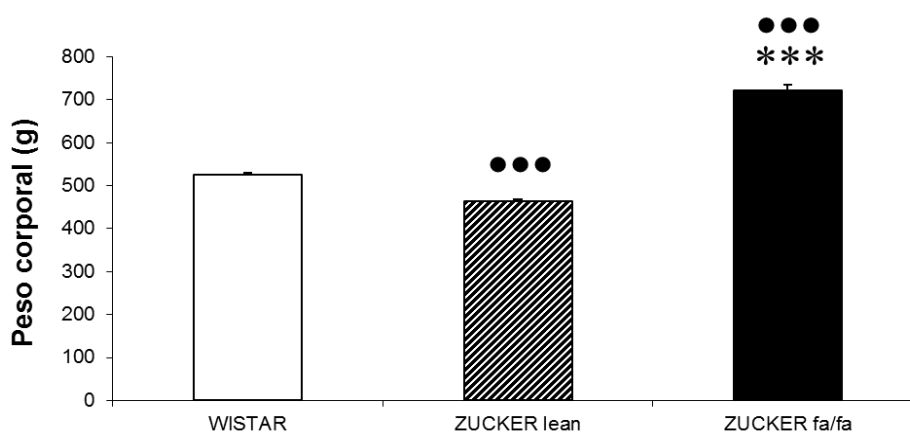


Figura 2. Peso corporal (g) en ratas Zucker lean y (*fa/fa*) y ratas Wistar adultas, en el momento del sacrificio.

Cada columna representa la media $\pm$ E.E. del número de animales de cada grupo (Wistar $n=11$, lean $n=10$, *fa/fa* $n=11$). *** $p<0,001$ con respecto a los correspondientes valores en ratas Zucker lean. ••• $p<0,001$ con respecto a los correspondientes valores en ratas Wistar.

Peso absoluto y relativo de los distintos órganos extraídos tras el sacrificio

En la **tabla 1** se recogen los datos del estudio de los órganos extraídos (bazo, timo, hígado, corazón, grasa epididimal y lumbar, cerebro y riñones) de las ratas Zucker lean y obesas (*fa/fa*) y de las ratas de la cepa Wistar adultas, tras el sacrificio. Se muestran los resultados obtenidos del peso absoluto de los órganos (en gramos) y del % de peso relativo del órgano con respecto al peso corporal del animal, obtenido mediante la siguiente expresión: (peso del órgano (g) / peso corporal del animal (g)) $\times 100$.

En relación al análisis de los pesos absolutos de los diferentes órganos, encontramos que en todos los órganos estudiados (excepto en el cerebro), existe un

aumento significativo del peso en ratas Zucker obesas (*fa/fa*) con respecto a sus controles Zucker lean y a las ratas de la cepa Wistar (excepto en bazo donde existe una tendencia de aumento de peso respecto a esta cepa, no significativa). En el cerebro encontramos por el contrario una disminución significativa del peso en ratas Zucker *fa/fa* con respecto a sus controles lean y a la cepa de ratas Wistar.

En el peso de los órganos de las ratas Zucker lean se muestra que a la edad adulta de seis meses el bazo, el timo, el hígado y la grasa epididimal y lumbar muestran un menor peso con respecto a los correspondientes órganos de la cepa de ratas Wistar.

Con respecto al valor del % de peso relativo, encontramos que las ratas obesas *fa/fa* muestran un menor % de peso relativo respecto a su peso corporal en el sacrificio, en órganos como el bazo, el corazón, el cerebro y los riñones. Esta disminución del % de peso es estadísticamente significativa con respecto a los valores obtenidos en sus controles lean y en la cepa de ratas Wistar (excepto en el caso de los riñones donde no existen diferencias con respecto a esta cepa). Por el contrario el % de peso relativo se incrementa en las ratas *fa/fa* en órganos como el timo, el hígado y la grasa epididimal y lumbar. Este incremento es estadísticamente significativo con respecto a sus controles lean y a la cepa de ratas Wistar (excepto en el caso de la grasa epididimal donde no existen diferencias con respecto a esta cepa).

En ratas Zucker lean se muestra como existe un descenso significativo en el % de peso relativo en órganos como el bazo y la grasa epididimal y lumbar, y no significativo en el timo y el hígado, con respecto a los valores obtenidos en ratas Wistar. Por el contrario, existe un aumento significativo del % de peso relativo en el corazón, el cerebro y los riñones, con respecto a los valores obtenidos en ratas Wistar.

ÓRGANO	PESO ABSOLUTO (g)			% PESO RELATIVO RESPECTO AL PESO CORPORAL		
	WISTAR	LEAN	FA/FA	WISTAR	LEAN	FA/FA
Bazo	0,91±0,02	0,69±0,03●●●	0,94±0,04***	0,17±0,004	0,15±0,006●●	0,13±0,005*/●●●
Timo	0,76±0,05	0,61±0,03●	1,87±0,08***/●●●	0,15±0,01	0,13±0,01	0,26±0,01***/●●●
Hígado	15,33±0,35	13,35±0,26●●	26,41±1,33***/●●●	2,92±0,07	2,88±0,04	3,65±0,13***/●●●
Corazón	1,25±0,04	1,25±0,02	1,54±0,05***/●●	0,24±0,009	0,27±0,005●●	0,21±0,004***/●
Grasa epididimal	14,16±1,01	8,02±0,36●●●	21,81±0,73***/●●●	2,69±0,17	1,73±0,06●●●	3,03±0,09***
Grasa lumbar	18,82±1,25	9,19±0,41●●●	33,92±1,59***/●●●	3,57±0,22	1,99±0,90●●●	4,69±0,16***/●●
Cerebro	2,09±0,02	2,01±0,03	1,87±0,03**/●●●	0,40±0,004	0,43±0,006●●●	0,26±0,004***/●●●
Riñones	3,02±0,08	2,87±0,05	4,02±0,14***/●●●	0,58±0,01	0,62±0,01●	0,56±0,01**

Tabla 1. Peso absoluto (g) y % de peso relativo de cada órgano (extraído en el sacrificio), respecto al peso corporal (g), en ratas Zucker lean y (fa/fa) y ratas Wistar adultas.

Cada dato representa la media ± E.E. del número de animales de cada grupo (Wistar n=11, lean n=10, fa/fa n=11).

***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05 con respecto a los correspondientes valores en ratas Zucker lean. ●●●p<0,001, ●●p<0,01, ●p<0,05 con respecto a los correspondientes valores en ratas Wistar.

Estudio de varias funciones inmunitarias en leucocitos peritoneales

Tras el sacrificio de los animales, se recogió la suspensión de leucocitos peritoneales y se valoró la capacidad fagocítica de los macrófagos representada con el Índice de Fagocitosis (I.F.) y la Eficacia Fagocítica (E.F.), así como la actividad “Natural Killer” de los leucocitos.

Capacidad fagocítica: Índice de Fagocitosis y Eficacia fagocítica

La **figura 3** recoge la capacidad fagocítica de los macrófagos peritoneales, que se expresa como el número de partículas ingeridas por cada 100 macrófagos tomados al azar, esto es, el Índice de Fagocitosis (I.F.). Además, se determinó el porcentaje de células, de las 100 contabilizadas, que fagocitaron al menos una partícula, lo que se denomina Eficacia Fagocítica (E.F.).

Los valores hallados en el Índice de Fagocitosis (**figura 3A**) indican que este parámetro muestra una tendencia a disminuir en ratas obesas (*fa/fa*) respecto a sus controles lean. Asimismo, existe un descenso significativo en ambas ratas Zucker lean ($p<0,05$) y *fa/fa* ($p<0,01$), con respecto a la cepa de ratas Wistar, la cual presenta el mayor Índice de Fagocitosis.

En relación a la Eficacia Fagocítica (E.F.) (**figura 3B**), encontramos que las ratas Zucker obesas (*fa/fa*) presentan un ligero descenso de dicha eficacia respecto a sus controles Zucker lean, que resulta ser estadísticamente significativo ($p<0,05$). Nuevamente, al igual que ocurría con el Índice de Fagocitosis, existe un descenso significativo de la Eficacia Fagocítica en ambas ratas Zucker lean ($p<0,05$) y *fa/fa* ($p<0,001$), con respecto a la cepa de ratas Wistar, la cual presenta el mayor valor en este parámetro.

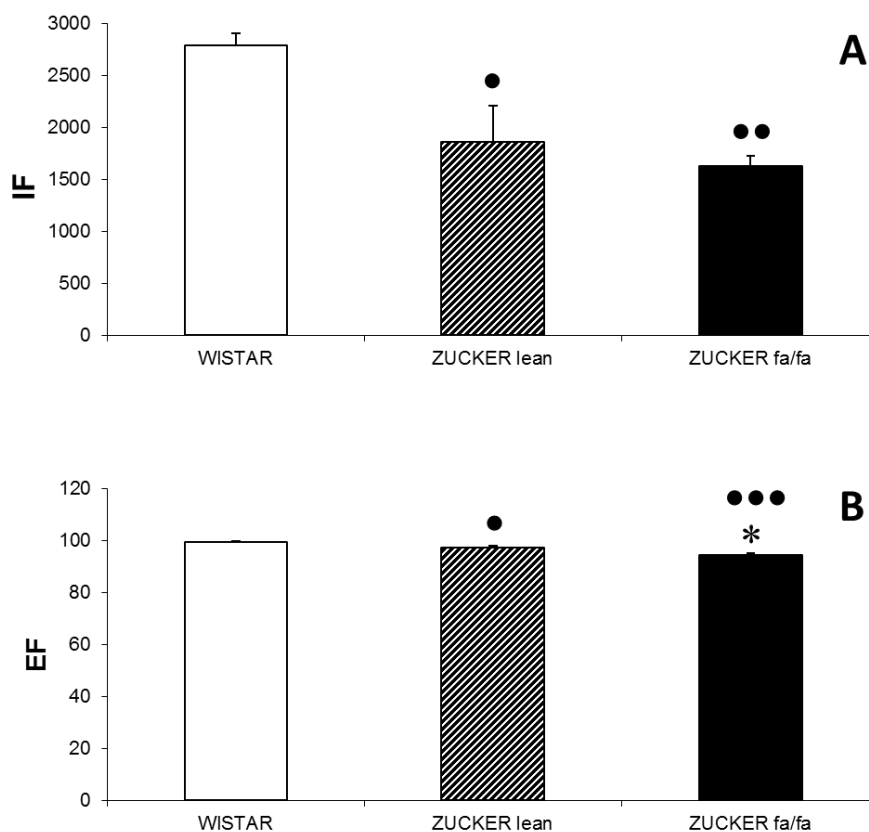


Figura 3. Índice de Fagocitosis (IF) (A) y Eficacia Fagocítica (EF) (B) de macrófagos peritoneales en ratas Zucker lean y (*fa/fa*) y ratas Wistar adultas.

Cada columna representa la media $\pm$ E.E. del número de animales de cada grupo ($n=10$ en todos los grupos). * $p<0,05$ con respecto a los correspondientes valores en ratas Zucker lean. ••• $p<0,001$, •• $p<0,01$, • $p<0,05$ con respecto a los correspondientes valores en ratas Wistar.

Actividad citotóxica “Natural Killer”

La actividad “Natural Killer” (expresada como % de lisis de células tumorales) de leucocitos peritoneales se refleja en la **figura 4**. Las ratas Zucker *fa/fa* muestran un descenso de esta actividad con respecto a sus controles, las ratas Zucker lean. Cuando se realiza la prueba “t” de Student, se ponen de manifiesto estas diferencias de manera significativa ($p<0,05$).

Asimismo, ambas ratas Zucker presentan valores más bajos de actividad que las ratas de la cepa Wistar, siendo significativa esta diferencia en el caso de las ratas obesas *fa/fa* ($p<0,01$).

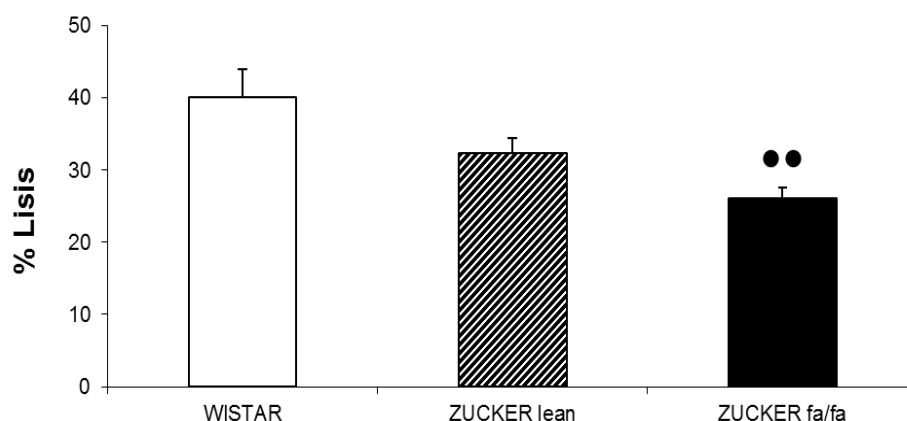


Figura 4. Actividad “Natural Killer” (% lisis) de leucocitos peritoneales en ratas Zucker lean y (fa/fa) y ratas Wistar adultas.

Cada columna representa la media $\pm$ E.E. del número de animales de cada grupo (Wistar $n=9$, lean $n=10$, fa/fa $n=10$). ●● $p<0,01$ con respecto a los correspondientes valores en ratas Wistar.

Estudio de varias funciones inmunitarias en leucocitos de bazo y timo

Una vez obtenido el peritoneo de los animales, se procedió a la extracción de los órganos inmunitarios (bazo y timo) y se analizaron diferentes parámetros de funcionalidad inmunitaria como la actividad “Natural Killer” de los leucocitos, la respuesta proliferativa y la liberación de los niveles de citoquinas de los linfocitos.

Actividad citotóxica “Natural Killer”

La actividad “Natural Killer” (expresada como % de lisis de células tumorales) de leucocitos de bazo y timo se refleja en la **figura 5**.

En el bazo (**figura 5A**) el porcentaje de lisis encontrado muestra una disminución en ratas Zucker obesas (fa/fa) con respecto a sus controles Zucker lean. Asimismo, ambas ratas Zucker presentan significativamente valores más bajos de porcentaje de lisis que las ratas de la cepa Wistar ($p<0,001$).

En el caso del timo (**figura 5B**), no se detectan diferencias entre ratas obesas (fa/fa) y ratas lean, sin embargo al igual que en el bazo, ambas ratas Zucker muestran un

deterioro significativo del porcentaje de lisis ($p < 0,001$) respecto a las ratas de la cepa Wistar.

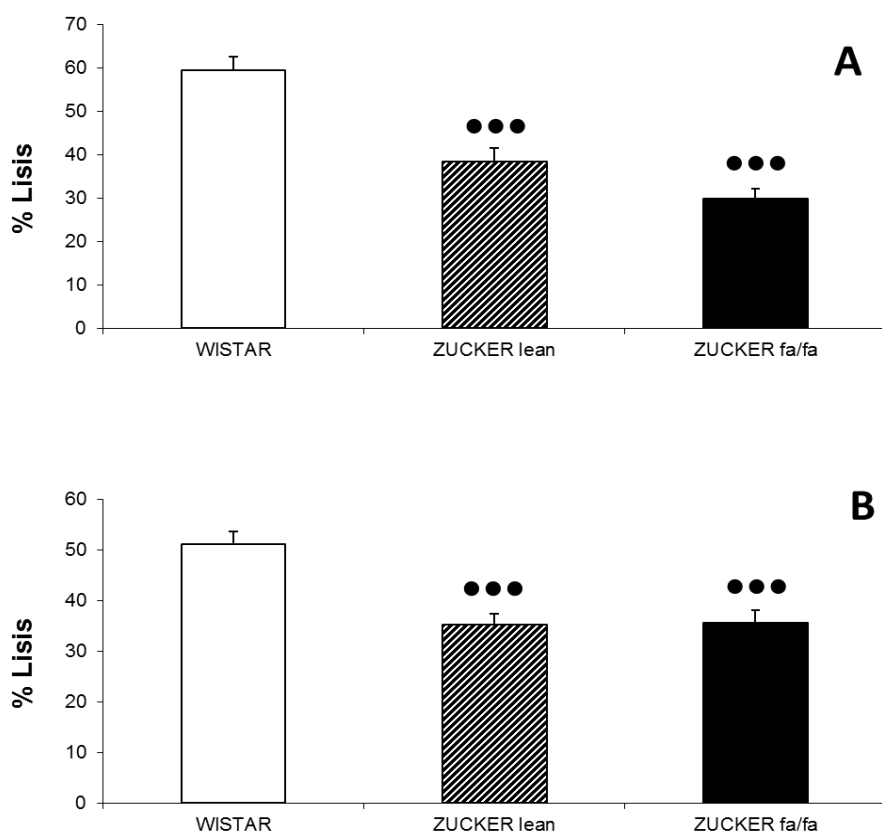


Figura 5. Actividad “Natural Killer” (% lisis) de leucocitos de bazo (A) y timo (B) en ratas Zucker lean y (*fa/fa*) y ratas Wistar adultas.

Cada columna representa la media $\pm$ E.E. del número de animales de cada grupo (Wistar $n=8$, lean $n=10$, *fa/fa* $n=8$). *** $p < 0,001$ con respecto a los correspondientes valores en ratas Wistar.

Capacidad proliferativa de los linfocitos

La capacidad proliferativa de los linfocitos de bazo y timo en respuesta a los mitógenos Con A, LPS (a las concentraciones de 1, 3 y 5 $\mu\text{g/ml}$) y PHA (a las concentraciones de 5, 25 y 50 $\mu\text{g/ml}$) se muestran en la **figura 6 (A y B)**, así como en las **tablas 2 y 3**. En la **figura 6** se representan las cuentas por minuto (cpm) obtenidas de proliferación basal y en respuesta a los diferentes mitógenos. En la **tablas 2 y 3** se reflejan numéricamente las cuentas por minuto (cpm) obtenidas de proliferación basal y

en respuesta a los diferentes mitógenos, así como el porcentaje de linfoproliferación con respecto al valor 100% dado a las cuentas por minuto de proliferación basal.

En el caso del bazo (**figura 6A y tabla 2**), las ratas obesas *fa/fa* muestran de manera generalizada un descenso en esta función (representado en cpm) respecto a sus controles las ratas lean y a la cepa de ratas Wistar. De igual manera, en ambas ratas Zucker encontramos un deterioro de la respuesta proliferativa respecto a la cepa de ratas Wistar. En el caso de la estimulación con Con A, en todas las concentraciones estudiadas las ratas obesas muestran un descenso significativo de esta función ($p < 0,05$) respecto a las ratas Wistar. Las ratas lean por su parte muestran también un descenso de la proliferación respecto a las ratas Wistar, que es significativo ($p < 0,05$) a las concentraciones de 3 y 5 $\mu\text{g/ml}$.

La estimulación con LPS, muestra nuevamente un deterioro de la proliferación de las ratas obesas, siendo éste significativo ($p < 0,05$) respecto a las ratas Wistar a la concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$. Cuando se realiza la prueba “t” de Student, se pone de manifiesto de manera significativa ($p < 0,05$) el descenso proliferativo de las ratas Zucker lean respecto a las ratas Wistar con LPS a la concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$. Asimismo, con la prueba “t” de Student el deterioro proliferativo de las ratas obesas respecto a las ratas Wistar con LPS a la concentración de 3 $\mu\text{g/ml}$ se pone de manifiesto significativamente ($p < 0,05$). Cuando la estimulación se realiza con PHA, ambas ratas Zucker muestran un deterioro significativo ($p < 0,01$) respecto a las ratas Wistar a la concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$. La respuesta proliferativa basal en ambas ratas Zucker muestra un descenso respecto a la cepa de ratas Wistar, no siendo significativa esta diferencia.

En cuanto al porcentaje de linfoproliferación en bazo (**tabla 2**), encontramos que ambas ratas Zucker presentan un deterioro en dicho porcentaje respecto a la cepa de ratas Wistar, no siendo significativo en ningún caso. Por su parte, las ratas obesas *fa/fa* muestran un menor porcentaje proliferativo respecto a sus controles lean en respuesta a Con A, a las concentraciones de 1 y 3 $\mu\text{g/ml}$, no siendo significativas estas diferencias. En respuesta a Con A, a la concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$, así como a LPS y PHA, las ratas obesas muestran un porcentaje prácticamente igual respecto a sus controles lean, no encontrándose diferencias significativas.

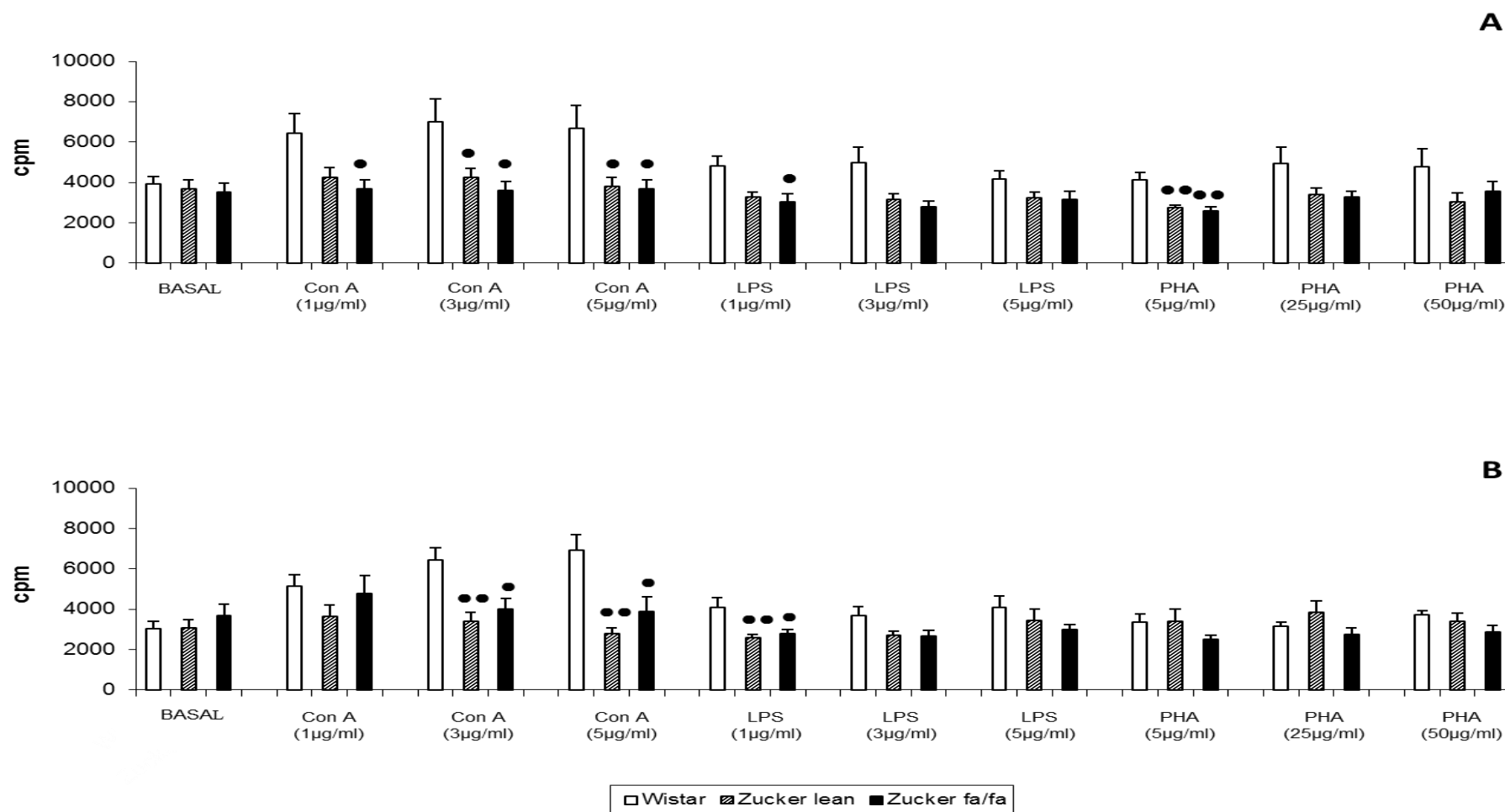


Figura 6. Respuesta proliferativa (cuentas por minuto: cpm) a los mitógenos Con A, LPS (1, 3, 5 µg/ml) y PHA (5, 25, 50 µg/ml) de linfocitos de bazo (A) y timo (B), en ratas Zucker lean y (*fa/fa*) y ratas Wistar adultas. Cada columna representa la media $\pm$ E.E. del número de animales ($n=8-11$) de cada grupo. ●● $p<0,01$, ● $p<0,05$ con respecto a los correspondientes valores en ratas Wistar.

LINFOPROLIFERACIÓN BAZO						
Mitógeno	Wistar		Zucker lean		Zucker <i>fa/fa</i>	
	Cpm	% Linfoproliferación	Cpm	% Linfoproliferación	Cpm	% Linfoproliferación
Con A (1 µg/ml)	6447±969	170±29 (n=10)	4230±514	131±16 (n=10)	3670±454 ●	118±13 (n=10)
Con A (3 µg/ml)	7007±1137	212±51 (n=10)	4234±479 ●	132±17 (n=10)	3583±478 ●	118±15 (n=10)
Con A (5 µg/ml)	6679±1126	207±52 (n=10)	3781±475 ●	120±20 (n=10)	3690±449 ●	122±15 (n=10)
LPS (1 µg/ml)	4803±508	124±13 (n=10)	3282±225	102±8 (n=10)	3052±386 ●	101±14 (n=10)
LPS (3 µg/ml)	4961±793	133±19 (n=10)	3146±275	96±7 (n=10)	2805±254	96±14 (n=10)
LPS (5 µg/ml)	4181±380	112±17 (n=10)	3221±286	101±11 (n=10)	3162±389	101±12 (n=10)
PHA (5 µg/ml)	4148±342	117±19 (n=10)	2736±154 ●●	88±8 (n=10)	2591±201 ●●	93±17 (n=10)
PHA (25 µg/ml)	4946±786	141±34 (n=10)	3375±338	110±16 (n=10)	3259±320	111±15 (n=10)
PHA (50 µg/ml)	4773±900	137±31 (n=10)	3037±439	100±19 (n=10)	3575±481	114±15 (n=10)
BASAL (cpm)	3928±375 (n=11)		3667±478 (n=10)		3523±457 (n=11)	

Tabla 2. Respuesta proliferativa (cuentas por minuto: cpm y % de linfoproliferación) a los mitógenos Con A, LPS (1, 3, 5 µg/ml) y PHA (5, 25, 50 µg/ml) de linfocitos de bazo, en ratas Zucker lean y (*fa/fa*) y ratas Wistar adultas. Cada dato representa la media ± E.E. del número de animales de cada grupo (entre paréntesis). ●●p<0,01, ●p<0,05 con respecto a los correspondientes valores en ratas Wistar.

LINFOPROLIFERACIÓN TIMO						
Mitógeno	Wistar		Zucker lean		Zucker <i>fa/fa</i>	
	Cpm	% Linfoproliferación	Cpm	% Linfoproliferación	Cpm	% Linfoproliferación
Con A (1 µg/ml)	5122±570	176±26 (n=8)	3649±555	128±18 (n=8)	4782±878	161±24 (n=8)
Con A (3 µg/ml)	6457±596	227±35 (n=8)	3385±475 ●●	126±24 ● (n=8)	3990±524 ●	124±15 ● (n=8)
Con A (5 µg/ml)	6940±739	244±39 (n=8)	2798±287 ●●	101±12 ● (n=8)	3881±725 ●	113±12 ● (n=8)
LPS (1 µg/ml)	4107±486	134±14 (n=8)	2581±180 ●●	97±13 (n=8)	2785±219 ●	96±8 (n=8)
LPS (3 µg/ml)	3674±450	120±13 (n=8)	2681±221	99±12 (n=8)	2684±270	85±10 (n=8)
LPS (5 µg/ml)	4095±547	138±23 (n=8)	3427±573	115±10 (n=8)	3007±250	106±10 (n=8)
PHA (5 µg/ml)	3350±434	113±17 (n=8)	3376±618	125±21 (n=8)	2526±192	81±8 (n=8)
PHA (25 µg/ml)	3177±188	103±11 (n=8)	3817±607	143±25 (n=8)	2763±309	89±12 (n=8)
PHA (50 µg/ml)	3731±203	130±18 (n=8)	3380±436	125±17 (n=8)	2887±303	90±7 (n=8)
BASAL (cpm)	3037±357 (n=11)		3082±391 (n=9)		3694±574 (n=10)	

Tabla 3. Respuesta proliferativa (cuentas por minuto: cpm y % de linfoproliferación) a los mitógenos Con A, LPS (1, 3, 5 µg/ml) y PHA (5, 25, 50 µg/ml) de linfocitos de timo, en ratas Zucker lean y (*fa/fa*) y ratas Wistar adultas. Cada dato representa la media ± E.E. del número de animales de cada grupo (entre paréntesis). ●●p<0,01, ●p<0,05 con respecto a los correspondientes valores en ratas Wistar.

Respecto al timo (**figura 6B y tabla 3**), encontramos que las ratas obesas muestran un incremento de la respuesta proliferativa basal respecto a sus controles lean y a la cepa de ratas Wistar, no siendo significativo dicho incremento. También se observa que ambas ratas Zucker muestran un deterioro en la respuesta proliferativa (representado como cpm) respecto a la cepa de ratas Wistar al igual que ocurre en bazo.

En el caso de la estimulación con Con A, las ratas obesas muestran una tendencia a aumentar su capacidad proliferativa respecto a sus controles las ratas lean. En el caso de la estimulación a las concentraciones de 3 y 5 $\mu\text{g/ml}$, el deterioro proliferativo que presentan las ratas Zucker lean y *fa/fa* con respecto a las ratas Wistar resulta significativo, ($p<0,05$) y ($p<0,01$) respectivamente.

La estimulación con LPS a las concentraciones de 1 y 3 $\mu\text{g/ml}$, refleja de nuevo en ratas obesas una ligera tendencia, no significativa, a aumentar su proliferación con respecto a las ratas lean. Por el contrario, la respuesta proliferativa en dichas ratas obesas es menor a la concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$, respecto a las ratas lean. Además, ambas ratas Zucker lean y *fa/fa* presentan un deterioro significativo (($p<0,01$) y ($p<0,05$) respectivamente) de la respuesta proliferativa respecto a las ratas Wistar, cuando se estimulan con LPS a la concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$.

Cuando la estimulación se realiza con PHA, las ratas obesas muestran un deterioro proliferativo respecto a sus controles lean. Por su parte, las ratas lean presentan valores algo mayores de proliferación respecto a las ratas Wistar a las concentraciones de 5 y 25 $\mu\text{g/ml}$, ocurriendo lo contrario a la concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$. Al realizar la prueba “t” de Student, se pone de manifiesto de manera significativa ($p<0,05$) el descenso proliferativo de las ratas Zucker *fa/fa* respecto a las ratas Wistar al estimular los linfocitos del timo a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$.

En cuanto al porcentaje de linfoproliferación en timo (**tabla 3**), observamos que ambas ratas Zucker presentan un deterioro en dicho porcentaje respecto a la cepa de ratas Wistar cuando la estimulación se realiza con Con A y LPS, siendo significativo este deterioro ($p<0,05$) con Con A, a las concentraciones de 3 y 5 $\mu\text{g/ml}$.

Las ratas obesas muestran porcentajes de linfoproliferación menores que sus controles lean al estimular los linfocitos con LPS y PHA, mientras que con Con A son ligeramente superiores a la concentración de 1 y 5 $\mu\text{g/ml}$, no encontrándose diferencias

significativas. Cuando se realiza la prueba “t” de Student, se pone de manifiesto significativamente ($p<0,05$) el deterioro en el porcentaje de proliferación que muestran las ratas obesas respecto a las ratas Wistar al estimular con LPS a las concentraciones de 1 y 3 $\mu\text{g/ml}$.

Cuando la estimulación se realiza con PHA, las ratas obesas mantienen el deterioro en el porcentaje de proliferación respecto a las ratas lean y a la cepa de ratas Wistar, sin embargo, las ratas lean presentan un porcentaje algo superior a las Wistar al estimular con las concentraciones de 5 y 25 $\mu\text{g/ml}$, que no resulta ser estadísticamente significativo.

Niveles de citoquinas

La valoración de los niveles de citoquinas se realizó en los sobrenadantes de cultivo de 48 horas de linfocitos de bazo, tanto en reposo como estimulados con los mitógenos Con A y LPS a la concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$.

Niveles de IL-2

Los niveles de IL-2 (pg/ml) de linfocitos de bazo se muestran en la **figura 7**.

El estudio de los niveles de IL-2 liberados por los linfocitos de bazo en condiciones basales (**figura 7A**), muestra que las ratas obesas *fa/fa* presentan un descenso significativo ($p<0,05$) en los niveles de esta citoquina con respecto a sus controles las ratas lean. Además, ambas ratas Zucker presentan una disminución de estos niveles con respecto a la cepa de ratas Wistar, encontrándose diferencias significativas ($p<0,001$) en ratas obesas.

Cuando los linfocitos de bazo se estimulan con Con A (**figura 7B**), de nuevo las ratas obesas muestran una menor liberación de IL-2 estadísticamente significativa ($p<0,05$), en comparación con sus controles lean. Al igual que ocurría en condiciones basales, ambas ratas Zucker muestran una menor liberación de IL-2 con respecto a las ratas Wistar. En este caso se encuentran diferencias significativas tanto para las ratas lean ($p<0,05$), como para las *fa/fa* ($p<0,001$).

En el caso de la estimulación con LPS (**figura 7C**), la liberación de IL-2 por los linfocitos de bazo en ratas obesas muestra una pequeña disminución, con respecto a sus controles lean. Nuevamente, ambas ratas Zucker presentan un descenso en los niveles de IL-2 con respecto a las ratas Wistar, encontrándose diferencias significativas tanto en ratas lean ($p<0,05$), como en ratas obesas ($p<0,01$).

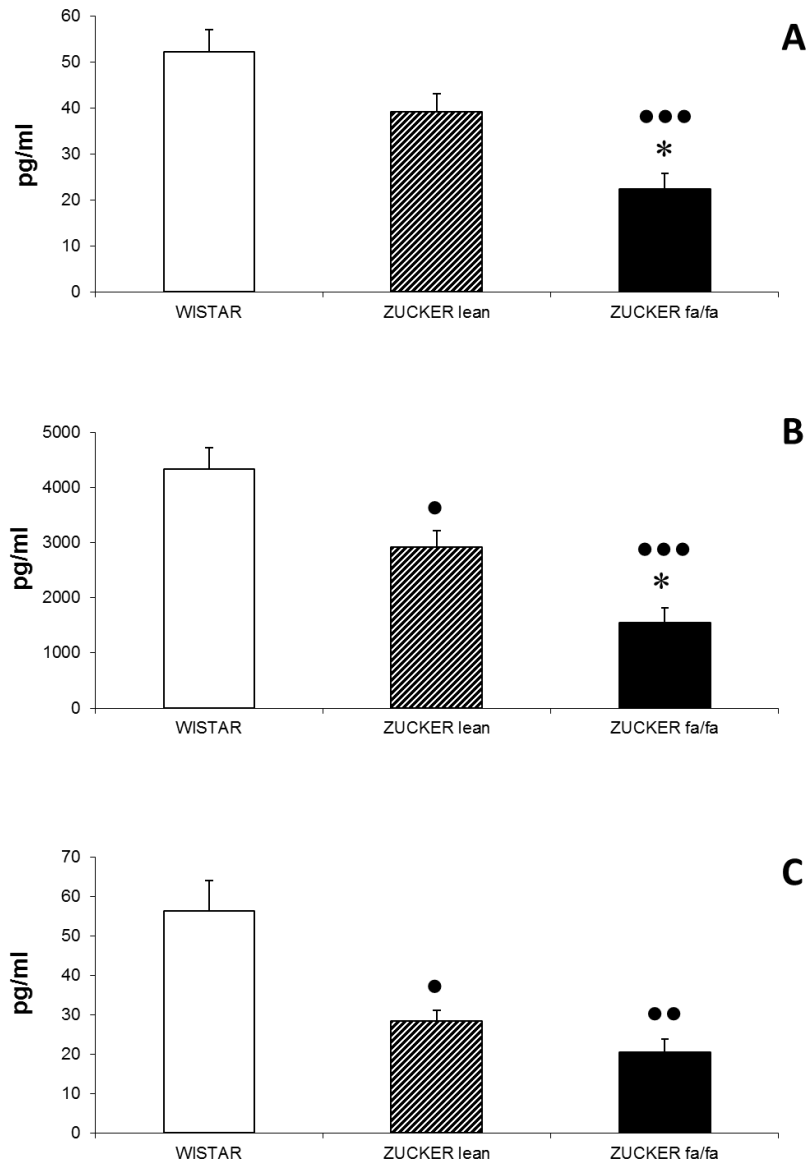


Figura 7. Niveles de IL-2 (pg/ml) de linfocitos de bazo en condiciones basales (A), estimulados con Con A (B) y con LPS (C), en ratas Zucker lean y (fa/fa) y ratas Wistar adultas.

Cada columna representa la media $\pm$ E.E. del número de animales ($n= 9-10$) de cada grupo. * $p<0,05$ con respecto a los correspondientes valores en ratas Zucker lean. ••• $p<0,001$, •• $p<0,01$, • $p<0,05$ con respecto a los correspondientes valores en ratas Wistar.

Niveles de IL-1 β

En relación a los niveles de IL-1 β (pg/ml) (**tabla 4**), los linfocitos de bazo en ratas obesas muestran una mayor liberación de esta citoquina con respecto a sus controles lean y a las ratas Wistar, que no resulta ser estadísticamente significativa, tanto en condiciones basales como estimulados con Con A y LPS. Tampoco se encontraron diferencias en la liberación de IL-1 β en ratas lean con respecto a Wistar.

Cuando se realiza la prueba “t” de Student, en linfocitos estimulados con LPS, se ponen de manifiesto diferencias significativas ($p < 0,05$) en ratas obesas, con respecto a las ratas Wistar.

Tabla 4. Niveles de IL-1Beta (pg/ml) de linfocitos de bazo en condiciones basales, estimulados con Con A y con LPS, en ratas Zucker lean y (fa/fa) y ratas Wistar adultas. Cada dato representa la media $\pm$ E.E. del número de animales de cada grupo (entre paréntesis).

	IL-1BETA (pg/ml)		
	WISTAR	LEAN	FA/FA
BASAL	31 $\pm$ 3 (n=9)	34 $\pm$ 4 (n=8)	41 $\pm$ 6 (n=9)
Con A	42 $\pm$ 4 (n=10)	40 $\pm$ 4 (n=9)	44 $\pm$ 5 (n=9)
LPS	43 $\pm$ 6 (n=10)	52 $\pm$ 7 (n=9)	88 $\pm$ 17 (n=9)

Niveles de TNF- α

Los niveles de TNF- α (pg/ml) de linfocitos de bazo se muestran en la **figura 8**.

Las ratas obesas fa/fa muestran un incremento significativo ($p < 0,05$) en la liberación de esta citoquina en condiciones basales (**figura 8A**), en comparación con sus

controles lean y con la cepa de ratas Wistar. Por otro lado, no se observan diferencias entre las ratas Zucker lean y las Wistar.

Cuando los linfocitos de bazo se estimulan con Con A (**figura 8B**), nuevamente encontramos que las ratas obesas presentan un incremento significativo en los niveles de TNF- α con respecto a sus controles lean ($p<0,05$), y a la cepa de ratas Wistar ($p<0,01$). Al igual que en condiciones basales, no se encuentran diferencias entre las ratas Zucker lean y las Wistar.

Finalmente, la estimulación con LPS (**figura 8C**), también muestra un incremento de los niveles de TNF- α en ratas *fa/fa* que es altamente significativo ($p<0,001$) con respecto a sus controles lean y a las ratas Wistar. De nuevo, no se observan diferencias entre las ratas Zucker lean y las Wistar. Sin embargo, al realizar la prueba “t” de Student, si encontramos un aumento significativo ($p<0,05$) en la liberación de TNF- α en ratas Zucker lean, respecto a las ratas Wistar.

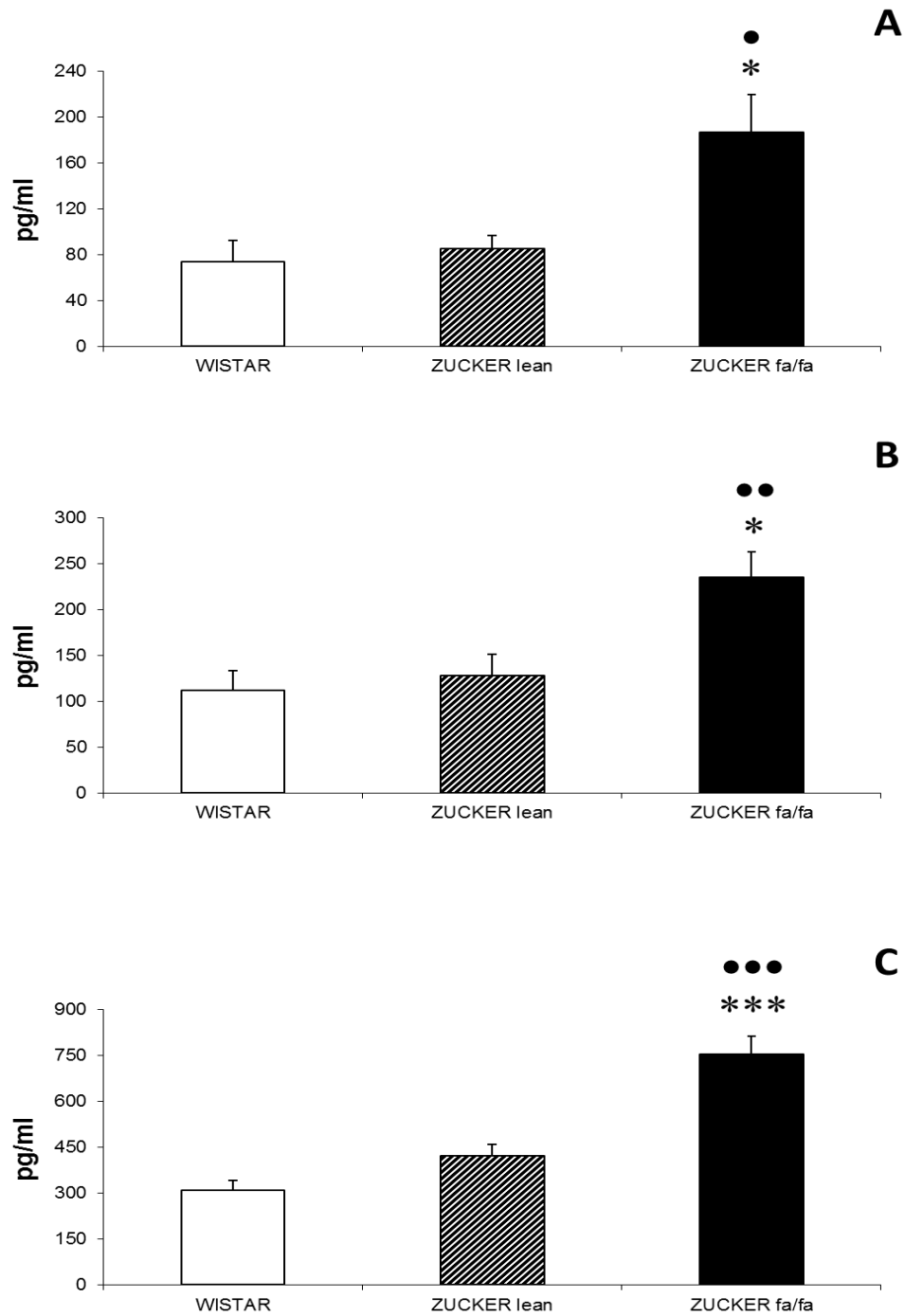


Figura 8. Niveles de TNF- α (pg/ml) de linfocitos de bazo en condiciones basales (A), estimulados con Con A (B) y con LPS (C), en ratas Zucker lean y (*fa/fa*) y ratas Wistar adultas.

Cada columna representa la media $\pm$ E.E. del número de animales (n= 9-10) de cada grupo. ***p<0,001, *p<0,05 con respecto a los correspondientes valores en ratas Zucker lean. •••p<0,001, ••p<0,01, •p<0,05 con respecto a los correspondientes valores en ratas Wistar.

Niveles de IL-10

Los niveles de IL-10 (pg/ml) de linfocitos de bazo se muestran en la **figura 9**.

Las ratas obesas *fa/fa* presentan un aumento significativo ($p<0,05$) en la liberación de IL-10 en condiciones basales (**figura 9A**), con respecto a sus controles lean y a la cepa de ratas Wistar. Por otra parte, no se observan diferencias entre las ratas Zucker lean y las Wistar.

Cuando se realiza la estimulación con Con A (**figura 9B**), por el contrario, encontramos que las ratas obesas muestran un descenso significativo ($p<0,05$) en los niveles de IL-10 cuando se comparan con sus controles, las ratas lean. Este descenso, sin embargo, no es significativo respecto a las ratas Wistar. De nuevo, no se observan diferencias entre las ratas Zucker lean y las Wistar.

En el caso de la estimulación con LPS (**figura 9C**), las ratas obesas presentan menores niveles de liberación de IL-10 respecto a sus controles lean y a las ratas Wistar, no siendo significativas dichas diferencias. Del mismo modo, se observa un descenso en los niveles de dicha citoquina en ratas Zucker lean con respecto a Wistar, que tampoco resulta ser significativo. Cuando se realiza la prueba “t” de Student, se pone de manifiesto significativamente ($p<0,05$) el descenso de los niveles de IL-10 en ratas obesas en comparación con las ratas Wistar.

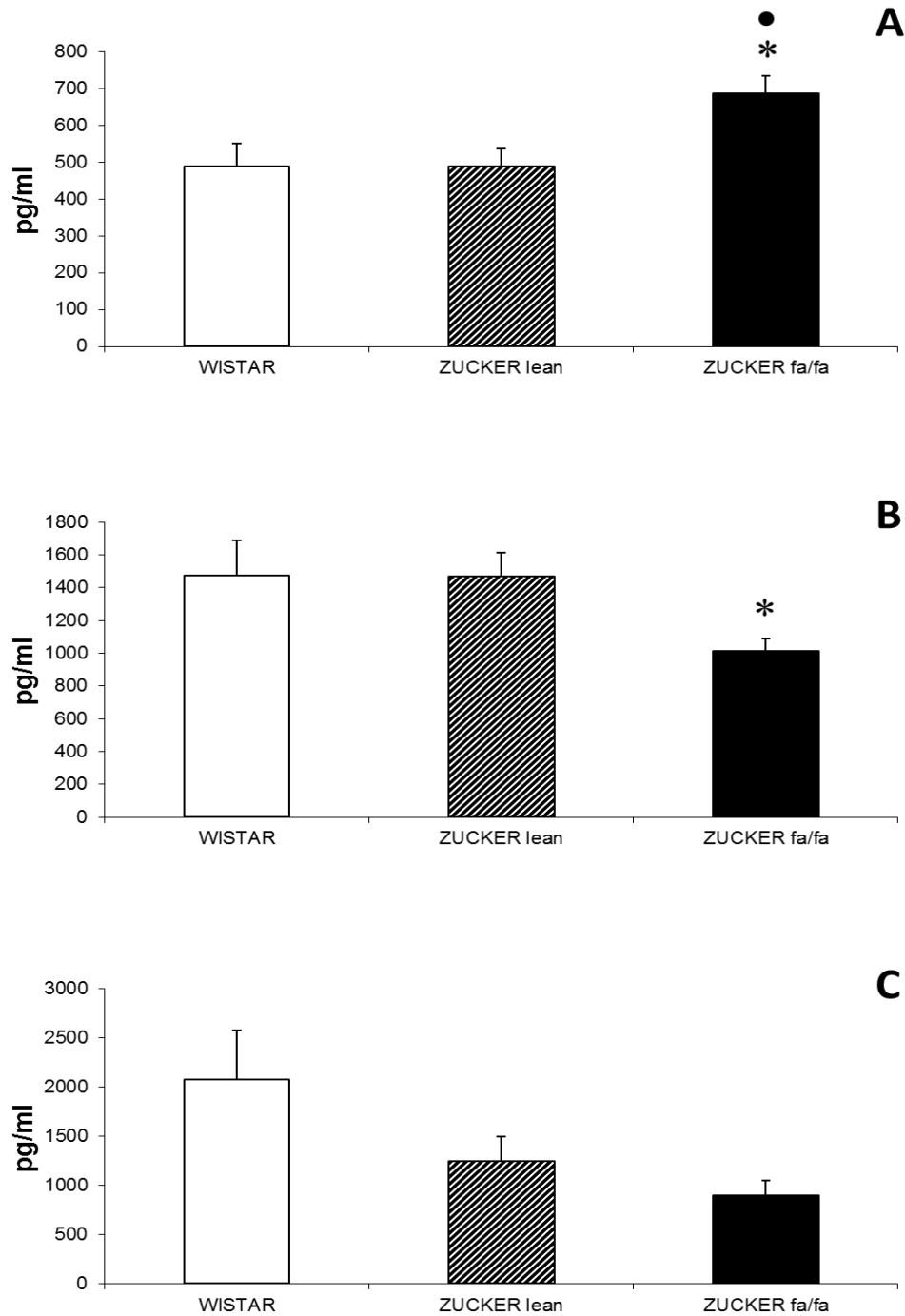


Figura 9. Niveles de IL-10 (pg/ml) de linfocitos de bazo en condiciones basales (A), estimulados con Con A (B) y con LPS (C), en ratas Zucker lean y (*fa/fa*) y ratas Wistar adultas.

Cada columna representa la media $\pm$ E.E. del número de animales ($n= 9-10$) de cada grupo. * $p<0,05$ con respecto a los correspondientes valores en ratas Zucker lean. • $p<0,05$ con respecto a los correspondientes valores en ratas Wistar.

Estudio de parámetros de estrés oxidativo

En el sacrificio de los animales, además de extraer los órganos inmunitarios (bazo y timo), se obtuvo el hígado y en ellos se analizaron diferentes parámetros de estrés oxidativo como el contenido intracelular de glutathion total (GSH), la capacidad antioxidante total, y la actividades de las enzimas xantina oxidasa (XO), glutathion peroxidasa (GPx) y glutathion reductasa (GR). Además se obtuvo el cerebelo, el telencéfalo y el plasma para la valoración de la actividad de la enzima xantina oxidasa (XO).

Parámetros de estrés oxidativo en bazo

En el bazo (**tabla 5**), los niveles de glutathion total se encuentran ligeramente incrementados en las ratas obesas *fa/fa* respecto a sus controles lean y a la cepa de ratas Wistar, no encontrándose diferencias significativas en ningún caso. Por el contrario, la capacidad antioxidante total se encuentra significativamente disminuida en ambas ratas Zucker lean ($p<0,05$) y *fa/fa* ($p<0,001$) con respecto a la cepa de ratas Wistar.

Respecto a las actividades de las enzimas, observamos que la xantina oxidasa en ratas obesas está incrementada significativamente ($p<0,01$) respecto a sus controles lean, pero no respecto a las ratas Wistar. En ratas lean, esta actividad es significativamente inferior ($p<0,01$) respecto a la cepa de ratas Wistar.

En ambas ratas Zucker la actividad glutathion peroxidasa está aumentada respecto a las ratas Wistar, siendo significativo ($p<0,05$) este aumento en ratas *fa/fa*. Esta actividad también se encuentra aumentada en ratas obesas respecto a sus controles lean, en cambio este aumento no resulta ser significativo.

Los valores de la actividad glutathion reductasa muestran que dicha actividad es similar en todos los grupos de animales.

Tabla 5. Glutation total (nmol/mg tejido), Capacidad antioxidante total (U/mg tejido), Actividad Xantina Oxidasa (mU/mg tejido), Actividad Glutation Peroxidasa (mU/mg tejido) y Actividad Glutation Reductasa (mU/mg tejido) en homogenados de bazo de ratas Zucker lean y (*fa/fa*) y ratas Wistar adultas.

Cada dato representa la media $\pm$ E.E. del número de animales de cada grupo (entre paréntesis). ** $p < 0,01$ con respecto a los correspondientes valores en ratas Zucker lean. ●●● $p < 0,001$, ●● $p < 0,01$, ● $p < 0,05$ con respecto a los correspondientes valores en ratas Wistar.

BAZO			
Parámetro	WISTAR	LEAN	FA/FA
Glutation Total (GSH) (nmol/mg tejido)	1,08 $\pm$ 0,03 (n=11)	1,12 $\pm$ 0,04 (n=10)	1,17 $\pm$ 0,04 (n=11)
Capacidad Antioxidante Total (U/mg tejido)	0,20 $\pm$ 0,01 (n=10)	0,16 $\pm$ 0,01 ● (n=10)	0,14 $\pm$ 0,01 ●●● (n=10)
Actividad Xantina Oxidasa (XO) (mU/mg tejido)	6,94 $\pm$ 0,48 (n=11)	4,69 $\pm$ 0,19 ●● (n=10)	6,09 $\pm$ 0,23 ** (n=11)
Actividad Glutation Peroxidasa (GPx) (mU/mg tejido)	295 $\pm$ 15 (n=11)	331 $\pm$ 19 (n=10)	360 $\pm$ 22 ● (n=11)
Actividad Glutation Reductasa (GR) (mU/mg tejido)	67 $\pm$ 3 (n=11)	71 $\pm$ 3 (n=10)	70 $\pm$ 3 (n=11)

Parámetros de estrés oxidativo en timo

Los distintos parámetros de estrés oxidativo estudiados en timo se muestran en la **figura 10**.

Los niveles de glutacion total (**figura 10A**), así como la actividad glutacion reductasa (**figura 10B**), se encuentran disminuidos significativamente ($p < 0,001$) en ratas obesas *fa/fa* con respecto a sus controles lean y a la cepa de ratas Wistar. No se observan diferencias significativas entre las ratas lean y las Wistar.

Respecto a la actividad xantina oxidasa (**figura 10C**), se observa que ambas ratas Zucker muestran valores significativamente superiores ($p<0,01$) respecto a las ratas Wistar.

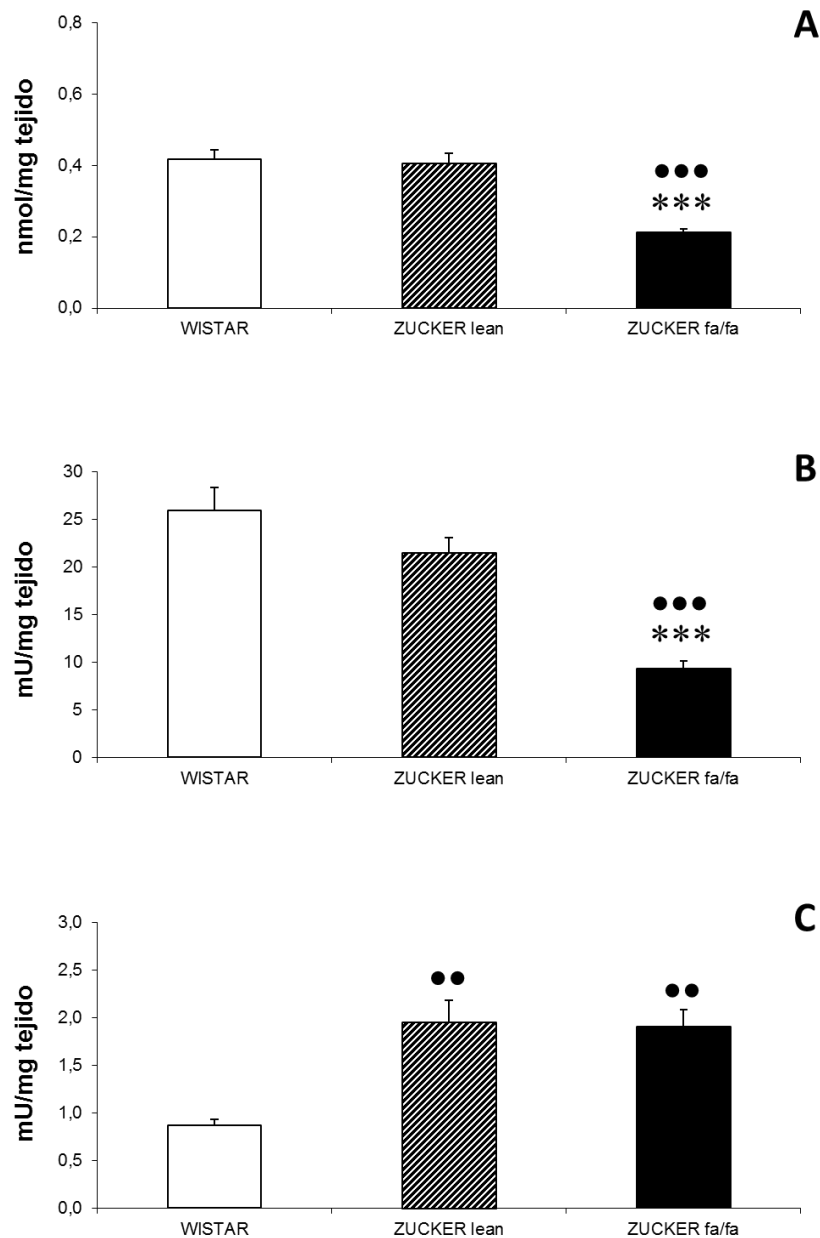


Figura 10. Glutathione total (nmol/mg tejido) (A), Actividad Glutathione Reductasa (mU/mg tejido) (B) y Actividad Xantina Oxidasa (mU/mg tejido) (C), en homogenados de timo de ratas Zucker lean y (fa/fa) y ratas Wistar adultas.

Cada columna representa la media $\pm$ E.E. del número de animales ($n= 7-11$) de cada grupo. *** $p<0,001$ con respecto a los correspondientes valores en ratas Zucker lean. ••• $p<0,001$, •• $p<0,01$ con respecto a los correspondientes valores en ratas Wistar.

Parámetros de estrés oxidativo en hígado

En el hígado (**tabla 6**), los niveles de glutathion total son significativamente ($p<0,05$) menores en ratas obesas respecto a sus controles lean, no encontrándose diferencias significativas respecto a las ratas Wistar.

La capacidad antioxidante total está ligeramente incrementada en ratas Wistar respecto a ambas ratas Zucker, pero no se observan diferencias significativas en ningún caso. Cuando se realiza la prueba “t” de Student, se pone de manifiesto significativamente ($p<0,05$) dicho incremento en ratas Wistar respecto a las ratas lean. Del mismo modo, el ligero incremento observado en ratas obesas respecto a sus controles lean, se muestra significativo ($p<0,05$) al realizar esta prueba.

En cuanto a la actividad xantina oxidasa, ambas ratas Zucker muestran valores más bajos respecto a las ratas Wistar, siendo significativa ($p<0,05$) esta disminución en el caso de las ratas lean. Por su parte, las ratas obesas presentan valores superiores de dicha actividad respecto a sus controles lean, que no resultan ser estadísticamente significativos. La prueba “t” de Student, muestra diferencias significativas ($p<0,05$) en el incremento de dicha actividad en ratas Wistar respecto a las ratas obesas *fa/fa*.

En ratas obesas, la actividad glutathion peroxidasa, se encuentra significativamente ($p<0,01$) disminuida respecto a sus controles lean y a las ratas Wistar. De igual manera, la actividad glutathion reductasa muestra una disminución significativa en ratas obesas respecto a sus controles lean ($p<0,05$), y a las ratas Wistar ($p<0,01$). No se observaron diferencias significativas entre las ratas lean y las Wistar en ninguna de estas dos actividades enzimáticas.

Tabla 6. Glutation total (nmol/mg tejido), Capacidad antioxidante total (U/mg tejido), Actividad Xantina Oxidasa (mU/mg tejido), Actividad Glutation Peroxidasa (mU/mg tejido) y Actividad Glutation Reductasa (mU/mg tejido) en homogenados de hígado de ratas Zucker lean y (fa/fa) y ratas Wistar adultas.

Cada dato representa la media $\pm$ E.E. del número de animales de cada grupo (entre paréntesis).

**p<0,01, *p<0,05 con respecto a los correspondientes valores en ratas Zucker lean. ●●p<0,01,

●p<0,05 con respecto a los correspondientes valores en ratas Wistar.

HÍGADO			
Parámetro	WISTAR	LEAN	FA/FA
Glutation Total (GSH) (nmol/mg tejido)	2,41 $\pm$ 0,09 (n=11)	2,72 $\pm$ 0,13 (n=10)	2,35 $\pm$ 0,06 * (n=11)
Capacidad Antioxidante Total (U/mg tejido)	0,28 $\pm$ 0,03 (n=9)	0,19 $\pm$ 0,01 (n=9)	0,22 $\pm$ 0,01 (n=11)
Actividad Xantina Oxidasa (XO) (mU/mg tejido)	4,25 $\pm$ 0,31 (n=11)	2,92 $\pm$ 0,27● (n=10)	3,51 $\pm$ 0,13 (n=11)
Actividad Glutation Peroxidasa (GPx) (mU/mg tejido)	1006 $\pm$ 39 (n=11)	1052 $\pm$ 63 (n=10)	818 $\pm$ 17 **/●● (n=11)
Actividad Glutation Reductasa (GR) (mU/mg tejido)	89 $\pm$ 4 (n=11)	88 $\pm$ 5 (n=10)	72 $\pm$ 3 */●● (n=11)

Actividad xantina oxidasa (XO) en cerebelo, telencéfalo y plasma

La actividad xantina oxidasa (**tabla7**), encontrada en cerebelo y telencéfalo no muestra diferencias significativas en ninguno de los grupos estudiados. Por su parte, las ratas lean mostraron valores ligeramente superiores respecto a los demás grupos en cerebelo, y ligeramente inferiores en telencéfalo.

En plasma, las ratas obesas presentan mayores valores de actividad respecto a sus controles y a las ratas Wistar, sin embargo estas diferencias no resultaron ser estadísticamente significativas.

Tabla 7. Actividad Xantina Oxidasa en homogenados de cerebelo, telencéfalo (mU/mg tejido) y plasma (mU/ml) de ratas Zucker lean y (*fa/fa*) y ratas Wistar adultas.
Cada dato representa la media $\pm$ E.E. del número de animales de cada grupo (entre paréntesis).

XANTINA OXIDASA			
	WISTAR	LEAN	FA/FA
Cerebelo (mU/mg tejido)	0,23 $\pm$ 0,02 (n=11)	0,32 $\pm$ 0,03 (n=10)	0,24 $\pm$ 0,03 (n=11)
Telencéfalo (mU/mg tejido)	0,33 $\pm$ 0,04 (n=11)	0,29 $\pm$ 0,03 (n=10)	0,34 $\pm$ 0,02 (n=11)
Plasma (mU/ml)	4,44 $\pm$ 0,23 (n=11)	4,75 $\pm$ 0,26 (n=10)	5,69 $\pm$ 0,54 (n=10)

4.1.1.2. Estudio de varias funciones inmunitarias, de estrés oxidativo y del perfil metabólico en ratas Zucker genéticamente obesas jóvenes y adultas.

Los resultados del estudio comparativo en ratas Zucker jóvenes y adultas se recogen en las **figuras 11-23** y en las **tablas 8-15**. Los animales empleados fueron ratas Zucker lean y (*fa/fa*) de dos meses de edad y los animales correspondientes al estudio anterior, las ratas Zucker lean y (*fa/fa*) adultas, de seis meses de edad. Se muestran los resultados del estudio de varias funciones inmunitarias (actividad “Natural Killer”, respuesta proliferativa y niveles de liberación de citoquinas) y de parámetros de estrés oxidativo (capacidad antioxidante total, niveles de GSH, así como actividades de las enzimas XO, GPx y GR). Asimismo, se recogen los resultados del peso corporal en el momento del sacrificio, y del peso relativo de los distintos órganos extraídos.

Finalmente, se exponen los resultados pertenecientes al estudio del perfil metabólico. Para cada parámetro analizado, se realizaron las comparaciones debidas a la dotación genética de los animales, es decir, se compararon las ratas obesas (*fa/fa*) con sus correspondientes controles, las ratas Zucker lean, a una misma edad (dos o seis

meses). Asimismo, se realizaron las comparaciones debidas al efecto de la edad dentro de cada grupo de animales, es decir, se compararon las ratas lean a la edad de dos y seis meses, así como las ratas obesas entre sí a esas dos edades.

Además, se efectuó la comparación existente entre las ratas Zucker obesas (*fa/fa*) de dos meses de edad respecto a las ratas Zucker lean adultas, de seis meses con objeto de poner de manifiesto si las ratas obesas a la temprana edad de dos meses se comportan de manera similar a una rata control adulta.

En las gráficas y tablas pertenecientes a este apartado de resultados, la edad de los animales aparece indicada como 2M que corresponde a la edad de dos meses (juvenil) y 6M que es la edad de seis meses (adulta).

Peso corporal en el momento del sacrificio

Los resultados correspondientes al peso corporal de los animales en el momento del sacrificio (**figura 11**), muestran como las ratas Zucker obesas (*fa/fa*) a la temprana edad de dos meses y a la edad adulta (6 meses), presentan un peso significativamente mayor ($p<0,001$) que sus respectivos controles, las ratas Zucker lean de la misma edad.

Por otro lado, las ratas Zucker lean y obesas (*fa/fa*) a la edad adulta, presentaron a su vez un peso corporal significativamente mayor ($p<0,001$) que a la edad de dos meses. Cuando se comparan las ratas obesas jóvenes respecto a las ratas lean adultas, encontramos que el peso corporal es significativamente menor ($p<0,01$) en ratas obesas que en ratas lean.

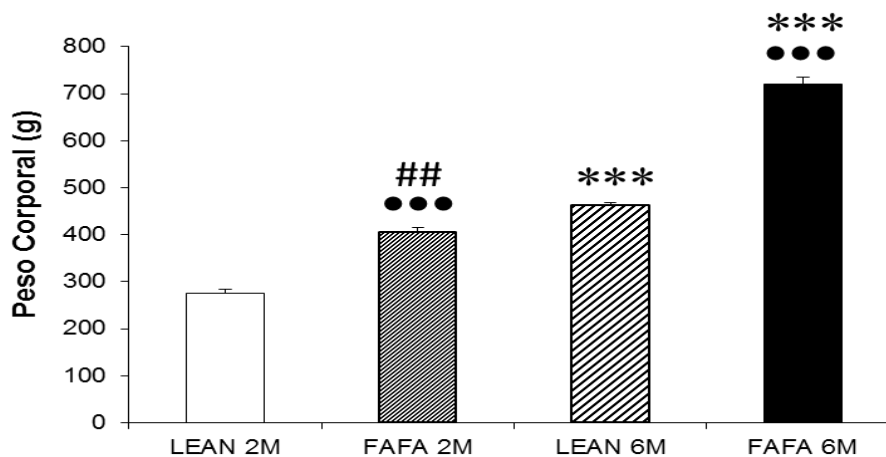


Figura 11. Peso corporal (g) en ratas Zucker lean y obesas (*fa/fa*) jóvenes y adultas, en el momento del sacrificio.

Cada columna representa la media $\pm$ E.E. del número de animales de cada grupo (lean 2m, *fa/fa* 2m y lean 6m $n=10$; *fa/fa* 6m $n=11$).

*** $p<0,001$ con respecto a los correspondientes valores en cada grupo de animales a la edad de 2 meses. ●●● $p<0,001$ con respecto a los correspondientes valores en ratas Zucker lean a cada edad. ## $p<0,01$ con respecto a los correspondientes valores en ratas Zucker lean a la edad de 6 meses.

Peso relativo de los distintos órganos extraídos tras el sacrificio

En la **tabla 8** se recogen los datos del estudio de los órganos extraídos (bazo, timo, hígado, corazón, grasa epididimal y lumbar y riñones) de las ratas Zucker lean y obesas (*fa/fa*) jóvenes y adultas, tras el sacrificio. Se muestran los resultados obtenidos del % de peso relativo del órgano con respecto al peso corporal del animal, obtenido mediante la siguiente expresión: (peso del órgano (g) / peso corporal del animal (g)) $\times 100$.

A la edad juvenil, las ratas obesas (*fa/fa*) presentan un % de peso relativo significativamente mayor ($p<0,001$) en órganos como el hígado y la grasa epididimal y lumbar respecto a sus controles lean de la misma edad. Por el contrario, en órganos como el bazo, el corazón y los riñones el % de peso relativo es significativamente menor ($p<0,001$) en ratas obesas respecto a ratas lean. No se encontraron diferencias en el timo de ambos grupos de animales.

Las ratas obesas adultas, muestran un % de peso relativo significativamente mayor ($p<0,001$) en timo, grasa epididimal y lumbar, así como en hígado ($p<0,01$) respecto a sus controles lean de la misma edad. En cambio, dichas ratas obesas adultas

presentan un % de peso relativo estadísticamente menor en corazón ($p<0,001$) y en riñones ($p<0,01$) respecto a las ratas lean adultas. No se encontraron diferencias en el bazo de ambos grupos de ratas.

En relación al estudio con la edad, las ratas lean adultas muestran un % de peso relativo significativamente mayor ($p<0,001$) en la grasa tanto epididimal como lumbar, respecto a su mismo grupo de animales a la edad juvenil. Para el resto de los órganos estudiados (bazo, timo, hígado, corazón y riñones) las ratas lean adultas presentan un % de peso relativo significativamente menor ($p<0,001$) que su correspondiente grupo a la edad de dos meses.

Por su parte, las ratas obesas (*fa/fa*) adultas exhiben un % de peso relativo significativamente mayor ($p<0,001$) en la grasa epididimal y lumbar respecto a su grupo de animales a la edad de dos meses. Por el contrario, dichas ratas obesas adultas presentan un % de peso relativo significativamente menor ($p<0,001$) en bazo y corazón, así como en los riñones ($p<0,01$) en comparación con los animales obesos a la edad juvenil. No se observan diferencias ni en timo ni en hígado entre ambos grupos de ratas obesas.

Por último, las ratas obesas a la edad de dos meses presentan un % de peso relativo significativamente mayor ($p<0,01$) en bazo y timo, así como en hígado ($p<0,001$) respecto a las ratas lean adultas. Por su parte, el % de peso relativo en la grasa lumbar resultó ser significativamente menor ($p<0,05$) en ratas obesas jóvenes en comparación con las ratas lean adultas. No se encontraron diferencias en corazón, grasa epididimal y riñones entre ambos grupos de animales.

ÓRGANO	% PESO RELATIVO RESPECTO AL PESO CORPORAL			
	ZUCKER LEAN 2M	ZUCKER FA/FA 2M	ZUCKER LEAN 6M	ZUCKER FA/FA 6M
Bazo	0,21±0,006	0,18±0,005●●●/##	0,15±0,006***	0,13±0,005***
Timo	0,25±0,01	0,27±0,03##	0,13±0,01***	0,26±0,01●●●
Hígado	3,44±0,06	3,92±0,06●●●/###	2,88±0,04***	3,65±0,13●●
Corazón	0,31±0,009	0,27±0,006●●●	0,27±0,005***	0,21±0,004***/●●●
Grasa epididimal	0,88±0,04	1,78±0,06●●●	1,73±0,06***	3,03±0,09***/●●●
Grasa lumbar	0,68±0,05	1,53±0,12●●●/#	1,99±0,09***	4,69±0,16***/●●●
Riñones	0,75±0,01	0,63±0,01●●●	0,62±0,01***	0,56±0,01***/●●

Tabla 8. % de peso relativo de cada órgano (extraído en el sacrificio), respecto al peso corporal (g), en ratas Zucker lean y obesas (*fa/fa*) jóvenes y adultas. Cada dato representa la media ± E.E. del número de animales de cada grupo (lean 2m, *fa/fa* 2m y lean 6m n=10; *fa/fa* 6m n=11).

***p<0,001, **p<0,01 con respecto a los correspondientes valores en cada grupo de animales a la edad de 2 meses. ●●●p<0,001, ●●p<0,01 con respecto a los correspondientes valores en ratas Zucker lean a cada edad. ###p<0,001, ##p<0,01, #p<0,05 con respecto a los correspondientes valores en ratas Zucker lean a la edad de 6 meses

Estudio de varias funciones inmunitarias en leucocitos de bazo y timo

Tras el sacrificio de los animales, se extrajeron los órganos inmunitarios (bazo y timo) y se analizaron diferentes parámetros de funcionalidad inmunitaria como la actividad “Natural Killer” de los leucocitos, la respuesta proliferativa y la liberación de los niveles de citoquinas de los linfocitos.

Actividad citotóxica “Natural Killer”

La actividad “Natural Killer” (expresada como % de lisis de células tumorales) de leucocitos de bazo y timo se refleja en la **tabla 9**.

Tabla 9. Actividad “Natural Killer” (% lisis) de leucocitos de bazo y timo en ratas Zucker lean y obesas (*fa/fa*) jóvenes y adultas. Cada dato representa la media $\pm$ E.E. del número de animales de cada grupo (entre paréntesis).

*** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ con respecto a los correspondientes valores en cada grupo de animales a la edad de 2 meses. • $p < 0,05$ con respecto a los correspondientes valores en ratas Zucker lean a cada edad. ### $p < 0,001$ con respecto a los correspondientes valores en ratas Zucker lean a la edad de 6 meses.

ÓRGANO	ACTIVIDAD "NATURAL KILLER" (NK) (% de lisis)			
	ZUCKER LEAN 2M	ZUCKER FA/FA 2M	ZUCKER LEAN 6M	ZUCKER FA/FA 6M
Bazo	24 $\pm$ 2 (n=10)	14 $\pm$ 2•/### (n=10)	38 $\pm$ 3** (n=10)	30 $\pm$ 2*** (n=8)
Timo	24 $\pm$ 3 (n=10)	15 $\pm$ 1•/### (n=9)	35 $\pm$ 2** (n=10)	36 $\pm$ 2*** (n=8)

Con respecto al estudio de la dotación genética, tanto en bazo como en timo, el porcentaje de lisis muestra como las ratas obesas (*fa/fa*) jóvenes muestran una actividad “Natural Killer” significativamente menor ($p < 0,05$) en comparación con sus controles lean de la misma edad. En cambio, no se encontraron diferencias significativas entre las ratas obesas (*fa/fa*) y las ratas lean adultas.

En cuanto al estudio con la edad, la actividad “Natural Killer” de los leucocitos esplénicos y tímicos está aumentada significativamente ($p<0,01$) en ratas lean adultas con respecto a su mismo grupo a la edad de dos meses. Del mismo modo, el grupo de ratas obesas adultas presenta una actividad “Natural Killer” significativamente mayor ($p<0,001$) que las ratas obesas jóvenes. Finalmente encontramos que las ratas obesas a la edad juvenil muestran una actividad “Natural Killer” significativamente menor ($p<0,001$) respecto a las ratas lean a la edad adulta en ambos órganos estudiados.

Capacidad proliferativa de los linfocitos

La capacidad proliferativa de los linfocitos de bazo en respuesta a los mitógenos Con A, LPS (a la concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$) y PHA (a la concentración de 25 $\mu\text{g/ml}$) se muestra en la **figura 12**, mientras que la capacidad proliferativa de los linfocitos de timo en respuesta a los mismos mitógenos se refleja en la **figura 13**. En ambas figuras se representa el porcentaje de linfoproliferación con respecto al valor 100% dado a las cuentas por minuto de proliferación basal. Dichas cuentas por minuto (cpm) obtenidas en ausencia de mitógeno, en ambos órganos, se resumen en la **tabla 10**.

Tabla 10. Respuesta proliferativa basal (cpm) de linfocitos de bazo y timo, en ratas Zucker lean y obesas (fa/fa) jóvenes y adultas.

Cada dato representa la media $\pm$ E.E. del número de animales de cada grupo (entre paréntesis). *** $p<0,001$, ** $p<0,01$ con respecto a los correspondientes valores en cada grupo de animales a la edad de 2 meses. ### $p<0,001$ ## $p<0,01$ con respecto a los correspondientes valores en ratas Zucker lean a la edad de 6 meses.

ÓRGANO	PROLIFERACIÓN BASAL (cpm)			
	ZUCKER LEAN 2M	ZUCKER FA/FA 2M	ZUCKER LEAN 6M	ZUCKER FA/FA 6M
Bazo	314 $\pm$ 43 (n=10)	398 $\pm$ 49### (n=10)	3667 $\pm$ 478*** (n=10)	3523 $\pm$ 457*** (n=11)
Timo	180 $\pm$ 18 (n=10)	244 $\pm$ 26## (n=8)	3082 $\pm$ 391*** (n=9)	3694 $\pm$ 574** (n=10)

En cuanto a la proliferación basal de los linfocitos de bazo y timo, encontramos que la tendencia es un aumento de dicha proliferación en ratas obesas (*fa/fa*) con respecto a sus controles lean (excepto en bazo a los seis meses de edad), en cambio no se observan diferencias significativas en ambas edades estudiadas. Por el contrario, lo que resulta bastante notorio, es el significativo incremento de proliferación ($p<0,001$) y ($p<0,01$ en linfocitos tímicos de ratas obesas adultas) en ratas obesas y lean adultas con respecto a su mismo grupo de animales a la edad juvenil. Por último, se muestra como las ratas obesas jóvenes presentan una proliferación basal significativamente menor en linfocitos de bazo ($p<0,001$) y timo ($p<0,01$) respecto a los de las ratas lean adultas (**tabla 10**).

En el estudio de la respuesta proliferativa en bazo (**figura 12**), la estimulación con Con A (**figura 12A**) refleja que las ratas obesas (*fa/fa*) jóvenes presentan un % de linfoproliferación significativamente menor ($p<0,01$) que sus controles lean de la misma edad. En cambio, a la edad adulta no se observan diferencias entre las ratas obesas y las lean. Por otro lado, tanto las ratas lean como las obesas, a los seis meses, muestran un descenso significativo en la proliferación ($p<0,001$) y ($p<0,01$) respectivamente), respecto a los animales de dos meses. Finalmente, la proliferación en ratas obesas jóvenes es significativamente mayor ($p<0,05$) respecto a la de las ratas lean adultas. En cuanto a la estimulación con LPS (**figura 12B**), la proliferación muestra un comportamiento similar al de la estimulación con Con A, no encontrándose en este caso diferencias significativas. Cuando se realiza la prueba “t” de Student, se pone de manifiesto significativamente ($p<0,05$) el descenso en la proliferación de ratas lean adultas respecto a las jóvenes. Finalmente, cuando la estimulación es con PHA (**figura 12C**), nuevamente encontramos un comportamiento similar al que ocurre con los otros dos mitógenos, sin embargo en este caso sólo se observan diferencias significativas ($p<0,01$) en cuanto al descenso en proliferación presentado por las ratas lean adultas respecto a sus controles jóvenes. Cuando se realiza la prueba “t” de Student, se pone de manifiesto significativamente ($p<0,05$) el descenso en la proliferación de ratas obesas adultas respecto a su mismo grupo a la edad juvenil. Asimismo, con esta prueba estadística resulta ser significativo ($p<0,01$) el incremento en la proliferación de ratas obesas jóvenes en comparación con las ratas lean adultas.

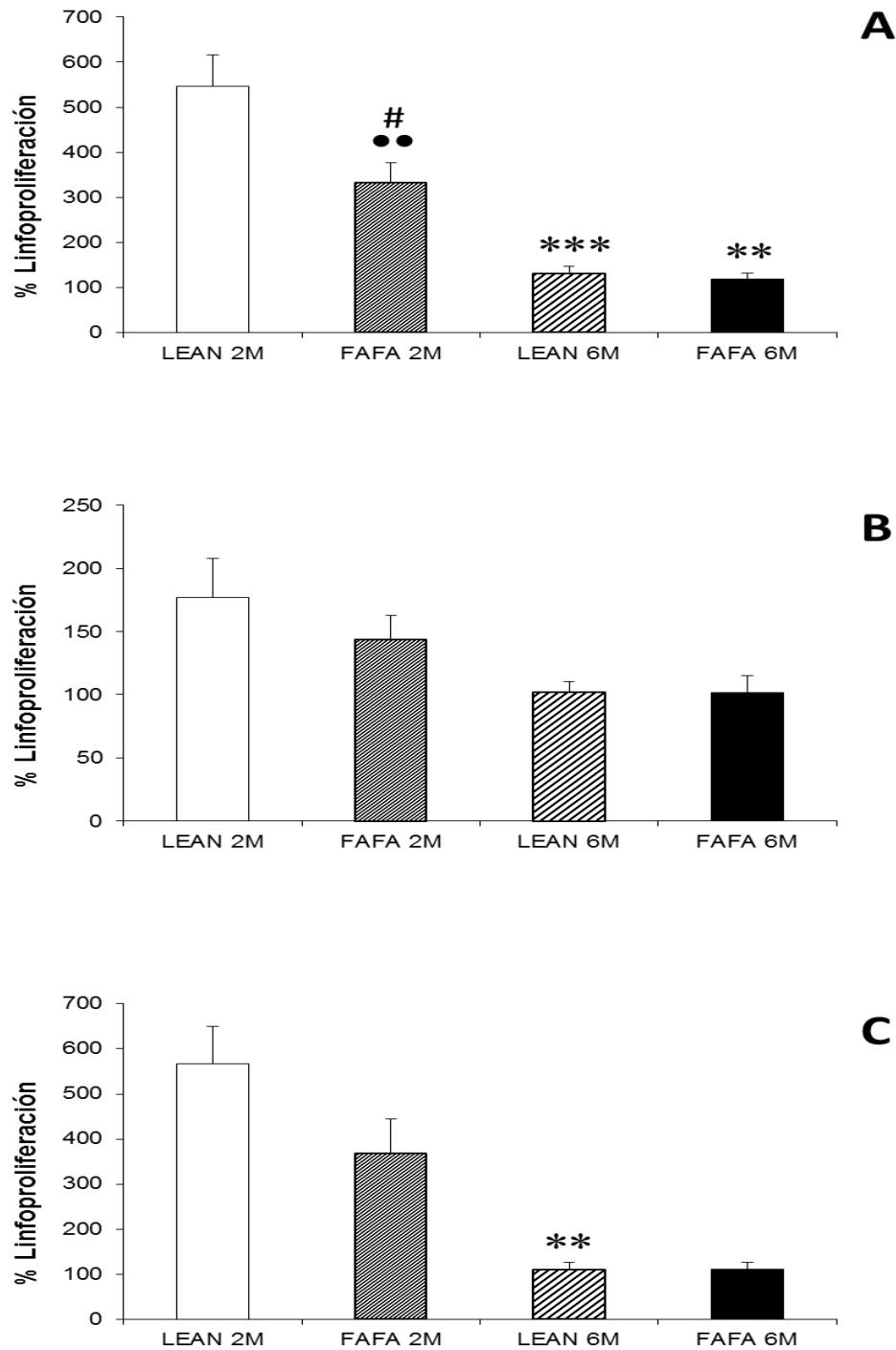


Figura 12. Respuesta proliferativa (% de linfoproliferación) a los mitógenos Con A (1 μ g/ml) (A), LPS (1 μ g/ml) (B) y PHA (25 μ g/ml) (C) de linfocitos de bazo, en ratas Zucker lean y obesas (*fa/fa*) jóvenes y adultas.

Cada columna representa la media $\pm$ E.E. del número de animales de cada grupo (n=10 en todos los grupos).

***p<0,001, **p<0,01 con respecto a los correspondientes valores en cada grupo de animales a la edad de 2 meses. ●●p<0,01 con respecto a los correspondientes valores en ratas Zucker lean a cada edad. #p<0,05 con respecto a los correspondientes valores en ratas Zucker lean a la edad de 6 meses.

Con respecto a la respuesta proliferativa en timo (**figura 13**), encontramos que cuando la estimulación se realiza con Con A (**figura 13A**), la proliferación en ratas obesas (*fa/fa*) jóvenes es menor respecto a la de sus controles lean de la misma edad, sin embargo esta diferencia no resulta ser estadísticamente significativa. A la edad adulta, el % de proliferación de ambos grupos de animales no presenta diferencias. Por otra parte, se muestra un importante descenso en la respuesta proliferativa de ratas lean adultas en relación a su mismo grupo a la edad juvenil, el cual resulta ser estadísticamente significativo ($p<0,05$). Del mismo modo, las ratas obesas a la edad de seis meses muestran un notable descenso de la proliferación respecto a las ratas obesas de dos meses, en cambio estas diferencias no resultan ser estadísticamente significativas. Al realizar la prueba “t” de Student, sí se ponen de manifiesto ($p<0,01$). Por último, la proliferación en ratas obesas jóvenes resulta ser significativamente mayor ($p<0,05$) respecto a la de las ratas lean adultas.

En cuanto a la estimulación con LPS (**figura 13B**), la respuesta proliferativa de los distintos grupos de animales presenta un comportamiento similar al encontrado con la estimulación con Con A. A pesar de presentar las ratas obesas jóvenes una menor proliferación respecto a sus controles lean de la misma edad, no resulta significativa dicha diferencia. A los seis meses de edad, no se encuentran diferencias en la respuesta proliferativa de ambos grupos de animales. Por otro lado, se refleja un descenso significativo ($p<0,05$) en la proliferación en ratas lean adultas respecto a su mismo grupo a la edad de dos meses. También se presenta un descenso en la proliferación de ratas obesas adultas respecto a su mismo grupo a la edad juvenil, que no resulta ser estadísticamente significativo, pero que sí se pone de manifiesto ($p<0,05$) al realizar la prueba “t” de Student. Las ratas obesas a la edad de dos meses muestran un aumento de la proliferación, que no es estadísticamente significativo, en comparación con las ratas lean adultas. Cuando se realiza la prueba “t” de Student, este aumento se pone de manifiesto significativamente ($p<0,05$).

Por último, cuando la estimulación es con PHA (**figura 13C**), las ratas obesas jóvenes y adultas muestran una menor proliferación respecto a sus controles lean, que no resulta ser significativa. Las ratas lean adultas por su parte muestran un descenso significativo ($p<0,01$) en la proliferación respecto a las ratas lean jóvenes. Las ratas

obesas adultas muestran una menor proliferación respecto a su mismo grupo a la edad juvenil. Estas diferencias no resultan ser significativas. En cambio al realizar la prueba “t” de Student, sí se ponen de manifiesto ($p < 0,05$).

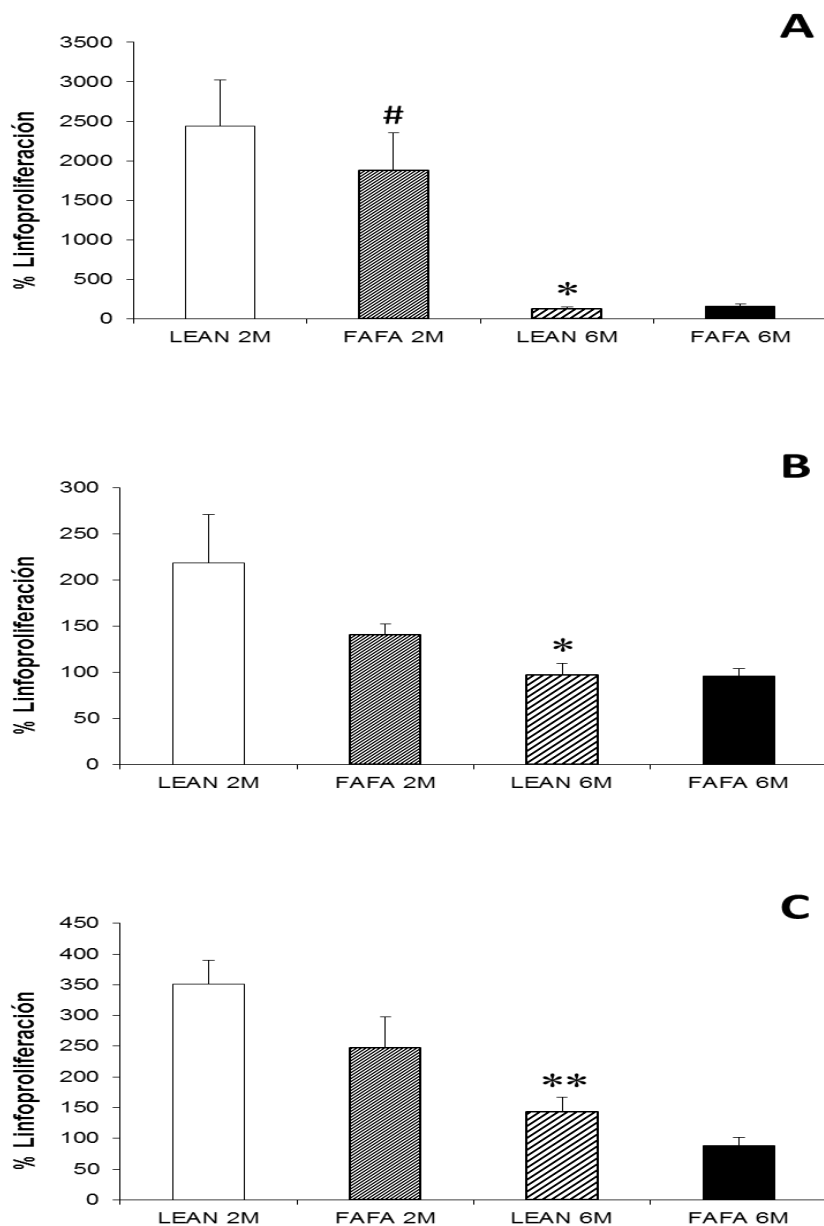


Figura 13. Respuesta proliferativa (% de linfoproliferación) a los mitógenos Con A (1 $\mu\text{g/ml}$) (A), LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) (B) y PHA (25 $\mu\text{g/ml}$) (C) de linfocitos de timo, en ratas Zucker lean y obesas (*fa/fa*) jóvenes y adultas.

Cada columna representa la media $\pm$ E.E. del número de animales ($n = 10-8$) de cada grupo. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ con respecto a los correspondientes valores en cada grupo de animales a la edad de 2 meses. # $p < 0,05$ con respecto a los correspondientes valores en ratas Zucker lean a la edad de 6 meses.

Niveles de citoquinas

La valoración de los niveles de citoquinas se llevó a cabo en los sobrenadantes de cultivo de 48 horas de linfocitos de bazo, tanto en reposo como estimulados con los mitógenos Con A y LPS a la concentración de 1 µg/ml.

Niveles de IL-2

Los niveles de IL-2 (pg/ml) de linfocitos de bazo se muestran en la **figura 14**.

El análisis de los niveles de IL-2 liberados por los linfocitos de bazo en condiciones basales (**figura 14A**), muestra que las ratas obesas jóvenes presentan menores niveles de esta citoquina respecto a sus controles lean de la misma edad, sin embargo esta diferencia no es estadísticamente significativa. Por el contrario, el descenso en los niveles de IL-2 que muestran las ratas obesas adultas respecto a las ratas lean adultas sí resulta ser estadísticamente significativo ($p < 0,05$). Por otra parte, tanto las ratas obesas como las lean adultas presentan una menor liberación de IL-2 que sus respectivos grupos de animales a la edad juvenil, no siendo significativas estas diferencias. Tampoco se encuentran diferencias entre las ratas obesas jóvenes y las lean adultas.

Cuando los linfocitos de bazo se estimulan con Con A (**figura 14B**), nuevamente encontramos que las ratas obesas en ambas edades estudiadas, muestran menores niveles de IL-2 que sus respectivos controles lean, sin embargo no son significativas estas diferencias. Cuando se realiza la prueba “t” de Student, se pone de manifiesto de manera significativa ($p < 0,01$) el descenso encontrado en los niveles de esta citoquina en ratas obesas adultas respecto a las ratas lean de la misma edad. Por otro lado, no se encuentran diferencias con la edad en ambos grupos de animales estudiados. Finalmente, se observa un descenso no significativo en los niveles de IL-2 en ratas obesas jóvenes respecto a las ratas lean adultas. Dicho descenso se pone de manifiesto significativamente ($p < 0,01$) al realizar la prueba “t” de Student.

En el caso de la estimulación con LPS (**figura 14C**), los animales obesos presentan una disminución en los niveles de IL-2 con respecto a sus controles lean en

ambas edades estudiadas, que no resulta ser estadísticamente significativa. Cuando se realiza la prueba “t” de Student, se pone de manifiesto significativamente ($p < 0,05$) el descenso en los niveles de IL-2 que presentan las ratas obesas jóvenes respecto a sus controles lean de la misma edad. Por su parte, las ratas lean adultas presentan un descenso significativo ($p < 0,05$) de esta citoquina respecto a su mismo grupo a la edad juvenil. Este mismo comportamiento lo presentan las ratas obesas adultas, pero en este caso no se encuentran diferencias significativas respecto a las ratas obesas jóvenes. Finalmente, no se observan diferencias entre ratas obesas jóvenes y lean adultas.

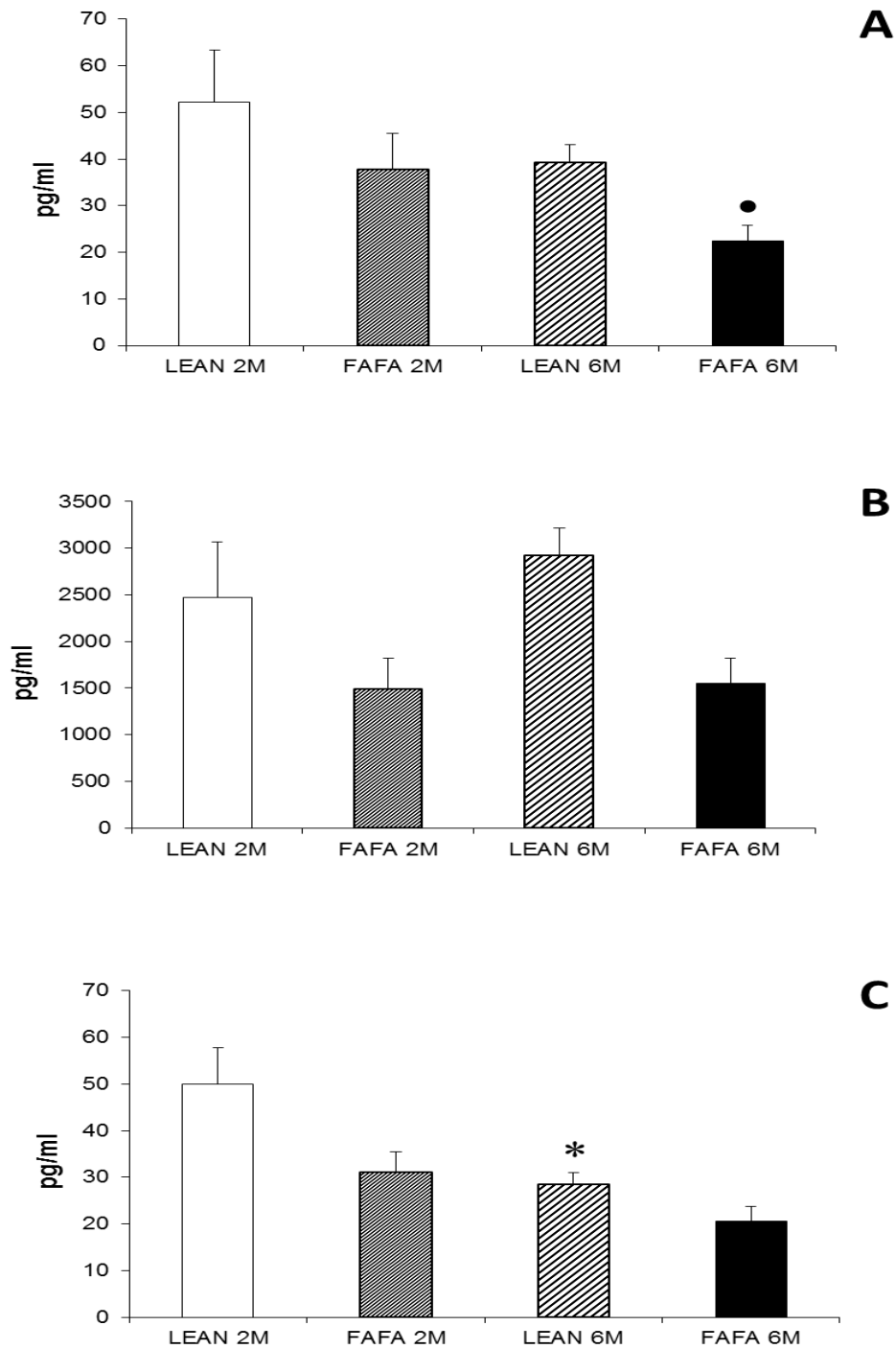


Figura 14. Niveles de IL-2 (pg/ml) de linfocitos de bazo en condiciones basales (A), estimulados con Con A (B) y con LPS (C), en ratas Zucker lean y obesas (*fa/fa*) jóvenes y adultas.

Cada columna representa la media $\pm$ E.E. del número de animales (n= 10-8) de cada grupo. *p<0,05 con respecto a los correspondientes valores en cada grupo de animales a la edad de 2 meses. •p<0,05 con respecto a los correspondientes valores en ratas Zucker lean a cada edad.

Niveles de IL-1 β

En cuanto a los niveles de IL-1 β (pg/ml) (**tabla 11**), los linfocitos de bazo de ratas obesas en condiciones basales y estimulados con los mitógenos, muestran una tendencia al incremento en la liberación de esta citoquina respecto a sus controles lean a cada edad estudiada, no siendo significativo este incremento. Por otra parte, las ratas lean adultas también presentan una tendencia no significativa al incremento en la liberación de IL-1 β respecto a las ratas jóvenes de su mismo grupo en todas las condiciones estudiadas. De igual manera, el grupo de ratas obesas adultas tiende a mostrar un aumento no significativo en los niveles de IL-1 β respecto a su grupo a la edad juvenil.

Cuando se realiza la prueba “t” de Student, el aumento en la liberación de IL-1 β que presentan las ratas lean y obesas adultas basalmente en comparación con su mismo grupo de animales jóvenes, se pone de manifiesto significativamente (($p < 0,01$) y ($p < 0,05$) respectivamente). Con esta prueba estadística, a su vez, también se obtienen diferencias significativas en el aumento en la liberación de IL-1 β que presentan las ratas lean ($p < 0,05$) y obesas ($p < 0,05$) adultas frente a las jóvenes, cuando los linfocitos se estimulan con LPS.

Tabla 11. Niveles de IL-1Beta (pg/ml) de linfocitos de bazo en condiciones basales, estimulados con Con A y con LPS, en ratas Zucker lean y obesas (fa/fa) jóvenes y adultas. Cada dato representa la media $\pm$ E.E. del número de animales de cada grupo (entre paréntesis).

IL-1 BETA (pg/ml)				
	ZUCKER LEAN 2M	ZUCKER FA/FA 2M	ZUCKER LEAN 6M	ZUCKER FA/FA 6M
BASAL	20 $\pm$ 2 (n=10)	26 $\pm$ 4 (n=10)	34 $\pm$ 4 (n=8)	41 $\pm$ 6 (n=9)
Con A	32 $\pm$ 3 (n=10)	42 $\pm$ 7 (n=10)	40 $\pm$ 4 (n=9)	44 $\pm$ 5 (n=9)
LPS	33 $\pm$ 3 (n=10)	39 $\pm$ 4 (n=10)	52 $\pm$ 7 (n=9)	88 $\pm$ 17 (n=9)

Niveles de TNF- α

Los niveles de TNF- α (pg/ml) de linfocitos de bazo se muestran en la **figura 15**.

En condiciones basales (**figura 15A**), las ratas obesas presentan un ligero incremento en los niveles de TNF- α a la edad de dos meses, y un incremento notable a la edad de seis meses respecto a sus controles lean a cada edad. En ninguno de los casos se encuentran diferencias significativas. Cuando se realiza la prueba “t” de Student, sí que se obtiene que el incremento en la liberación de esta citoquina es significativo ($p<0,05$) en ratas obesas adultas respecto a las ratas lean de la misma edad. Por otro lado, las ratas lean y obesas adultas sí que presentan un aumento significativo ($p<0,01$) de esta citoquina respecto a su mismo grupo a la edad de dos meses. Las ratas obesas jóvenes exhiben un descenso significativo ($p<0,01$) en los niveles de TNF- α en comparación con las ratas lean adultas.

Cuando los linfocitos de bazo se estimulan con Con A (**figura 15B**), encontramos que nuevamente las ratas obesas presentan un aumento en los niveles de TNF- α respecto a sus controles lean a cada edad, sin embargo solo se obtienen diferencias significativas en ratas obesas adultas ($p<0,05$). Por otra parte, en ratas lean existe un aumento no significativo en la liberación de esta citoquina con la edad. Dicho aumento se pone de manifiesto significativamente ($p<0,05$) al realizar la prueba “t” de Student. Asimismo, las ratas obesas adultas presentan un aumento significativo ($p<0,01$) de los niveles de TNF- α respecto a su mismo grupo a la edad juvenil. No se observan diferencias entre ratas obesas jóvenes y lean adultas.

Finalmente, la estimulación con LPS (**figura 15C**), muestra que las ratas obesas a la edad de dos meses presentan un incremento no significativo en los niveles de TNF- α respecto a sus controles lean de la misma edad. Dicho incremento se pone de manifiesto de manera significativa ($p<0,05$) cuando se realiza la prueba “t” de Student. A la edad adulta, las ratas obesas exhiben un aumento significativo ($p<0,01$) en la liberación de TNF- α respecto a las ratas lean. Por otro lado, las ratas lean y obesas muestran un aumento significativo ($p<0,001$) en los niveles de esta citoquina con la edad. Finalmente, las ratas obesas a la edad de dos meses muestran un descenso significativo ($p<0,01$) en los niveles de TNF- α respecto a las ratas lean adultas.

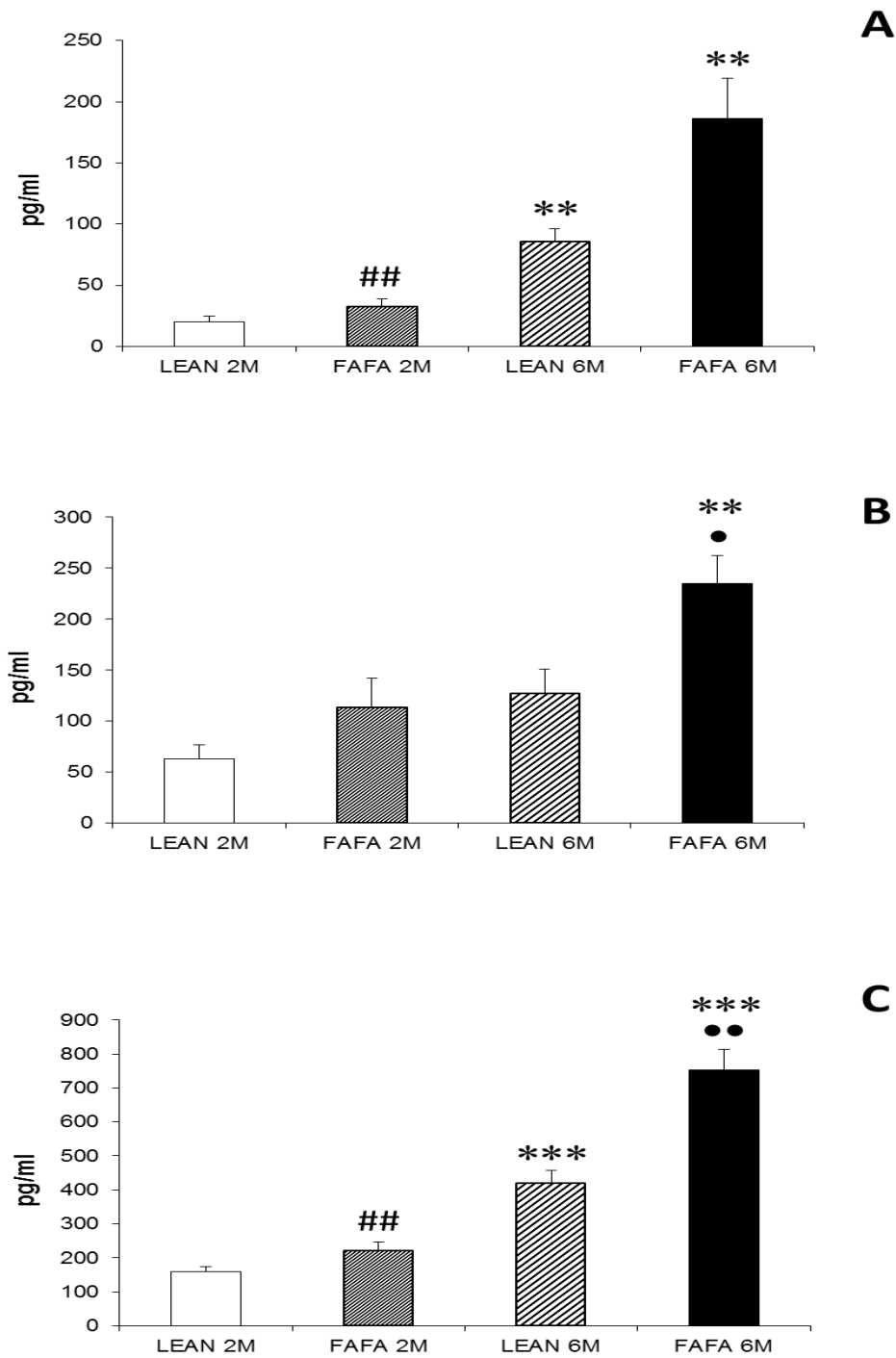


Figura 15. Niveles de TNF- α (pg/ml) de linfocitos de bazo en condiciones basales (A), estimulados con Con A (B) y con LPS (C), en ratas Zucker lean y obesas (*fa/fa*) jóvenes y adultas.

Cada columna representa la media $\pm$ E.E. del número de animales (n= 10-8) de cada grupo. ***p<0,001, **p<0,01 con respecto a los correspondientes valores en cada grupo de animales a la edad de 2 meses. ●●p<0,01, ●p<0,05 con respecto a los correspondientes valores en ratas Zucker lean a cada edad. ##p<0,01 con respecto a los correspondientes valores en ratas Zucker lean a la edad de 6 meses.

Niveles de IL-10

Los niveles de IL-10 (pg/ml) de linfocitos de bazo se reflejan en la **figura 16**.

El estudio de los niveles de IL-10 liberados por los linfocitos de bazo en condiciones basales (**figura 16A**), muestra que las ratas obesas presentan mayores niveles de esta citoquina con respecto a sus controles lean en ambas edades estudiadas, sin embargo este incremento no resulta significativo. Cuando se realiza la prueba “t” de Student se pone de manifiesto significativamente ($p<0,05$) el incremento en la liberación de IL-10 que presentan las ratas obesas adultas respecto a sus controles lean de la misma edad. Por otra parte, también se observa un aumento en niveles de IL-10 en ratas lean y obesas con la edad que tampoco resulta significativo. Por su parte, las ratas obesas jóvenes exhiben mayores niveles de IL-10 que las ratas lean adultas, no siendo significativa esta diferencia.

En cuanto a la estimulación con Con A (**figura 16B**), encontramos que a los dos meses, las ratas obesas presentan un aumento de IL-10 respecto a las ratas lean que no es significativo. Por el contrario a la edad de seis meses, las ratas obesas muestran un notable descenso en los niveles de esta citoquina respecto a las ratas lean, que no resulta significativo. Al realizar la prueba “t” de Student, dicho descenso se pone de manifiesto significativamente ($p<0,05$). Por otro lado, las ratas lean presentan un aumento significativo ($p<0,01$) de los niveles de IL-10 con la edad, en cambio, el grupo de ratas obesas no muestra diferencias en ambas edades de estudio. Finalmente, las ratas obesas jóvenes muestran un descenso apreciable pero no significativo de IL-10 respecto a las ratas lean adultas. Cuando se realiza la prueba “t” de Student, este descenso sí resulta ser estadísticamente significativo ($p<0,01$).

En el caso de la estimulación con LPS (**figura 16C**), las ratas obesas jóvenes muestran un incremento no significativo en los niveles de IL-10 respecto a sus controles lean de la misma edad. Sin embargo, este incremento resulta significativo ($p<0,05$) cuando se realiza la prueba “t” de Student. Por el contrario, a la edad adulta las ratas obesas presentan un descenso no significativo de esta citoquina respecto a las ratas lean. Por otra parte, las ratas lean muestran un aumento no significativo de IL-10 con la edad, mientras que las obesas presentan un descenso no significativo de dichos niveles con la

edad. Al realizar la prueba “t” de Student, se pone de manifiesto significativamente ($p<0,05$) este descenso en ratas obesas.

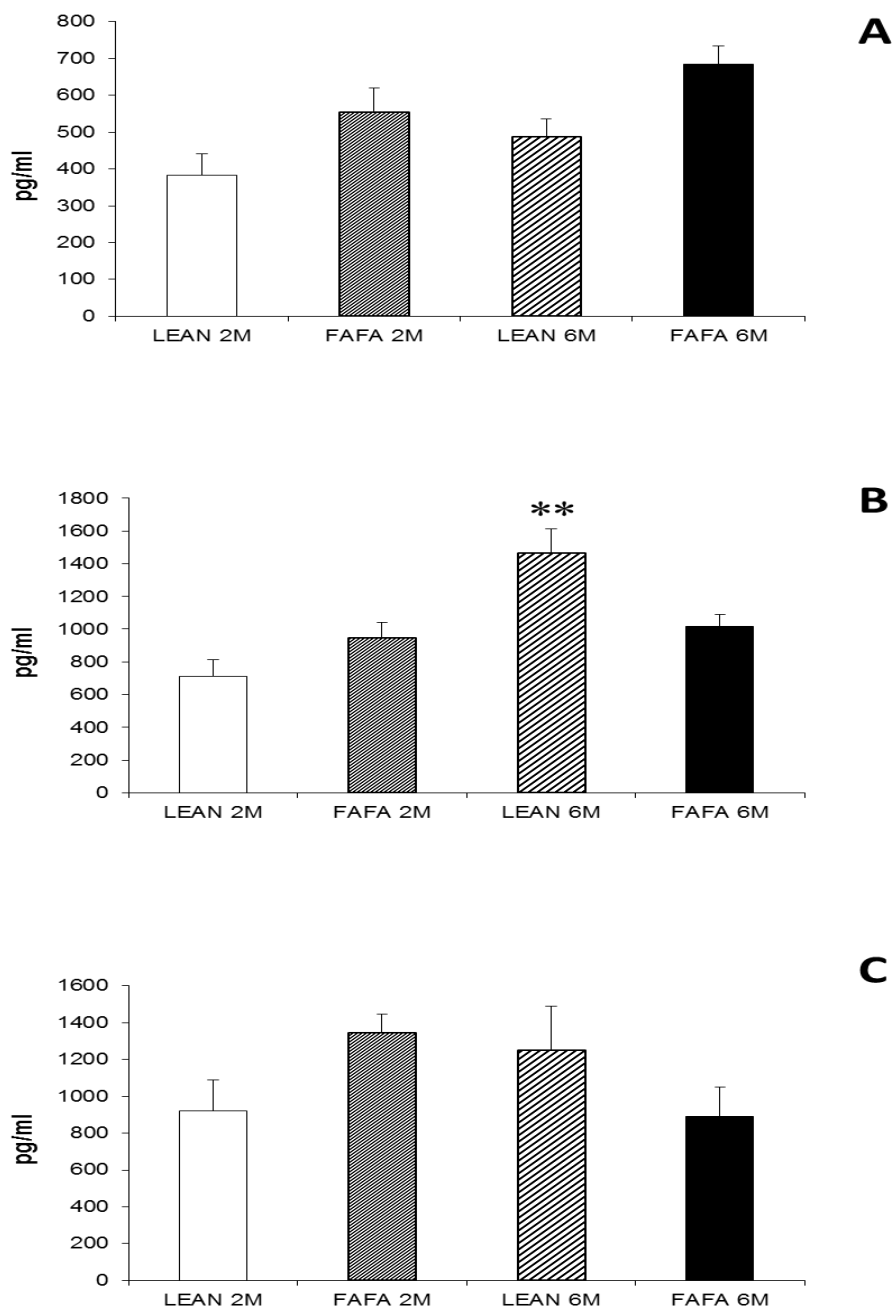


Figura 16. Niveles de IL-10 (pg/ml) de linfocitos de bazo en condiciones basales (A), estimulados con Con A (B) y con LPS (C), en ratas Zucker lean y obesas (*fa/fa*) jóvenes y adultas.

Cada columna representa la media $\pm$ E.E. del número de animales ($n= 10-9$) de cada grupo. ** $p<0,01$ con respecto a los correspondientes valores en cada grupo de animales a la edad de 2 meses.

Estudio de parámetros de estrés oxidativo

En el sacrificio de los animales, tras la extracción de los órganos inmunitarios (bazo y timo), se obtuvo el hígado y en ellos se analizaron diferentes parámetros de estrés oxidativo como el contenido intracelular de glutathion total (GSH), la capacidad antioxidante total, y la actividades de las enzimas glutathion peroxidasa (GPx) y glutathion reductasa (GR).

Parámetros de estrés oxidativo en bazo

Los distintos parámetros de estrés oxidativo estudiados en bazo se muestran en la **tabla 12**.

En todas las valoraciones, las ratas obesas no presentan diferencias significativas respecto a sus controles lean en ambas edades estudiadas, sin embargo los niveles de glutathion total y la actividad de la enzima glutathion peroxidasa tienden a aumentar en ratas obesas.

Cuando se estudian los cambios con la edad, las ratas lean adultas muestran un descenso significativo en los niveles de glutathion total ($p<0,001$), la capacidad antioxidante total ($p<0,01$) y la actividad glutathion peroxidasa ($p<0,01$) respecto a su grupo a la edad juvenil. También presentan un descenso no significativo en la actividad glutathion reductasa, que sí resulta serlo ($p<0,01$) al realizar la prueba “t” de Student.

Las ratas obesas adultas, al igual que en lean, muestran un descenso significativo en los niveles de glutathion total ($p<0,001$), la capacidad antioxidante total ($p<0,01$) y la actividad glutathion peroxidasa ($p<0,05$) respecto a las ratas obesas jóvenes. La actividad glutathion reductasa también muestra un descenso no significativo en ratas obesas con la edad. Cuando se realiza la prueba “t” de Student dicho descenso se manifiesta significativamente ($p<0,05$).

Por último, los resultados reflejan que las ratas obesas jóvenes muestran un aumento significativo en los niveles de glutathion total ($p<0,001$), la capacidad antioxidante total ($p<0,01$) y la actividad glutathion peroxidasa ($p<0,01$) respecto a las ratas lean adultas. Del mismo modo, la actividad glutathion reductasa también está disminuida en ratas obesas jóvenes, pero en este caso esta disminución no es significativa.

BAZO

Parámetro	ZUCKER LEAN 2M	ZUCKER FA/FA 2M	ZUCKER LEAN 6M	ZUCKER FA/FA 6M
Glutation Total (GSH) (nmol/mg tejido)	1,60±0,03 (n=10)	1,65±0,05#### (n=10)	1,12±0,04*** (n=10)	1,17±0,04*** (n=11)
Capacidad Antioxidante Total (U/mg tejido)	0,20±0,01 (n=9)	0,21±0,01## (n=9)	0,16±0,01** (n=10)	0,14±0,01** (n=10)
Actividad Glutation Peroxidasa (GPx) (mU/mg tejido)	425±13 (n=10)	432±17## (n=9)	331±19** (n=10)	360±22* (n=11)
Actividad Glutation Reductasa (GR) (mU/mg tejido)	81±2 (n=10)	77±2 (n=10)	71±3 (n=10)	70±3 (n=11)

Tabla 12. Glutation total (nmol/mg tejido), Capacidad antioxidante total (U/mg tejido), Actividad Glutation Peroxidasa (mU/mg tejido) y Actividad Glutation Reductasa (mU/mg tejido) en homogenados de bazo de ratas Zucker lean y obesas (*fa/fa*) jóvenes y adultas.

Cada dato representa la media ± E.E. del número de animales de cada grupo (entre paréntesis).

***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05 con respecto a los correspondientes valores en cada grupo de animales a la edad de 2 meses. ####p<0,001, ##p<0,01 con respecto a los correspondientes valores en ratas Zucker lean a la edad de 6 meses.

Parámetros de estrés oxidativo en timo

En el timo (**tabla 13**), las ratas obesas (*fa/fa*) a los dos meses de edad no muestran diferencias significativas respecto a sus controles lean en ambos parámetros estudiados, pero se observa cierta tendencia al aumento en los niveles de glutathion total en animales obesos. A la edad adulta, las ratas obesas muestran un descenso significativo en los niveles de glutathion total ($p<0,01$) y en la actividad glutathion reductasa ($p<0,001$) respecto a las ratas lean.

Por su parte, las ratas lean y obesas presentan significativamente menores niveles de glutathion total y de actividad glutathion reductasa ($p<0,001$) con la edad.

Por último, las ratas obesas jóvenes muestran un incremento significativo ($p<0,001$) en los niveles de glutathion total y en la actividad glutathion reductasa respecto a las ratas lean adultas.

Parámetros de estrés oxidativo en hígado

Los parámetros de estrés oxidativo analizados en hígado se muestran en la **tabla 14**.

A los dos meses de edad, las ratas obesas presentan un aumento significativo en la capacidad antioxidante total ($p<0,05$) y una disminución significativa ($p<0,05$) de la actividad glutathion reductasa respecto a las ratas lean. También muestran una disminución en la actividad glutathion peroxidasa pero que no resulta significativa. A la edad adulta, las ratas obesas presentan un descenso significativo ($p<0,01$) de la actividad glutathion peroxidasa respecto a las ratas lean, mientras que el descenso en la actividad glutathion reductasa sólo se pone de manifiesto significativamente ($p<0,01$) al realizar la prueba “t” de Student. La capacidad antioxidante total se ve aumentada en ratas obesas respecto a las ratas lean a los seis meses, resultando ser significativa esta diferencia ($p<0,05$) cuando se realiza la prueba “t” de Student.

Por su parte, las ratas lean adultas muestran una disminución no significativa de la actividad glutathion peroxidasa y significativa de la actividad glutathion reductasa ($p<0,001$) con la edad, mientras que la capacidad antioxidante total apenas se modifica. Las ratas obesas, a su vez, presentan una disminución significativa ($p<0,001$) de las

actividades glutathion peroxidasa y reductasa con la edad, no viéndose modificada la capacidad antioxidante total.

Finalmente, las ratas obesas jóvenes muestran un aumento de los tres parámetros estudiados respecto a ratas lean adultas, siendo significativo únicamente en el caso de la glutathion reductasa ($p < 0,01$).

TIMO				
Parámetro	ZUCKER LEAN 2M	ZUCKER FA/FA 2M	ZUCKER LEAN 6M	ZUCKER FA/FA 6M
Glutation Total (GSH) (nmol/mg tejido)	0,72±0,03 (n=9)	0,76±0,03#### (n=9)	0,41±0,03*** (n=8)	0,21±0,01***/●● (n=10)
Actividad Glutation Reductasa (GR) (mU/mg tejido)	33±1 (n=9)	32±1#### (n=9)	21±2*** (n=8)	9±1***/●●● (n=11)

Tabla 13. Glutation total (nmol/mg tejido) y Actividad Glutation Reductasa (mU/mg tejido) en homogenados de timo de ratas Zucker lean y obesas (fa/fa) jóvenes y adultas.

Cada dato representa la media ± E.E. del número de animales de cada grupo (entre paréntesis).

***p<0,001 con respecto a los correspondientes valores en cada grupo de animales a la edad de 2 meses. ●●●p<0,001, ●●p<0,01 con respecto a los correspondientes valores en ratas Zucker lean a cada edad. ####p<0,001 con respecto a los correspondientes valores en ratas Zucker lean a la edad de 6 meses.

HÍGADO

Parámetro	ZUCKER LEAN 2M	ZUCKER FA/FA 2M	ZUCKER LEAN 6M	ZUCKER FA/FA 6M
Capacidad Antioxidante Total (U/mg tejido)	0,17±0,01 (n=10)	0,22±0,01● (n=10)	0,19±0,01 (n=9)	0,22±0,01 (n=11)
Actividad Glutation Peroxidasa (GPx) (mU/mg tejido)	1172±32 (n=10)	1117±36 (n=10)	1052±63 (n=10)	818±17***/●● (n=11)
Actividad Glutation Reductasa (GR) (mU/mg tejido)	132±5 (n=10)	113±5●/## (n=10)	88±5*** (n=10)	72±3*** (n=11)

Tabla 14. Capacidad antioxidante total (U/mg tejido), Actividad Glutation Peroxidasa (mU/mg tejido) y Actividad Glutation Reductasa (mU/mg tejido) en homogenados de hígado de ratas Zucker lean y obesas (fa/fa) jóvenes y adultas.

Cada dato representa la media ± E.E. del número de animales de cada grupo (entre paréntesis).

***p<0,001 con respecto a los correspondientes valores en cada grupo de animales a la edad de 2 meses. ●●p<0,01, ●p<0,05 con respecto a los correspondientes valores en ratas Zucker lean a cada edad. ##p<0,01 con respecto a los correspondientes valores en ratas Zucker lean a la edad de 6 meses.

Estudio del perfil metabólico

En este estudio se expone una visión global, general de los cambios relacionados con la edad, asociados al perfil metabólico del tejido hepático, cardiaco y del adiposo blanco de ratas Zucker obesas (*fa/fa*) jóvenes y adultas en comparación con sus correspondientes controles Zucker lean.

Caracterización del perfil metabólico hepático

La **figura 18A** muestra un espectro típico obtenido de los extractos polares del tejido hepático. El perfil metabólico del hígado se caracteriza por niveles elevados de betaina, glucosa, fosfocolina, glutatión, lactato, alanina e inosina.

Para visualizar el conjunto de datos y eliminar los potenciales valores atípicos, se realizó el análisis de componentes principales (Principal Component Analysis – PCA) no supervisado de los extractos polares hepáticos en todos los grupos de estudio (ratas Zucker lean y *fa/fa* a los 2 y 6 meses de edad). La **figura 17** refleja este análisis, el cual muestra una clara separación entre las ratas *fa/fa* y las lean a lo largo del primer componente principal representado por el 23% de la variación total en el conjunto de los datos. Para apreciar más específicamente los cambios metabólicos atribuidos a un único factor, se llevaron a cabo modelos discriminantes por pares utilizando un algoritmo CF-PLS (Cross- Fitted Projection on Latent Structure). Los modelos de regresión de mínimos cuadrados parciales (CF-PLS model parameters) se resumen en la **tabla 15**.

Los metabolitos hepáticos que son significativamente diferentes entre los grupos estudiados están representados en la **figura 18B**. Los colores azules están asociados con diferencias marcadas en el perfil metabólico perteneciente a las ratas lean (*fa/+*), mientras que los colores naranjas están asociados a las ratas obesas (*fa/fa*). Secciones ampliadas de la región alifática del espectro promedio (obtenido a partir de los diferentes espectros de todos los individuos de cada grupo), ilustran las principales diferencias significativas en los grupos de ratas *fa/+* y *fa/fa* respectivamente.

Para todos los análisis metabonómicos, la dotación genética (genetic background) se caracterizó por los marcadores metabólicos comunes asociados con cada mutación en ambas edades. Esto se refleja en la **figura 18** por los altos niveles de betaina comunes en ratas lean (*fa/+*) comparado con ratas (*fa/fa*) en cada edad

estudiada. Por el contrario, el grupo de ratas *fa/fa* se caracteriza por altos niveles de fosfocolina y glutamina a ambas edades, en comparación con sus controles lean. De igual manera, el factor edad se caracteriza por una reducción en los niveles de acetato y un incremento de los lípidos residuales con la edad.

Por último, se describe la influencia de la dotación genética en ratas obesas (*fa/fa*), a cada edad. A los dos meses, las ratas Zucker *fa/fa* muestran específicamente altos niveles de glucosa, glutation, hipotaurina y lípidos residuales mientras que la concentración de alanina es relativamente baja en comparación con el grupo de ratas lean a la misma edad. A la edad adulta (seis meses), las ratas Zucker *fa/fa* presentan altos niveles de lípidos residuales en comparación con sus controles heterocigotos lean (**figura 18**). Además, se observa que el glutation y la hipotaurina se incrementan específicamente con la edad en ratas lean (*fa/+*). Es interesante mencionar que el glutation se encuentra en altas concentraciones en el grupo de ratas lean a los seis meses, y en ambos grupos de ratas *fa/fa* respecto a las ratas lean a los dos meses de edad (**figura 19**). Mientras que el glutation permanece a un nivel constante en ratas *fa/fa* con la edad, los niveles de glutamina están significativamente incrementados a los seis meses. Finalmente, este grupo de ratas obesas, que muestra niveles predominantes de glucosa e inosina a los dos meses de edad, presenta un descenso significativo de estos metabolitos con la edad mientras que la glutamina aumenta sus niveles (**figura 18**).

Tabla 25. Modelos de regresión de mínimos cuadrados parciales (CF-PLS model parameters).

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. NS: no significativo.

Hígado: Liver; Corazón: Heart; Tejido Adiposo blanco: White adipose tissue (WAT)

(*fa/+*): ratas Zucker lean; (*fa/fa*): ratas Zucker obesas; 2M: 2 Meses; 6M: 6 Meses.

	Liver		Heart		WAT	
Model	R^2Y	P value	R^2Y	P value	R^2Y	P value
<i>fa/+</i> 2M vs 6M	0.39	0.03*	0.25	0.10	0.77	$3.11 \cdot 10^{-4}***$
<i>fa/fa</i> 2M vs 6M	0.56	0.005**	0.36	0.05	0.72	$6.94 \cdot 10^{-4}***$
<i>fa/+</i> vs <i>fa/fa</i> at 2M	0.79	$1.26 \cdot 10^{-4}***$	0.40	0.04*	0.86	$3.84 \cdot 10^{-5}***$
<i>fa/+</i> vs <i>fa/fa</i> at 6M	0.53	0.008**	~ 0	NS	0.64	0.002**
<i>fa/+</i> at 6M vs <i>fa/fa</i> at 2M	0.60	0.003**	0.11	NS	~ 0	NS

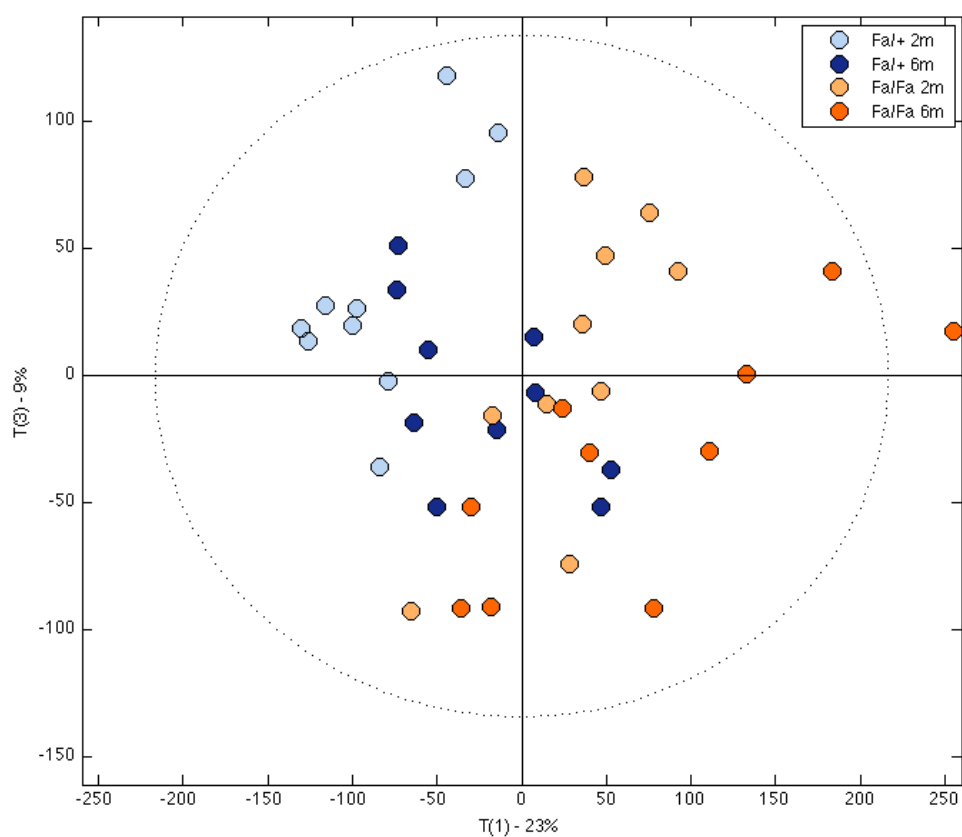


Figura 17. Análisis de componentes principales (Principal component analysis-PCA) de los perfiles metabólicos de ^1H RMN derivados de extractos polares hepáticos.
(*fa/+*): ratas Zucker lean; (*fa/fa*): ratas Zucker obesas; 2m: 2 meses; 6m: 6 meses.

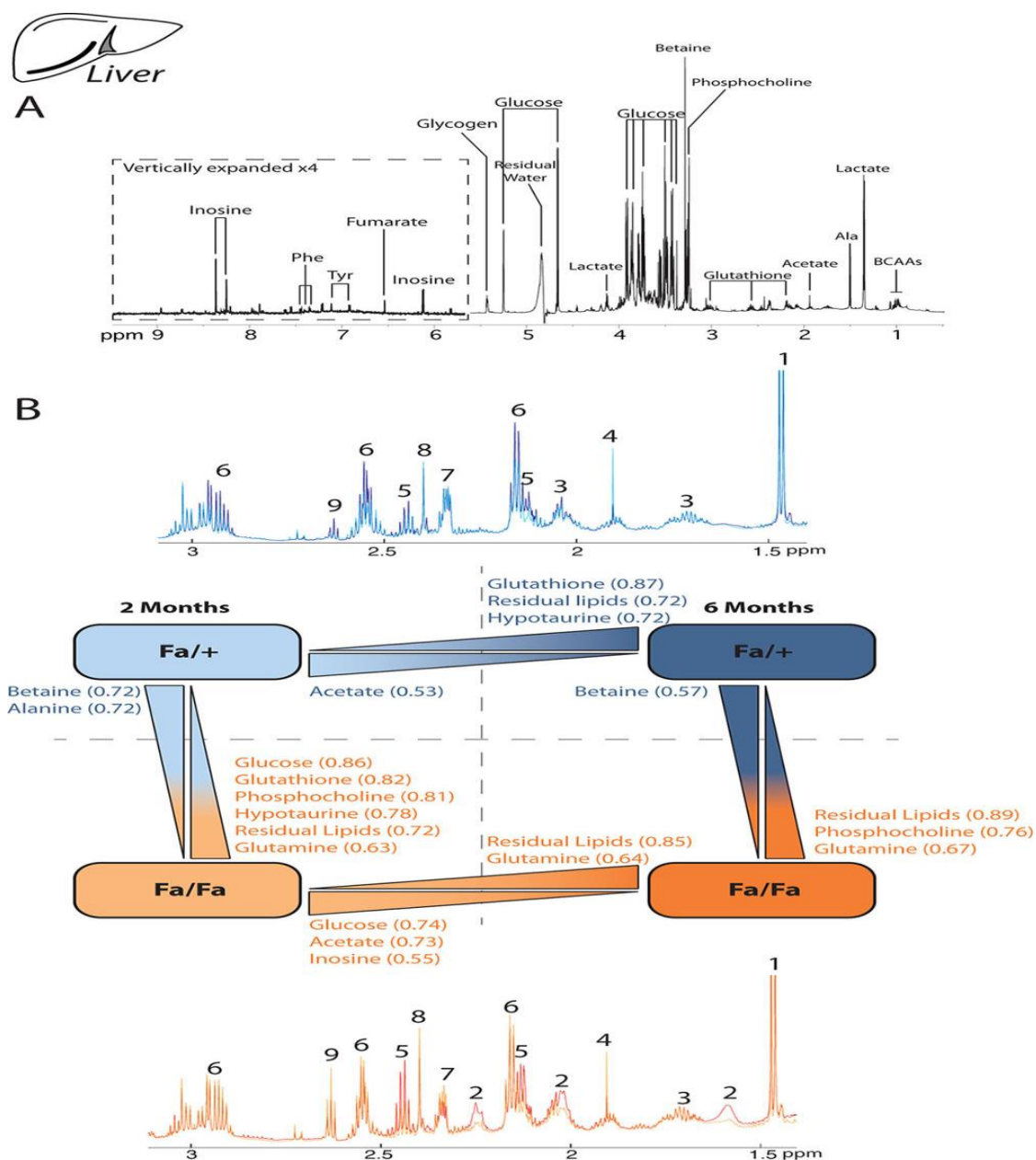


Figura 18. Espectro típico de ^1H RMN 700 MHz derivado de extractos polares de hígado (A). (Inosine: inosina; Phe: fenilalanina; Tyr: tirosina; fumarate: fumarato; glycogen: glucógeno; glucose: glucosa; residual water: agua residual; lactate: lactato; betaine: betaina; phosphocholine: fosfocolina; glutathione: glutation; acetate: acetato; ala: alanina; BCAAs: Branched-Chain Amino Acids- aminoácidos de cadena ramificada).

Espectro ^1H RMN promedio obtenido de los extractos polares de hígado (B) de ratas Zucker lean (fa/+) (azul claro: 2 meses/months; azul oscuro: 6 meses/months) y Zucker obesas (fa/fa) (naranja claro: 2 meses; naranja oscuro: 6 meses).

Las diferencias metabólicas significativas extraídas de las comparaciones por pares se resumen en el panel central. Las flechas dobles indican los modelos por pares donde se muestran los metabolitos más próximos al grupo en el cual están en mayor concentración. Los números entre paréntesis corresponden a la correlación entre el metabolito y los resultados derivados de la regresión de mínimos cuadrados parciales (Projection on Latent Structure- PLS regression). Clave: 1: lactato; 2: lípidos residuales; 3: lisina; 4: acetato; 5: glutamina; 6: glutatión; 7: glutamato; 8: succinato; 9: hipotaurina. (Betaine: betaina; alanine: alanina; acetate: acetato; glucose: glucosa; glutathione: glutatión; phosphocholine: fosfocolina; hypotaurine: hipotaurina; residual lipids: lípidos residuales; glutamine: glutamina; inosine: inosina).

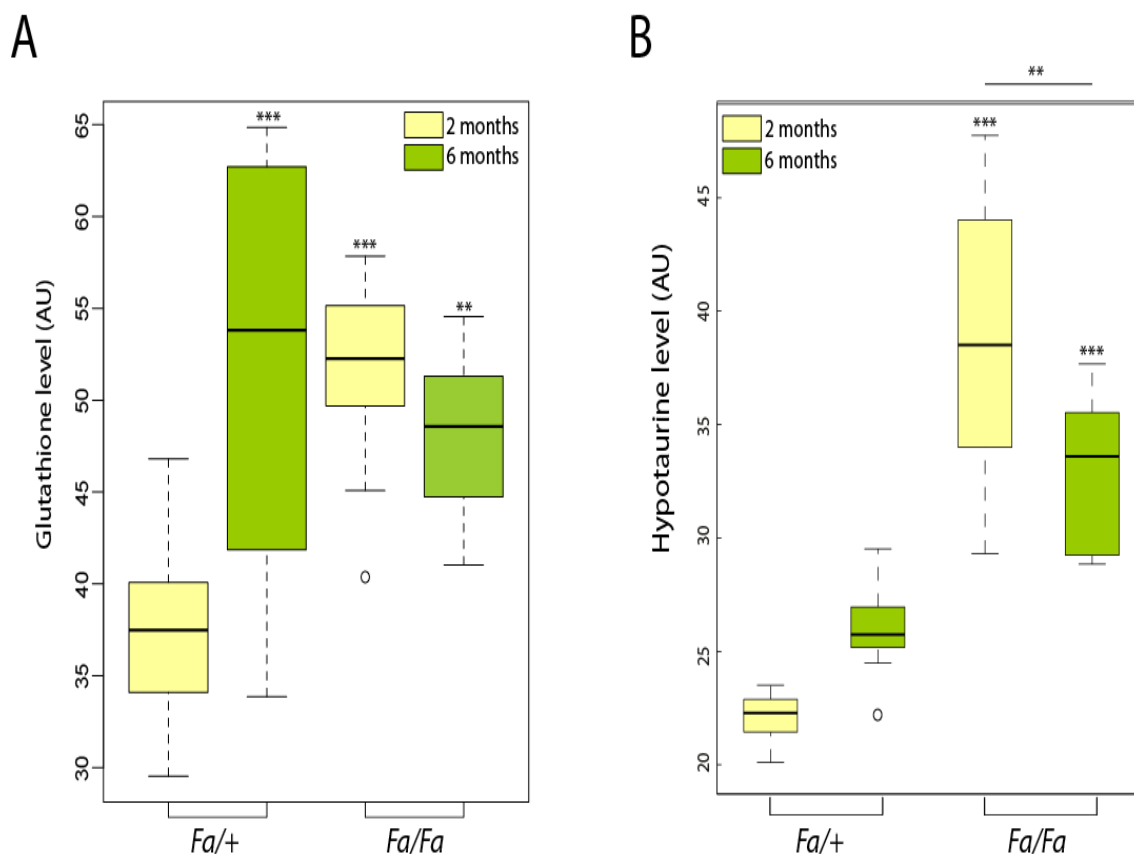


Figura 19. Niveles relativos hepáticos de glutathione (A) e hipotaurina (B).

(*fa/+*): ratas Zucker lean; (*fa/fa*): ratas Zucker obesas; 2 months: 2 meses; 6 months: 6 meses.

Glutathione level (AU): niveles de glutathione (unidades arbitrarias); Hypotaurine level (AU): niveles de hipotaurina (unidades arbitrarias).

ANOVA (glutathione): factor dotación genética: $p = 0,022$; factor edad: $p = 0,009$; interacción entre dotación genética y edad: $p = 0,0002$.

ANOVA (hipotaurina): factor dotación genética: $p = 2,02E-12$; factor edad: $p = 0,335$; interacción entre dotación genética y edad: $p = 1,45E-4$.

Test de comparaciones múltiples (Tuckey HSD): *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ con respecto a los correspondientes valores en ratas Zucker lean (*fa/+*) a la edad de dos meses.

Los niveles de glutathione e hipotaurina se estimaron en base a la integración de las resonancias a 2,55 (m) ppm y 2,63 (t) ppm respectivamente, donde se observó que no existía solapamiento con otro compuesto.

Caracterización del perfil metabólico cardiaco

La **figura 21A** representa un espectro (700 MHz ^1H RMN) típico derivado de extractos polares de tejido cardiaco. El perfil metabólico del corazón está dominado por altos niveles de lactato, creatina, taurina y escilo-inositol. El predominio de las

concentraciones de lactato, taurina, y creatina en este tejido es típico del importante remplazo energético de este activo músculo.

El análisis de componentes principales (PCA) obtenido del análisis de los extractos polares cardiacos se representa en la **figura 20**. En ella se pone de manifiesto que las ratas Zucker lean *fa/+* a los dos meses se agrupan de forma independiente respecto a los demás grupos de animales. Se llevó a cabo el análisis por pares (CF-PLS) y en la **figura 21B** se muestra un resumen de las principales diferencias observadas en los perfiles metabólicos cardiacos.

En comparación a lo que se observa en los perfiles metabólicos del hígado, no se identifican variaciones comunes debidas a la dotación genética o a la edad en el tejido cardiaco. Sin embargo, sí es posible identificar claros patrones metabólicos asociados con cada dotación genética a las distintas edades estudiadas.

El grupo de ratas obesas *fa/fa* muestra altos niveles de fosfocolina, creatina, colina y taurina y bajos niveles de lactato y escilo-inositol en comparación con las ratas lean a los dos meses de edad. Además, los niveles de citidina, acetato, fosfocolina y taurina decrecen en el paso de dos a seis meses en ratas *fa/fa*.

En el grupo de ratas lean *fa/+*, los resultados revelan altos niveles de escilo-inositol a la edad de dos meses. Este metabolito muestra un descenso con la edad, mientras que la creatina se encuentra en alta concentración a los seis meses de edad. Es interesante destacar que el grupo de ratas lean a los seis meses y el de ratas obesas a los dos meses muestran perfiles metabólicos similares por lo que no son estadísticamente diferentes (**figura 21B y tabla 15**).

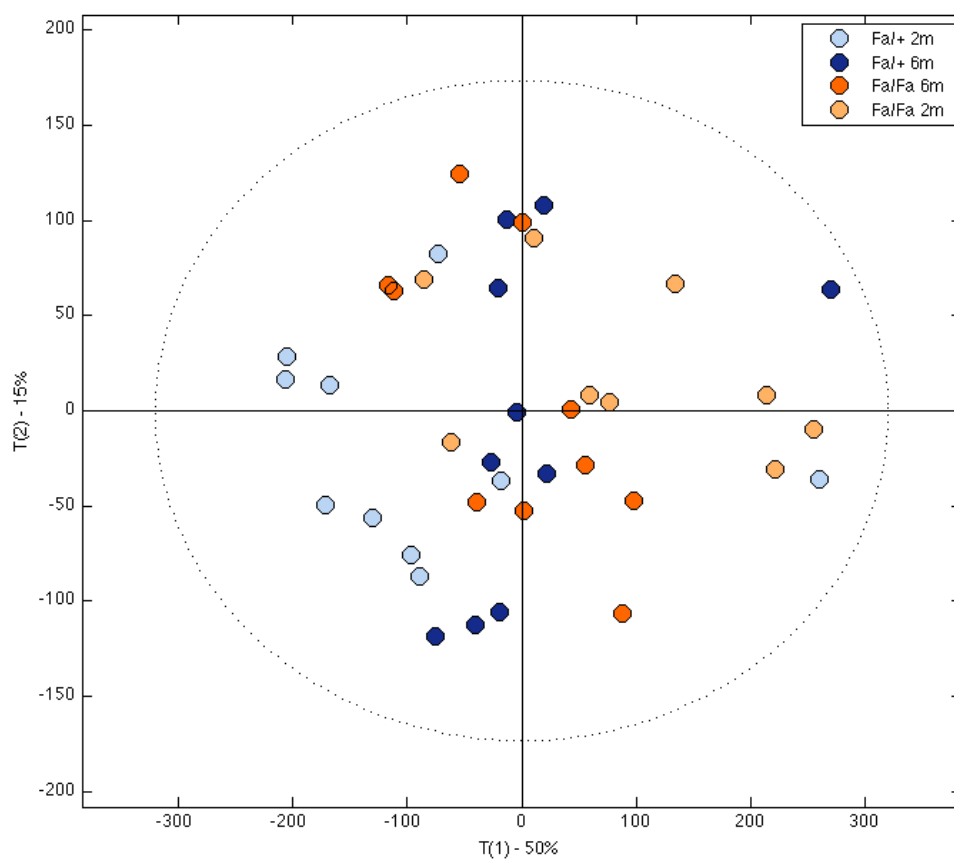


Figura 20. Análisis de componentes principales (Principal component analysis-PCA) de los perfiles metabólicos de ^1H RMN derivados de extractos polares de corazón.
(*fa/+*): ratas Zucker lean; (*fa/fa*): ratas Zucker obesas; 2m: 2 meses; 6m: 6 meses.

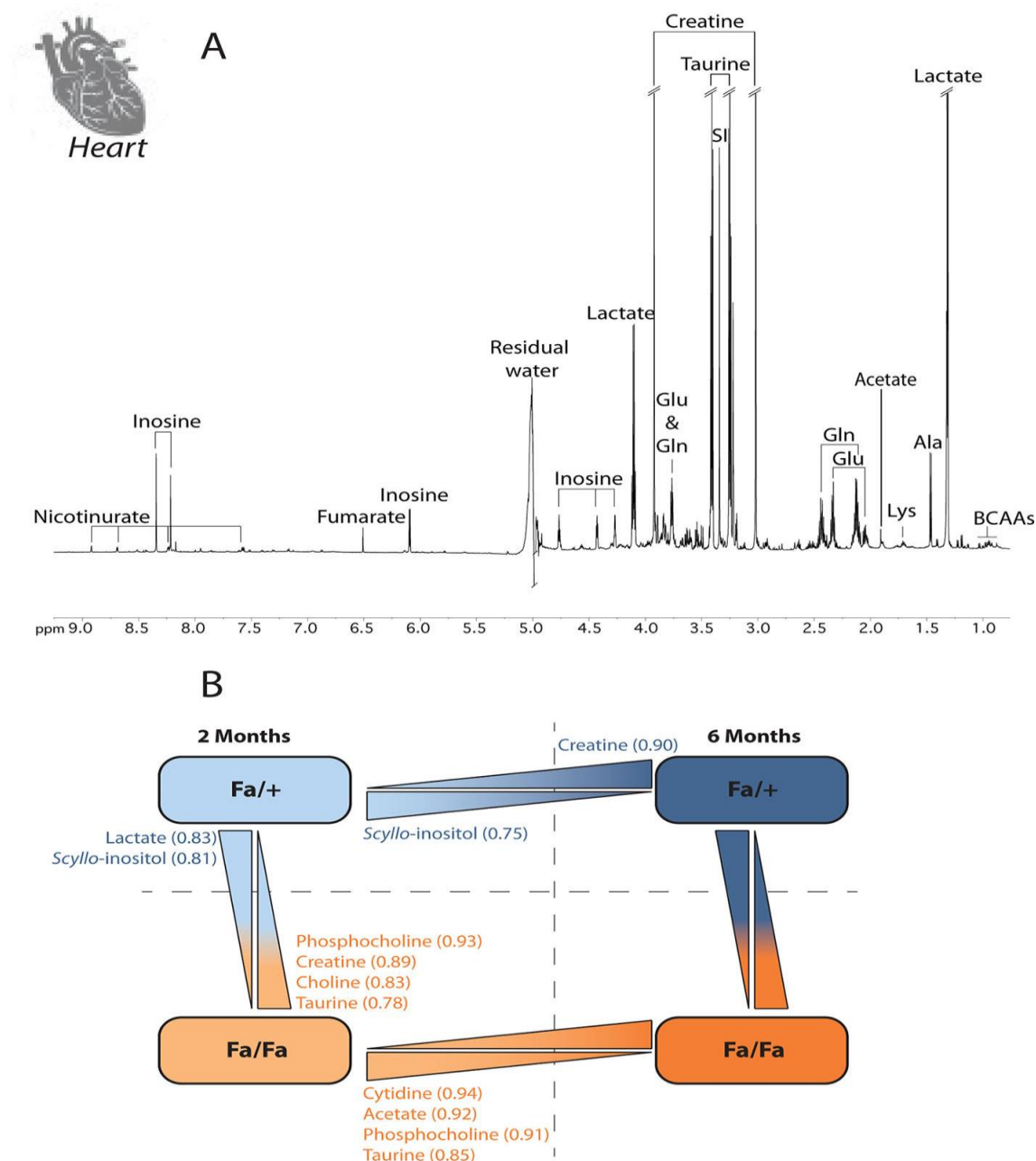


Figura 21. Espectro típico de ^1H RMN 700 MHz obtenido en extratos polares cardiacos (A).

(Nicotinurate: nicotinurato; inosine: inosina; fumarate: fumarato; residual water: agua residual; lactate: lactato; Glu: glutamato; Gln: glutamina; creatine: creatina; taurine: taurina; SI: escilo-inositol; acetate: acetato; lys: lisina; ala: alanina; BCAAs: Branched-Chain Amino Acids- aminoácidos de cadena ramificada).

Diferencias metabólicas significativas extraídas de las comparaciones por pares (B) en ratas Zucker lean: (fa/+) (azul claro: 2 meses/months; azul oscuro: 6 meses/months) y Zucker obesas: (fa/fa) (naranja claro: 2 meses; naranja oscuro: 6 meses).

Las flechas dobles indican los modelos por pares donde se muestran los metabolitos más próximos al grupo en el cual están en mayor concentración. Los números entre paréntesis corresponden a la correlación entre el metabolito y los resultados derivados de la regresión de mínimos cuadrados parciales (Projection on Latent Structure- PLS regression). (Lactate: lactato; scyllo-inositol: escilo-inositol; phosphocholine: fosfocolina; creatine: creatina; choline: colina; taurine: taurina; cytidine: citidina; acetate: acetato).

Caracterización del perfil metabólico del tejido adiposo blanco

La **figura 22** muestra el gráfico de PCA derivado de los perfiles metabólicos ^1H RMN de extractos polares del tejido adiposo. En este análisis se pone de manifiesto que las ratas lean *fa/+* a los seis meses forman un grupo independiente respecto a los otros tres grupos de animales. La **figura 23A** representa un espectro típico de los extractos polares de tejido adiposo blanco. Este perfil metabólico se caracteriza por altos niveles de lactato, creatina, glicerol, colina y sus fosfoderivados (fosfocolina (PC) y glicerofosfocolina (GPC)) y taurina; un perfil que comparte muchas características comunes con los adipocitos humanos.

La **figura 23B** muestra las principales diferencias metabólicas obtenidas entre los grupos de animales estudiados. La dotación genética se caracteriza por cantidades elevadas y constantes de hipotaurina en ratas obesas *fa/fa* en comparación con las ratas lean *fa/+*. También se observa que los niveles de glicerofosfocolina son considerablemente más elevados en ambos grupos de animales a los dos meses en comparación con los seis meses, lo que indica un efecto común de la edad.

Por su parte las ratas Zucker lean jóvenes presentan mayores niveles de citidina, uracilo, glicina, tirosina, mio-inositol, fenilalanina, creatina y glicerol en comparación con su mismo grupo a la edad adulta. Por otro lado, la colina y la creatina se encuentran incrementadas a los dos meses en ratas lean en comparación con los animales obesos a la misma edad.

En cuanto a las ratas obesas *fa/fa* jóvenes, se observa que presentan altos niveles de glicógeno, inosina, taurina y glucosa y bajos niveles de colina en comparación con los animales adultos. A los seis meses de edad, las ratas obesas exhiben altos niveles de glicerol, fumarato, uracilo, glicerofosfocolina, fenilalanina, tirosina, lactato, alanina y fosfocolina en comparación con sus controles lean a la misma edad.

Finalmente, la comparación estadística entre el grupo de ratas lean a los seis meses de edad y el de ratas obesas a los dos meses, no resultó significativa, lo que indica que estos dos grupos son indistinguibles en términos de perfil metabólico (**tabla 15**).

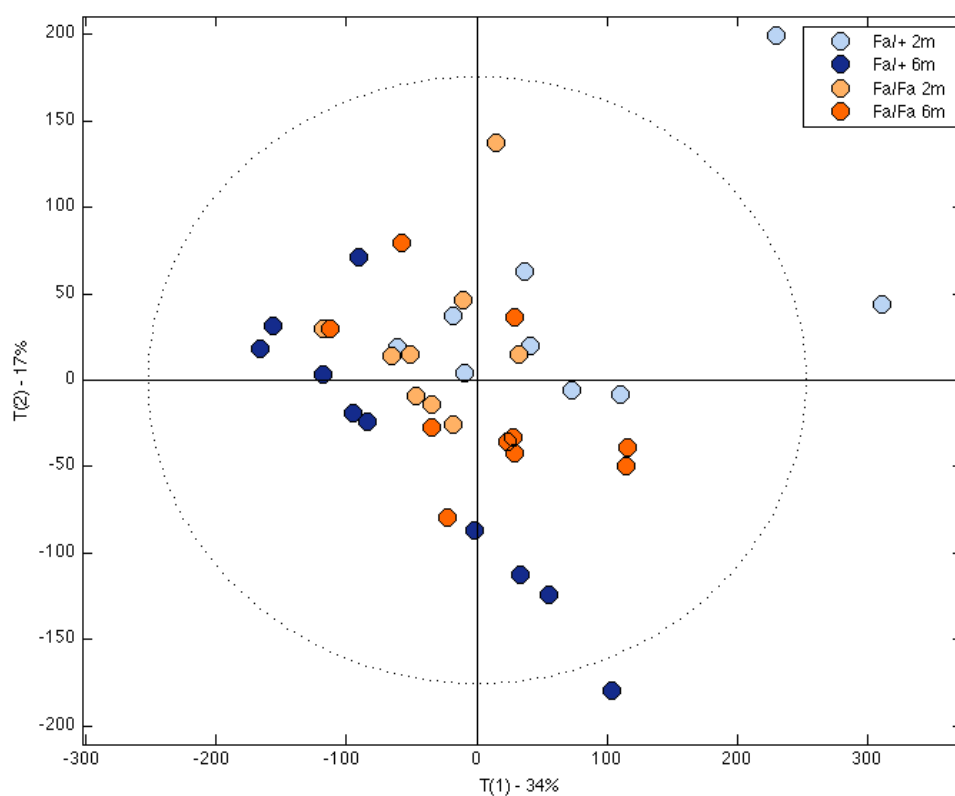


Figura 22. Análisis de componentes principales (Principal component analysis-PCA) de los perfiles metabólicos de ^1H RMN derivados de extractos polares de adipocitos. (*fa/+*): ratas Zucker lean; (*fa/fa*): ratas Zucker obesas; 2m: 2 meses; 6m: 6 meses.

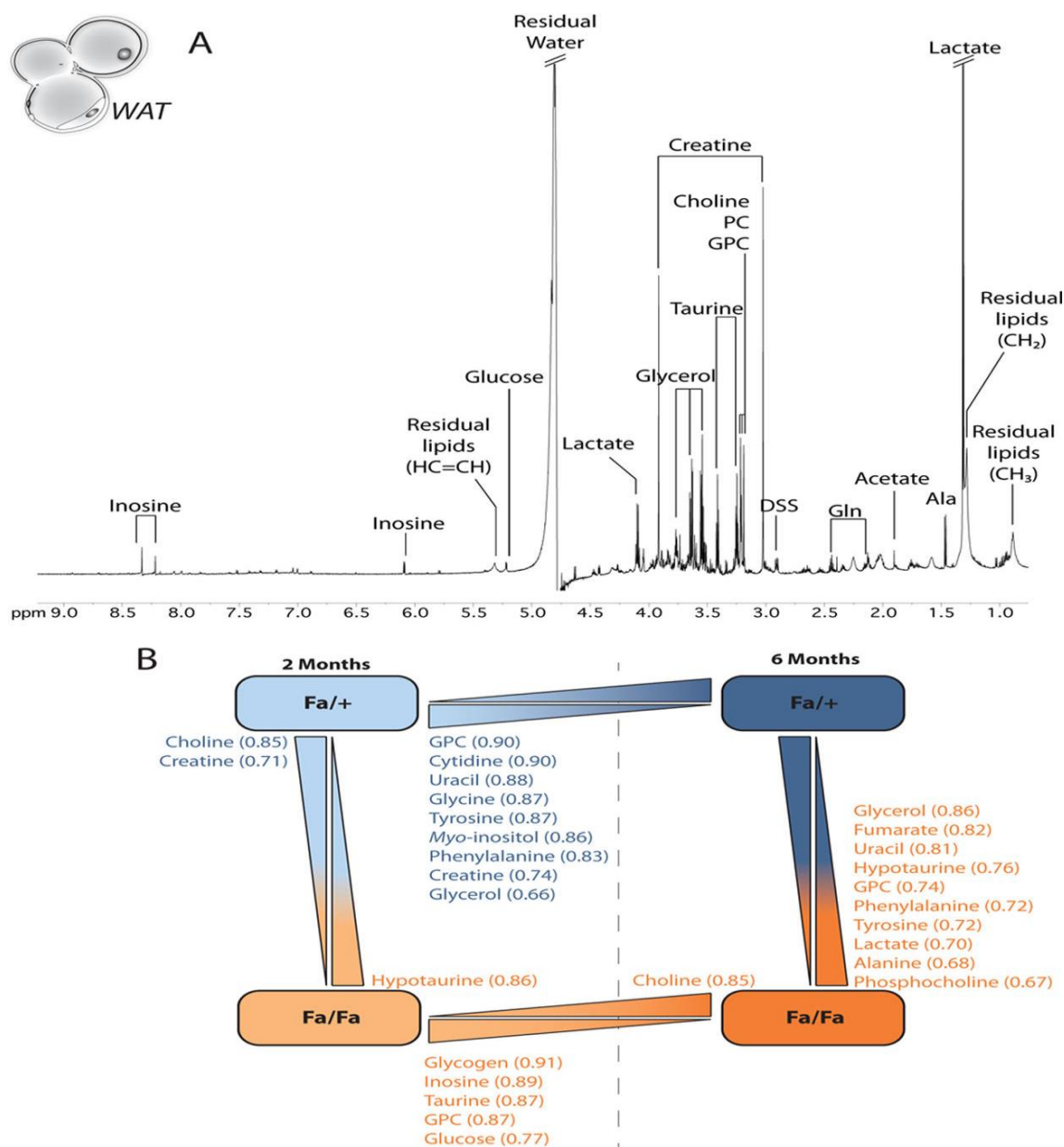


Figura 23. Espectro típico de ^1H RMN 700 MHz derivado de extratos polares de tejido adiposo blanco (A).

(Inosine: inosina; residual lipids: lípidos residuales; glucose: glucosa; residual water: agua residual; lactate: lactato; creatine: creatina; choline: colina; PC: fosfocolina; GPC: glicerofosfocolina; taurine: taurina; glycerol: glicerol; DSS: sal sódica de 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato; Gln: glutamina; acetate: acetato; ala: alanina).

Diferencias metabólicas significativas extraídas de las comparaciones por pares (B) en ratas Zucker lean: (fa/+) (azul claro: 2 meses/months; azul oscuro: 6 meses/months) y Zucker obesas: (fa/fa) (naranja claro: 2 meses; naranja oscuro: 6 meses).

Las flechas dobles indican los modelos por pares donde se muestran los metabolitos más próximos al grupo en el cual están en mayor concentración. Los números entre paréntesis corresponden a la correlación entre el metabolito y los resultados derivados de la regresión de mínimos cuadrados parciales (Projection on Latent Structure- PLS regression). (Choline: colina; creatine: creatina; GPC: glicerofosfocolina; cytidine: citidina; uracil: uracilo; glycine: glicina; tyrosine: tirosina; myo-inositol: mio-inositol; phenylalanine: fenilalanina; creatine: creatina; glycerol: glicerol; hypotaurine: hipotaurina; glycogen: glucógeno; inosine: inosina; taurine: taurina; glucose: glucosa; fumarate: fumarato; lactate: lactato; alanine: alanina; phosphocholine: fosfocolina).

4.1.2. EFECTO DEL EJERCICIO FÍSICO EN RATAS MACHO GENÉTICAMENTE OBESAS ADULTAS. ESTUDIO INMUNOLÓGICO Y DE ESTRÉS OXIDATIVO

En el presente objetivo, los resultados del estudio del efecto del ejercicio físico en ratas genéticamente obesas se recogen en las **figuras 24-25** y en las **tablas 16-20**. Los animales empleados fueron ratas Zucker (*fa/fa*) adultas que se clasificaron en los siguientes grupos:

- Ratas Zucker (*fa/fa*) sedentarias (S).
- Ratas Zucker (*fa/fa*) entrenadas (E).
- Ratas Zucker (*fa/fa*) sedentarias y sometidas a un golpe de ejercicio agudo (S+EA) previo al sacrificio.
- Ratas Zucker (*fa/fa*) entrenadas y sometidas a un golpe de ejercicio agudo (E+EA) previo al sacrificio.

Se muestran los resultados del estudio de varias funciones inmunitarias en leucocitos de bazo (actividad “Natural Killer”, respuesta proliferativa y niveles de TNF- α) y de parámetros de estrés oxidativo en bazo e hígado (capacidad antioxidante total, niveles de GSH, así como actividades de las enzimas XO, GPx y GR). Asimismo, se recogen los resultados del peso corporal y de la glucemia antes del sacrificio, así como del peso relativo de los distintos órganos extraídos tras el sacrificio de los animales.

Para cada parámetro analizado, se estudió el efecto del entrenamiento, es decir, se compararon las ratas obesas entrenadas con sus correspondientes controles, las ratas sedentarias. Por otra parte, se analizó el efecto del ejercicio agudo en animales sedentarios y entrenados, es decir, se compararon tanto las ratas sedentarias como las entrenadas con su correspondiente grupo que había recibido el golpe de ejercicio agudo.

Además, se efectuó la comparación existente entre ambos grupos de ratas sedentarias y entrenadas que recibieron el golpe de ejercicio agudo.

4.1.2.1. Efecto del ejercicio físico sobre el peso corporal, en el momento del sacrificio.

Los resultados obtenidos del estudio del peso corporal de los animales antes del sacrificio, se presentan en la **figura 24**. Las ratas sometidas al programa de entrenamiento muestran una disminución significativa ($p<0,001$) del peso corporal respecto a las ratas sedentarias que no fueron sometidas a entrenamiento físico. También se observa que el ejercicio agudo no provoca pérdida de peso en animales sedentarios ni en entrenados. Por otra parte, sí que se observa una disminución significativa ($p<0,001$) del peso en animales entrenados y sometidos a ejercicio agudo respecto a los sedentarios sometidos a ejercicio agudo.

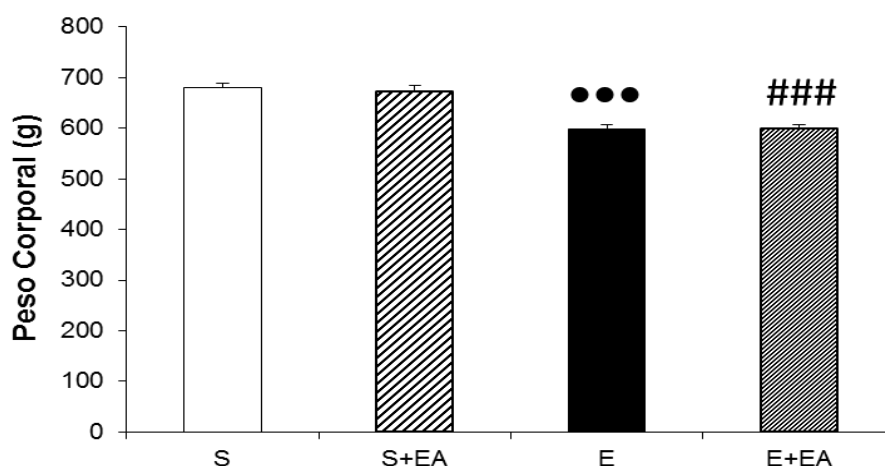


Figura 24. Peso corporal (g) en ratas Zucker obesas (*fa/fa*) sedentarias (S), sedentarias con golpe de ejercicio agudo (S+EA), entrenadas (E) y entrenadas con golpe de ejercicio agudo (E+EA), en el momento del sacrificio.

Cada columna representa la media $\pm$ E.E. del número de animales de cada grupo (S y S+EA $n=10$; E $n=9$; E+EA $n=11$).

••• $p<0,001$ con respecto a los correspondientes valores en ratas sedentarias. ### $p<0,001$ con respecto a los correspondientes valores en ratas sedentarias con golpe de ejercicio agudo.

4.1.2.2. Efecto del ejercicio físico sobre el peso relativo de los distintos órganos extraídos tras el sacrificio.

En la **tabla 16** se recogen los datos del estudio de los órganos extraídos (hígado, corazón, grasa epididimal y grasa lumbar) de los diferentes grupos de ratas, tras el

sacrificio. Se muestran los resultados obtenidos del % de peso relativo del órgano con respecto al peso corporal del animal, obtenido mediante la siguiente expresión: (peso del órgano (g) /peso corporal del animal (g)) x100.

En hígado, encontramos que el % de peso relativo apenas disminuye en animales entrenados, en comparación con los animales sedentarios. Por otro lado, el ejercicio agudo disminuye el % de peso relativo en ambos grupos de ratas respecto al grupo de animales que no lo realizaron. En ninguno de los casos se observan diferencias significativas.

El % de peso relativo del corazón en ratas entrenadas resulta ser significativamente mayor ($p<0,01$) que en ratas sedentarias. Por otra parte, el ejercicio agudo no modifica el peso relativo de este órgano en ninguno de los grupos de ratas estudiado. También se observa que el peso relativo en ratas entrenadas que realizaron el ejercicio agudo es significativamente mayor ($p<0,001$) en comparación con el grupo de ratas sedentarias que también realizaron el golpe de ejercicio agudo.

El % de peso relativo de la grasa epididimal encontrado en ratas entrenadas que realizaron ejercicio agudo resulta ser inferior al encontrado en los demás grupos de animales, pero no se observan diferencias significativas.

Las ratas entrenadas muestran un % de peso relativo de grasa lumbar superior al encontrado en ratas sedentarias, sin embargo esta diferencia no resulta estadísticamente significativa. El ejercicio agudo incrementa el peso relativo de esta grasa en ratas sedentarias, donde tampoco se observan diferencias significativas. Nuevamente encontramos que el ejercicio agudo en ratas entrenadas disminuye el % de peso relativo de la grasa lumbar, siendo inferior al encontrado en los demás grupos de animales, sin embargo no se observan diferencias significativas.

Tabla 16. % de peso relativo de cada órgano (extraído en el sacrificio), respecto al peso corporal (g), en ratas Zucker obesas (fa/fa) sedentarias, sedentarias con golpe de ejercicio agudo (EA), entrenadas y entrenadas con golpe de ejercicio agudo (EA).

Cada dato representa la media $\pm$ E.E. del número de animales de cada grupo (S y S+EA n=10; E n=9; E+EA n=11).

●●p<0,01 con respecto a los correspondientes valores en ratas sedentarias. ###p<0,001 con respecto a los correspondientes valores en ratas sedentarias con golpe de ejercicio agudo.

ÓRGANO	% PESO RELATIVO RESPECTO AL PESO CORPORAL			
	Sedentarias	Sedentarias + EA	Entrenadas	Entrenadas + EA
Hígado	3,58 $\pm$ 0,12	3,38 $\pm$ 0,11	3,54 $\pm$ 0,18	3,39 $\pm$ 0,11
Corazón	0,24 $\pm$ 0,003	0,24 $\pm$ 0,005	0,27 $\pm$ 0,005●●	0,27 $\pm$ 0,004###
Grasa epididimal	3,28 $\pm$ 0,17	3,31 $\pm$ 0,08	3,30 $\pm$ 0,20	3,11 $\pm$ 0,10
Grasa lumbar	5,19 $\pm$ 0,26	5,46 $\pm$ 0,24	5,56 $\pm$ 0,17	5,01 $\pm$ 0,15

4.1.2.3. Efecto del ejercicio físico sobre la glucemia, en el momento del sacrificio.

Los resultados obtenidos del estudio de la glucemia de los animales, se presentan en la **tabla 17**, donde se observa que los mayores niveles de glucosa se encuentran en ambos grupos de ratas entrenadas. El entrenamiento eleva la glucemia, en cambio no se observan diferencias significativas respecto a las ratas sedentarias. El ejercicio agudo, por su parte, disminuye los niveles de glucosa en sangre tanto en ratas sedentarias como entrenadas, pero no se encuentran diferencias significativas respecto al grupo de ratas que no lo realizan. El aumento de la glucemia en ratas entrenadas que realizan ejercicio agudo, sí resulta ser estadísticamente significativo (p<0,05) respecto al grupo de ratas sedentarias que también lo realizan.

Tabla 17. Glucemia (mg/dl) en ratas Zucker obesas (*fa/fa*) sedentarias, sedentarias con golpe de ejercicio agudo (EA), entrenadas y entrenadas con golpe de ejercicio agudo (EA), en el momento del sacrificio.

Cada dato representa la media $\pm$ E.E. del número de animales de cada grupo (entre paréntesis).
$p < 0,05$ con respecto a los correspondientes valores en ratas sedentarias con golpe de ejercicio agudo.

	Sedentarias	Sedentarias + EA	Entrenadas	Entrenadas + EA
Glucemia (mg/dl)	302 $\pm$ 20 (<i>n</i> =10)	290 $\pm$ 15 (<i>n</i> =10)	367 $\pm$ 15 (<i>n</i> =9)	357 $\pm$ 17# (<i>n</i> =11)

4.1.2.4. Efecto del ejercicio físico sobre varios parámetros de función inmunitaria de leucocitos de bazo.

Una vez sacrificados los animales, se procedió a la extracción del bazo y se analizaron diferentes parámetros de funcionalidad inmunitaria como la actividad “Natural Killer” de los leucocitos y la respuesta proliferativa a los mitógenos LPS y PHA. Asimismo, se estudiaron los niveles de liberación de TNF- α medidos en los sobrenadantes de cultivo de 48 horas estimulados con LPS, a la concentración de 1 μ g/ml. Todos estos resultados se muestran en la **tabla 18**.

En relación a la actividad “Natural Killer” encontramos que el entrenamiento no modifica dicha actividad y que el ejercicio agudo la disminuye ligeramente en ambos grupos de animales. Estas diferencias no resultan estadísticamente significativas.

Respecto a la respuesta proliferativa a los mitógenos LPS y PHA, medida como el % de linfoproliferación, las ratas entrenadas presentan una menor proliferación en comparación con las sedentarias que no resulta significativa. El golpe de ejercicio agudo disminuye la proliferación en ratas sedentarias mientras que la aumenta notablemente en ratas entrenadas. En ningún caso dichas diferencias se manifiestan de forma significativa. El incremento que se observa en la proliferación en animales entrenados

con ejercicio agudo respecto a los sedentarios que también lo realizaron, tampoco resulta estadísticamente significativo.

Por su parte, los niveles de TNF- α aumentan en animales entrenados respecto a los animales sedentarios, no siendo significativo este aumento. El ejercicio agudo disminuye significativamente ($p<0,001$) estos niveles en ratas sedentarias, mientras que los aumenta muy ligeramente en entrenadas. La liberación de TNF- α por parte de las ratas entrenadas que realizaron ejercicio agudo presenta un incremento significativo ($p<0,001$) respecto al grupo de ratas sedentarias que también lo realizaron.

Tabla 18. Parámetros de función inmunitaria de leucocitos de bazo en ratas Zucker obesas (fa/fa) sedentarias, sedentarias con golpe de ejercicio agudo (EA), entrenadas y entrenadas con golpe de ejercicio agudo (EA).

Cada dato representa la media $\pm$ E.E. del número de animales de cada grupo (entre paréntesis). *** $p<0,001$ con respecto a los correspondientes valores de su mismo grupo sin golpe de ejercicio agudo. ### $p<0,001$ con respecto a los correspondientes valores en ratas sedentarias con golpe de ejercicio agudo.

BAZO				
Parámetro	Sedentarias	Sedentarias + EA	Entrenadas	Entrenadas + EA
Actividad "Natural Killer" (NK) (% de lisis)	36 $\pm$ 2 (n=7)	32 $\pm$ 2 (n=7)	38 $\pm$ 2 (n=7)	33 $\pm$ 4 (n=7)
% de Linfoproliferación (LPS)	230 $\pm$ 45 (n=7)	185 $\pm$ 31 (n=7)	187 $\pm$ 39 (n=7)	340 $\pm$ 126 (n=7)
% de Linfoproliferación (PHA)	472 $\pm$ 73 (n=7)	369 $\pm$ 82 (n=7)	411 $\pm$ 97 (n=7)	541 $\pm$ 117 (n=7)
Niveles de TNF- α (pg/ml)	279 $\pm$ 21 (n=7)	152 $\pm$ 16*** (n=7)	320 $\pm$ 14 (n=7)	325 $\pm$ 11### (n=7)

4.1.2.5. Efecto del ejercicio físico sobre parámetros de estrés oxidativo.

Tras el sacrificio de los animales, además de extraer el bazo, se obtuvo el hígado y en ellos se analizaron diferentes parámetros de estrés oxidativo como el contenido intracelular de glutathion total (GSH), la capacidad antioxidante total, y la actividades de las enzimas xantina oxidasa (XO), glutathion peroxidasa (GPx) y glutathion reductasa (GR).

Parámetros de estrés oxidativo en bazo

Los distintos parámetros de estrés oxidativo estudiados en bazo se muestran en la **tabla 19**.

Los niveles de glutathion total no se ven afectados de manera significativa en ratas entrenadas respecto a sedentarias. El golpe de ejercicio agudo eleva estos niveles en ambos grupos de animales estudiados, pero es solo en animales entrenados donde el aumento de glutathion es significativo ($p < 0,05$) respecto a su grupo control, que no realizó ejercicio agudo. No se observan diferencias significativas entre animales sedentarios y entrenados que realizan ejercicio agudo.

El programa de entrenamiento no modifica la capacidad antioxidante total respecto a la encontrada en animales sedentarios. El ejercicio agudo tampoco modifica dicha capacidad en animales entrenados, en cambio en sedentarios provoca una disminución significativa ($p < 0,05$) de la misma. El incremento en la capacidad antioxidante total que muestran los animales entrenados con ejercicio agudo es significativo ($p < 0,01$) respecto a animales sedentarios con ejercicio agudo.

La actividad de la enzima xantina oxidasa presenta un ligero aumento no significativo, en ratas entrenadas respecto a sedentarias. El golpe de ejercicio agudo incrementa la actividad de esta enzima en ambos grupos de animales estudiados, no siendo significativas estas diferencias. Cuando se realiza la prueba “t” de Student, se pone de manifiesto significativamente ($p < 0,01$) el aumento de esta actividad enzimática en ratas sedentarias que realizaron ejercicio agudo respecto a su mismo grupo que no lo realizó. No se encuentran diferencias significativas entre ratas sedentarias y entrenadas que realizan ejercicio agudo.

Las ratas entrenadas muestran una disminución no significativa de la actividad glutathion peroxidasa respecto a las sedentarias. Asimismo, el ejercicio agudo provoca una disminución de dicha actividad enzimática en animales sedentarios y entrenados, que no resulta significativa. En ratas entrenadas con ejercicio agudo encontramos menores niveles de actividad glutathion peroxidasa en comparación con las ratas sedentarias que también realizaron ejercicio agudo, no siendo significativa esta diferencia.

La actividad glutathion reductasa prácticamente no se modifica en los distintos grupos de ratas estudiados. Solo se aprecia una muy ligera disminución de esta actividad en animales entrenados respecto a los sedentarios, que no es significativa.

Parámetros de estrés oxidativo en hígado

El contenido intracelular de glutathion total (GSH) y las actividades de las enzimas glutathion peroxidasa (GPx) y glutathion reductasa (GR) se presentan en la **tabla 20**.

El entrenamiento eleva ligeramente, no de forma significativa, los niveles de glutathion. Por otro lado, el ejercicio agudo disminuye estos niveles no significativamente en ratas sedentarias, en cambio prácticamente no los modifica en ratas entrenadas. El aumento en el contenido intracelular de glutathion en ratas entrenadas con ejercicio agudo sí que resulta significativo ($p < 0,05$) respecto al grupo de sedentarias que también lo realizan.

La actividad glutathion peroxidasa disminuye en ratas entrenadas respecto a sedentarias. Tanto en animales entrenados como sedentarios, el ejercicio agudo provoca una disminución de esta actividad enzimática. Las ratas entrenadas que realizaron ejercicio agudo muestran una menor actividad glutathion peroxidasa que las sedentarias que también lo realizaron. No se observan diferencias significativas en ninguna de las comparaciones.

El entrenamiento no modifica la actividad glutathion reductasa. Por otra parte, el ejercicio agudo, eleva muy ligeramente dicha actividad tanto en animales entrenados como sedentarios, por lo que no se observan diferencias significativas. Del mismo modo, el ligero incremento en la actividad glutathion reductasa que presentan las ratas

entrenadas que realizan ejercicio agudo no es significativo respecto al grupo de sedentarias que también lo realizan.

Los resultados correspondientes al estudio de la capacidad antioxidante total y la actividad xantina oxidasa se representan en la **figura 25**.

La capacidad antioxidante total (**figura 25A**), no se modifica en ratas entrenadas respecto a sedentarias. Cuando las ratas sedentarias realizan el golpe de ejercicio agudo, su capacidad antioxidante total disminuye significativamente ($p<0,01$). Por el contrario, el ejercicio agudo no modifica dicha capacidad antioxidante en ratas entrenadas. El incremento que se observa de la capacidad antioxidante en ratas entrenadas con ejercicio agudo es significativo ($p<0,01$) respecto al grupo de ratas sedentarias que también lo realizan.

Respecto a la actividad xantina oxidasa (**figura 25B**), los animales entrenados no la modifican respecto a los sedentarios. Por su parte, el ejercicio agudo aumenta significativamente ($p<0,05$) esta actividad en animales sedentarios, sin embargo no la modifica en animales entrenados. Finalmente, los animales entrenados que realizan ejercicio agudo muestran una disminución significativa ($p<0,05$) de la actividad xantina oxidasa respecto al grupo de animales sedentarios que también lo realizaron.

BAZO				
Parámetro	Sedentarias	Sedentarias + EA	Entrenadas	Entrenadas + EA
Glutation Total (GSH) (nmol/mg tejido)	0,79±0,04 (n=7)	0,84±0,03 (n=8)	0,75±0,02 (n=7)	0,88±0,03* (n=8)
Capacidad Antioxidante Total (U/mg tejido)	0,13±0,008 (n=7)	0,10±0,005* (n=8)	0,15±0,007 (n=7)	0,14±0,007## (n=8)
Actividad Xantina Oxidasa (XO) (mU/mg tejido)	3,79±0,10 (n=7)	4,44±0,18 (n=7)	3,96±0,25 (n=7)	4,12±0,21 (n=7)
Actividad Glutation Peroxidasa (GPx) (mU/mg tejido)	257±21 (n=7)	237±18 (n=8)	226±19 (n=7)	207±16 (n=8)
Actividad Glutation Reductasa (GR) (mU/mg tejido)	84±1 (n=7)	83±2 (n=8)	80±3 (n=7)	82±2 (n=8)

Tabla 19. Glutation total (nmol/mg tejido), Capacidad antioxidante total (U/mg tejido), Actividad Xantina Oxidasa (mU/mg tejido), Actividad Glutation Peroxidasa (mU/mg tejido) y Actividad Glutation Reductasa (mU/mg tejido) en homogenados de bazo de ratas Zucker obesas (*fa/fa*) sedentarias, sedentarias con golpe de ejercicio agudo (EA), entrenadas y entrenadas con golpe de ejercicio agudo (EA).

Cada dato representa la media ± E.E. del número de animales de cada grupo (entre paréntesis).

*p<0,05 con respecto a los correspondientes valores de su mismo grupo sin golpe de ejercicio agudo. ##p<0,01 con respecto a los correspondientes valores en ratas sedentarias con golpe de ejercicio agudo.

HÍGADO

Parámetro	Sedentarias	Sedentarias + EA	Entrenadas	Entrenadas + EA
Glutation Total (GSH) (nmol/mg tejido)	2,11±0,19 (n=8)	1,97±0,07 (n=8)	2,43±0,10 (n=8)	2,45±0,08# (n=8)
Actividad Glutation Peroxidasa (GPx) (mU/mg tejido)	1180±48 (n=8)	1044±58 (n=8)	1030±68 (n=8)	1017±100 (n=8)
Actividad Glutation Reductasa (GR) (mU/mg tejido)	103±6 (n=8)	105±5 (n=8)	103±10 (n=8)	108±5 (n=8)

Tabla 20. Glutation total (nmol/mg tejido), Actividad Glutation Peroxidasa (mU/mg tejido) y Actividad Glutation Reductasa (mU/mg tejido) en homogenados de hígado de ratas Zucker obesas (*fa/fa*) sedentarias, sedentarias con golpe de ejercicio agudo (EA), entrenadas y entrenadas con golpe de ejercicio agudo (EA).

Cada dato representa la media ± E.E. del número de animales de cada grupo (entre paréntesis).

#p<0,05 con respecto a los correspondientes valores en ratas sedentarias con golpe de ejercicio agudo.

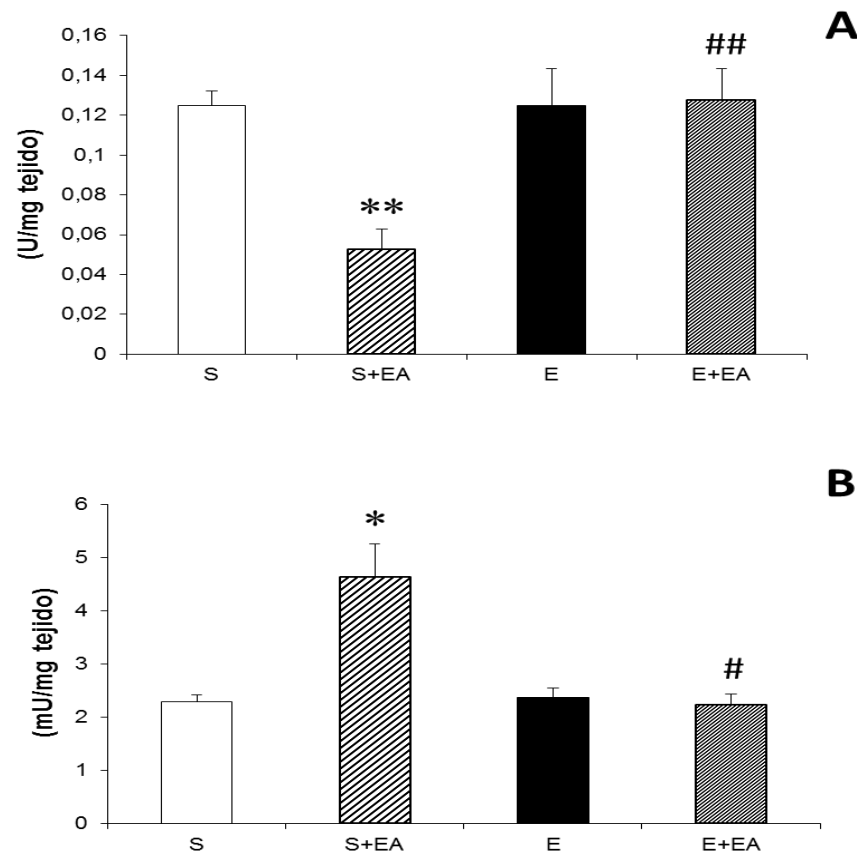


Figura 25. Capacidad antioxidante total (U/mg tejido) (A) y Actividad Xantina Oxidasa (mU/mg tejido) (B) en homogenados de hígado de ratas Zucker obesas (*fa/fa*) sedentarias (S), sedentarias con golpe de ejercicio agudo (S+EA), entrenadas (E) y entrenadas con golpe de ejercicio agudo (E+EA).

Cada columna representa la media $\pm$ E.E. del número de animales de cada grupo (n=8 en la capacidad antioxidante total y n=7 en la actividad xantina oxidasa).

**p<0,01, *p<0,05 con respecto a los correspondientes valores de su mismo grupo sin golpe de ejercicio agudo. ##p<0,01, #p<0,05 con respecto a los correspondientes valores en ratas sedentarias con golpe de ejercicio agudo.

4.2. ESTUDIOS EN RATONES HEMBRA GENÉTICAMENTE OBESOS: CONDUCTUAL, INMUNOLÓGICO Y DEL ESTADO ANTIOXIDANTE EN EL ENVEJECIMIENTO

En este objetivo se emplearon ratones hembra homocigotos (*db/db*) como modelo de obesidad genética, ratones controles heterocigotos (*db/+*) que no desarrollan obesidad y ratones control de la cepa salvaje. Se realizó un estudio longitudinal a diferentes edades, jóvenes (2-3 meses), adultos (6 meses), y maduros (12 meses), del que se muestra en primer lugar la evolución del peso de cada animal y el análisis de la glucemia (a la edad de seis y doce meses).

Seguidamente se presentan los datos del estudio conductual a cada una de las edades a estudiar. También se exponen los resultados del estudio de varias funciones inmunitarias en leucocitos peritoneales (actividad “Natural Killer”, respuesta proliferativa y niveles de citoquinas) y de parámetros de estado antioxidante (niveles de GSH y la actividad de la enzima GPx). Finalmente, se realizó el estudio de la longevidad, que se refleja en la curva de supervivencia.

Para cada parámetro analizado, se realizaron las comparaciones debidas a la dotación genética de los animales, es decir, se compararon los ratones obesos (*db/db*) con sus correspondientes controles heterocigotos (*db/+*) y salvajes, así como los heterocigotos respecto a los salvajes a una determinada edad. Además, se realizaron las comparaciones debidas al efecto de la edad dentro de cada grupo de animales, es decir, se comparó cada cepa de animales a las tres edades estudiadas.

Los resultados de este estudio longitudinal en ratones genéticamente obesos se recogen en las **figuras 26-30** y en las **tablas 21-26**. Las tablas nombradas como **A, B, y C** pertenecen a las pruebas de conducta.

4.2.1. Evolución del peso corporal.

La **figura 26** recoge la evolución del peso corporal de los animales comenzando el registro a las 8 semanas de edad y finalizándolo a las 65 semanas.

El gráfico muestra como la evolución en la ganancia de peso es similar y progresiva en ratones salvajes y heterocigotos a lo largo de las semanas, en cambio los

ratones homocigotos obesos presentan una acelerada ganancia de peso desde los dos meses de edad y en la edad adulta que van perdiendo paulatinamente a partir de las 35 semanas de edad.

En cuanto a las diferencias encontradas con 8 semanas de edad, ambos ratones homocigotos y heterocigotos muestran un aumento del peso corporal estadísticamente significativo ($p < 0,001$) respecto a la cepa de ratones salvajes. Los ratones homocigotos obesos también experimentan un incremento del peso altamente significativo ($p < 0,001$) en relación a sus controles heterocigotos. Este mismo comportamiento en el peso corporal de los animales lo encontramos también a las 18, 28, 41 y 51 semanas de edad.

Los valores hallados a las 61 semanas de edad, reflejan como los ratones obesos y los heterocigotos siguen presentando un incremento significativo del peso corporal respecto a los salvajes, en cambio con una significación estadística menor ($p < 0,01$), ya que no resulta tan acusada la diferencia como en las edades anteriores, debido a la pérdida de peso de los ratones obesos. De la misma manera, los ratones obesos a esta edad mantienen un incremento significativo del peso corporal respecto a los heterocigotos, sin embargo la significación ha disminuido ($p < 0,05$). En la semana 63 se observa como los ratones obesos presentan una bajada de peso respecto a la semana 61, y aunque siguen manteniendo mayores valores de peso corporal respecto a los salvajes ($p < 0,05$), no muestran diferencias significativas respecto a los heterocigotos. A esta edad los ratones heterocigotos también mantienen un aumento significativo ($p < 0,05$) del peso respecto a los salvajes.

Finalmente, a la edad de 65 semanas, encontramos que existe un aumento del peso corporal en ratones obesos respecto a la semana 63, que vuelve a poner de manifiesto estadísticamente ($p < 0,05$) las diferencias de peso respecto a los ratones heterocigotos. El aumento de peso en ratones obesos respecto a salvajes ha aumentado su significación ($p < 0,01$) respecto a la semana 63. Por último, los ratones heterocigotos también mantienen el aumento significativo ($p < 0,05$) del peso respecto a los salvajes.

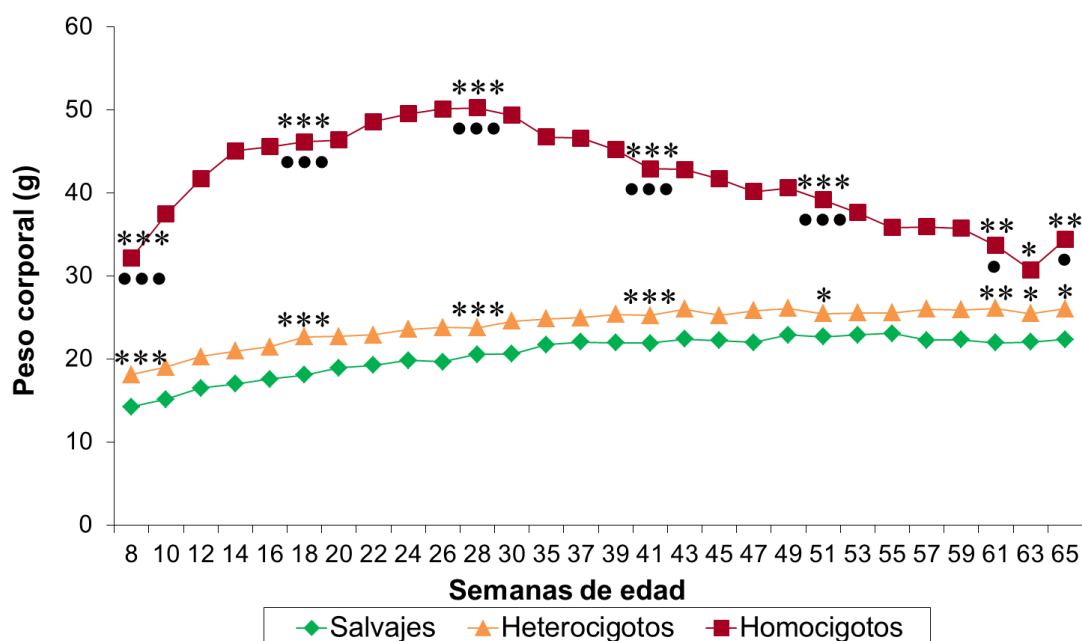


Figura 26. Evolución del peso corporal (g) en ratones homocigotos (*db/db*), heterocigotos (*db/+*) y salvajes.

Cada punto de las diferentes curvas representa la media $\pm$ E.E. de los animales de cada grupo. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ con respecto a los correspondientes valores en ratones salvajes a esa edad. ●●● $p < 0,001$, ● $p < 0,05$ con respecto a los correspondientes valores en ratones heterocigotos (*db/+*) a esa edad.

4.2.2. Estudio de la glucemia.

Los resultados obtenidos del estudio de la glucemia de los animales a los seis y doce meses de edad, se presentan en la **tabla 21**.

A los seis meses, los animales obesos presentan un aumento significativo ($p < 0,001$) de los niveles de glucosa en sangre respecto a los animales salvajes y heterocigotos. A los doce meses, la glucemia en ratones obesos disminuye respecto a los seis meses, sin embargo continua siendo mayor respecto a la de sus controles heterocigotos y salvajes, aunque no se encuentran diferencias significativas a esta edad.

La glucemia de los animales heterocigotos es menor respecto a la de los animales salvajes en ambas edades, pero no existen diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 21. Glucemia (mg/dl) en ratones homocigotos (*db/db*), heterocigotos (*db/+*) y salvajes, a la edad de seis y doce meses.

Hetero: heterocigoto; Homo: homocigoto; 6M: seis meses; 12M: doce meses.

Cada dato representa la media $\pm$ E.E. del número de animales de cada grupo (entre paréntesis).

*** $p < 0,001$ con respecto a los correspondientes valores en ratones salvajes a esa edad.

●●● $p < 0,001$ con respecto a los correspondientes valores en ratones heterocigotos (*db/+*) a esa edad.

	Salvaje 6M	Hetero 6M	Homo 6M	Salvaje 12M	Hetero 12M	Homo 12M
Glucemia (mg/dl)	88 $\pm$ 4 (<i>n</i> =11)	70 $\pm$ 4 (<i>n</i> =17)	262 $\pm$ 24***/●●● (<i>n</i> =18)	87 $\pm$ 10 (<i>n</i> =7)	58 $\pm$ 5 (<i>n</i> =11)	161 $\pm$ 64 (<i>n</i> =7)

4.2.3. Estudio conductual.

En el estudio comportamental llevado a cabo en ratones se evaluó la capacidad sensoriomotora mediante las pruebas del reflejo visual, reflejo de extensión posterior, prueba de la tabla de madera o “wood rod test” y prueba de la cuerda tirante. Asimismo, se analizó el comportamiento exploratorio y las respuestas de ansiedad mediante la prueba de la neofobia, el campo abierto con pared, el tablero de agujeros y el laberinto en T. Los resultados obtenidos de esta batería de pruebas destinadas a valorar parámetros comportamentales se exponen a continuación en las **tablas A, B y C**.

La leyenda de símbolos utilizada para todas las tablas de pruebas conductuales es la siguiente:

2M: dos meses; 6M: seis meses; 12M: doce meses.

Cada dato representa la media $\pm$ E.E. del número de animales de cada grupo (entre paréntesis).

*** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ con respecto a los correspondientes valores en ratones salvajes a esa edad. ●●● $p < 0,001$, ●● $p < 0,01$, ● $p < 0,05$ con respecto a los correspondientes valores en ratones heterocigotos (*db/+*) a esa edad. aa $p < 0,001$, aa $p < 0,01$, aa $p < 0,05$ con respecto al correspondiente grupo a la edad de dos meses. bb $p < 0,001$, bb $p < 0,01$, bb $p < 0,05$ con respecto al correspondiente grupo a la edad de seis meses.

Los datos numéricos que figuran en el texto también se representan como media $\pm$ E.E.

4.2.3.1. Peso corporal y batería de pruebas de capacidad sensoriomotora

Los animales fueron pesados antes de comenzar las pruebas de capacidad sensoriomotora, para garantizar así que todos ellos se encontrasen activos de igual manera.

Los resultados de los pesos de los animales en gramos y de la batería de pruebas de capacidad sensoriomotora, que se realizaron todas en el mismo día, se muestran a continuación en las **tablas A y B**.

A. Pesos (g)

SALVAJES 2M (n=20)

14±0,23

HETEROCIGOTOS 2M (n=20)

18±0,37

HOMOCIGOTOS 2M (n=20)

32±0,69

***/●●●

SALVAJES 6M (n=12)

20±0,32

aaa

HETEROCIGOTOS 6M (n=17)

24±0,53

***/aaa

HOMOCIGOTOS 6M (n=18)

50±1,58

***/●●●/aaa

SALVAJES 12M (n=11)

22±0,66

aaa

HETEROCIGOTOS 12M (n=15)

26±0,54

*/aaa

HOMOCIGOTOS 12M (n=13)

36±2,80

*/b

B. Capacidad sensoriomotora

Reflejo visual

% Animales que presentan respuesta

SALVAJES 2M (n=20)

100

HETEROCIGOTOS 2M (n=20)

100

HOMOCIGOTOS 2M (n=20)

100

SALVAJES 6M (n=12)

100

HETEROCIGOTOS 6M (n=17)

100

HOMOCIGOTOS 6M (n=18)

100

SALVAJES 12M (n=11)

100

HETEROCIGOTOS 12M (n=15)

100

HOMOCIGOTOS 12M (n=13)

100

B. Capacidad sensoriomotora

Reflejo de Extensión Posterior	% Animales que presentan respuesta		
	<u>SALVAJES 2M (n=20)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 2M (n=20)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 2M (n=20)</u>
	100	100	100
	<u>SALVAJES 6M (n=12)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 6M (n=17)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 6M (n=18)</u>
	100	100	100
	<u>SALVAJES 12M (n=11)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 12M (n=15)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 12M (n=13)</u>
	100	100	92 */●/a/b
Test Tabla de Madera Equilibrio y Coordinación motora	% Animales que presentan freezing		
	<u>SALVAJES 2M (n=20)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 2M (n=20)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 2M (n=20)</u>
	0	0	5
	<u>SALVAJES 6M (n=12)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 6M (n=17)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 6M (n=18)</u>
	0	0	83 ***/●●●/aaa
	<u>SALVAJES 12M (n=11)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 12M (n=15)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 12M (n=13)</u>
	0	0	46 ***/●●●/aaa/bbb

B. Capacidad sensoriomotora

Test Tabla de Madera % Animales que completan la prueba

Equilibrio y

Coordinación motora

SALVAJES 2M (n=20)

HETEROCIGOTOS 2M (n=20)

HOMOCIGOTOS 2M (n=20)

65

15

0

***/●●●

SALVAJES 6M (n=12)

HETEROCIGOTOS 6M (n=17)

HOMOCIGOTOS 6M (n=18)

25

aaa

0

*** /aaa

0

SALVAJES 12M (n=11)

HETEROCIGOTOS 12M (n=15)

HOMOCIGOTOS 12M (n=13)

0

aaa/bbb

7

*/b

0

●

Test Tabla de Madera % No caídas

Equilibrio y

Coordinación motora

SALVAJES 2M (n=20)

HETEROCIGOTOS 2M (n=20)

HOMOCIGOTOS 2M (n=20)

100

85

95

●

SALVAJES 6M (n=12)

HETEROCIGOTOS 6M (n=17)

HOMOCIGOTOS 6M (n=18)

100

71

*** /a

94

*/●●●

SALVAJES 12M (n=11)

HETEROCIGOTOS 12M (n=15)

HOMOCIGOTOS 12M (n=13)

91

aa/bb

67

*** /aa

62

*** /aaa/bbb

B. Capacidad sensoriomotora

Test Tabla de Madera % Animales que recorren 1 o más segmentos

Equilibrio y

Coordinación motora

SALVAJES 2M (n=20)

HETEROCIGOTOS 2M (n=20)

HOMOCIGOTOS 2M (n=20)

95

50

25

***/●●●

SALVAJES 6M (n=12)

HETEROCIGOTOS 6M (n=17)

HOMOCIGOTOS 6M (n=18)

67

aaa

12

***/aaa

11

***/a

SALVAJES 12M (n=11)

HETEROCIGOTOS 12M (n=15)

HOMOCIGOTOS 12M (n=13)

9

aaa/bbb

13

aaa

15

Test Tabla de Madera Segmentos recorridos

Equilibrio y

Coordinación motora

SALVAJES 2M (n=19)

HETEROCIGOTOS 2M (n=10)

HOMOCIGOTOS 2M (n=5)

4,47±0,50

2,20±0,39

**

1,40±0,40

**

SALVAJES 6M (n=8)

HETEROCIGOTOS 6M (n=2)

HOMOCIGOTOS 6M (n=2)

2,63±0,78

a

1,00±0,00

2,00±1,00

SALVAJES 12M (n=5)

HETEROCIGOTOS 12M (n=2)

HOMOCIGOTOS 12M (n=2)

1,20±0,20

aa

2,00±1,00

1,50±0,50

Respecto al peso corporal de los animales, a los dos y seis meses de edad los ratones homocigotos obesos muestran un aumento significativo ($p<0,001$) de peso respecto a sus controles salvajes y heterocigotos. A estas mismas edades, los ratones heterocigotos a su vez presentan un incremento significativo ($p<0,001$) del peso corporal respecto a los ratones salvajes. A los doce meses, tanto los ratones homocigotos como los heterocigotos muestran un aumento significativo ($p<0,05$) del peso respecto a los salvajes.

En cuanto al estudio con la edad, los animales salvajes y heterocigotos a los seis y doce meses de edad presentan un aumento significativo ($p<0,001$) del peso respecto a los dos meses. Por su parte, los ratones homocigotos a los seis meses muestran un aumento significativo ($p<0,001$) del peso respecto a los dos meses. Estos animales presentan a los doce meses un descenso significativo ($p<0,05$) del peso corporal respecto a los seis meses.

La batería de pruebas de capacidad sensoriomotora se inició con el estudio de los reflejos.

Reflejos

Todos los grupos de animales a todas las edades presentan reflejo visual. En el estudio del reflejo de extensión posterior de las patas traseras, encontramos que todos los grupos de animales lo presentan a todas las edades, excepto el grupo de ratones homocigotos a los doce meses. En este grupo se observa que el porcentaje de animales que presentan este reflejo es significativamente menor ($p<0,05$) respecto al de los seis y dos meses de edad. También este porcentaje es significativamente menor ($p<0,05$) que el encontrado en los controles salvajes y heterocigotos a la misma edad de doce meses.

Tras evaluar los reflejos se continuó con el test de la tabla de madera y la cuerda tirante.

Test de la tabla de madera

En esta prueba solo presentan freezing los animales homocigotos obesos. A los seis y doce meses, estos animales presentan porcentajes de freezing significativamente mayores ($p<0,001$) que los de salvajes y heterocigotos, ya que no presentan porcentaje.

A los seis y doce meses, los homocigotos muestran un porcentaje de freezing significativamente mayor ($p<0,001$) que a los dos meses de edad. Por otro lado, a los doce meses el porcentaje de freezing en ratones obesos es significativamente menor ($p<0,001$) que a los seis meses.

Respecto al porcentaje de animales que completan la prueba, ningún animal homocigoto la completa. A los dos meses de edad, los animales homocigotos y heterocigotos presentan porcentajes significativamente menores ($p<0,001$) que los salvajes. Por su parte, los homocigotos presentan un porcentaje nulo, que obviamente es significativamente menor ($p<0,001$) que el de los heterocigotos. A la edad de seis meses, ningún animal homocigoto y heterocigoto completa la prueba, por lo que su nulo porcentaje es significativamente menor ($p<0,001$) al de los animales salvajes. Con doce meses, solo los heterocigotos completan la prueba. Por esta razón, los heterocigotos presentan un porcentaje significativamente mayor ($p<0,05$) que los salvajes, y los homocigotos muestran un porcentaje significativamente menor ($p<0,05$) que sus controles heterocigotos.

En cuanto al estudio con la edad, los ratones salvajes a los seis y doce meses muestran porcentajes significativamente menores ($p<0,001$) que a los dos meses. Dado que a los doce meses el porcentaje es nulo, resulta ser significativamente menor ($p<0,001$) que a los seis meses.

Los animales heterocigotos presentan un porcentaje nulo a la edad de seis meses, por tanto, resulta ser significativamente menor ($p<0,001$) que a los dos meses. El porcentaje de estos animales a los doce meses es significativamente mayor ($p<0,05$) que a los seis meses.

Al evaluar la latencia de llegada en segundos (parámetro no representado en tabla), el dato resulta no evaluable ($n=0$) en animales salvajes a los doce meses de edad, en heterocigotos a los seis meses y en homocigotos a las tres edades estudiadas. En heterocigotos a los doce meses solo existe un único dato ($n=1$) (6,57). Los grupos con

datos evaluables son los siguientes: a los dos meses, salvajes ($n=13$) ($11,84\pm1,58$) y heterocigotos ($n=3$) ($13,73\pm2,84$) y a los seis meses, los salvajes ($n=3$) ($14,07\pm2,87$). No se encuentran diferencias significativas entre estos últimos grupos.

En cuanto al porcentaje de no caídas, ningún animal salvaje se cae del aparato ni a los dos ni a los seis meses de edad. A los dos meses, el porcentaje de no caídas en heterocigotos es significativamente menor ($p<0,001$) que en salvajes. Por su parte, los ratones homocigotos presentan un porcentaje significativamente mayor ($p<0,05$) que los heterocigotos. Con seis meses de edad, de nuevo el porcentaje de no caídas en ratones heterocigotos es significativamente menor ($p<0,001$) que en salvajes. A esta edad, los ratones homocigotos muestran un porcentaje significativamente menor ($p<0,05$) que en salvajes, y significativamente mayor ($p<0,001$) que en heterocigotos. A los doce meses de edad, tanto los animales homocigotos como los heterocigotos presentan un porcentaje significativamente menor ($p<0,001$) que en salvajes.

En relación al estudio a lo largo de la edad, los ratones salvajes a los doce meses muestran un porcentaje significativamente menor ($p<0,01$) que a los dos y seis meses. Los animales heterocigotos presentan a los seis meses un porcentaje de no caídas significativamente menor ($p<0,05$) que a los dos meses. Estos animales con doce meses también presentan un porcentaje significativamente menor ($p<0,01$) que a los dos meses de edad. Los ratones homocigotos a los doce meses muestran un porcentaje de no caídas significativamente menor ($p<0,001$) que a los dos y seis meses.

Con respecto a la latencia de caída del aparato medida en segundos (parámetro no representado en tabla), el dato resulta no evaluable ($n=0$) en animales salvajes a los dos y seis meses de edad. A los doce meses, solo existe un único dato ($n=1$) ($6,03$) en estos animales. En ratones homocigotos a la edad de dos meses existe un único dato ($n=1$) ($16,47$), al igual que a los seis meses ($3,72$). Con doce meses ($n=5$), los valores en este grupo son ($5,04\pm0,92$).

En ratones heterocigotos a la edad de dos meses ($n=3$) los valores son ($15,59\pm1,57$), con seis meses ($n=5$) ($12,94\pm1,61$), y con doce meses ($n=5$) los valores son ($8,09\pm1,91$). Cuando se realiza la prueba “t” de Student, la disminución en el tiempo de latencia de caída en ratones heterocigotos a los doce meses respecto a los dos meses,

se pone de manifiesto significativamente ($p<0,05$). Con esta misma prueba, a los doce meses de edad, la disminución en el tiempo de latencia de caída en homocigotos respecto a heterocigotos, resulta estar en el límite de significación ($p<0,05$).

En cuanto al porcentaje de animales que recorren uno o más segmentos, a los dos meses los animales homocigotos y heterocigotos muestran un porcentaje significativamente menor ($p<0,001$) que los salvajes. Los animales homocigotos presentan un porcentaje significativamente menor ($p<0,001$) que los heterocigotos a esta edad. Con seis meses, los ratones homocigotos y heterocigotos muestran un porcentaje significativamente menor ($p<0,001$) que los salvajes.

En el estudio con la edad encontramos que los ratones salvajes a los seis y doce meses presentan un porcentaje significativamente menor ($p<0,001$) que a los dos meses. Con doce meses, estos ratones presentan un porcentaje significativamente menor ($p<0,001$) que a los seis meses. Los ratones heterocigotos muestran a los seis y doce meses un porcentaje significativamente menor ($p<0,001$) que a los dos meses. Por último, en ratones homocigotos el porcentaje de animales que recorre uno o más segmentos a los seis meses, es significativamente menor ($p<0,05$) que a los dos meses.

Finalmente, al evaluar los segmentos recorridos en la tabla de madera, encontramos que a la edad de dos meses los animales homocigotos y heterocigotos muestran un descenso significativo ($p<0,01$) en el número de segmentos respecto a los salvajes. En el estudio con la edad, los animales salvajes a los seis meses presentan un descenso significativo ($p<0,05$) del número de segmentos respecto a los dos meses. También a los doce meses de edad, estos animales muestran un descenso significativo ($p<0,01$) en este parámetro respecto a los dos meses.

B. Capacidad sensoriomotora

Cuerda Tirante (60 segundos)	% No caídas					
Vigor muscular y Coordinación motora	<u>SALVAJES 2M (n=20)</u>		<u>HETEROCIGOTOS 2M (n=20)</u>		<u>HOMOCIGOTOS 2M (n=20)</u>	
	100		40	***	15	***/●●●
	<u>SALVAJES 6M (n=12)</u>		<u>HETEROCIGOTOS 6M (n=17)</u>		<u>HOMOCIGOTOS 6M (n=18)</u>	
	83	aaa	29	***	0	***/●●●/aaa
	<u>SALVAJES 12M (n=11)</u>		<u>HETEROCIGOTOS 12M (n=15)</u>		<u>HOMOCIGOTOS 12M (n=13)</u>	
	64	aaa/bb	0	***/aaa/bbb	0	***/aaa
Cuerda Tirante (60 segundos)	Latencia caída (s)					
Vigor muscular y Coordinación motora	<u>SALVAJES 2M (n=0)</u>		<u>HETEROCIGOTOS 2M (n=12)</u>		<u>HOMOCIGOTOS 2M (n=17)</u>	
	No evaluable		8,75±4,39		7,61±2,06	
	<u>SALVAJES 6M (n=2)</u>		<u>HETEROCIGOTOS 6M (n=12)</u>		<u>HOMOCIGOTOS 6M (n=18)</u>	
	13,66±4,28		6,67±2,20		1,96±0,19	
	<u>SALVAJES 12M (n=4)</u>		<u>HETEROCIGOTOS 12M (n=15)</u>		<u>HOMOCIGOTOS 12M (n=13)</u>	
	14,15±7,27		5,35±1,53		3,82±1,26	

B. Capacidad sensoriomotora

Cuerda Tirante		% Animales que recorren 1 o más segmentos			
(60 segundos)					
Vigor muscular y Coordinación motora	<u>SALVAJES 2M (n=20)</u>		<u>HETEROCIGOTOS 2M (n=20)</u>		<u>HOMOCIGOTOS 2M (n=20)</u>
	80		40	***	25 ***/●
	<u>SALVAJES 6M (n=12)</u>		<u>HETEROCIGOTOS 6M (n=17)</u>		<u>HOMOCIGOTOS 6M (n=18)</u>
	50	aaa	18	***/aa	0 ***/●●●/aaa
	<u>SALVAJES 12M (n=11)</u>		<u>HETEROCIGOTOS 12M (n=15)</u>		<u>HOMOCIGOTOS 12M (n=13)</u>
	45	aaa	7	***/aaa/b	0 ***/●/aaa
Cuerda Tirante		% Animales que completan la prueba			
(60 segundos)					
Vigor muscular y Coordinación motora	<u>SALVAJES 2M (n=20)</u>		<u>HETEROCIGOTOS 2M (n=20)</u>		<u>HOMOCIGOTOS 2M (n=20)</u>
	45		35		5 ***/●●●
	<u>SALVAJES 6M (n=12)</u>		<u>HETEROCIGOTOS 6M (n=17)</u>		<u>HOMOCIGOTOS 6M (n=18)</u>
	25	aa	24		0 ***/●●●
	<u>SALVAJES 12M (n=11)</u>		<u>HETEROCIGOTOS 12M (n=15)</u>		<u>HOMOCIGOTOS 12M (n=13)</u>
	9	aaa/bb	0	**/aaa/bbb	0 **

B. Capacidad sensoriomotora

<i>Cuerda Tirante (60 segundos)</i>	Tracción (% prensilidad óptima)				
<i>Vigor muscular y Coordinación motora</i>	<u>SALVAJES 2M (n=20)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 2M (n=20)</u>		<u>HOMOCIGOTOS 2M (n=20)</u>	
	90	50	***	15	***/●●●
	<u>SALVAJES 6M (n=12)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 6M (n=17)</u>		<u>HOMOCIGOTOS 6M (n=18)</u>	
	92	53	***	0	***/●●●/aaa
	<u>SALVAJES 12M (n=11)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 12M (n=15)</u>		<u>HOMOCIGOTOS 12M (n=13)</u>	
	73	33	***/a/bb	0	***/●●●/aaa
		aa/bbb			

Cuerda tirante

En esta prueba, respecto al porcentaje de no caídas, encontramos que todos los ratones obesos con seis y doce meses y los heterocigotos con doce meses se caen de la cuerda. A las tres edades estudiadas los animales homocigotos y heterocigotos muestran un porcentaje significativamente menor ($p < 0,001$) que los salvajes. Los ratones homocigotos obesos a la edad de dos y seis meses presentan además un porcentaje significativamente menor ($p < 0,001$) que los heterocigotos.

En cuanto al estudio con la edad, los ratones salvajes muestran a la edad de seis meses un porcentaje significativamente menor ($p < 0,001$) que a los dos meses. De la misma manera, estos animales a los doce meses presentan un porcentaje significativamente menor que a los dos ($p < 0,001$) y seis meses ($p < 0,01$).

Los animales heterocigotos con doce meses al presentar un porcentaje nulo, éste es significativamente menor ($p < 0,001$) que el que presentan a los dos y seis meses. Los ratones homocigotos muestran también un porcentaje nulo a los seis y doce meses, que es por tanto significativamente menor ($p < 0,001$) que a los dos meses.

En relación a la latencia de caída medida en segundos, este parámetro no es evaluable ($n=0$) en ratones salvajes a la edad de dos meses. En el resto de grupos de animales no se encuentran diferencias significativas. Solo al realizar la prueba “t” de Student, el descenso en el tiempo de latencia de caída que se observa en animales homocigotos a los seis meses respecto a los dos meses, resulta significativo ($p < 0,05$).

Al analizar el porcentaje de animales que recorren uno o más segmentos, encontramos que los animales homocigotos a la edad de seis y doce meses no recorren ningún segmento. Los animales homocigotos y heterocigotos muestran un porcentaje significativamente menor ($p < 0,001$) que los salvajes, a las tres edades estudiadas. Los ratones homocigotos por su parte, presentan un porcentaje significativamente menor que los heterocigotos a los dos meses ($p < 0,05$), a los seis meses ($p < 0,001$) y a los doce meses ($p < 0,05$).

Respecto al estudio con la edad, los ratones salvajes a los seis y doce meses muestran un porcentaje significativamente menor ($p < 0,001$) que a los dos meses de edad. De igual manera, los animales heterocigotos muestran a los seis meses un

porcentaje significativamente menor ($p<0,01$) que a los dos meses. Con doce meses, estos animales presentan un porcentaje significativamente menor que a los dos meses ($p<0,001$), y que a los seis meses ($p<0,05$). Por último, los ratones homocigotos obesos al presentar a la edad de seis y doce meses un porcentaje nulo, éste resulta significativamente menor ($p<0,001$) que a los dos meses.

En la valoración del número de segmentos recorridos (parámetro no representado en tabla), el dato resulta no evaluable ($n=0$) en ratones homocigotos a los seis y doce meses. A los doce meses, existe un único dato en heterocigotos ($n=1$) (1,00). En animales salvajes los valores a los dos meses son ($n=16$) ($2,63\pm0,18$), a los seis ($n=6$) ($2,17\pm0,54$) y a los doce ($n=5$) ($1,80\pm0,37$). Los valores en heterocigotos a los dos meses son ($n=8$) ($3,75\pm0,31$) y los seis meses ($n=3$) ($4,00\pm0,58$). El valor de los homocigotos a los dos meses es ($n=5$) ($2,20\pm0,58$).

Cuando se realiza la prueba “t” de Student, el aumento del número de segmentos recorridos en animales heterocigotos respecto a salvajes, resulta significativo ($p<0,01$) a los dos meses. Con esta prueba, la disminución en el número de segmentos recorridos en animales homocigotos respecto a heterocigotos a los dos meses, se pone de manifiesto significativamente ($p<0,05$). Asimismo, la disminución en el número de segmentos en ratones salvajes a los doce meses respecto a los dos meses, resulta significativa ($p<0,05$) con esta misma prueba estadística.

En relación al porcentaje de animales que completan la prueba, ningún animal homocigoto obeso a la edad de seis y doce meses la completa. Los heterocigotos a los doce meses tampoco la completan.

A los dos y seis meses, los animales homocigotos muestran un porcentaje significativamente menor ($p<0,001$) que sus controles salvajes y heterocigotos. Con doce meses de edad, los animales heterocigotos y homocigotos al presentar un porcentaje nulo, éste es significativamente menor ($p<0,01$) que el de los salvajes.

Respecto al estudio con la edad, los ratones salvajes a los seis meses presentan un porcentaje significativamente menor ($p<0,01$) que a los dos meses. Estos ratones a los doce meses muestran un porcentaje significativamente menor que a los dos meses ($p<0,001$) y que a los seis meses ($p<0,01$). Los animales heterocigotos al presentar a los

doce meses un porcentaje nulo, éste es significativamente menor ($p<0,001$) que a los dos y seis meses.

Al analizar la latencia de llegada mediada en segundos (parámetro no representado en tabla), el dato resulta no evaluable ($n=0$) en animales homocigotos a los seis y doce meses, y en animales heterocigotos a los doce meses. A los doce meses solo existe un único dato ($n=1$) (39) en salvajes. A los dos meses son los homocigotos los que presentan un solo dato ($n=1$) (42).

Los grupos con datos evaluables son los siguientes: a los dos meses, salvajes ($n=9$) (37 ± 4) y heterocigotos ($n=7$) (35 ± 5), y a los seis meses, salvajes ($n=3$) (45 ± 7) y heterocigotos ($n=4$) (26 ± 10). No se encuentran diferencias significativas entre estos últimos grupos.

Por último, en cuanto al porcentaje de prensilidad óptima, los ratones homocigotos obesos no muestran prensilidad óptima a los seis y doce meses, es decir, ninguno utiliza las patas delanteras, las traseras y la cola para permanecer colgados en la cuerda. A las tres edades estudiadas, los ratones heterocigotos y homocigotos presentan un porcentaje de prensilidad óptima significativamente menor ($p<0,001$) que los salvajes. Además, a todas las edades los ratones homocigotos muestran un porcentaje significativamente menor ($p<0,001$) que los heterocigotos.

En relación al estudio con la edad, a los doce meses los animales salvajes exhiben un porcentaje significativamente menor que a los dos meses ($p<0,01$), y que a los seis meses ($p<0,001$). Los animales heterocigotos a los doce meses muestran un porcentaje significativamente menor que a los dos meses ($p<0,05$), y que a los seis meses ($p<0,01$). Los ratones homocigotos al presentar a la edad de seis y doce meses un porcentaje nulo, éste es significativamente menor ($p<0,001$) que a los dos meses de edad.

4.2.3.2. Batería de pruebas de comportamiento exploratorio y respuestas de ansiedad.

Los resultados de la batería de pruebas de comportamiento exploratorio y respuestas de ansiedad se muestran a continuación en la **tabla C**.

C. Comportamiento exploratorio y respuestas de ansiedad

Test de esquinas	% Animales que presentan rearing				
	<u>SALVAJES 2M (n=20)</u>		<u>HETEROCIGOTOS 2M (n=20)</u>		<u>HOMOCIGOTOS 2M (n=20)</u>
	100		100		70
					***/ 
	<u>SALVAJES 6M (n=12)</u>		<u>HETEROCIGOTOS 6M (n=17)</u>		<u>HOMOCIGOTOS 6M (n=18)</u>
	100		94		0
			*/a		***/  /aaa
	<u>SALVAJES 12M (n=11)</u>		<u>HETEROCIGOTOS 12M (n=15)</u>		<u>HOMOCIGOTOS 12M (n=13)</u>
	100		100		8
			b		***/  /aaa/b
Test de esquinas	Número de esquinas visitadas				
	<u>SALVAJES 2M (n=20)</u>		<u>HETEROCIGOTOS 2M (n=20)</u>		<u>HOMOCIGOTOS 2M (n=20)</u>
	7,55±0,43		7,35±0,42		4,50±0,33
					***/ 
	<u>SALVAJES 6M (n=12)</u>		<u>HETEROCIGOTOS 6M (n=17)</u>		<u>HOMOCIGOTOS 6M (n=17)</u>
	9,50±0,61		8,12±0,88		3,12±0,32
					***/ 
	<u>SALVAJES 12M (n=11)</u>		<u>HETEROCIGOTOS 12M (n=15)</u>		<u>HOMOCIGOTOS 12M (n=9)</u>
	6,18±0,40		5,47±0,52		1,44±0,34
		bb			***/  /aaa

C. Comportamiento exploratorio y respuestas de ansiedad***Test de esquinas***

Número de rearings

SALVAJES 2M (n=20)

4,45±0,30

HETEROCIGOTOS 2M (n=20)

5,55±0,46

HOMOCIGOTOS 2M (n=14)

1,93±0,27

*** / ●●●

SALVAJES 6M (n=12)

3,67±0,50

HETEROCIGOTOS 6M (n=16)

4,50±0,44

HOMOCIGOTOS 6M (n=0)

No evaluable

SALVAJES 12M (n=11)

4,00±0,40

HETEROCIGOTOS 12M (n=15)

4,07±0,48

HOMOCIGOTOS 12M (n=1)

1 (dato único)

Test de esquinas

En esta prueba, respecto al porcentaje de animales que presentan rearing, a la edad de dos meses los ratones homocigotos obesos muestran un porcentaje significativamente menor ($p<0,001$) que el que presentan salvajes y heterocigotos, en los cuales todos los animales completan la prueba. Con seis meses de edad, ningún animal homocigoto completa la prueba. Este grupo de animales muestra un porcentaje nulo que es significativamente menor ($p<0,001$) al que presentan los salvajes y los heterocigotos. A esta edad los ratones heterocigotos presentan un porcentaje significativamente menor ($p<0,05$) que los salvajes. A los doce meses, los ratones homocigotos muestran un porcentaje significativamente menor ($p<0,001$) que sus controles salvajes y heterocigotos.

En relación al estudio con la edad, los animales heterocigotos presentan a los seis meses un porcentaje significativamente menor ($p<0,05$) que a los dos meses. Asimismo, estos animales a los doce meses muestran un porcentaje significativamente mayor ($p<0,05$) que a los seis meses. Los animales homocigotos a los seis y doce meses presentan un porcentaje significativamente menor ($p<0,001$) que a los dos meses. Estos animales a los doce meses muestran un porcentaje significativamente mayor ($p<0,05$) que a los seis meses donde el porcentaje es nulo.

En cuanto al número de esquinas visitadas, los ratones homocigotos a los dos y doce meses presentan un descenso significativo de este número ($p<0,001$) respecto a sus controles salvajes y heterocigotos. De igual manera, a los seis meses, estos ratones muestran un descenso significativo del número de esquinas visitadas respecto a sus controles salvajes ($p<0,001$), y heterocigotos ($p<0,01$).

Respecto al estudio con la edad, los animales salvajes a los doce meses presentan un descenso significativo ($p<0,01$) del número de esquinas visitadas respecto a los seis meses de edad. En estos animales, cuando se realiza la prueba “t” de Student, el aumento en el número de esquinas visitadas a los seis meses respecto a los dos meses, resulta significativo ($p<0,05$). Al realizar esta misma prueba, la disminución que se observa de este parámetro en ratones salvajes a los doce meses respecto a los dos meses, se pone de manifiesto significativamente ($p<0,05$).

En animales heterocigotos, cuando se realiza la prueba “t” de Student, se pone de manifiesto significativamente el descenso en el número de esquinas visitadas a los doce meses respecto a los dos meses ($p<0,01$), y a los seis meses de edad ($p<0,05$). Por último, el descenso que se observa de este parámetro en animales homocigotos a los seis meses respecto a los dos meses, y a los doce meses respecto a los seis meses, resulta significativo ($p<0,01$).

En relación al número de rearings, a la edad de dos meses los animales homocigotos presentan un descenso significativo ($p<0,001$) de este parámetro respecto a sus controles salvajes y heterocigotos. Al realizar la prueba “t” de Student, el descenso en el número de rearings en animales heterocigotos a los doce meses respecto a los dos meses, resulta significativo ($p<0,05$).

Respecto al porcentaje de animales que presentan grooming (parámetro no representado en tabla), los datos obtenidos son los siguientes: en animales salvajes a los dos meses ($n=20$) (5%), a los seis meses ($n=12$) (0%) y a los doce meses ($n=11$) (0%). En heterocigotos a los dos meses ($n=20$) (5%), a los seis meses ($n=17$) (0%) y a los doce meses ($n=15$) (0%). En homocigotos a los dos meses ($n=20$) (0%), a los seis meses ($n=18$) (0%) y a los doce meses ($n=13$) (31%). Los animales homocigotos a los doce meses presentan un porcentaje significativamente mayor ($p<0,001$) que sus controles salvajes y heterocigotos donde el porcentaje es nulo. Estos ratones también a la edad de doce meses, muestran un porcentaje significativamente mayor ($p<0,001$) que a la edad de dos y seis meses donde presentan un porcentaje nulo.

Por último, en cuanto al número de groomings (parámetro no representado en tabla), el dato resulta no evaluable ($n=0$) en animales homocigotos a los dos meses, en todos los grupos de animales a los seis meses, y en salvajes y heterocigotos a los doce meses. A los dos meses, solo existe un único dato ($n=1$) (1) en salvajes y en heterocigotos ($n=1$) (1). El grupo de homocigotos a los doce meses presenta este resultado ($n=4$) (1 ± 0).

Una vez finalizado el test de esquinas, se continuó sometiendo a los animales a la prueba del campo abierto con pared.

C. Comportamiento exploratorio y respuestas de ansiedad

Campo abierto con pared	% Animales que presentan freezing			
	<u>SALVAJES 2M (n=20)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 2M (n=20)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 2M (n=20)</u>	
	0	15	95	***/●●●
	<u>SALVAJES 6M (n=12)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 6M (n=17)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 6M (n=18)</u>	
	0	18	100	***/●●●
	<u>SALVAJES 12M (n=11)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 12M (n=15)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 12M (n=13)</u>	
	0	7	100	*/b ***/●●●
Campo abierto con pared	Tiempo total de inmovilidad (s)			
	<u>SALVAJES 2M (n=0)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 2M (n=3)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 2M (n=19)</u>	
	No evaluable	8,33±3,18	37,63±9,48	
	<u>SALVAJES 6M (n=0)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 6M (n=3)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 6M (n=18)</u>	
	No evaluable	8,00±3,06	246,50±9,24	●●●/aaa
	<u>SALVAJES 12M (n=0)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 12M (n=1)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 12M (n=13)</u>	
	No evaluable	3 (dato único)	265,00±12,56	aaa

C. Comportamiento exploratorio y respuestas de ansiedad

Campo abierto		% Animales que salen del centro			
con pared					
Actividad horizontal	<u>SALVAJES 2M (n=20)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 2M (n=20)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 2M (n=20)</u>		
	100	100	95		
	<u>SALVAJES 6M (n=12)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 6M (n=17)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 6M (n=18)</u>		
	100	94	17	*/a	***./●●●/aaa
	<u>SALVAJES 12M (n=11)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 12M (n=15)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 12M (n=13)</u>		
	100	100	23	b	***./●●●/aaa
Campo abierto		Tiempo salida centro (s)			
con pared					
Actividad horizontal	<u>SALVAJES 2M (n=20)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 2M (n=20)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 2M (n=19)</u>		
	2,00±0,39	7,10±1,41	25,05±11,45	***	***
	<u>SALVAJES 6M (n=12)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 6M (n=16)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 6M (n=3)</u>		
	3,58±1,00	24,25±11,99	12,33±6,44	**	
	<u>SALVAJES 12M (n=11)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 12M (n=15)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 12M (n=3)</u>		
	2,27±0,52	14,67±9,20	6,00±2,00	**	

C. Comportamiento exploratorio y respuestas de ansiedad

Campo abierto con pared		% Animales que entran en periferia				
Actividad horizontal	<u>SALVAJES 2M (n=20)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 2M (n=20)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 2M (n=20)</u>			
	100	100	85	***/●●●		
	<u>SALVAJES 6M (n=12)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 6M (n=17)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 6M (n=18)</u>			
	100	94	11	***/●●●/aaa		
	<u>SALVAJES 12M (n=11)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 12M (n=15)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 12M (n=13)</u>			
	100	100	15	***/●●●/aaa		
	Campo abierto con pared		Tiempo hasta entrar en periferia (s)			
	<u>SALVAJES 2M (n=20)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 2M (n=20)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 2M (n=17)</u>			
	4,10±0,35	12,35±1,52	20,12±3,90	***		
<u>SALVAJES 6M (n=12)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 6M (n=16)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 6M (n=2)</u>				
5,42±0,92	27,56±12,25	18,50±10,50	**			
<u>SALVAJES 12M (n=11)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 12M (n=15)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 12M (n=2)</u>				
4,18±0,57	18,53±9,15	10,50±0,50	***			

C. Comportamiento exploratorio y respuestas de ansiedad

<i>Campo abierto con pared</i>	Deambulación total				
<i>Actividad horizontal</i>	<u>SALVAJES 2M (n=20)</u>		<u>HETEROCIGOTOS 2M (n=20)</u>		<u>HOMOCIGOTOS 2M (n=20)</u>
	257±13		212±10	*	71±11 ***/●●●
	<u>SALVAJES 6M (n=12)</u>		<u>HETEROCIGOTOS 6M (n=17)</u>		<u>HOMOCIGOTOS 6M (n=16)</u>
	149±22	aaa	158±13	aa	6±3 ***/●●●/aaa
	<u>SALVAJES 12M (n=11)</u>		<u>HETEROCIGOTOS 12M (n=15)</u>		<u>HOMOCIGOTOS 12M (n=10)</u>
	128±19	aaa	161±12	aa	9±5 ***/●●●/aaa
<i>Campo abierto con pared</i>	Deambulación externa				
<i>Actividad horizontal</i>	<u>SALVAJES 2M (n=20)</u>		<u>HETEROCIGOTOS 2M (n=20)</u>		<u>HOMOCIGOTOS 2M (n=17)</u>
	156±9		131±7		58±8 ***/●●●
	<u>SALVAJES 6M (n=12)</u>		<u>HETEROCIGOTOS 6M (n=16)</u>		<u>HOMOCIGOTOS 6M (n=2)</u>
	86±14	aaa	104±6		30±9
	<u>SALVAJES 12M (n=11)</u>		<u>HETEROCIGOTOS 12M (n=15)</u>		<u>HOMOCIGOTOS 12M (n=3)</u>
	83±10	aaa	106±9		21±16 ●●

C. Comportamiento exploratorio y respuestas de ansiedad

Campo abierto con pared	Deambulación interna			
Actividad horizontal	<u>SALVAJES 2M (n=20)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 2M (n=20)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 2M (n=20)</u>	
	101±8	81±5	22±3	***/●●●
	<u>SALVAJES 6M (n=12)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 6M (n=17)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 6M (n=16)</u>	
	63±11	60±6	2±0,48	**/●●●/aa
	<u>SALVAJES 12M (n=11)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 12M (n=15)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 12M (n=9)</u>	
	45±10	55±5	3±0,87	●●●/aa
	aa	a		
Campo abierto con pared	% Deambulación interna con respecto a la total			
Actividad horizontal	<u>SALVAJES 2M (n=20)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 2M (n=20)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 2M (n=20)</u>	
	39±2	38±2	42±6	
	<u>SALVAJES 6M (n=12)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 6M (n=17)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 6M (n=16)</u>	
	41±4	41±4	90±7	***/●●●/aaa
	<u>SALVAJES 12M (n=11)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 12M (n=15)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 12M (n=9)</u>	
	33±3	34±2	83±12	**/●●/a

C. Comportamiento exploratorio y respuestas de ansiedad

Campo abierto con pared	% Animales que presentan rearing			
Actividad vertical	<u>SALVAJES 2M (n=20)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 2M (n=20)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 2M (n=20)</u>	
	100	100	50	***/●●●
	<u>SALVAJES 6M (n=12)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 6M (n=17)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 6M (n=18)</u>	
	100	88	0	**/aa ***/●●●/aaa
	<u>SALVAJES 12M (n=11)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 12M (n=15)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 12M (n=13)</u>	
	100	93	0	*/a ***/●●●/aaa
Campo abierto con pared	Número total de rearings			
Actividad vertical	<u>SALVAJES 2M (n=20)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 2M (n=20)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 2M (n=10)</u>	
	29,10±1,79	13,65±1,33	3,90±1,20	***/*
	<u>SALVAJES 6M (n=12)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 6M (n=15)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 6M (n=0)</u>	
	10,00±2,82	11,20±1,70	No evaluable	
	<u>SALVAJES 12M (n=11)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 12M (n=14)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 12M (n=0)</u>	
	9,45±2,99	12,43±1,96	No evaluable	

C. Comportamiento exploratorio y respuestas de ansiedad

Campo abierto		Latencia primer rearing (s)				
con pared						
Actividad vertical	<u>SALVAJES 2M (n=20)</u>		<u>HETEROCIGOTOS 2M (n=20)</u>		<u>HOMOCIGOTOS 2M (n=10)</u>	
	43±4		94±11	**	171±21	**
	<u>SALVAJES 6M (n=12)</u>		<u>HETEROCIGOTOS 6M (n=15)</u>		<u>HOMOCIGOTOS 6M (n=0)</u>	
	100±22		108±18		No evaluable	
	<u>SALVAJES 12M (n=11)</u>		<u>HETEROCIGOTOS 12M (n=14)</u>		<u>HOMOCIGOTOS 12M (n=0)</u>	
	69±18		106±12		No evaluable	
Campo abierto		% Animales que realizan grooming				
con pared						
Acicalamiento	<u>SALVAJES 2M (n=20)</u>		<u>HETEROCIGOTOS 2M (n=20)</u>		<u>HOMOCIGOTOS 2M (n=20)</u>	
	75		100	***	100	***
	<u>SALVAJES 6M (n=12)</u>		<u>HETEROCIGOTOS 6M (n=17)</u>		<u>HOMOCIGOTOS 6M (n=18)</u>	
	92	aa	100	*	78	*/●●●/aaa
	<u>SALVAJES 12M (n=11)</u>		<u>HETEROCIGOTOS 12M (n=15)</u>		<u>HOMOCIGOTOS 12M (n=13)</u>	
	100	aaa/b	93	*/a/b	31	***/*●●●/aaa/bbb

C. Comportamiento exploratorio y respuestas de ansiedad

Campo abierto con pared Acicalamiento	Número total de groomings			
	<u>SALVAJES 2M (n=15)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 2M (n=20)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 2M (n=20)</u>	
	1,47±0,17	2,60±0,39	3,90±0,78	***
	<u>SALVAJES 6M (n=11)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 6M (n=17)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 6M (n=14)</u>	
	1,73±0,19	4,41±0,61	2,00±0,33	●●/a
	<u>SALVAJES 12M (n=11)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 12M (n=14)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 12M (n=4)</u>	
	2,18±0,33	4,36±0,78	1,75±0,48	*
Campo abierto con pared Acicalamiento	Latencia primer grooming (s)			
	<u>SALVAJES 2M (n=15)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 2M (n=20)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 2M (n=20)</u>	
	188±21	115±9	136±12	
	<u>SALVAJES 6M (n=11)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 6M (n=17)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 6M (n=14)</u>	
	111±19	95±8	201±22	●
	<u>SALVAJES 12M (n=11)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 12M (n=14)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 12M (n=4)</u>	
	84±16	72±11	206±30	a

C. Comportamiento exploratorio y respuestas de ansiedad

**Campo abierto
con pared**

% Animales que defecan

SALVAJES 2M (n=20)

30

HETEROCIGOTOS 2M (n=20)

55

HOMOCIGOTOS 2M (n=20)

55

SALVAJES 6M (n=12)

33

HETEROCIGOTOS 6M (n=17)

29

aaa

HOMOCIGOTOS 6M (n=18)

67

***/●●●

SALVAJES 12M (n=11)

73

aaa/bbb

HETEROCIGOTOS 12M (n=15)

47

***b

HOMOCIGOTOS 12M (n=13)

38

***a/bbb

**Campo abierto
con pared**

Número de bolas fecales

SALVAJES 2M (n=6)

1,17±0,17

HETEROCIGOTOS 2M (n=11)

2,27±0,43

HOMOCIGOTOS 2M (n=11)

1,36±0,15

SALVAJES 6M (n=4)

2,00±0,58

HETEROCIGOTOS 6M (n=5)

3,40±0,81

HOMOCIGOTOS 6M (n=12)

2,50±0,44

SALVAJES 12M (n=8)

2,13±0,44

HETEROCIGOTOS 12M (n=7)

3,86±0,83

HOMOCIGOTOS 12M (n=5)

2,20±0,58

C. Comportamiento exploratorio y respuestas de ansiedad

***Campo abierto
con pared***

% Animales que orinan

SALVAJES 2M (n=20)

10

HETEROCIGOTOS 2M (n=20)

10

HOMOCIGOTOS 2M (n=20)

10

SALVAJES 6M (n=12)

0

aa

HETEROCIGOTOS 6M (n=17)

0

aa

HOMOCIGOTOS 6M (n=18)

0

aa

SALVAJES 12M (n=11)

0

aa

HETEROCIGOTOS 12M (n=15)

7

*/b

HOMOCIGOTOS 12M (n=13)

0

●/aa

Campo abierto con pared

En esta prueba, en cuanto al porcentaje de animales que presentan rearing, encontramos que ningún animal salvaje presenta conducta de rearing a ninguna de las edades estudiadas.

A los dos y seis meses, los animales heterocigotos y homocigotos muestran un porcentaje significativamente mayor ($p < 0,001$) que los salvajes, los cuales presentan un porcentaje nulo. A los doce meses, también los animales heterocigotos presentan un porcentaje significativamente mayor ($p < 0,05$) que los salvajes, al igual que ocurre con los homocigotos ($p < 0,001$) frente a los salvajes. Asimismo, el grupo de ratones homocigotos muestra un porcentaje de rearing significativamente mayor ($p < 0,001$) que el grupo de heterocigotos, a todas edades.

Por otra parte, los ratones heterocigotos a los doce meses presentan un porcentaje significativamente menor ($p < 0,05$) que a los seis meses.

El tiempo total de inmovilidad valorado en segundos a lo largo de toda esta prueba, no se puede evaluar en animales salvajes, ya que no presentan inmovilidad a ninguna de las edades estudiadas. Con seis meses, los animales homocigotos muestran un aumento altamente significativo de este tiempo ($p < 0,001$) respecto a los heterocigotos. A los doce meses de edad, solo un animal heterocigoto muestra inmovilidad. Por otro lado, en ratones homocigotos este tiempo de inmovilidad se incrementa con la edad. Estos animales a los doce y seis meses de edad presentan un incremento altamente significativo de este tiempo ($p < 0,001$) respecto a los dos meses.

En relación al porcentaje de animales que salen del centro del aparato, todos los ratones salvajes salen del centro a todas las edades. Asimismo, todos los animales heterocigotos a los dos y doce meses salen del centro.

Con seis meses de edad, los ratones heterocigotos presentan un porcentaje significativamente menor ($p < 0,05$) que los salvajes. Los animales homocigotos a los seis y doce meses muestran un porcentaje significativamente menor ($p < 0,001$) que sus controles salvajes y heterocigotos. Por otra parte, los ratones heterocigotos a los seis meses presentan un porcentaje significativamente menor ($p < 0,05$) que a los dos meses. En cambio, estos animales a los doce meses muestran un porcentaje significativamente

mayor ($p<0,05$) que a los seis meses. Por último, los animales homocigotos a los seis y doce meses presentan un porcentaje significativamente menor ($p<0,001$) que a los dos meses.

Respecto al tiempo de salida del centro del aparato medido en segundos, a los dos meses, los animales heterocigotos y homocigotos muestran un aumento significativo de este tiempo ($p<0,001$) respecto a los salvajes. De la misma manera, a los seis y doce meses los ratones heterocigotos presentan un incremento significativo de este tiempo ($p<0,01$) respecto a los salvajes. Al realizar la prueba “t” de Student, el aumento en el tiempo de salida del centro que se observa en animales homocigotos respecto a salvajes a los doce meses, resulta significativo ($p<0,05$).

En cuanto al porcentaje de animales que entran en la periferia del aparato, todos los animales salvajes a todas las edades entran, así como los heterocigotos a los dos y doce meses de edad. Con seis meses, los ratones heterocigotos presentan un porcentaje significativamente menor ($p<0,05$) que los salvajes. Los animales homocigotos a todas las edades muestran un porcentaje significativamente menor ($p<0,001$) que sus controles salvajes y heterocigotos.

Por otro lado, al igual que ocurre con el porcentaje de animales que salen del centro de la aparato, los ratones heterocigotos a los seis meses presentan un porcentaje de entrada en la periferia significativamente menor ($p<0,05$) que a los dos meses. Sin embargo, estos animales a los doce meses muestran un porcentaje significativamente mayor ($p<0,05$) que a los seis meses. Finalmente, los ratones homocigotos a los seis y doce meses presentan un porcentaje significativamente menor ($p<0,001$) que a los dos meses.

En relación al tiempo que tardan los animales en entrar en la periferia medido en segundos, a los dos meses de edad los ratones heterocigotos y homocigotos muestran un incremento significativo de este tiempo ($p<0,001$) respecto a los salvajes. Con seis meses, los animales heterocigotos también presentan un aumento significativo ($p<0,01$) del tiempo que tardan en entrar en la periferia respecto a los salvajes. A los doce meses de edad encontramos que los animales heterocigotos muestran un incremento

significativo de este parámetro ($p<0,001$) con respecto a los salvajes, así como lo muestran también los homocigotos ($p<0,05$).

En cuanto a la deambulaci3n total, los ratones heterocigotos a los dos meses presentan un descenso significativo de la misma ($p<0,05$) respecto a los salvajes. Por su parte, los animales homocigotos muestran a todas las edades un descenso significativo de la deambulaci3n total ($p<0,001$) respecto a sus controles salvajes y heterocigotos. Respecto al estudio con la edad, tanto los ratones salvajes como los homocigotos presentan a los seis y doce meses un descenso significativo de este parámetro ($p<0,001$) respecto a los dos meses. De la misma manera, los animales heterocigotos exhiben un descenso significativo de la deambulaci3n total ($p<0,01$) a los seis y doce meses respecto a los dos meses.

En el análisis de la deambulaci3n externa, a los dos meses encontramos que los ratones homocigotos obesos presentan un descenso significativo de la misma ($p<0,001$) respecto a sus controles salvajes y heterocigotos. Con doce meses, estos animales obesos también presentan un descenso significativo ($p<0,01$) de esta deambulaci3n respecto a los heterocigotos.

Cuando se realiza la prueba “t” de Student, el descenso que presentan los ratones heterocigotos en esta deambulaci3n respecto a los salvajes a los dos meses, se pone de manifiesto significativamente ($p<0,05$). Con esta misma prueba, el descenso en la deambulaci3n total que se observa a los seis meses en homocigotos respecto a heterocigotos, resulta significativo ($p<0,01$). Asimismo, el descenso que encontramos en la deambulaci3n externa de estos animales obesos a los doce meses respecto a los salvajes, también se pone de manifiesto significativamente ($p<0,05$) con esta prueba.

En el estudio a lo largo de la edad encontramos que los ratones salvajes presentan un descenso altamente significativo de esta deambulaci3n ($p<0,001$) a los seis y doce meses, respecto a los dos meses de edad. Al realizar la prueba “t” de Student, el descenso que se observa de este parámetro en ratones heterocigotos a los seis y doce meses respecto a los dos meses de edad, resulta significativo ($p<0,05$).

En relación a la deambulación interna, a los dos meses los animales homocigotos muestran un descenso significativo de la misma ($p<0,001$) respecto a sus controles salvajes. Estos animales obesos a los seis meses también presentan un descenso de este parámetro respecto a los salvajes de manera significativa ($p<0,01$). En todas las edades estudiadas, estos ratones homocigotos muestran un descenso significativo de esta deambulación ($p<0,001$) respecto a sus controles heterocigotos.

Cuando se realiza la prueba “t” de Student, el descenso que se observa en esta deambulación en animales heterocigotos respecto a salvajes a los dos meses, se pone de manifiesto significativamente ($p<0,05$). Con esta misma prueba estadística, el descenso que existe en la deambulación interna en ratones homocigotos respecto a salvajes a los doce meses, resulta significativo ($p<0,01$).

En el estudio con la edad y realizando también la prueba “t” de Student, el descenso en este parámetro en animales salvajes a los seis meses respecto a los dos meses, se pone de manifiesto significativamente ($p<0,01$). De igual manera, con esta prueba el descenso en la deambulación interna en ratones heterocigotos a los seis meses respecto a los dos meses, resulta significativo ($p<0,05$).

Respecto al porcentaje de deambulación interna con respecto a la total, a los seis meses los animales homocigotos muestran un incremento significativo de este porcentaje ($p<0,001$) respecto a sus controles salvajes y heterocigotos. Estos animales obesos a los doce meses también presentan un aumento significativo de este parámetro ($p<0,01$) respecto a salvajes y heterocigotos. Por otra parte, estos ratones homocigotos muestran un aumento significativo de este porcentaje a los seis meses ($p<0,001$) y a los doce meses ($p<0,05$), respecto a los dos meses de edad.

En cuanto al porcentaje de animales que presentan rearing, todos los animales salvajes lo presentan a todas las edades estudiadas, así como los animales heterocigotos con dos meses de edad. Ningún ratón homocigoto presenta conducta de rearing ni a los seis ni a los doce meses.

Los animales homocigotos muestran a todas las edades un porcentaje de rearing significativamente menor ($p<0,001$) que sus controles salvajes y heterocigotos. Los ratones heterocigotos presentan un porcentaje significativamente menor que los salvajes

a los seis meses ($p<0,01$) y a los doce meses ($p<0,05$) de edad. En relación al estudio con la edad, los ratones heterocigotos muestran un porcentaje de rearing significativamente menor a los seis meses ($p<0,01$) y a los doce meses ($p<0,05$) respecto a los dos meses de edad. Los animales homocigotos obesos al presentar un porcentaje nulo a los seis y doce meses, éste es significativamente menor ($p<0,001$) que a los dos meses de edad en estos animales.

En el estudio del número total de rearings, a los seis y doce meses encontramos que este dato no es evaluable ($n=0$) en los animales homocigotos obesos, ya que ninguno de ellos realiza rearing a esta edad. Por otra parte, a la edad de dos meses los ratones heterocigotos y homocigotos presentan un descenso significativo ($p<0,001$) del número de rearings respecto a los salvajes. Asimismo, se observa un descenso significativo ($p<0,05$) de este parámetro en ratones homocigotos respecto a heterocigotos también a la edad de dos meses. Los animales salvajes a los seis y doce meses muestran un descenso significativo ($p<0,001$) del número de rearings respecto a los dos meses.

En relación al tiempo de latencia del primer rearing medido en segundos, nuevamente encontramos que este dato no es evaluable ($n=0$) en los ratones homocigotos a los seis y doce meses de edad, ya que ninguno de ellos realiza rearing a esta edad. Con dos meses, los animales heterocigotos y homocigotos presentan un aumento significativo ($p<0,01$) en el tiempo de latencia en realizar el primer rearing respecto a los salvajes. Cuando se realiza la prueba “t” de Student, el aumento en el tiempo de latencia que se observa en homocigotos respecto a heterocigotos a los dos meses de edad, resulta significativo ($p<0,01$). Con esta misma prueba, el incremento que se encuentra en este parámetro en ratones salvajes a los seis meses respecto a los dos meses, se pone de manifiesto significativamente ($p<0,05$).

Respecto al porcentaje de animales que realizan grooming, a los dos meses encontramos que todos los animales heterocigotos y homocigotos lo realizan, así como los heterocigotos a los seis meses y los salvajes a los doce meses. Con dos meses, los ratones heterocigotos y homocigotos presentan un porcentaje significativamente mayor

($p < 0,001$) que los salvajes. A la edad de seis meses, de nuevo los ratones heterocigotos muestran un porcentaje de grooming significativamente mayor ($p < 0,05$) que los salvajes, en cambio los homocigotos presentan un porcentaje significativamente menor ($p < 0,05$) que sus controles salvajes a esta edad. Con doce meses, los animales heterocigotos muestran un porcentaje significativamente menor ($p < 0,05$) que los salvajes. También a esta edad, los ratones homocigotos presentan un porcentaje significativamente menor ($p < 0,001$) que los salvajes. Por otro lado, a la edad de seis y doce meses los animales homocigotos muestran un porcentaje significativamente menor ($p < 0,001$) que los heterocigotos.

En referencia al estudio con la edad, los ratones salvajes presentan a los seis meses un porcentaje de grooming significativamente mayor ($p < 0,01$) que a los dos meses. A los doce meses, la totalidad de estos animales muestra conducta de grooming, por lo que presentan un porcentaje significativamente mayor que a los dos meses ($p < 0,001$) y que a los seis meses ($p < 0,05$) de edad. Los animales heterocigotos con doce meses presentan un porcentaje significativamente menor ($p < 0,05$) que con dos y seis meses, edades en las cuales todos los animales muestran conducta de grooming. Por último, los ratones homocigotos a los seis meses presentan un porcentaje de grooming significativamente menor ($p < 0,001$) que a los dos meses. Estos animales a los doce meses muestran un porcentaje significativamente menor ($p < 0,001$) que a los dos y seis meses de edad.

En el análisis del número total de groomings, a la edad de dos meses los ratones heterocigotos presentan un aumento significativo ($p < 0,05$) de este número respecto a los salvajes. Del mismo modo, los homocigotos a esta edad muestran un incremento significativo ($p < 0,001$) del número de groomings respecto a los salvajes. Con seis meses, los animales heterocigotos presentan un aumento significativo ($p < 0,01$) de este número respecto a salvajes. A esta misma edad, los ratones homocigotos muestran un descenso significativo ($p < 0,01$) del número de groomings respecto a los heterocigotos. Con doce meses, nuevamente los animales heterocigotos presentan un incremento significativo ($p < 0,05$) de este número respecto a salvajes.

En el estudio con la edad, los animales heterocigotos a los seis meses muestran un aumento significativo ($p < 0,05$) del número de groomings respecto a los dos meses.

Los ratones homocigotos a los seis meses presentan un descenso significativo ($p<0,05$) de este número respecto a los dos meses. Por otra parte, el aumento en el número de groomings que se observa en ratones heterocigotos a la edad de doce meses respecto a los dos meses, se encuentra en el límite de significación ($p=0,05$). Al realizar la prueba “t” de Student, este aumento se pone de manifiesto significativamente ($p<0,05$).

En cuanto al tiempo de latencia en realizar el primer grooming medido en segundos, a los seis meses los animales homocigotos muestran un incremento significativo de este tiempo ($p<0,05$) respecto a sus controles heterocigotos. Los animales salvajes a los doce meses presentan un descenso significativo ($p<0,05$) de este tiempo de latencia respecto a los dos meses.

Cuando se realiza la prueba “t” de Student, se obtienen las siguientes significaciones: a los dos meses, los ratones heterocigotos muestran un descenso significativo ($p<0,01$) del tiempo de latencia respecto a los salvajes. A esta misma edad, los ratones homocigotos también presentan un descenso significativo ($p<0,05$) de este parámetro respecto a sus controles salvajes. Con seis y doce meses de edad, los animales homocigotos muestran un aumento significativo ($p<0,01$) de este tiempo de latencia respecto a los salvajes. A la edad de doce meses, los ratones homocigotos también presentan un aumento significativo ($p<0,001$) del tiempo de latencia en realizar el primer grooming respecto a los heterocigotos.

En relación al estudio con la edad y realizando también la prueba “t” de Student, el descenso en el tiempo de latencia que se observa en animales salvajes a los seis meses respecto a los dos meses de edad, se pone de manifiesto significativamente ($p<0,05$). Los ratones heterocigotos a los doce meses muestran con la prueba “t” de Student, un descenso significativo ($p<0,01$) del tiempo de latencia respecto a los dos meses. Finalmente, los animales homocigotos presentan un incremento significativo del tiempo de latencia a los seis ($p<0,01$) y a los doce meses ($p<0,05$) respecto a los dos meses de edad, al realizar esta misma prueba estadística.

Respecto al porcentaje de animales que defecan, a los dos meses los animales heterocigotos y homocigotos muestran un porcentaje significativamente mayor ($p<0,001$) que los salvajes. Con seis meses, los animales homocigotos presentan un

aumento significativo ($p < 0,001$) en este porcentaje respecto a sus controles salvajes y heterocigotos. A los doce meses, el grupo de heterocigotos y homocigotos muestran un porcentaje de animales que defecan significativamente menor ($p < 0,001$) que los salvajes. En el estudio con la edad, los ratones salvajes a los doce meses presentan un aumento significativo ($p < 0,001$) de este porcentaje respecto a los dos y seis meses. A los seis meses, los animales heterocigotos muestran un porcentaje significativamente menor ($p < 0,001$) que a los dos meses. Estos animales a los doce meses presentan un porcentaje significativamente mayor ($p < 0,05$) que a los seis meses. Por último, los animales homocigotos obesos a los doce meses muestran un porcentaje significativamente menor que a los dos meses ($p < 0,05$) y que a los seis meses ($p < 0,001$) de edad.

En el estudio del número de bolas fecales no se encuentran diferencias significativas entre grupos. Solo cuando se realiza la prueba “t” de Student, el aumento que se observa del número de defecaciones en ratones heterocigotos respecto a salvajes a los dos meses de edad, resulta significativo ($p < 0,05$). Con esta misma prueba, el aumento en el número de bolas fecales en animales homocigotos a los seis meses respecto a los dos meses, se pone de manifiesto significativamente ($p < 0,05$).

En cuanto al porcentaje de animales que orinan, a los seis meses ningún grupo de animales orina, y a los doce meses no orinan ni los ratones salvajes ni los homocigotos. A los doce meses, los ratones heterocigotos presentan un aumento significativo de este porcentaje ($p < 0,05$) respecto a los salvajes, que muestran un porcentaje nulo. A esta misma edad, los animales homocigotos presentan un porcentaje nulo, que es significativamente menor ($p < 0,05$) que el que muestran los heterocigotos. Por otra parte, a los seis y doce meses de edad al presentar los animales salvajes y homocigotos un porcentaje nulo, éste resulta ser significativamente menor ($p < 0,01$) que el que presentan a la edad de dos meses. Los ratones heterocigotos a los seis meses presentan un porcentaje nulo, que es significativamente menor ($p < 0,01$) al que presentan a los dos meses de edad. Estos animales a los doce meses muestran un porcentaje significativamente mayor ($p < 0,05$) que a los seis meses.

Por último, en el análisis del número de orinas (parámetro no representado en tabla), el dato resulta no evaluable ($n=0$) en animales salvajes y homocigotos a los seis y doce meses, y en los heterocigotos a los seis meses de edad. A los doce meses, solo existe un único dato ($n=1$) (1) en heterocigotos. A los dos meses, los valores obtenidos en animales salvajes son ($n=2$) ($1,00 \pm 0,00$), en heterocigotos ($n=2$) ($1,50 \pm 0,50$) y en homocigotos ($n=2$) ($1,00 \pm 0,00$). No se encuentran diferencias significativas entre estos grupos a la edad de dos meses.

Tras la realización de la prueba del campo abierto, al día siguiente se sometió a los animales a la prueba del tablero de agujeros.

C. Comportamiento exploratorio y respuestas de ansiedad

Tablero de agujeros % Animales que presentan freezing

<u>SALVAJES 2M (n=20)</u>		<u>HETEROCIGOTOS 2M (n=20)</u>		<u>HOMOCIGOTOS 2M (n=20)</u>	
15		5	*	60	***/●●●
<u>SALVAJES 6M (n=12)</u>		<u>HETEROCIGOTOS 6M (n=17)</u>		<u>HOMOCIGOTOS 6M (n=18)</u>	
0	aaa	18	***/aaa	100	***/●●●/aaa
<u>SALVAJES 12M (n=11)</u>		<u>HETEROCIGOTOS 12M (n=15)</u>		<u>HOMOCIGOTOS 12M (n=13)</u>	
0	aaa	27	***/aaa	100	***/●●●/aaa

Tablero de agujeros Tiempo total de inmovilidad (s)

<u>SALVAJES 2M (n=4)</u>		<u>HETEROCIGOTOS 2M (n=1)</u>		<u>HOMOCIGOTOS 2M (n=12)</u>	
14,50±6,09		5 (dato único)		34,17±8,01	
<u>SALVAJES 6M (n=0)</u>		<u>HETEROCIGOTOS 6M (n=3)</u>		<u>HOMOCIGOTOS 6M (n=18)</u>	
No evaluable		5,67±1,76		239,94±13,27	●●●/aaa
<u>SALVAJES 12M (n=0)</u>		<u>HETEROCIGOTOS 12M (n=4)</u>		<u>HOMOCIGOTOS 12M (n=13)</u>	
No evaluable		32,50±23,52		210,00±17,21	●●/aaa

C. Comportamiento exploratorio y respuestas de ansiedad

Tablero de agujeros	Deambulación total				
Comportamiento					
exploratorio no dirigido	<u>SALVAJES 2M (n=20)</u>		<u>HETEROCIGOTOS 2M (n=20)</u>		<u>HOMOCIGOTOS 2M (n=20)</u>
Actividad horizontal	212±7		197±7		104±10 ***/●●●
	<u>SALVAJES 6M (n=12)</u>		<u>HETEROCIGOTOS 6M (n=17)</u>		<u>HOMOCIGOTOS 6M (n=14)</u>
	184±9 a		156±6 */aaa		11±5 ***/●●●/aaa
	<u>SALVAJES 12M (n=11)</u>		<u>HETEROCIGOTOS 12M (n=15)</u>		<u>HOMOCIGOTOS 12M (n=12)</u>
	151±14 aa		160±9 aa		20±5 ***/●●●/aaa
Tablero de agujeros	Deambulación externa				
Comportamiento					
exploratorio no dirigido	<u>SALVAJES 2M (n=20)</u>		<u>HETEROCIGOTOS 2M (n=20)</u>		<u>HOMOCIGOTOS 2M (n=20)</u>
Actividad horizontal	129±5		141±7		71±6 ***/●●●
	<u>SALVAJES 6M (n=12)</u>		<u>HETEROCIGOTOS 6M (n=17)</u>		<u>HOMOCIGOTOS 6M (n=14)</u>
	110±6 a		111±5 aa		10±5 ***/●●●/aaa
	<u>SALVAJES 12M (n=11)</u>		<u>HETEROCIGOTOS 12M (n=15)</u>		<u>HOMOCIGOTOS 12M (n=12)</u>
	89±7 aaa/b		104±7 aa		19±5 ***/●●●/aaa

C. Comportamiento exploratorio y respuestas de ansiedad

Tablero de agujeros	Deambulaci3n interna			
Comportamiento				
exploratorio no dirigido	<u>SALVAJES 2M (n=20)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 2M (n=20)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 2M (n=19)</u>	
Actividad horizontal				
	83±5	57±3	**	34±5 ***/●
	<u>SALVAJES 6M (n=12)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 6M (n=17)</u>		<u>HOMOCIGOTOS 6M (n=6)</u>
	73±5	44±2	**	3±1 ***/●●●/aaa
	<u>SALVAJES 12M (n=11)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 12M (n=15)</u>		<u>HOMOCIGOTOS 12M (n=2)</u>
	62±7	55±4		3±1 ***/●●●/aaa
Tablero de agujeros	% Deambulaci3n interna con respecto a la total			
Comportamiento				
exploratorio no dirigido	<u>SALVAJES 2M (n=20)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 2M (n=20)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 2M (n=19)</u>	
Actividad horizontal				
	39±2	29±1	**	29±3
	<u>SALVAJES 6M (n=12)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 6M (n=17)</u>		<u>HOMOCIGOTOS 6M (n=6)</u>
	40±2	29±1	**	20±3 *
	<u>SALVAJES 12M (n=11)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 12M (n=15)</u>		<u>HOMOCIGOTOS 12M (n=2)</u>
	40±2	35±2		6±1 ***/●●●/aaa

C. Comportamiento exploratorio y respuestas de ansiedad

Tablero de agujeros	% Animales que presentan rearing			
Comportamiento				
exploratorio no dirigido	<u>SALVAJES 2M (n=20)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 2M (n=20)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 2M (n=20)</u>	
Actividad vertical				
	100	100	65	***/●●●
	<u>SALVAJES 6M (n=12)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 6M (n=17)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 6M (n=18)</u>	
	100	100	0	***/●●●/aaa
	<u>SALVAJES 12M (n=11)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 12M (n=15)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 12M (n=13)</u>	
	100	100	0	***/●●●/aaa
Tablero de agujeros	Número total de rearings			
Comportamiento				
exploratorio no dirigido	<u>SALVAJES 2M (n=20)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 2M (n=20)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 2M (n=13)</u>	
Actividad vertical				
	18,05±1,36	18,60±1,55	5,08±0,96	***/●●●
	<u>SALVAJES 6M (n=12)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 6M (n=17)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 6M (n=0)</u>	
	13,25±2,00	10,71±1,27	aa	No evaluable
	<u>SALVAJES 12M (n=11)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 12M (n=15)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 12M (n=0)</u>	
	6,27±1,70	aaa	10,60±1,07	aa
				No evaluable

C. Comportamiento exploratorio y respuestas de ansiedad

Tablero de agujeros	Latencia primer rearing (s)			
Comportamiento				
exploratorio no dirigido	<u>SALVAJES 2M (n=20)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 2M (n=20)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 2M (n=13)</u>	
Actividad vertical	38±4	32±4	171±16	***/●●●
	<u>SALVAJES 6M (n=12)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 6M (n=17)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 6M (n=0)</u>	
	67±15	86±10	No evaluable	aa
	<u>SALVAJES 12M (n=11)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 12M (n=15)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 12M (n=0)</u>	
	95±27	88±19	No evaluable	
Tablero de agujeros	% Animales que exploran agujeros			
Comportamiento				
exploratorio dirigido	<u>SALVAJES 2M (n=20)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 2M (n=20)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 2M (n=20)</u>	
	100	100	90	**/●●
	<u>SALVAJES 6M (n=12)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 6M (n=17)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 6M (n=18)</u>	
	100	100	11	***/●●●/aaa
	<u>SALVAJES 12M (n=11)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 12M (n=15)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 12M (n=13)</u>	
	100	100	0	***/●●●/aaa/bb

C. Comportamiento exploratorio y respuestas de ansiedad

Tablero de agujeros	Número total de exploraciones en agujeros			
Comportamiento exploratorio dirigido	<u>SALVAJES 2M (n=20)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 2M (n=20)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 2M (n=18)</u>	
	10,45±0,75	14,00±0,86	5,78±0,67	**/●●●
	<u>SALVAJES 6M (n=12)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 6M (n=17)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 6M (n=2)</u>	
	10,50±1,26	13,53±0,68	1,50±0,50	*/●●●
	<u>SALVAJES 12M (n=11)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 12M (n=15)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 12M (n=0)</u>	
	10,18±1,41	14,47±0,52	No evaluable	*
Tablero de agujeros	Tiempo latencia hasta explorar el primer agujero (s)			
Comportamiento exploratorio dirigido	<u>SALVAJES 2M (n=20)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 2M (n=20)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 2M (n=18)</u>	
	37±4	56±6	110±19	*
	<u>SALVAJES 6M (n=12)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 6M (n=17)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 6M (n=2)</u>	
	28±5	23±3	263±33	aa
	<u>SALVAJES 12M (n=11)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 12M (n=15)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 12M (n=0)</u>	
	25±6	32±7	No evaluable	

C. Comportamiento exploratorio y respuestas de ansiedad

Tablero de agujeros Acicalamiento	% Animales que realizan grooming			
	<u>SALVAJES 2M (n=20)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 2M (n=20)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 2M (n=20)</u>	
	50	70	**	60
	<u>SALVAJES 6M (n=12)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 6M (n=17)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 6M (n=18)</u>	
	42	71	***	56 •
	<u>SALVAJES 12M (n=11)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 12M (n=15)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 12M (n=13)</u>	
	45	80	***	62 */●●
Tablero de agujeros Acicalamiento	Número total de groomings			
	<u>SALVAJES 2M (n=10)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 2M (n=14)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 2M (n=12)</u>	
	2,20±0,42	1,50±0,17	2,17±0,37	
	<u>SALVAJES 6M (n=5)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 6M (n=12)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 6M (n=10)</u>	
	2,20±0,58	1,67±0,19	1,70±0,37	
	<u>SALVAJES 12M (n=5)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 12M (n=12)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 12M (n=8)</u>	
	1,40±0,24	2,83±0,63	2,13±0,40	

C. Comportamiento exploratorio y respuestas de ansiedad

Tablero de agujeros	Latencia primer grooming (s)			
	Acicalamiento			
	<u>SALVAJES 2M (n=10)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 2M (n=14)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 2M (n=12)</u>	
	136±17	186±19	181±19	
	<u>SALVAJES 6M (n=5)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 6M (n=12)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 6M (n=10)</u>	
	107±22	200±16	186±23	
	<u>SALVAJES 12M (n=5)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 12M (n=12)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 12M (n=8)</u>	
	104±20	123±14	161±29	
Tablero de agujeros	% Animales que defecan			
	<u>SALVAJES 2M (n=20)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 2M (n=20)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 2M (n=20)</u>	
	25	30	50	***/●●
	<u>SALVAJES 6M (n=12)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 6M (n=17)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 6M (n=18)</u>	
	8	29	56	***/●●●
	<u>SALVAJES 12M (n=11)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 12M (n=15)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 12M (n=13)</u>	
	27	27	15	aaa/bbb

C. Comportamiento exploratorio y respuestas de ansiedad

<i>Tablero de agujeros</i>	Número de bolas fecales			
	<u>SALVAJES 2M (n=5)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 2M (n=6)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 2M (n=10)</u>	
	1,00±0,00	1,17±0,17	2,60±0,56	*
	<u>SALVAJES 6M (n=1)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 6M (n=5)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 6M (n=10)</u>	
	4 (dato único)	1,40±0,24	2,60±0,50	
	<u>SALVAJES 12M (n=3)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 12M (n=4)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 12M (n=2)</u>	
	1,00±0,00	2,25±0,95	2,00±0,00	*

Tablero de agujeros

En esta prueba, en cuanto al porcentaje de animales que presentan freezing, encontramos que a los seis y doce meses ningún salvaje lo presenta, en cambio sí lo presentan todos los homocigotos obesos. A la edad de dos meses, los ratones heterocigotos muestran un porcentaje de freezing significativamente menor que los salvajes ($p<0,05$), pero presentan un porcentaje significativamente mayor que los salvajes ($p<0,001$) a la edad de seis y doce meses. Los animales homocigotos muestran a todas las edades un porcentaje de freezing significativamente mayor ($p<0,001$) que sus controles salvajes y heterocigotos.

En relación al estudio con la edad, los ratones salvajes a los seis y doce meses al presentar un porcentaje nulo, éste es significativamente menor ($p<0,001$) que a la edad de dos meses. Por el contrario, los animales heterocigotos y homocigotos a la edad de seis y doce meses muestran un porcentaje de freezing significativamente mayor ($p<0,001$) que a los dos meses.

Respecto al tiempo total de inmovilidad medido en segundos, éste no se puede evaluar en animales salvajes a la edad de seis y doce meses, ya que no presentan inmovilidad a estas edades. Por otro lado, solamente presenta inmovilidad un animal heterocigoto a la edad de dos meses. Los animales homocigotos muestran un aumento significativo de este tiempo respecto a los heterocigotos a los seis meses ($p<0,001$) y a los doce meses ($p<0,01$) de edad. Estos animales también presentan un aumento significativo ($p<0,001$) del tiempo de inmovilidad a los seis y doce meses respecto a los dos meses.

En el estudio de la deambulación total encontramos que a la edad de seis meses, los ratones heterocigotos muestran un descenso significativo ($p<0,05$) de esta deambulación respecto a los salvajes. Por otra parte, los animales homocigotos presentan un descenso significativo ($p<0,001$) de la deambulación total respecto a sus controles salvajes y heterocigotos a todas las edades estudiadas.

Los ratones salvajes por su parte, muestran un descenso significativo de esta deambulación a los seis meses ($p<0,05$) y a los doce meses ($p<0,01$), respecto a los dos meses de edad. Del mismo modo, los animales heterocigotos presentan un descenso

significativo de este parámetro a los seis meses ($p<0,001$) y a los doce meses ($p<0,01$), respecto a los dos meses de edad. Finalmente, los animales homocigotos también muestran descenso significativo ($p<0,001$) de la deambulaci3n total a los seis y doce meses, respecto a los dos meses de edad.

En relaci3n a la deambulaci3n externa, los ratones homocigotos presentan un descenso altamente significativo ($p<0,001$) de la misma, respecto a sus controles salvajes y heterocigotos. Por otro lado, los ratones salvajes muestran un descenso significativo de esta deambulaci3n a los seis meses ($p<0,05$) y a los doce meses ($p<0,001$), respecto a los dos meses de edad. Estos animales tambi3n presentan un descenso significativo ($p<0,05$) de la deambulaci3n externa a los doce meses, respecto a los seis meses de edad. A la edad de seis y doce meses, los animales heterocigotos muestran un descenso significativo ($p<0,01$) de este parámetro respecto a los dos meses. Por 3ltimo, los ratones homocigotos tambi3n presentan un descenso significativo ($p<0,001$) de la deambulaci3n externa a los seis y doce meses, respecto a los dos meses de edad.

En el an3lisis de la deambulaci3n interna, los animales heterocigotos muestran un descenso significativo ($p<0,01$) de esta deambulaci3n respecto a los animales salvajes, a los dos y seis meses de edad. Los ratones homocigotos a los dos meses presentan un descenso significativo de la deambulaci3n interna respecto a sus controles salvajes ($p<0,001$) y heterocigotos ($p<0,05$). Adem3s, estos animales homocigotos a los seis y doce meses, tambi3n muestran un descenso significativo ($p<0,001$) de este parámetro, respecto a los ratones salvajes y heterocigotos.

Por otra parte, los ratones homocigotos presentan un descenso altamente significativo ($p<0,001$) de la deambulaci3n interna a los seis y doce meses, respecto a los dos meses de edad. Cuando se realiza la prueba “t” de Student, el descenso que se observa en esta deambulaci3n en animales salvajes a los doce meses respecto a los dos meses, resulta significativo ($p<0,05$). Con esta misma prueba, la disminuci3n de este parámetro en ratones heterocigotos a los seis meses respecto a los dos meses de edad, se pone de manifiesto significativamente ($p<0,01$). Por otro lado, el aumento en la

deambulaci3n total en estos animales a los doce meses respecto a los seis meses, resulta significativo ($p<0,05$) tambi3n con esta prueba.

En cuanto al porcentaje de deambulaci3n interna respecto a la total, a los dos meses los ratones heterocigotos muestran un descenso significativo del mismo ($p<0,01$) respecto a los salvajes. Con seis meses de edad, los animales heterocigotos presentan un porcentaje significativamente menor ($p<0,01$) que los salvajes, al igual que los homocigotos frente a los salvajes ($p<0,05$). A los doce meses, los ratones homocigotos obesos muestran un porcentaje significativamente menor ($p<0,001$) que sus controles salvajes y heterocigotos. Al realizar la prueba “t” de Student, el descenso en el porcentaje de deambulaci3n interna respecto a la total que se observa en ratones homocigotos a los dos meses respecto a salvajes, resulta significativo ($p<0,01$). Asimismo, el descenso en este par3metro en ratones homocigotos a los seis meses respecto a heterocigotos, se pone de manifiesto significativamente ($p<0,01$) con esta prueba. Adem3s, el descenso en este porcentaje en ratones heterocigotos respecto a salvajes a los doce meses, tambi3n resulta significativo ($p<0,05$) con prueba “t” de Student.

En relaci3n al estudio con la edad, los animales homocigotos a los doce meses presentan un descenso significativo ($p<0,001$) de este porcentaje respecto a los dos y seis meses. Cuando se realiza la prueba “t” de Student, el incremento que se observa en este porcentaje en animales heterocigotos a los doce meses, se pone de manifiesto significativamente respecto a los dos meses ($p<0,05$), al igual que respecto a los seis meses ($p<0,01$). Por 3ltimo, el descenso que presentan los ratones homocigotos en este par3metro a los doce meses respecto a los seis meses, tambi3n resulta significativo ($p<0,05$) con esta prueba.

Respecto al porcentaje de animales que presentan rearing, todos los animales salvajes y heterocigotos a todas las edades lo presentan. Ning3n animal homocigoto a los seis y doce meses presenta conducta de rearing, solo la encontramos a los dos meses. En consecuencia, estos ratones homocigotos obesos muestran un porcentaje de rearing significativamente menor ($p<0,001$) que sus controles salvajes y heterocigotos a todas

las edades. Por otro lado, al presentar estos ratones obesos un porcentaje nulo a la edad de seis y doce meses, éste es significativamente menor ($p<0,001$) que a los dos meses.

En cuanto al estudio del número total de rearings, este parámetro no es evaluable ($n=0$) en ratones homocigotos a los seis y doce meses de edad. Estos animales a los dos meses presentan un descenso significativo ($p<0,001$) del número de rearings respecto a sus controles salvajes y heterocigotos. Al realizar la prueba “t” de Student, el aumento que se observa en este número en animales heterocigotos respecto a salvajes a los doce meses, resulta significativo ($p<0,05$).

En el estudio con la edad, los animales salvajes muestran a los doce meses un descenso significativo ($p<0,001$) de este parámetro respecto a los dos meses. Por su parte, los ratones heterocigotos presentan a los seis y doce meses un descenso significativo ($p<0,01$) del número de rearings respecto a los dos meses. Cuando se realiza la prueba “t” de Student, la disminución que presentan los ratones salvajes en este parámetro a los doce meses respecto a los seis meses de edad, resulta significativa ($p<0,05$). Con esta misma prueba, el descenso en el número de rearings en estos animales salvajes a la edad de seis meses respecto a los dos meses, se encuentra en el límite de significación ($p=0,05$).

En el análisis del tiempo de latencia en realizar el primer rearing medido en segundos, encontramos que este parámetro no es evaluable en ratones homocigotos a los seis y doce meses. Estos animales, con dos meses de edad, presentan un tiempo de latencia significativamente mayor ($p<0,001$) que sus controles salvajes y heterocigotos. Por su parte, los animales heterocigotos a los seis meses muestran un incremento significativo ($p<0,01$) en este parámetro respecto a los dos meses. Al realizar la prueba “t” de Student, el aumento que se observa en el tiempo de latencia en ratones heterocigotos a los doce meses respecto a los dos meses, resulta significativo ($p<0,05$).

En relación al porcentaje de animales que exploran agujeros, todos los animales exploran a todas las edades excepto los homocigotos a los doce meses de edad. Estos animales obesos con dos meses muestran un porcentaje significativamente menor ($p<0,01$) que sus controles salvajes y heterocigotos. De igual manera, los animales

homocigotos a los seis y doce meses presentan un porcentaje significativamente menor ($p<0,001$) que sus controles salvajes y heterocigotos. Por otro lado, a la edad de seis y doce meses los ratones homocigotos muestran un porcentaje significativamente menor ($p<0,001$) que a los dos meses. Estos animales con doce meses al presentar un porcentaje nulo, éste resulta significativamente menor ($p<0,01$) que a los seis meses.

Respecto al número total de exploraciones en agujeros, este parámetro no es evaluable en animales homocigotos a los doce meses. A la edad de dos y doce meses los ratones heterocigotos muestran un aumento significativo ($p<0,05$) en el número de exploraciones respecto a los salvajes. Los ratones homocigotos a los dos meses presentan un descenso significativo de este parámetro respecto a sus controles salvajes ($p<0,01$) y heterocigotos ($p<0,001$). De la misma manera, estos animales obesos a los seis meses muestran un descenso significativo del número de exploraciones respecto a los ratones salvajes ($p<0,05$) y heterocigotos ($p<0,001$). Al realizar la prueba “t” de Student, el aumento que se observa en este parámetro a los seis meses en ratones heterocigotos respecto a salvajes, resulta significativo ($p<0,05$).

En cuanto al tiempo de latencia hasta explorar el primer agujero (medido en segundos), este parámetro no es evaluable en ratones homocigotos a los doce meses. Estos animales obesos con dos meses muestran un incremento significativo ($p<0,05$) de este tiempo respecto a sus controles salvajes. Cuando se realiza la prueba “t” de Student, el aumento que presentan en este parámetro los ratones heterocigotos a los dos meses respecto a salvajes, resulta significativo ($p<0,05$). Además con esta misma prueba, también se pone de manifiesto significativamente ($p<0,05$) el incremento de este tiempo en ratones homocigotos a los dos meses respecto a heterocigotos.

En el estudio con la edad, a los seis meses los animales heterocigotos presentan un descenso significativo ($p<0,01$) de este parámetro respecto a los dos meses. Al realizar la prueba “t” de Student, el descenso en el tiempo de latencia que muestran estos animales a los doce meses respecto a los dos meses, resulta significativo ($p<0,05$). Con esta misma prueba, el aumento que se observa de este parámetro en animales homocigotos a los seis meses respecto a los dos meses, se pone de manifiesto significativamente ($p<0,05$).

En relación al porcentaje de animales que realizan grooming, a los dos meses los ratones heterocigotos presentan un porcentaje significativamente mayor ($p<0,01$) que los salvajes. Asimismo, estos animales con seis y doce meses, también muestran un porcentaje significativamente mayor ($p<0,001$) que los salvajes. Los ratones homocigotos a los doce meses presentan un aumento significativo ($p<0,05$) de este porcentaje respecto a sus controles salvajes. Estos animales obesos muestran un porcentaje significativamente menor que los heterocigotos a los seis meses ($p<0,05$) y a los doce meses ($p<0,01$). No se observan diferencias significativas en el estudio con la edad.

En el estudio del número total de groomings, no se encuentran diferencias significativas. Solo cuando se realiza la prueba “t” de Student, el incremento en el número de groomings que presentan los animales heterocigotos a los doce meses respecto a los dos meses de edad resulta significativo ($p<0,05$).

En el análisis del tiempo de latencia en realizar el primer grooming medido en segundos, tampoco se observan diferencias significativas. Al realizar la prueba “t” de Student, el aumento que se observa en este tiempo de latencia en animales homocigotos a los seis meses respecto a los salvajes, resulta significativo ($p<0,05$). Con esta misma prueba, el incremento de este parámetro en ratones heterocigotos respecto a salvajes a los seis meses, se pone de manifiesto significativamente ($p<0,01$). En cuanto al estudio con la edad, el descenso que se observa de este tiempo de latencia en animales heterocigotos con doce meses respecto a los dos meses, resulta significativo ($p<0,05$) con la prueba “t” de Student. De la misma manera, el descenso en este parámetro en estos animales a los doce meses respecto a los seis meses, también se pone de manifiesto significativamente ($p<0,01$) con esta prueba estadística.

Respecto al porcentaje de animales que defecan, los ratones homocigotos a los dos meses presentan un porcentaje significativamente mayor que sus controles salvajes ($p<0,001$) y heterocigotos ($p<0,01$). Con seis meses de edad, los ratones heterocigotos y homocigotos muestran un porcentaje significativamente mayor ($p<0,001$) que los

salvajes. Además, los animales homocigotos a esta edad presentan un porcentaje significativamente mayor ($p<0,001$) que los heterocigotos.

En el estudio con la edad encontramos que los animales salvajes a los seis meses muestran un descenso significativo ($p<0,01$) de este parámetro respecto a los dos meses. Estos ratones a los doce meses presentan un porcentaje significativamente mayor ($p<0,001$) que a los seis meses. Finalmente, los animales homocigotos a los doce meses muestran un descenso significativo ($p<0,001$) de este parámetro respecto a los dos y seis meses.

En cuanto al número de bolas fecales, solo existe un único dato en el grupo de animales salvajes a los seis meses. Por su parte, los ratones homocigotos con dos y doce meses de edad presentan un aumento significativo ($p<0,05$) de este número respecto a sus controles salvajes. Cuando se realiza la prueba “t” de Student, el incremento que se observa en este parámetro en animales homocigotos respecto a heterocigotos a los dos meses, resulta significativo ($p<0,05$).

Por último, en el estudio del porcentaje de animales que orinan (parámetro no representado en tabla), encontramos que ningún animal orina en ninguna de las edades estudiadas. Al obtener un 0% de animales que orinan en todos los grupos, el número de orinas no se puede evaluar en ninguno de los casos ($n=0$).

Al término del ensayo en el tablero de agujeros, se realizó al día siguiente la prueba del laberinto en T, para finalizar la batería de parámetros conductuales.

C. Comportamiento exploratorio y respuestas de ansiedad

Laberinto en T % Animales que presentan freezing

<u>SALVAJES 2M (n=20)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 2M (n=20)</u>		<u>HOMOCIGOTOS 2M (n=20)</u>	
0	5		20	***/●●
<u>SALVAJES 6M (n=12)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 6M (n=17)</u>		<u>HOMOCIGOTOS 6M (n=18)</u>	
0	6	*	78	***/●●●/aaa
<u>SALVAJES 12M (n=11)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 12M (n=15)</u>		<u>HOMOCIGOTOS 12M (n=13)</u>	
0	0	b	77	***/●●●/aaa

Laberinto en T % Animales que cruzan la intersección
Actividad horizontal

<u>SALVAJES 2M (n=20)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 2M (n=20)</u>		<u>HOMOCIGOTOS 2M (n=20)</u>	
100	100		95	
<u>SALVAJES 6M (n=12)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 6M (n=17)</u>		<u>HOMOCIGOTOS 6M (n=18)</u>	
100	100		78	***/●●●/aaa
<u>SALVAJES 12M (n=11)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 12M (n=15)</u>		<u>HOMOCIGOTOS 12M (n=13)</u>	
100	100		77	***/●●●/aaa

C. Comportamiento exploratorio y respuestas de ansiedad

Laberinto en T		Tiempo cruce intersección (s)			
Actividad horizontal		<u>SALVAJES 2M (n=20)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 2M (n=20)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 2M (n=19)</u>	
		5,60±0,73	7,90±1,12	10,84±1,82	**
			*		
		<u>SALVAJES 6M (n=12)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 6M (n=17)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 6M (n=14)</u>	
		7,08±0,77	10,65±3,00	25,93±5,42	***/●●●/aaa
		<u>SALVAJES 12M (n=11)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 12M (n=15)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 12M (n=10)</u>	
		7,73±1,66	9,93±1,08	26,10±7,40	**/●●/aa
			a		
Laberinto en T		% Animales que completan la prueba			
Actividad horizontal		<u>SALVAJES 2M (n=20)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 2M (n=20)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 2M (n=20)</u>	
		100	100	80	***/●●●
		<u>SALVAJES 6M (n=12)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 6M (n=17)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 6M (n=18)</u>	
		100	100	33	***/●●●/aaa
		<u>SALVAJES 12M (n=11)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 12M (n=15)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 12M (n=13)</u>	
		100	100	69	***/●●●/bbb

C. Comportamiento exploratorio y respuestas de ansiedad

Laberinto en T		Tiempo que tardan en completar prueba (s)			
Actividad horizontal					
	<u>SALVAJES 2M (n=20)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 2M (n=20)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 2M (n=16)</u>		
	22±2	29±4	52±12		
	<u>SALVAJES 6M (n=12)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 6M (n=17)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 6M (n=6)</u>		
	28±4	31±5	69±20		
	<u>SALVAJES 12M (n=11)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 12M (n=15)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 12M (n=9)</u>		
	35±8	39±5	79±15		
Laberinto en T		% Animales que presentan rearing			
Actividad vertical					
	<u>SALVAJES 2M (n=20)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 2M (n=20)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 2M (n=20)</u>		
	40	25	0	*	***/●●●
	<u>SALVAJES 6M (n=12)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 6M (n=17)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 6M (n=18)</u>		
	50	24	0	***	***/●●●
	<u>SALVAJES 12M (n=11)</u>	<u>HETEROCIGOTOS 12M (n=15)</u>	<u>HOMOCIGOTOS 12M (n=13)</u>		
	36	40	0	ab	***/●●●

C. Comportamiento exploratorio y respuestas de ansiedad

Laberinto en T

% Animales que defecan

SALVAJES 2M (n=20)

30

HETEROCIGOTOS 2M (n=20)

15

*

HOMOCIGOTOS 2M (n=20)

60

***/●●●

SALVAJES 6M (n=12)

33

HETEROCIGOTOS 6M (n=17)

18

*

HOMOCIGOTOS 6M (n=18)

28

aaa

SALVAJES 12M (n=11)

27

HETEROCIGOTOS 12M (n=15)

13

*

HOMOCIGOTOS 12M (n=13)

15

aaa/b

Laberinto en T

Número de bolas fecales

SALVAJES 2M (n=6)

1,17±0,17

HETEROCIGOTOS 2M (n=3)

1,00±0,00

HOMOCIGOTOS 2M (n=12)

1,58±0,23

SALVAJES 6M (n=4)

1,00±0,00

HETEROCIGOTOS 6M (n=3)

1,33±0,33

HOMOCIGOTOS 6M (n=5)

2,00±0,77

SALVAJES 12M (n=3)

1,67±0,33

HETEROCIGOTOS 12M (n=2)

1,50±0,50

HOMOCIGOTOS 12M (n=2)

1,00±0,00

Laberinto en T

En esta prueba, respecto al porcentaje de animales que presentan freezing, encontramos que ningún grupo de animales salvajes lo realiza, ni tampoco los ratones heterocigotos con doce meses de edad. Los animales homocigotos a la edad de dos meses muestran un porcentaje significativamente mayor que sus controles salvajes ($p<0,001$) y heterocigotos ($p<0,01$). También con seis y doce meses de edad estos animales obesos presentan un porcentaje significativamente superior ($p<0,001$) que sus controles salvajes y heterocigotos. Por su parte, los ratones heterocigotos a la edad de seis meses muestran un incremento significativo de este porcentaje ($p<0,05$) respecto a los salvajes. Por otro lado, al presentar los ratones heterocigotos con doce meses un porcentaje nulo, éste es significativamente menor ($p<0,05$) que el que muestran a los seis meses. Los animales homocigotos con seis y doce meses presentan un porcentaje significativamente mayor ($p<0,001$) que a los dos meses.

En cuanto al tiempo total de inmovilidad (parámetro no representado en tabla), el dato resulta no evaluable ($n=0$) en todos los grupos de animales salvajes, así como en heterocigotos con doce meses de edad. Solo existe un único dato en animales heterocigotos a los dos meses ($n=1$) (5) y a los seis meses ($n=1$) (50). Los ratones homocigotos presentan los siguientes resultados: a la edad de dos meses ($n=4$) (129 ± 26), a los seis meses ($n=14$) (124 ± 15) y con doce meses ($n=10$) (80 ± 22). No se encuentran diferencias significativas entre los grupos de animales homocigotos.

En relación al porcentaje de animales que cruza la intersección, todos animales salvajes y heterocigotos la cruzan. Los ratones homocigotos con seis y doce meses muestran un porcentaje significativamente menor ($p<0,001$) que sus controles salvajes y heterocigotos. Por otra parte, estos animales obesos a los seis y doce meses presentan una disminución significativa ($p<0,001$) de este porcentaje respecto a los dos meses.

Respecto al tiempo que tardan los animales en cruzar la intersección (medido en segundos), encontramos que a los dos meses los ratones heterocigotos muestran un aumento significativo de este tiempo respecto a los salvajes ($p<0,05$), incremento que también presentan los homocigotos respecto a los salvajes ($p<0,01$). Con seis meses de

edad, los animales homocigotos obesos muestran un aumento significativo ($p<0,001$) de este parámetro respecto a sus controles salvajes y heterocigotos. Asimismo, a los doce meses estos animales obesos también presentan un incremento significativo ($p<0,01$) del tiempo de cruce de la intersección, respecto a sus controles. Por otra parte, los ratones heterocigotos a los doce meses muestran un aumento significativo de este parámetro ($p<0,05$) respecto a los dos meses. Por último, los animales homocigotos presentan un incremento significativo de este tiempo a los seis meses ($p<0,001$) y a los doce meses ($p<0,01$) respecto a los dos meses de edad.

En el estudio del porcentaje de animales que completan la prueba, encontramos que todos los grupos de salvajes y heterocigotos la completan. Por esta razón, los ratones homocigotos a las tres edades estudiadas muestran un porcentaje significativamente menor que sus controles salvajes y heterocigotos ($p<0,001$). Por otro lado, estos animales obesos a los seis meses presentan un descenso significativo de este porcentaje ($p<0,001$) respecto a los dos meses. En cambio, con doce meses muestran un porcentaje significativamente mayor ($p<0,001$) que a los seis meses.

En el análisis del tiempo que tardan los animales en completar la prueba (medido en segundos), no encontramos diferencias significativas entre grupos. Solo cuando se realiza la prueba “t” de Student, el aumento que presentan en este parámetro los animales homocigotos con dos meses respecto a sus controles salvajes, resulta significativo ($p<0,05$). Con esta misma prueba, el incremento que se observa de este tiempo a los doce meses en ratones homocigotos respecto a sus controles salvajes y heterocigotos, se pone de manifiesto significativamente ($p<0,05$).

En cuanto al porcentaje de animales que presentan rearing, ningún grupo de ratones homocigotos lo presenta. Por este motivo, estos animales obesos muestran a las tres edades estudiadas un porcentaje nulo, que es significativamente menor ($p<0,001$) que el que presentan sus controles salvajes y heterocigotos. Por otra parte, los animales heterocigotos a los dos meses presentan un descenso significativo en este porcentaje ($p<0,05$) respecto a los salvajes. Asimismo, también muestran un porcentaje significativamente menor ($p<0,001$) que los salvajes a los seis meses de edad. Por

último, estos ratones heterocigotos con doce meses presentan un incremento significativo de este porcentaje ($p<0,05$) respecto a los dos y seis meses.

En relación al número total de rearings (parámetro de actividad vertical no representado en tabla), el dato resulta no evaluable ($n=0$) en todos los grupos de animales homocigotos. Los animales salvajes presentan los siguientes resultados: a la edad de dos meses ($n=8$) ($1,13\pm0,13$), a los seis meses ($n=6$) ($1,67\pm0,33$) y con doce meses ($n=4$) ($1,50\pm0,29$). Los resultados de los ratones heterocigotos son los siguientes: a la edad de dos meses ($n=5$) ($1,80\pm0,37$), a los seis meses ($n=4$) ($1,50\pm0,29$) y con doce meses ($n=6$) ($2,17\pm0,54$). No se encuentran diferencias significativas entre ninguno de estos grupos de animales salvajes y heterocigotos.

En el estudio del porcentaje de animales que realizan grooming (parámetro de acicalamiento no representado en tabla), encontramos que ningún animal salvaje ni heterocigoto presenta conducta de grooming. Los porcentajes obtenidos en los grupos de animales homocigotos son los siguientes: con dos meses ($n=20$) (35%), a la edad de seis meses ($n=18$) (22%) y con doce meses ($n=13$) (38%). A las tres edades estudiadas, estos ratones homocigotos obesos muestran un porcentaje significativamente mayor ($p<0,001$) que sus controles salvajes y heterocigotos, ya que éstos presentan un porcentaje nulo. Con doce meses, los animales homocigotos muestran un aumento significativo en este porcentaje ($p<0,05$) respecto a los seis meses.

Respecto al número total de groomings (parámetro de acicalamiento no representado en tabla), el dato resulta no evaluable ($n=0$) en todos los grupos de animales salvajes y heterocigotos. Los animales homocigotos presentan los siguientes resultados: a la edad de dos meses ($n=7$) ($1,29\pm0,18$), a los seis meses ($n=4$) ($1,00\pm0,00$) y con doce meses ($n=5$) ($1,40\pm0,24$). No se encuentran diferencias significativas entre ninguno de estos grupos de animales obesos.

En el análisis del porcentaje de animales que defecan, los ratones heterocigotos muestran un porcentaje significativamente menor ($p<0,05$) que los salvajes, a las tres edades de estudio. Por su parte, los animales homocigotos con dos meses presentan un

aumento significativo de este porcentaje ($p < 0,001$), respecto a sus controles salvajes y heterocigotos. Estos animales obesos a los seis y doce meses muestran una disminución significativa de este parámetro ($p < 0,001$), respecto a los dos meses. Asimismo, los ratones homocigotos presentan a los doce meses un porcentaje significativamente menor ($p < 0,05$) que a los seis meses.

Por otra parte, no se encuentran diferencias significativas entre grupos en el estudio del número de bolas fecales.

Finalmente, en el estudio del porcentaje de animales que orinan (parámetro no representado en tabla), encontramos que al igual que en el tablero de agujeros, ningún animal orina en ninguna de las edades estudiadas. Al obtener un 0% de animales que orinan en todos los grupos, el número de orinas no se puede evaluar en ninguno de los casos ($n=0$).

4.2.4. Estudio de varias funciones inmunitarias en leucocitos peritoneales.

Una vez finalizada la batería de pruebas conductuales a cada edad, se realizó la extracción de leucocitos peritoneales y se analizaron diferentes parámetros de funcionalidad inmunitaria como la actividad “Natural Killer” de los leucocitos, la respuesta proliferativa y la liberación de los niveles de citoquinas de los linfocitos.

4.2.4.1. Actividad citotóxica “Natural Killer”.

La actividad “Natural Killer” (expresada como % de lisis de células tumorales) de leucocitos peritoneales se muestra en la **tabla 22**.

Los resultados reflejan que no existen diferencias significativas con respecto a la dotación genética de los animales. Se puede observar que los ratones homocigotos obesos muestran una tendencia al aumento en esta actividad “Natural Killer” a la edad de dos y doce meses respecto a sus controles. Cuando se realiza la prueba “t” de Student, se pone de manifiesto significativamente ($p < 0,05$) el aumento de esta actividad en ratones obesos con respecto a sus controles salvajes a los doce meses de edad.

Tampoco existen diferencias con la edad en cada grupo de animales estudiado, pero se aprecia que existe una tendencia general al aumento de esta actividad citotóxica con la edad. Cuando se realiza la prueba “t” de Student, resulta significativo ($p < 0,05$) el aumento de esta actividad en ratones heterocigotos y homocigotos a los doce meses con respecto a los dos meses de edad.

Tabla 22. Actividad “Natural Killer” (% lisis) de leucocitos peritoneales en ratones homocigotos (*db/db*), heterocigotos (*db/+*) y salvajes.

2M: dos meses; 6M: seis meses; 12M: doce meses.

Cada dato representa la media $\pm$ E.E. del número de animales de cada grupo (entre paréntesis).

ACTIVIDAD "NATURAL KILLER" (NK) (% de lisis)		
Salvaje 2M	Heterocigoto 2M	Homocigoto 2M
16 $\pm$ 2 (n=12)	17 $\pm$ 1 (n=15)	19 $\pm$ 2 (n=16)
Salvaje 6M	Heterocigoto 6M	Homocigoto 6M
20 $\pm$ 3 (n=11)	22 $\pm$ 3 (n=13)	21 $\pm$ 4 (n=13)
Salvaje 12M	Heterocigoto 12M	Homocigoto 12M
19 $\pm$ 2 (n=11)	24 $\pm$ 2 (n=13)	29 $\pm$ 3 (n=13)

4.2.4.2. Capacidad proliferativa de los linfocitos.

La capacidad proliferativa de los linfocitos peritoneales en respuesta a los mitógenos Con A y LPS, a la concentración de 1 μ g/ml, se muestra en la **figura 27**, donde se representa el porcentaje de linfoproliferación con respecto al valor 100% dado a las cuentas por minuto de proliferación basal.

La estimulación con Con A (**figura 27A**) refleja que a la edad de dos meses, los ratones homocigotos obesos presentan una mayor respuesta proliferativa en comparación con sus controles, siendo significativo este aumento ($p<0,01$) respecto a los animales heterocigotos. Cuando se realiza la prueba “t” de Student, se pone de manifiesto significativamente ($p<0,01$) el aumento de la proliferación en ratones obesos con respecto a sus controles salvajes.

A la edad de seis meses encontramos que los ratones salvajes muestran una mayor proliferación que los ratones heterocigotos y homocigotos. También se observa que la respuesta proliferativa es mayor en ratones homocigotos que en heterocigotos, en cambio no se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos de animales. Únicamente al realizar la prueba “t” de Student, se pone de manifiesto significativamente ($p<0,05$) el descenso de la proliferación en los ratones heterocigotos respecto a los salvajes.

A los doce meses de edad, de nuevo la respuesta proliferativa de los animales salvajes es mayor que la de heterocigotos y homocigotos. A esta edad, los ratones homocigotos obesos presentan un descenso en la proliferación respecto a sus controles, siendo significativo este descenso ($p<0,01$) respecto a los ratones salvajes. Cuando se realiza la prueba “t” de Student, se pone de manifiesto significativamente ($p<0,01$) el descenso de la proliferación en ratones heterocigotos respecto a salvajes.

En cuanto al estudio con la edad, los animales salvajes a la edad de seis y doce meses presentan un incremento significativo ($p<0,05$) de la respuesta proliferativa en comparación con los dos meses. A pesar de que a la edad de doce meses existe una disminución de la proliferación en estos animales respecto a los seis meses, no se observan diferencias estadísticamente significativas.

Los animales heterocigotos a los seis meses de edad, muestran un aumento significativo ($p<0,05$) de la proliferación respecto a los dos meses. Al realizar la prueba “t” de Student, se pone de manifiesto significativamente ($p<0,05$) el aumento de la proliferación en estos ratones a la edad de doce meses respecto a los dos meses. Con esta misma prueba estadística también se pone de manifiesto significativamente ($p<0,01$) el descenso en la proliferación a los doce meses respecto a los seis meses de edad en animales heterocigotos.

Finalmente, los animales homocigotos a los doce meses de edad presentan un descenso significativo de la proliferación respecto a los dos meses ($p<0,05$) y a los seis ($p<0,001$) meses de edad. Cuando se realiza la prueba “t” de Student, se pone de manifiesto significativamente ($p<0,05$) el aumento de la respuesta proliferativa a los seis meses respecto a los dos meses de edad en estos animales obesos.

La estimulación con LPS (**figura 27B**) muestra que a los dos meses de edad los animales heterocigotos presentan un descenso significativo ($p<0,05$) de la respuesta proliferativa respecto a los salvajes. Al realizar la prueba “t” de Student, se pone de manifiesto significativamente ($p<0,01$) el descenso en la proliferación de ratones obesos respecto a sus controles salvajes. No se observan diferencias entre animales homocigotos y heterocigotos a esta edad.

A la edad de seis meses, los ratones homocigotos obesos muestran un descenso significativo ($p<0,01$) de la proliferación en respecto a sus controles salvajes. Cuando se realiza la prueba “t” de Student, se pone de manifiesto significativamente ($p<0,01$) el descenso proliferativo que presentan los ratones heterocigotos respecto a los salvajes. Los ratones homocigotos muestran una menor proliferación que los heterocigotos a esta edad, pero esta diferencia no resulta estadísticamente significativa.

Con doce meses de edad, los animales heterocigotos y homocigotos presentan menor respuesta proliferativa respecto a los salvajes. Concretamente el descenso en la proliferación en animales homocigotos obesos respecto a salvajes se encuentra en el límite de significación ($p=0,05$), y al realizar la prueba “t” de Student, se pone de manifiesto significativamente ($p<0,01$). Con esta misma prueba estadística, también encontramos que el descenso en la proliferación en animales heterocigotos respecto a salvajes se pone de manifiesto significativamente ($p<0,01$). No se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre animales homocigotos y heterocigotos a esta edad.

Respecto al estudio con la edad, encontramos que los animales salvajes a los seis meses muestran un aumento significativo de la proliferación ($p<0,01$) respecto a los dos meses. A los doce meses estos animales presentan un descenso significativo de la proliferación ($p<0,05$) respecto a los seis meses de edad. Es al realizar la prueba “t” de

Student, cuando el aumento en la proliferación a los doce meses respecto a los dos meses se pone de manifiesto significativamente ($p<0,05$) en estos animales.

Los animales heterocigotos a los doce meses de edad, presentan un aumento significativo de la proliferación ($p<0,05$) respecto a los dos meses. Cuando se realiza la prueba “t” de Student, se pone de manifiesto significativamente ($p<0,01$) el aumento de la proliferación en estos animales a los seis meses respecto a los dos meses de edad. Con esta misma prueba la disminución de la proliferación a los doce meses respecto a los seis, también se pone de manifiesto significativamente ($p<0,05$) en estos animales.

Por último, en los ratones homocigotos obesos no se observan diferencias significativas con la edad. Sin embargo cuando se realiza la prueba “t” de Student, se pone de manifiesto significativamente ($p<0,05$) el incremento de respuesta proliferativa encontrado a los seis meses con respecto a los dos meses. También con esta prueba estadística, la disminución en la proliferación a los doce meses respecto a los seis, resulta ser significativa ($p<0,05$) en estos animales.

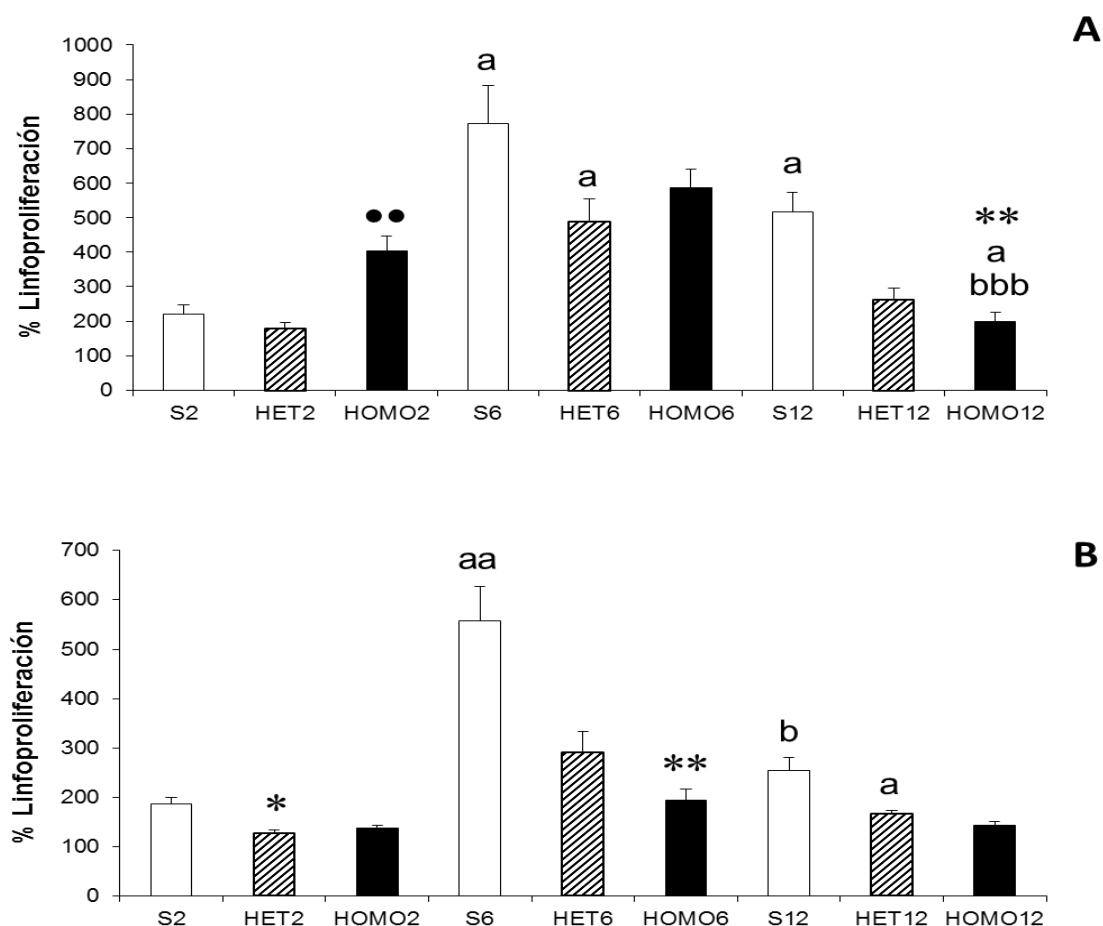


Figura 27. Respuesta proliferativa (% de linfoproliferación) a los mitógenos Con A (1 µg/ml) (A) y LPS (1 µg/ml) (B) de linfocitos peritoneales, en ratones homocigotos (*db/db*), heterocigotos (*db/+*) y salvajes.

S2: salvajes dos meses; HET2: heterocigotos dos meses; HOMO2: homocigotos dos meses; S6: salvajes seis meses; HET6: heterocigotos seis meses; HOMO6: homocigotos seis meses; S12: salvajes doce meses; HET12: heterocigotos doce meses; HOMO12: homocigotos doce meses.

Cada columna representa la media $\pm$ E.E. del número de animales ($n=10-18$) de cada grupo. ** $p<0,01$, * $p<0,05$ con respecto a los correspondientes valores en ratones salvajes a esa edad.

•• $p<0,01$ con respecto a los correspondientes valores en ratones heterocigotos (*db/+*) a esa edad.

aa $p<0,01$, ap $p<0,05$ con respecto al correspondiente grupo a la edad de dos meses. bbb $p<0,001$, bp $p<0,05$ con respecto al correspondiente grupo a la edad de seis meses.

4.2.4.3. Niveles de citoquinas.

La valoración de los niveles de citoquinas se llevó a cabo en los sobrenadantes de cultivo de 24 horas de linfocitos peritoneales estimulados con los mitógenos Con A y LPS a la concentración de 1 µg/ml.

Niveles de citoquinas en respuesta a Concanavalina A (Con A)

Los niveles de IL-2 (pg/ml) de linfocitos peritoneales estimulados con Con A se muestran en la **figura 28**.

Con dos meses de edad, los animales homocigotos muestran una disminución significativa ($p < 0,01$) de los niveles de esta citoquina respecto a los animales salvajes. La disminución que también se observa en los niveles de IL-2 en animales heterocigotos respecto a salvajes no resulta ser significativa. Cuando se realiza la prueba “t” de Student, se pone de manifiesto significativamente ($p < 0,05$) la disminución en la liberación de IL-2 de los animales homocigotos obesos respecto a los heterocigotos.

A los seis meses, los ratones homocigotos presentan una disminución altamente significativa ($p < 0,001$) de los niveles de IL-2 respecto a sus controles heterocigotos y salvajes. Al realizar la prueba “t” de Student, la disminución en la liberación de esta citoquina en ratones heterocigotos respecto a salvajes resulta ser significativa ($p < 0,05$).

A la edad de doce meses, los ratones obesos muestran una disminución de IL-2 respecto a sus controles salvajes que se pone de manifiesto significativamente ($p < 0,01$) cuando se realiza la prueba “t” de Student. Con esta misma prueba, la menor liberación de esta citoquina en ratones obesos respecto a heterocigotos resulta ser significativa ($p < 0,05$). No se encuentran diferencias estadísticamente significativas en ratones heterocigotos respecto a salvajes.

En cuanto al estudio a lo largo de la edad, los animales salvajes presentan a los doce meses una disminución significativa ($p < 0,01$) de los niveles de IL-2 respecto a los dos meses. Al realizar la prueba “t” de Student, la disminución que se observa de IL-2 en estos animales a los seis meses respecto a los dos meses de edad, resulta significativa ($p < 0,01$). No se encuentran diferencias significativas entre los doce y seis meses de edad en animales salvajes.

Los ratones heterocigotos muestran a los seis meses una disminución de esta citoquina respecto a los dos meses que se pone de manifiesto significativamente ($p < 0,05$) al realizar la prueba “t” de Student. Con esta misma prueba, la disminución de IL-2 que se observa a los doce meses respecto a los dos meses en estos animales, resulta significativa ($p < 0,01$). No se encuentran diferencias significativas entre los doce y seis meses de edad en estos ratones.

Finalmente, los animales homocigotos obesos a los seis meses presentan una disminución significativa ($p<0,01$) de la liberación de IL-2 respecto a los dos meses. Cuando se realiza la prueba “t” de Student, se pone de manifiesto significativamente ($p<0,05$) la disminución en la liberación de IL-2 a los doce meses respecto a los dos meses en estos animales. No se encuentran diferencias significativas entre los doce y seis meses de edad en animales obesos.

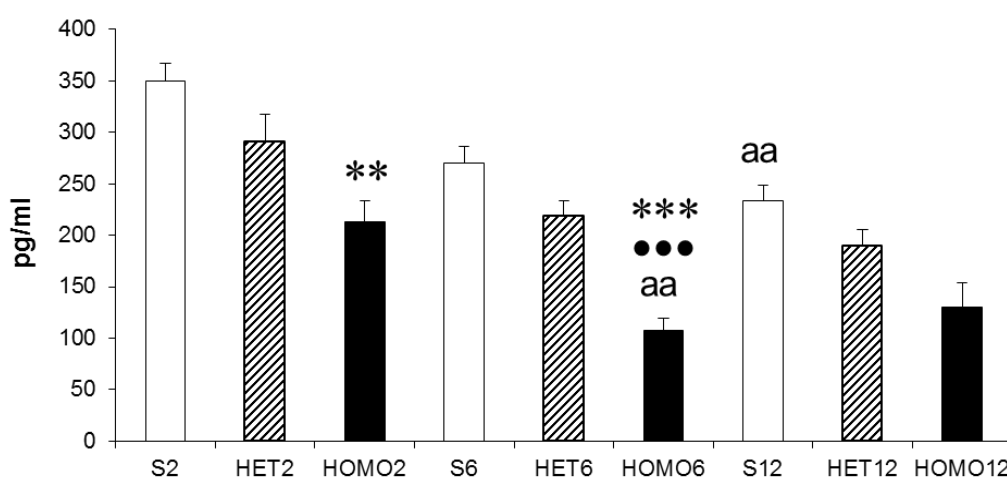


Figura 28. Niveles de IL-2 (pg/ml) de linfocitos peritoneales estimulados con Con A en ratones homocigotos (*db/db*), heterocigotos (*db/+*) y salvajes.

S2: salvajes dos meses; HET2: heterocigotos dos meses; HOMO2: homocigotos dos meses; S6: salvajes seis meses; HET6: heterocigotos seis meses; HOMO6: homocigotos seis meses; S12: salvajes doce meses; HET12: heterocigotos doce meses; HOMO12: homocigotos doce meses. Cada columna representa la media $\pm$ E.E. del número de animales ($n=10-18$) de cada grupo. *** $p<0,001$, ** $p<0,01$ con respecto a los correspondientes valores en ratones salvajes a esa edad. ●●● $p<0,001$ con respecto a los correspondientes valores en ratones heterocigotos (*db/+*) a esa edad. aa $p<0,01$ con respecto al correspondiente grupo a la edad de dos meses.

Los niveles de IL-1 β y TNF- α (pg/ml) de linfocitos peritoneales estimulados con Con A se muestran en la **tabla 23**.

Con respecto a los niveles de IL-1 β , a la edad de dos meses los animales homocigotos presentan un aumento significativo ($p<0,05$) de esta citoquina respecto a sus controles heterocigotos. Al realizar la prueba “t” de Student, el incremento en los niveles de IL-1 β en animales obesos respecto a sus controles salvajes, resulta significativo ($p<0,01$). No existen diferencias entre animales heterocigotos y salvajes a esta edad.

Con seis meses de edad, a pesar de que se observa un ligero aumento en los niveles de esta citoquina en animales homocigotos respecto a sus controles, no existen diferencias significativas entre los distintos grupos.

A la edad de doce meses, los ratones homocigotos obesos muestran un aumento significativo ($p<0,01$) en la liberación de IL-1 β respecto a sus controles salvajes. El incremento de esta citoquina en ratones obesos respecto a heterocigotos se pone de manifiesto significativamente ($p<0,001$) cuando se realiza la prueba “t” de Student. Con esta misma prueba, el aumento de esta citoquina en heterocigotos respecto a salvajes resulta significativo ($p<0,05$).

En relación al estudio con la edad, los ratones salvajes a los doce meses presentan un incremento de IL-1 β respecto a los dos y seis meses de edad, que resulta significativo ($p<0,01$) al realizar la prueba “t” de Student. No existen diferencias entre los dos y seis meses en estos animales.

Los animales heterocigotos a los doce meses de edad muestran un aumento significativo de esta citoquina ($p<0,01$) respecto a los dos y seis meses. Al igual que en ratones salvajes, no se observan diferencias entre los dos y seis meses en estos animales.

En ratones homocigotos existe un incremento significativo ($p<0,01$) de IL-1 β a los doce meses respecto a los dos y seis meses de edad. En el paso de dos a seis meses se observa una disminución de esta citoquina que no resulta significativa en estos animales.

En cuanto a la liberación de TNF- α , a los dos meses de edad los ratones homocigotos y heterocigotos muestran un aumento de esta citoquina con respecto a los salvajes, que no resulta significativo.

A los seis meses, de nuevo los ratones homocigotos y heterocigotos presentan un incremento de esta citoquina con respecto a los salvajes. Cuando se realiza la prueba “t” de Student, el incremento en heterocigotos respecto a salvajes se pone de manifiesto significativamente ($p<0,01$), en cambio no son significativas las diferencias entre homocigotos y salvajes.

No existen diferencias entre animales homocigotos y heterocigotos a la edad de dos y seis meses.

Con doce meses de edad, los animales obesos muestran un aumento significativo ($p<0,05$) en la liberación de esta citoquina respecto a sus controles salvajes. De la misma manera, los animales heterocigotos presentan un incremento significativo ($p<0,001$) de TNF- α respecto a los salvajes. A esta edad, los animales obesos muestran un aumento en esta citoquina respecto a los heterocigotos, que no resulta significativo.

Respecto al estudio a lo largo de la edad, en ratones salvajes se observa una disminución de TNF- α en el paso de dos a seis meses que no es significativo. En cambio, a los doce meses se observa un aumento significativo ($p<0,01$) de esta citoquina respecto a los seis meses. Al realizar la prueba “t” de Student el incremento de TNF- α a los doce meses respecto a los dos meses, resulta significativo ($p<0,01$) en estos ratones.

En animales heterocigotos a los doce meses encontramos un aumento significativo ($p<0,001$) en la liberación de TNF- α a los doce meses respecto a los dos y seis meses. También se observa un aumento de esta citoquina en el paso de dos a seis meses, que no resulta significativo.

Por último, los animales homocigotos obesos muestran a los doce meses un incremento significativo ($p<0,05$) de esta citoquina respecto a los dos y seis meses. El aumento que se observa de TNF- α en estos animales en el paso de dos a seis meses no resulta ser significativo.

Tabla 23. Niveles de IL-1 β y TNF- α (pg/ml) de linfocitos peritoneales estimulados con Con A en ratones homocigotos (db/db), heterocigotos (db/+) y salvajes.

2M: dos meses; 6M: seis meses; 12M: doce meses.

Cada dato representa la media $\pm$ E.E. del número de animales de cada grupo (entre paréntesis).

***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05 con respecto a los correspondientes valores en ratones salvajes a esa edad. •p<0,05 con respecto a los correspondientes valores en ratones heterocigotos (db/+) a esa edad. aaap<0,001, aap<0,01, ap<0,05 con respecto al correspondiente grupo a la edad de dos meses. bbbp<0,001, bbp<0,01, bp<0,05 con respecto al correspondiente grupo a la edad de seis meses.

LIBERACIÓN DE CITOQUINAS EN RESPUESTA A CON A			
IL-1 β (pg/ml)	Salvaje 2M	Heterocigoto 2M	Homocigoto 2M
	31 $\pm$ 2 (n=17)	30 $\pm$ 2 (n=18)	46 $\pm$ 4 • (n=15)
	Salvaje 6M	Heterocigoto 6M	Homocigoto 6M
	30 $\pm$ 3 (n=12)	31 $\pm$ 3 (n=15)	37 $\pm$ 5 (n=15)
	Salvaje 12M	Heterocigoto 12M	Homocigoto 12M
	43 $\pm$ 3 (n=11)	57 $\pm$ 5 aa/bb (n=15)	93 $\pm$ 8 **/aa/bb (n=10)
TNF- α (pg/ml)	Salvaje 2M	Heterocigoto 2M	Homocigoto 2M
	71 $\pm$ 6 (n=17)	81 $\pm$ 10 (n=18)	82 $\pm$ 8 (n=15)
	Salvaje 6M	Heterocigoto 6M	Homocigoto 6M
	66 $\pm$ 3 (n=12)	94 $\pm$ 8 (n=15)	95 $\pm$ 14 (n=15)
	Salvaje 12M	Heterocigoto 12M	Homocigoto 12M
	94 $\pm$ 4 bb (n=11)	166 $\pm$ 10 ***/aaa/bbb (n=15)	211 $\pm$ 24 */a/b (n=10)

En la **tabla 24** se presentan los niveles de IL-10 (pg/ml) de linfocitos peritoneales estimulados con Con A.

Con respecto al estudio de la dotación genética, a la edad de dos meses los animales homocigotos muestran un incremento de esta citoquina respecto a sus controles salvajes y heterocigotos. Este aumento resulta significativo ($p<0,05$) al realizar la prueba “t” de Student respecto a los animales salvajes. A pesar de que los animales heterocigotos muestran una mayor liberación de la citoquina respecto a los salvajes, no se encuentran diferencias significativas.

Con seis meses de edad, los ratones homocigotos presentan menores niveles de IL-10 respecto a sus controles salvajes, pero mayores respecto a los ratones heterocigotos. Por otro lado, la liberación de esta citoquina en heterocigotos es menor que en salvajes. No se observan diferencias significativas entre grupos a esta edad.

A los doce meses, los animales obesos muestran un incremento significativo de IL-10 respecto a sus controles salvajes ($p<0,01$) y heterocigotos ($p<0,05$). El aumento de esta citoquina en animales heterocigotos respecto a salvajes, resulta significativo ($p<0,01$) cuando se realiza la prueba “t” de Student.

En cuanto al estudio con la edad, los animales salvajes presentan una disminución de esta citoquina en el paso de dos a seis meses, así como un aumento de los seis a los doce, alcanzándose los mayores valores de IL-10 a la edad de doce meses. No se encuentran diferencias significativas entre ninguna de las edades en estos animales.

Los ratones heterocigotos a los seis meses muestran una disminución significativa ($p<0,001$) de esta citoquina respecto a los dos meses. A los doce meses, estos animales presentan niveles de IL-10 significativamente mayores ($p<0,001$) que a los seis meses. Al realizar la prueba “t” de Student, el aumento de esta citoquina a los doce meses respecto a los dos meses, resulta significativo ($p<0,01$) en estos animales.

Los ratones homocigotos obesos a la edad de doce meses presentan un aumento significativo ($p<0,01$) en la liberación de IL-10 respecto a los dos y seis meses. Cuando se realiza la prueba “t” de Student, la disminución de esta citoquina a los seis meses respecto a los dos meses, se pone de manifiesto significativamente ($p<0,01$) en estos ratones.

Tabla 24. Niveles de IL-10 (pg/ml) de linfocitos peritoneales estimulados con Con A en ratones homocigotos (*db/db*), heterocigotos (*db/+*) y salvajes.

2M: dos meses; 6M: seis meses; 12M: doce meses.

Cada dato representa la media $\pm$ E.E. del número de animales de cada grupo (entre paréntesis).

** $p < 0,01$ con respecto a los correspondientes valores en ratones salvajes a esa edad. • $p < 0,05$ con respecto a los correspondientes valores en ratones heterocigotos (*db/+*) a esa edad.

aa $p < 0,001$, aap $< 0,01$ con respecto al correspondiente grupo a la edad de dos meses.

bb $p < 0,001$, bbp $< 0,01$ con respecto al correspondiente grupo a la edad de seis meses.

LIBERACIÓN DE IL-10 EN RESPUESTA A CON A (pg/ml)

Salvaje 2M	Heterocigoto 2M	Homocigoto 2M
242 $\pm$ 15 (<i>n</i> =17)	276 $\pm$ 11 (<i>n</i> =18)	285 $\pm$ 13 (<i>n</i> =15)
Salvaje 6M	Heterocigoto 6M	Homocigoto 6M
208 $\pm$ 25 (<i>n</i> =12)	167 $\pm$ 14 aaa (<i>n</i> =15)	180 $\pm$ 32 (<i>n</i> =15)
Salvaje 12M	Heterocigoto 12M	Homocigoto 12M
255 $\pm$ 22 (<i>n</i> =11)	349 $\pm$ 22 bbb (<i>n</i> =15)	727 $\pm$ 74 **/•/aa/bb (<i>n</i> =10)

Niveles de citoquinas en respuesta a Lipopolisacárido de *E.coli* (LPS)

Los niveles de TNF- α (pg/ml) de linfocitos peritoneales estimulados con LPS se muestran en la **figura 29**.

En el estudio de la dotación genética, a los dos meses de edad los animales homocigotos obesos muestran un aumento significativo ($p < 0,01$) de la liberación de esta citoquina respecto a sus controles salvajes. Cuando se realiza la prueba “t” de Student, el aumento de TNF- α que se observa en heterocigotos respecto a salvajes, se pone de

manifiesto significativamente ($p<0,01$). No se observan diferencias significativas entre animales homocigotos y heterocigotos.

Con seis meses de edad, los ratones homocigotos y heterocigotos presentan un incremento significativo de TNF- α ($p<0,05$) respecto a los ratones salvajes. Por otro lado, los ratones homocigotos muestran niveles algo mayores de esta citoquina respecto a sus controles heterocigotos, sin embargo no se encuentran diferencias significativas.

A los doce meses de edad, los ratones homocigotos y heterocigotos presentan un incremento altamente significativo de TNF- α ($p<0,001$) respecto a los ratones salvajes. Al realizar la prueba “t” de Student, el aumento en la liberación de esta citoquina en homocigotos respecto a heterocigotos, resulta significativo ($p<0,01$).

Respecto al estudio con la edad, los ratones salvajes a los seis y doce meses, muestran un incremento significativo ($p<0,001$) de los niveles de esta citoquina respecto a los dos meses de edad. En estos animales, el aumento que se observa de TNF- α a los doce meses respecto a los seis meses, resulta significativo ($p<0,001$).

Los animales heterocigotos a los doce meses de edad presentan un aumento significativo de TNF- α ($p<0,001$) respecto a los dos meses. Cuando se realiza la prueba “t” de Student, el aumento de TNF- α que se observa a los seis meses respecto a los dos meses en estos animales, se pone de manifiesto significativamente ($p<0,01$). No resulta significativo el incremento de TNF- α que se observa a los doce meses respecto a los seis meses en heterocigotos.

Los ratones homocigotos obesos a los doce meses muestran un aumento significativo de la liberación de TNF- α respecto a los dos meses ($p<0,001$) y respecto a los seis meses ($p<0,05$) de edad. Al realizar la prueba “t” de Student, el aumento de TNF- α a los seis meses respecto a los dos meses en estos animales, resulta significativo ($p<0,01$).

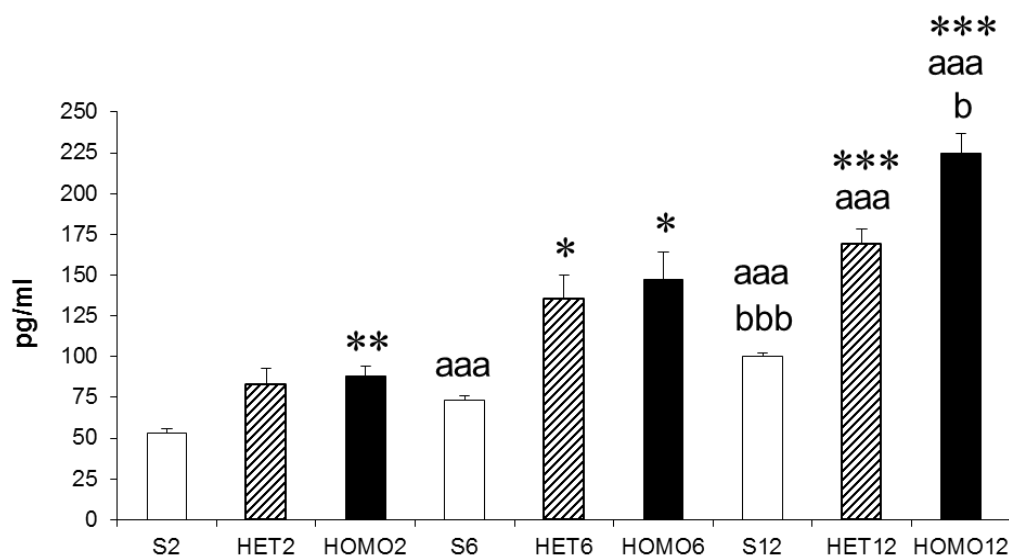


Figura 29. Niveles de TNF- α (pg/ml) de linfocitos peritoneales estimulados con LPS en ratones homocigotos (*db/db*), heterocigotos (*db/+*) y salvajes.

S2: salvajes dos meses; HET2: heterocigotos dos meses; HOMO2: homocigotos dos meses; S6: salvajes seis meses; HET6: heterocigotos seis meses; HOMO6: homocigotos seis meses; S12: salvajes doce meses; HET12: heterocigotos doce meses; HOMO12: homocigotos doce meses. Cada columna representa la media $\pm$ E.E. del número de animales ($n=10-18$) de cada grupo.

*** $p<0,001$, ** $p<0,01$, * $p<0,05$ con respecto a los correspondientes valores en ratones salvajes a esa edad. aaap $<0,001$ con respecto al correspondiente grupo a la edad de dos meses. bbbp $<0,001$, bp $<0,05$ con respecto al correspondiente grupo a la edad de seis meses.

Los niveles de IL-1 β e IL-10 (pg/ml) de linfocitos peritoneales estimulados con LPS se muestran en la **tabla 25**.

Con respecto a la liberación de IL-1 β , a la edad de dos meses los ratones homocigotos y heterocigotos muestran mayores niveles de esta citoquina respecto a ratones salvajes. Cuando se realiza la prueba “t” de Student, el aumento de IL-1 β en homocigotos respecto a salvajes se pone de manifiesto significativamente ($p<0,01$). A pesar de que los ratones obesos presentan un aumento en la liberación de IL-1 β respecto a sus controles heterocigotos, no se encuentran diferencias significativas.

A los seis meses, de nuevo los ratones homocigotos y heterocigotos muestran un incremento de esta citoquina respecto a ratones salvajes. No se observan diferencias entre los distintos grupos de animales.

Con doce meses de edad, los animales homocigotos obesos presentan un aumento significativo de IL-1 β ($p<0,01$) respecto a sus controles salvajes. Al realizar la prueba “t” de Student, el incremento en los niveles de esta citoquina en heterocigotos respecto a salvajes, resulta significativo ($p<0,05$). Con esta misma prueba, el aumento de IL-1 β en homocigotos respecto a heterocigotos, se pone de manifiesto significativamente ($p<0,01$).

En cuanto al estudio con la edad, los ratones salvajes presentan un aumento en los niveles de esta citoquina en el paso de dos a seis meses, así como una disminución de los seis a los doce meses, alcanzándose los mayores niveles a los seis meses. No se encuentran diferencias significativas entre las diferentes edades en estos ratones.

Los animales heterocigotos presentan un aumento de IL-1 β a lo largo de la edad, donde no se observan diferencias significativas.

Los ratones homocigotos a la edad de doce meses muestran un incremento significativo ($p<0,05$) en la liberación de IL-1 β respecto a los dos y seis meses de edad. No se encuentran diferencias significativas en los niveles de esta citoquina al pasar de los dos a seis meses en estos ratones.

En relación a la liberación de IL-10, a la edad de dos meses los animales homocigotos obesos presentan mayores niveles de esta citoquina que sus controles. Los heterocigotos muestran menor cantidad de IL-10 que los salvajes. No se observan diferencias significativas entre los grupos.

Con seis meses de edad, de nuevo los animales homocigotos muestran mayores niveles de esta citoquina respecto a sus controles, sin encontrarse diferencias significativas. Al realizar la prueba “t” de Student, el aumento de IL-10 en heterocigotos respecto a salvajes resulta estar en el límite de significación ($p=0,05$).

A la edad de doce meses, los ratones obesos presentan un aumento significativo en los niveles de IL-10 ($p<0,01$) respecto a sus controles heterocigotos. Además, este aumento también resulta ser significativo ($p<0,01$) respecto a los animales salvajes, cuando se realiza la prueba “t” de Student. No se observan diferencias significativas entre ratones heterocigotos y salvajes a esta edad.

Respecto al estudio con la edad, los animales salvajes a los seis meses muestran una disminución en los niveles de esta citoquina respecto a los dos meses, que se pone de manifiesto significativamente ($p < 0,01$) cuando se realiza la prueba “t” de Student. Con esta misma prueba, el incremento que se observa de IL-10 en estos animales a los doce meses respecto a los seis meses, resulta significativo ($p < 0,01$). El aumento en esta citoquina a los doce meses respecto a los dos meses no es significativo en animales salvajes.

Los ratones heterocigotos presentan un aumento en la liberación de IL-10 con la edad, sin observarse diferencias significativas entre las distintas edades.

Por último, los animales homocigotos obesos muestran un aumento de esta citoquina con la edad. A la edad de doce meses, el incremento de IL-10 es significativo respecto a los dos meses ($p < 0,001$) y respecto a los seis meses ($p < 0,05$) de edad en estos animales. En el paso de los dos a los seis meses el aumento de esta citoquina no resulta significativo.

Tabla 25. Niveles de IL-1 β e IL-10 (pg/ml) de linfocitos peritoneales estimulados con LPS en ratones homocigotos (db/db), heterocigotos (db/+) y salvajes.

2M: dos meses; 6M: seis meses; 12M: doce meses.

Cada dato representa la media $\pm$ E.E. del número de animales de cada grupo (entre paréntesis).

**p<0,01 con respecto a los correspondientes valores en ratones salvajes a esa edad. ●●p<0,01 con respecto a los correspondientes valores en ratones heterocigotos (db/+) a esa edad.

aaap<0,001, ap<0,05 con respecto al correspondiente grupo a la edad de dos meses. bp<0,05 con respecto al correspondiente grupo a la edad de seis meses.

LIBERACIÓN DE CITOQUINAS EN RESPUESTA A LPS			
IL-1 β (pg/ml)	Salvaje 2M	Heterocigoto 2M	Homocigoto 2M
	48 $\pm$ 4 (n=17)	61 $\pm$ 5 (n=18)	73 $\pm$ 6 (n=15)
	Salvaje 6M	Heterocigoto 6M	Homocigoto 6M
	58 $\pm$ 5 (n=12)	72 $\pm$ 8 (n=15)	70 $\pm$ 7 (n=15)
	Salvaje 12M	Heterocigoto 12M	Homocigoto 12M
	54 $\pm$ 4 (n=11)	75 $\pm$ 8 (n=15)	117 $\pm$ 10 **/a/b (n=10)
IL-10 (pg/ml)	Salvaje 2M	Heterocigoto 2M	Homocigoto 2M
	439 $\pm$ 29 (n=17)	425 $\pm$ 37 (n=18)	442 $\pm$ 35 (n=15)
	Salvaje 6M	Heterocigoto 6M	Homocigoto 6M
	327 $\pm$ 24 (n=12)	440 $\pm$ 49 (n=15)	463 $\pm$ 63 (n=15)
	Salvaje 12M	Heterocigoto 12M	Homocigoto 12M
	519 $\pm$ 51 (n=11)	513 $\pm$ 39 (n=15)	735 $\pm$ 23 ●●/aaa/b (n=10)

4.2.5. Estudio de parámetros de estado antioxidante en leucocitos peritoneales.

Una vez extraídos los leucocitos peritoneales, además de las funciones inmunitarias analizadas, también se valoraron dos parámetros de estado antioxidante, el contenido intracelular de glutathion total (GSH) y la actividad de la enzima glutathion peroxidasa (GPx). Estos resultados se muestran en la **tabla 26**.

En relación al contenido en glutathion total y atendiendo al estudio de la dotación genética, a la edad de dos meses los animales heterocigotos y homocigotos presentan mayor contenido en glutathion total respecto a los animales salvajes, no encontrándose diferencias significativas. Cuando se realiza la prueba “t” de Student, se pone de manifiesto significativamente ($p<0,05$) el aumento del glutathion en animales heterocigotos respecto a los salvajes. Asimismo con esta prueba, el incremento en la cantidad de glutathion en animales homocigotos obesos resulta ser significativamente mayor ($p<0,01$) que en salvajes. A pesar de que el contenido en glutathion es mayor en animales homocigotos respecto a heterocigotos a esta edad, no se observan diferencias significativas.

Con seis meses de edad, los ratones obesos muestran un menor contenido en glutathion que los salvajes y heterocigotos, sin embargo no se encuentran diferencias significativas entre grupos. Al realizar la prueba “t” de Student, se pone de manifiesto significativamente ($p<0,05$) la disminución del glutathion en ratones obesos respecto a los ratones heterocigotos. Los ratones heterocigotos presentan un mayor contenido en glutathion que los salvajes a esta edad, en cambio no se encuentran diferencias significativas.

A los doce meses, los animales homocigotos obesos vuelven a presentar mayores niveles de glutathion que sus controles heterocigotos y salvajes, pero no se encuentran diferencias significativas. Cuando se realiza la prueba “t” de Student, se pone de manifiesto significativamente ($p<0,05$) el aumento del glutathion en animales homocigotos respecto a los heterocigotos. Con esta misma prueba, la disminución de glutathion en animales heterocigotos respecto a salvajes, resulta significativa ($p<0,05$).

En el estudio a lo largo de la edad, el contenido en glutathion aumenta en animales salvajes a medida que aumenta la edad, sin observarse diferencias

significativas. Al realizar la prueba “t” de Student, se pone de manifiesto significativamente ($p<0,05$) el aumento de glutathione que se produce a los doce meses respecto a los dos meses de edad en estos animales.

Los ratones heterocigotos muestran un ligero aumento del glutathione en el paso de los dos meses a los seis meses, y una disminución a los doce meses de edad, sin observarse diferencias estadísticamente significativas. Cuando se realiza la prueba “t” de Student, se pone de manifiesto significativamente ($p<0,05$) la disminución de glutathione que se observa a los doce meses respecto a los dos meses de edad. También con esta prueba, la disminución de glutathione a los doce meses respecto a los seis meses resulta ser significativa ($p<0,05$) en estos animales.

Finalmente los ratones homocigotos obesos muestran un descenso importante del glutathione a los seis meses de edad respecto a los dos meses que solo se pone de manifiesto de manera significativa ($p<0,05$) al realizar la prueba “t” de Student. En el paso a los doce meses de edad, estos ratones muestran un incremento en los niveles de glutathione respecto a los seis meses que resulta ser significativo ($p<0,05$) cuando se realiza la prueba “t” de Student. La disminución de glutathione que se observa a los doce meses respecto a los dos meses no resulta estadísticamente significativa en estos ratones.

Con respecto a la actividad de la enzima glutathione peroxidasa, a los dos meses de edad, los ratones homocigotos obesos y los heterocigotos presentan un aumento significativo ($p<0,01$) de esta actividad respecto a los salvajes. Los animales obesos a su vez muestran un aumento de la actividad glutathione peroxidasa respecto a los heterocigotos que no resulta ser estadísticamente significativa.

Con seis meses de edad, nuevamente los animales obesos y los heterocigotos muestran un aumento de la actividad enzimática respecto a los salvajes, que solo se pone de manifiesto significativamente ($p<0,01$) cuando se realiza la prueba “t” de Student. El ligero aumento en la actividad glutathione peroxidasa encontrado en animales obesos respecto a los heterocigotos no resulta estadísticamente significativo.

A los doce meses, también encontramos que los animales obesos muestran un incremento de la actividad enzimática respecto a los salvajes, que solo se pone de manifiesto significativamente ($p<0,01$) cuando se realiza la prueba “t” de Student.

Asimismo con esta prueba, el incremento que se observa de la actividad enzimática en animales heterocigotos respecto a salvajes, resulta significativo ($p < 0,05$). Nuevamente, el incremento en la actividad glutathion peroxidasa encontrado en animales homocigotos respecto a los heterocigotos no resulta estadísticamente significativo.

En cuanto al estudio a lo largo de la edad, la actividad glutathion peroxidasa en animales salvajes apenas se modifica.

En animales heterocigotos esta actividad presenta una disminución con la edad. La disminución observada a los seis meses respecto a los dos meses de edad en estos animales se pone de manifiesto significativamente ($p < 0,05$) al realizar la prueba “t” de Student. De la misma manera, con esta prueba la disminución que se observa a los doce meses respecto a los dos meses de edad, resulta significativa ($p < 0,01$). El descenso de la actividad enzimática en el paso de los seis a los doce meses no resulta ser estadísticamente significativo en estos animales.

Por último, los animales homocigotos muestran una disminución de la actividad glutathion peroxidasa a los seis meses respecto a los dos meses de edad, que se pone de manifiesto de manera significativa ($p < 0,01$) cuando se realiza la prueba “t” de Student. A los doce meses se observa un aumento de la actividad en estos animales con respecto a los seis meses, que no resulta ser significativo. Del mismo modo, el descenso que se aprecia de la actividad enzimática a los doce meses respecto a los dos meses de edad no se manifiesta de manera significativa en estos ratones.

Tabla 26. Glutation total (nmol/mg tejido) y Actividad Glutation Peroxidasa (mU/mg tejido) de linfocitos peritoneales en ratones homocigotos (*db/db*), heterocigotos (*db/+*) y salvajes.

2M: dos meses; 6M: seis meses; 12M: doce meses.

Cada dato representa la media $\pm$ E.E. del número de animales de cada grupo (entre paréntesis).

** $p < 0,01$ con respecto a los correspondientes valores en ratones salvajes a esa edad.

PARÁMETROS DE ESTADO ANTIOXIDANTE			
Glutation Total (GSH) (nmol/mg tejido)	Salvaje 2M	Heterocigoto 2M	Homocigoto 2M
	119 $\pm$ 11 (<i>n</i> =13)	151 $\pm$ 8 (<i>n</i> =15)	181 $\pm$ 19 (<i>n</i> =12)
	Salvaje 6M	Heterocigoto 6M	Homocigoto 6M
	134 $\pm$ 10 (<i>n</i> =12)	159 $\pm$ 10 (<i>n</i> =15)	127 $\pm$ 7 (<i>n</i> =13)
	Salvaje 12M	Heterocigoto 12M	Homocigoto 12M
	146 $\pm$ 5 (<i>n</i> =10)	131 $\pm$ 5 (<i>n</i> =12)	154 $\pm$ 11 (<i>n</i> =10)
Actividad Glutation Peroxidasa (GPx) (mU/mg tejido)	Salvaje 2M	Heterocigoto 2M	Homocigoto 2M
	141 $\pm$ 6 (<i>n</i> =10)	226 $\pm$ 12 ** (<i>n</i> =11)	273 $\pm$ 20 ** (<i>n</i> =12)
	Salvaje 6M	Heterocigoto 6M	Homocigoto 6M
	143 $\pm$ 11 (<i>n</i> =11)	194 $\pm$ 8 (<i>n</i> =12)	201 $\pm$ 14 (<i>n</i> =13)
	Salvaje 12M	Heterocigoto 12M	Homocigoto 12M
	144 $\pm$ 7 (<i>n</i> =10)	179 $\pm$ 10 (<i>n</i> =12)	220 $\pm$ 20 (<i>n</i> =10)

4.2.6. Estudio de la longevidad.

En la **figura 30** se representan las curvas de supervivencia de los animales salvajes, heterocigotos y homocigotos expresadas como porcentaje de animales vivos de cada grupo en función de la edad (expresada en semanas).

El test de Kaplan-Meier muestra diferencias significativas (Log Rank $p=0$) entre los animales homocigotos y sus controles, tanto heterocigotos como salvajes. Los valores de supervivencia media de los grupos (expresados como media $\pm$ E.E.) son los siguientes: salvajes: 131 ± 6 semanas; heterocigotos: 113 ± 9 semanas; homocigotos: 67 ± 4 semanas.

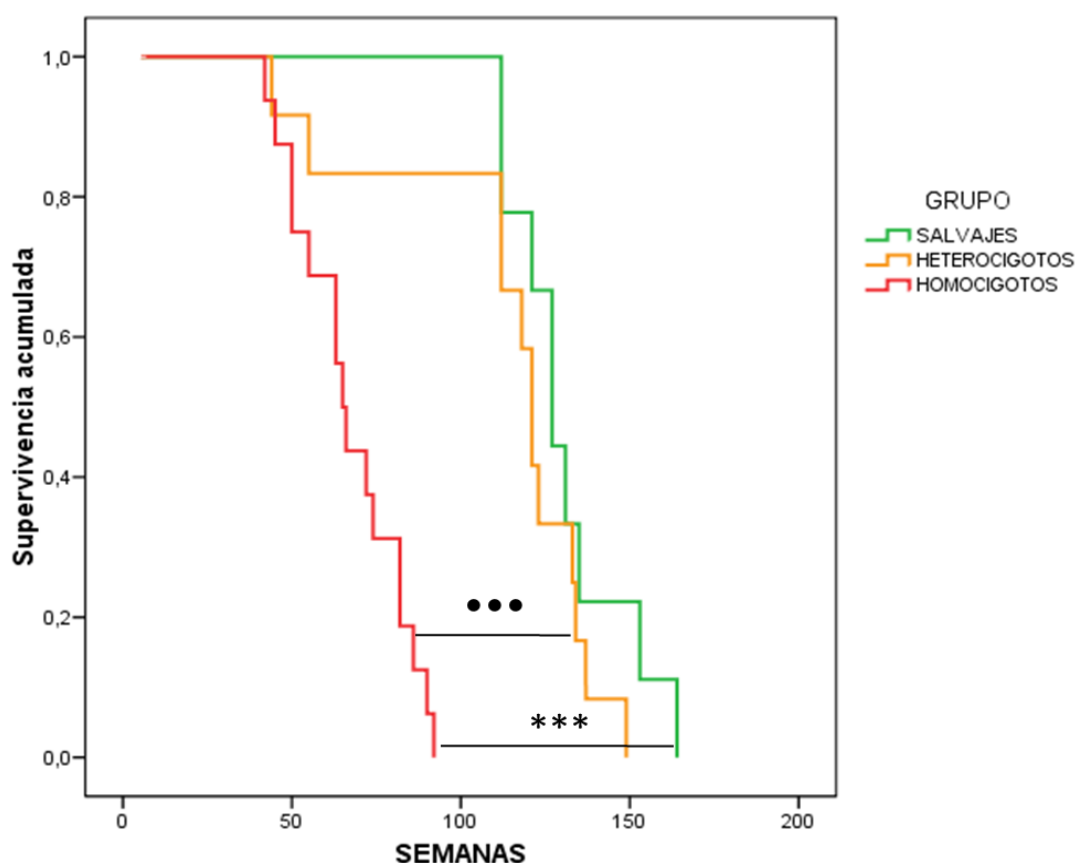


Figura 30. Curva de supervivencia (% de animales vivos de cada grupo en función de la edad en semanas) de ratones homocigotos (*db/db*), heterocigotos (*db/+*) y salvajes.

Cada línea representa la supervivencia media acumulada de los animales de cada grupo experimental (salvajes $n=10$; heterocigotos $n=13$; homocigotos $n=17$).

*** $p<0,001$ con respecto a los correspondientes valores en ratones salvajes. ••• $p<0,001$ con respecto a los correspondientes valores en ratones heterocigotos (*db/+*).

4.3. ACTIVIDAD NATURAL KILLER, CAPACIDAD PROLIFERATIVA Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL EN RATAS WISTAR MACHO ADULTAS CON SOBREPESO INDUCIDO POR DIETA HIPERCALÓRICA. ESTUDIO PRELIMINAR

En este último apartado se exponen los resultados del efecto de una dieta hipercalórica (25,5% de grasa) sobre la actividad “Natural Killer” y la capacidad proliferativa de leucocitos de bazo y ganglios axilares en ratas Wistar adultas. Asimismo se recoge el análisis de la capacidad antioxidante total plasmática y el peso corporal de los animales en el momento del sacrificio.

Todos estos resultados se recogen en la **figuras 31-34**. En ellas se representa cada parámetro, obtenido en el grupo de ratas alimentadas con una dieta hipercalórica y que alcanzaron sobrepeso, que fue comparado con el grupo de ratas control, alimentadas con una dieta estándar.

4.3.1. Peso corporal en el momento del sacrificio.

Los resultados correspondientes al peso corporal de los animales en el momento del sacrificio (**figura 31**), muestran como el grupo de ratas alimentadas con dieta hipercalórica alcanza un significativo aumento del peso corporal ($p < 0,05$), respecto al grupo control que recibió una dieta estándar. Se consiguió por tanto, establecer un modelo animal de sobrepeso inducido por la dieta hipercalórica utilizada.

El análisis de los resultados cuando se realiza la prueba “t” de Student, muestra el mismo nivel de significación que el obtenido mediante ANOVA.

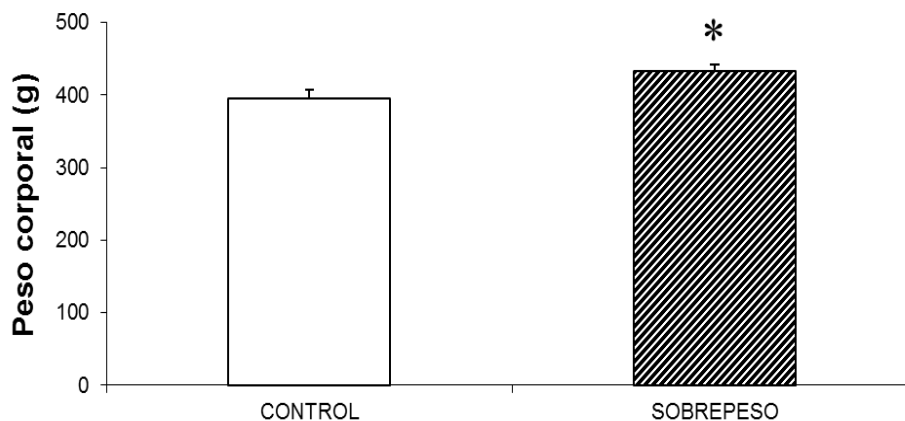


Figura 31. Peso corporal (g) en ratas Wistar alimentadas con dieta hipercalórica, en el momento del sacrificio.

Cada columna representa la media $\pm$ E.E. del número de animales de cada grupo (n=10).

* $p < 0,05$ con respecto a los correspondientes valores del grupo control.

4.3.2. Estudio de la actividad “Natural Killer” en leucocitos de bazo y ganglios axilares.

La actividad “Natural Killer” (expresada como % de lisis de células tumorales) se representa en la **figura 32**. Esta actividad citotóxica en leucocitos de bazo (**figura 32A**) y ganglios axilares (**figura 32B**), está disminuida significativamente ($p < 0,01$) en ratas con sobrepeso alimentadas con dieta hipercalórica, respecto al grupo control.

El análisis de los resultados cuando se realiza la prueba “t” de Student, muestra el mismo nivel de significación que el obtenido mediante ANOVA.

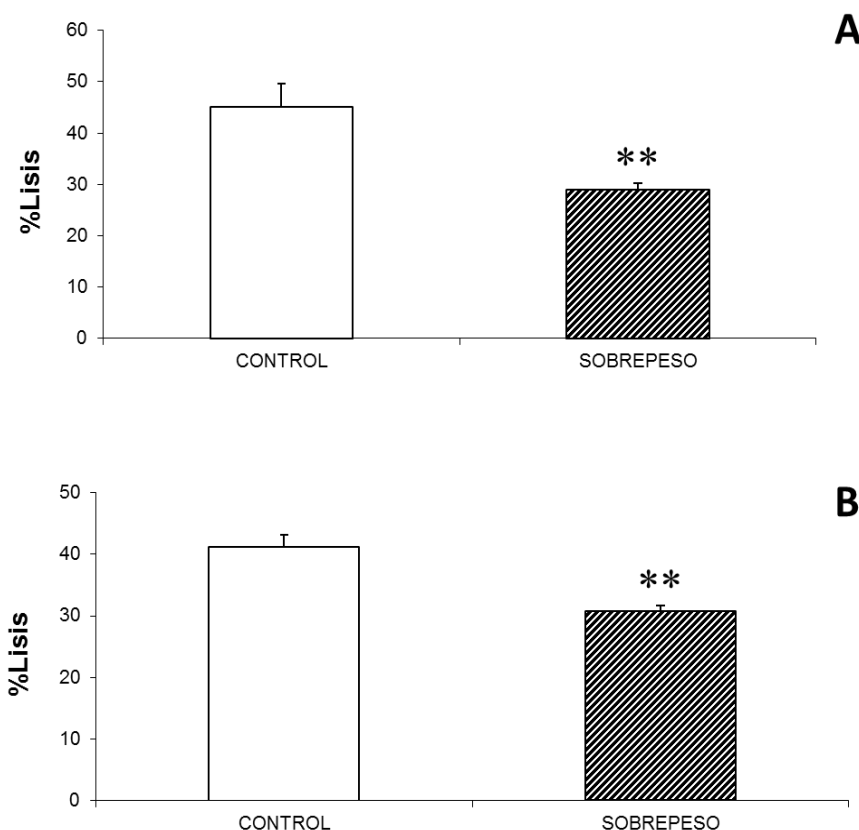


Figura 32. Actividad “Natural Killer” (% lisis) de leucocitos de bazo (A) y ganglios axilares (B) en ratas Wistar alimentadas con dieta hipercalórica.

Cada columna representa la media $\pm$ E.E. del número de animales de cada grupo (n=7).

**p<0,01 con respecto a los correspondientes valores del grupo control.

4.3.3. Estudio de la capacidad proliferativa en leucocitos de bazo y ganglios axilares.

La capacidad proliferativa medida como % de linfoproliferación se estudió en respuesta al mitógeno Con A a la concentración de 1 μ g/ml en pocillo. Los linfocitos de bazo (**figura 33A**) de ratas con sobrepeso, muestran de manera significativa ($p<0,05$) una menor proliferación respecto al grupo control. De igual manera, en los linfocitos de los ganglios axilares (**figura 33B**) también la proliferación resulta ser significativamente menor ($p<0,01$) en ratas alimentadas con dieta hipercalórica respecto al grupo control.

El análisis de los resultados cuando se realiza la prueba “t” de Student, muestra el mismo nivel de significación que el obtenido mediante ANOVA en linfocitos de bazo, en cambio en ganglio se reduce la significación a ($p<0,05$).

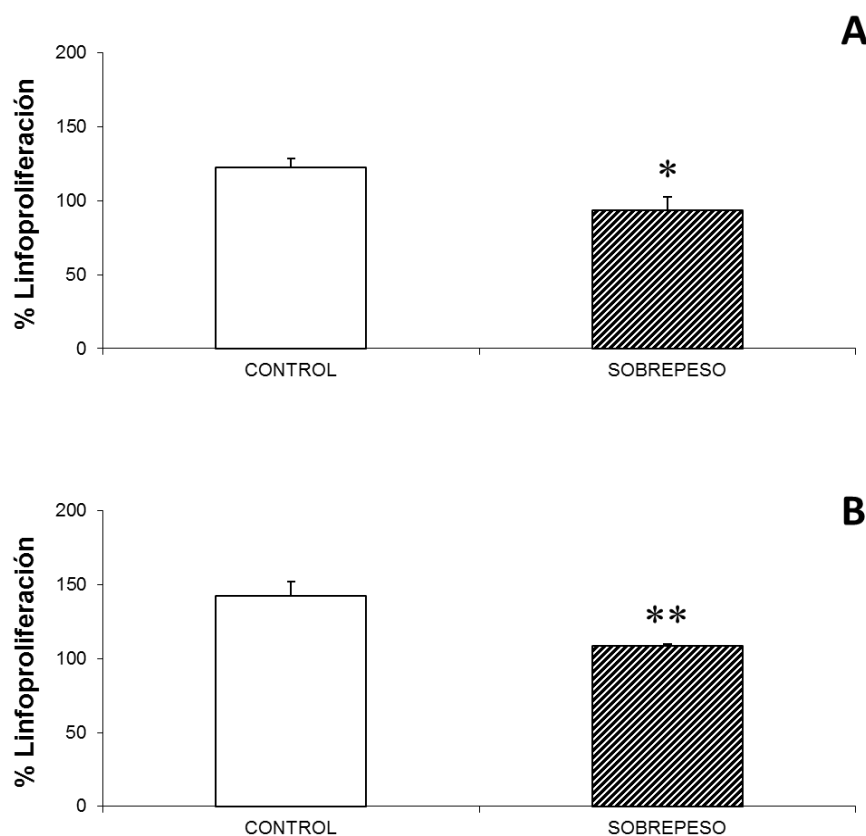


Figura 33. Respuesta proliferativa (% de linfoproliferación) al mitógeno Con A (1 µg/ml) de linfocitos de bazo (A) y ganglios axilares (B), en ratas Wistar alimentadas con dieta hipercalórica.

Cada columna representa la media $\pm$ E.E. del número de animales de cada grupo (n=7).

**p<0,01, *p<0,05 con respecto a los correspondientes valores del grupo control.

4.3.4. Estudio de la capacidad antioxidante total plasmática.

La capacidad antioxidante total plasmática medida en (U/ml) se representa en la **figura 34**. Las ratas con sobrepeso alimentadas con dieta hipercalórica presentan un aumento significativo (p<0,05) de la capacidad antioxidante total respecto al grupo control.

El análisis de los resultados cuando se realiza la prueba “t” de Student, muestra el mismo nivel de significación que el obtenido mediante ANOVA.

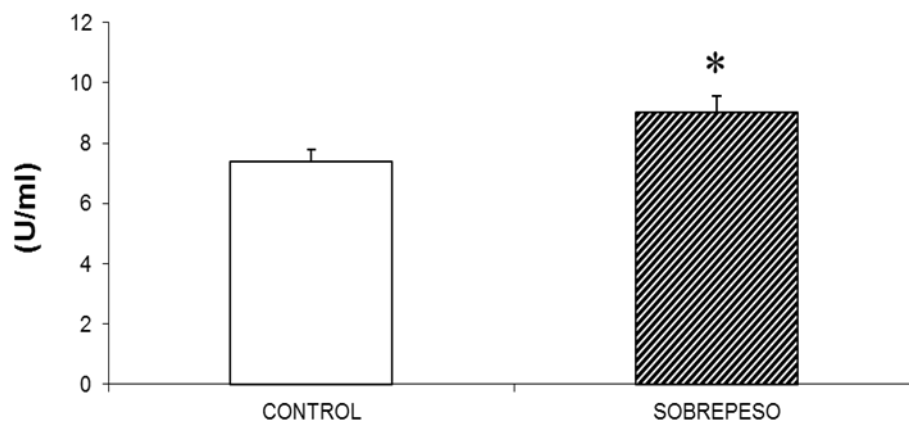


Figura 34. Capacidad antioxidante total plasmática (U/ml) en ratas Wistar alimentadas con dieta hipercalórica.

Cada columna representa la media $\pm$ E.E. del número de animales de cada grupo (n=9).

*p<0,05 con respecto a los correspondientes valores del grupo control.

5. DISCUSIÓN

5.1. ESTUDIOS REALIZADOS EN RATAS ZUCKER GENÉTICAMENTE OBESAS

5.1.1. ESTUDIO INMUNOLÓGICO, DE ESTRÉS OXIDATIVO Y DEL PERFIL METABÓLICO EN RATAS MACHO GENÉTICAMENTE OBESAS, JÓVENES Y ADULTAS

5.1.1.1. Estudio de varias funciones inmunitarias y de estrés oxidativo en ratas Zucker genéticamente obesas adultas. Estudio comparativo con ratas de la cepa Wistar.

En este primer sub-objetivo se ha realizado el estudio de la capacidad fagocítica, la actividad “Natural Killer”, la respuesta proliferativa y los niveles de liberación de citoquinas, como funciones de las células inmunitarias. Respecto a la caracterización de los distintos parámetros de estrés oxidativo, se ha valorado la capacidad antioxidante total (TAC, del inglés, *Total Antioxidant Capacity*), los niveles de GSH total, y las actividades de las enzimas XO, GPx y GR, en ratas Zucker (lean y *fa/fa*) así como en ratas Wistar adultas (6 meses). También se ha realizado una determinación del peso corporal y de los órganos.

Estudio del peso corporal y de los órganos

En cuanto a la **evolución del peso corporal**, en la presente tesis se observó que las ratas obesas *fa/fa* ya desde las 12 semanas de edad muestran un peso corporal significativamente mayor respecto a sus controles, las ratas lean, por lo que se puede decir que en estas ratas obesas quedaba establecido el modelo de obesidad genética, ya desde una temprana edad. Como ya ha sido descrito, en la rata Zucker *fa/fa* la obesidad comienza a ser notable desde la 3-5 semanas de edad, y alrededor de la semana 14 de edad, ya el 40% de la composición corporal son lípidos (Hakkak, Holley et al. 2005), hecho que se manifiesta en el peso corporal de los animales utilizados. A lo largo del tiempo en que se cuantificó el peso corporal de los animales, las ratas *fa/fa* presentaron

un peso significativamente superior a sus controles. Un estudio realizado por Ferrari y sus colaboradores, corrobora como existe una mayor ganancia de peso corporal en ratas Zucker *fa/fa* respecto a las ratas lean (Ferrari, Arnold et al. 2005). Asimismo, Tanaka y colaboradores observaron que la el peso en ratas *fa/fa* desde las 5 semanas hasta la 38 de edad, aumentaba de manera gradual y era siempre significativamente más elevado que en ratas control lean (Tanaka, Isoda et al. 1998).

En cuanto a la evolución del peso en ratas Zucker respecto a las ratas de la cepa Wistar, se observó que las ratas lean presentaban una evolución de ganancia de peso similar a la que se observa en ratas Wistar, hasta alcanzar las 18 semanas de edad, momento a partir del cual estas ratas Wistar incrementan significativamente su peso respecto a las ratas lean. Por su parte, las ratas *fa/fa* presentaron una evolución del peso significativamente superior al de las ratas Wistar, desde las 12 hasta las 24 semanas de edad. Por tanto, se puede concluir que, las ratas lean y Wistar, a pesar de tratarse de ratas control, sin obesidad, son dos cepas que no se comportan igual en cuanto a la ganancia de peso corporal, siendo las ratas Wistar una cepa con un aumento de peso más acelerado. En un estudio realizado por Cossio-Bolaños y sus colaboradores, también se mostró una evolución de peso corporal en ratas Wistar macho similar a la obtenida en nuestros resultados entre la semanas 12 y 18 de edad (Cossio-Bolaños, Gómez Campos et al. 2013). En otra investigación también se ha observado un incremento significativo del peso corporal alcanzado por las ratas *fa/fa* a las 14, 24 y 37 semanas de edad, respecto a las ratas lean (Løhr, Folkmann et al. 2015).

El **peso corporal obtenido en el momento del sacrificio** en la ratas *fa/fa*, que resultó ser significativamente superior respecto a sus controles lean y a la cepa de ratas Wistar, es un dato que vuelve a corroborar que el modelo de obesidad genética estaba establecido, para poder realizar las valoraciones de función inmunitaria y estrés oxidativo. También se comprobó como en este momento previo a la realización de las valoraciones, las ratas Wistar presentaban un peso significativamente mayor al de las ratas lean. En un estudio realizado por Moriguchi y sus colaboradores en ratas Zucker *fa/fa*, observaron que el peso a los 12 meses de edad (48 semanas) era casi tres veces

superior al de las ratas control lean (Moriguchi, Kato et al. 1998 (a)), lo que justifica la continua y significativa ganancia de peso en ratas *fa/fa*, respecto a sus controles lean.

En cuanto al **peso de los órganos** estudiados, como era de esperar, en las ratas obesas *fa/fa*, el peso absoluto de todos los órganos (bazo, timo, hígado, corazón, grasa epididimal y lumbar, y los riñones) excepto del cerebro, resultó ser significativamente mayor que en ratas lean. Este patrón de pesos es el mismo encontrado en comparación con las ratas Wistar, excepto en el caso del bazo. Esto parece indicar que la obesidad se manifiesta afectando a los distintos órganos periféricos, pero no al cerebro. El aumento significativo de peso observado en la mayoría de los órganos de ratas Wistar (bazo, timo, hígado, y grasa epididimal y lumbar), respecto a los de ratas lean, demuestra nuevamente que las Wistar son ratas pertenecientes a una cepa más corpulenta que las Zucker, a la misma edad.

Los datos obtenidos del % de peso relativo de los órganos respecto al peso corporal, muestran que las ratas *fa/fa* presentan un menor peso en bazo, corazón, cerebro y riñones, así como un mayor peso en timo, hígado, y grasa epididimal y lumbar respecto a sus controles lean y a las ratas Wistar, lo que parece indicar que en realidad, los únicos órganos que aumentan su tamaño respecto al peso corporal son, además del timo, los órganos clave metabólicos en la obesidad, la grasa y el hígado. Los demás órganos, por tanto, no han experimentado un aumento de peso en relación al incremento de peso corporal en estas ratas. Esto corrobora una acumulación de grasa principalmente en el tejido adiposo y en el hígado (ya que una de las características de este modelo animal es el hígado graso), así como en timo. En lo referente al bazo, lo encontrado en el presente trabajo reitera lo obtenido en otra investigación en ratas *fa/fa*, de 14 semanas de edad, cuyo peso del bazo por gramo de peso corporal era significativamente menor que en ratas control lean (Ruth, Taylor et al. 2008). No obstante, en otro estudio el peso del bazo por gramo de peso corporal en ratas Zucker *fa/fa*, no mostró diferencias significativas a los 12 meses de edad, en comparación con ratas lean (Moriguchi, Kato et al. 1998 (a)).

También se puede observar que las ratas Wistar presentan un peso relativo significativamente mayor en la grasa epididimal y lumbar, y una tendencia al aumento en hígado, respecto a las ratas lean, lo que parece indicar que el incremento de peso corporal en estas ratas y su mayor corpulencia, puede deberse fundamentalmente al aumento de peso en estos órganos.

Valoración de las funciones inmunitarias en leucocitos peritoneales

En lo que respecta a los parámetros funcionales de las células inmunitarias del peritoneo, se ha valorado la capacidad fagocítica de los macrófagos y la actividad “Natural Killer” de los leucocitos.

Los macrófagos son las células fagocíticas más importantes del organismo, ya que constituyen una relevante línea de defensa y desempeñan un papel esencial en la respuesta inmunitaria. Además, los macrófagos participan en la presentación de antígenos a los linfocitos, así como en la secreción de determinadas citoquinas que modulan la funcionalidad de otras células inmunitarias, coordinando la respuesta inmunitaria innata y adaptativa. Estas células poseen la capacidad de destruir agentes extraños, una vez fagocitados, mediante la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que se generan en el proceso conocido como estallido “estallido respiratorio”, en el cual tiene lugar una marcada activación del metabolismo oxidativo.

Los datos obtenidos en la **capacidad fagocítica de los macrófagos**, en términos de índice fagocítico, muestran un descenso significativo en ambas ratas Zucker en comparación con las Wistar. También se observa una tendencia a disminuir en ratas obesas *fa/fa* respecto a sus controles lean. En cuanto a la eficacia fagocítica, de nuevo las ratas Zucker presentan un descenso significativo en este parámetro respecto a las Wistar. Por su parte, las ratas *fa/fa* muestran un deterioro significativo de dicha eficacia respecto a sus controles lean. Todo esto estaría indicando que a la edad adulta las ratas Zucker son una cepa que tiene disminuida la capacidad de fagocitar, y que concretamente las ratas obesas *fa/fa* presentan una capacidad fagocítica más deteriorada que sus controles lean.

En un estudio realizado por Plotkin y sus colaboradores, se encontró que en ratas obesas Zucker macho adultas, la función fagocítica de macrófagos peritoneales no estaba afectada, en cambio sí mostraban una menor capacidad para destruir las levaduras fagocitadas, en comparación con las ratas lean (Plotkin, Paulson et al. 1996). Por otra parte, en una investigación realizada en un modelo de obesidad en rata inducido por dieta de cafetería durante cinco semanas, no se encontraron diferencias en la función fagocítica de los esplenocitos respecto a los animales control, pero la producción de ROS resultó ser menor en ratas obesas (Lamas, Martínez et al. 2002). Una investigación realizada en mujeres obesas adultas mostró una mayor capacidad fagocítica y estallido oxidativo en monocitos y granulocitos de sangre periférica, respecto a las mujeres no obesas (Nieman, Henson et al. 1999).

Por otro lado, también se ha observado una menor capacidad de fagocitosis en los macrófagos obtenidos de ratones con obesidad genética (*ob/ob*) y (*db/db*), (Marti, Marcos et al. 2001) (Lindström 2007), así como una menor actividad destruyendo levaduras (*Candida albicans*) que los aislados de animales control (Loffreda, Yang et al. 1998) (Marti, Marcos et al. 2001). Mancuso y sus colaboradores también demostraron que la fagocitosis de macrófagos alveolares de ratones (*ob/ob*) deficientes en leptina se encontraba deteriorada (Mancuso, Gottschalk et al. 2002). Además, se han identificado anomalías fenotípicas en macrófagos peritoneales de ratones (*ob/ob*), como un incremento en la producción mitocondrial de superóxido y peróxido de hidrógeno (Lee, Li et al. 1999). En otro estudio, en ratones alimentados con una dieta rica en grasa durante 8 semanas, se comprobó que la capacidad fagocítica de los granulocitos, y la producción de ROS por células peritoneales estaban disminuidas, en comparación con los ratones control (Strandberg, Verdrengh et al. 2009). Recientemente, en un trabajo llevado a cabo en células peritoneales de ratones adultos obesos, que fueron alimentados con una dieta rica en grasa durante la adolescencia, se ha comprobado que la capacidad fagocítica de los macrófagos, estaba significativamente disminuida respecto a los animales adultos control alimentados con una dieta estándar (Hunsche, Hernandez et al. 2015).

La gran mayoría de todos estos resultados corroboran los obtenidos en nuestro estudio, indicando alteraciones en la función fagocítica en la obesidad.

Por otra parte, las células NK constituyen el mecanismo protector más importante frente a tumores y células infectadas por virus. No poseen receptores específicos en su superficie, como ocurre con el receptor CD8 presente en los linfocitos T citotóxicos, y además su citotoxicidad no está restringida por el complejo mayor de histocompatibilidad. Las células NK no proceden del linaje T ni B y no requieren del timo para su maduración (McArthur 2000).

En cuanto a la **actividad “Natural Killer” (NK)** de los leucocitos, los resultados indican que la cepa de ratas Zucker presenta un deterioro de este parámetro, que es más acusado en ratas obesas *fa/fa*, respecto a la cepa de ratas Wistar. Además, este deterioro en la actividad NK de las ratas obesas resulta estadísticamente significativo respecto a sus controles lean.

A pesar de que no se ha encontrado otro trabajo, en el que se haya valorado la actividad NK en leucocitos peritoneales de ratas Zucker obesas, los resultados obtenidos en el presente estudio están en concordancia con los encontrados utilizando un modelo de obesidad por dieta rica en grasa, en ratón, en el cual los leucocitos peritoneales presentaron una actividad NK disminuida, en comparación con los ratones control no obesos (Hunsche, Hernandez et al. 2015). Como se ha comentado, al constituir las células NK el principal mecanismo protector frente a infecciones, el deterioro que presentan las ratas obesas en la actividad de estas células, explicaría, en parte, el incremento encontrado en la susceptibilidad a infecciones por *Candida albicans* (Plotkin, Paulson et al. 1996).

Estos resultados obtenidos en la presente tesis, en relación a una menor respuesta innata (capacidad fagocítica y actividad NK) en ratas Zucker obesas, coinciden con el deterioro en estas funciones de leucocitos peritoneales en modelos murinos de envejecimiento prematuro (Alvarado, Álvarez et al. 2006) (Álvarez, Alvarado et al. 2006) (Viveros, Arranz et al. 2007) y cronológico (Arranz, De Castro NM et al. 2010) (Arranz, Caamaño et al. 2010), así como en ratones triple transgénicos para la enfermedad de Alzheimer, también propuestos como prematuramente envejecidos (Maté, Cruces et al. 2015).

Valoración de las funciones inmunitarias en leucocitos de bazo y timo

En lo que respecta a la **actividad “Natural Killer” (NK)** de los leucocitos de bazo y timo, los resultados muestran una disminución significativa de esta actividad en la cepa de ratas Zucker, respecto a las Wistar. En el caso del bazo, también se observa que las ratas *fa/fa* tienden a presentar un mayor deterioro de esta actividad respecto a sus controles lean. En un estudio llevado a cabo en esplenocitos de ratas Zucker *fa/fa*, en este caso hembras, también se comprobó que presentaban una disminución muy marcada de la actividad NK, respecto a sus controles lean (Moriguchi, Kato et al. 1998 (b)). Sin embargo, en los resultados del presente trabajo no se observó un deterioro significativo de esta actividad en bazo y menos aún en timo de ratas *fa/fa*, en relación a las lean. Estas discrepancias encontradas podrían deberse a la edad de los animales empleados, ya que en nuestro estudio es de 6 meses y en el realizado por Moriguchi y sus colaboradores, la edad de los animales es de 12 meses, por lo que el haber alcanzado éstos el límite entre la edad adulta y la madura, puede ser un motivo que justifique ese mayor deterioro. También, la diferencia de sexo puede ser un factor relevante. De hecho, en algunas funciones inmunitarias a la edad adulta, en un modelo de envejecimiento prematuro en ratón, se han observado diferencias en hembras que no tienen lugar en machos (Guayerbas 2003).

En otro trabajo realizado en mujeres obesas adultas, la función de las células NK resultó no estar alterada, respecto al grupo de mujeres no obesas (Nieman, Henson et al. 1999). Sin embargo, en una investigación realizada en sujetos adultos con obesidad severa, en este caso en sangre periférica, se comprobó que los niveles de células NK circulantes estaban más disminuidos y tenían una actividad citotóxica deteriorada, en comparación con los sujetos sin obesidad. También comprobaron que las células NK de estos sujetos obesos, eran más susceptibles a los efectos perjudiciales del tabaco, y que en sujetos no obesos la adiponectina preserva la función basal de las células NK (O'Shea, Cawood et al. 2010). Dado que la leptina y la adiponectina son adipoquinas implicadas en la regulación del sistema inmunitario, y que receptores para ambas han sido identificados en células NK (Lord, Matarese et al. 1998) (Ouchi, Kihara et al. 2001), se podría sugerir que la adiponectina posee un papel protector y regulador

positivo en estas células. De hecho, niveles disminuidos de adiponectina se han asociado con distintas enfermedades relacionadas con la obesidad (Wei, Giovannucci et al. 2005) (Ishikawa, Kitayama et al. 2007) (Mantzoros, Trakatelli et al. 2007). Asimismo, en el estudio de O'Shea y sus colaboradores se observó que las células NK de individuos obesos no responden a la adiponectina (O'Shea, Cawood et al. 2010), por lo que estas células en sujetos obesos podrían ser resistentes a esos efectos positivos de la adiponectina. Dado que los resultados obtenidos en nuestro estudio en bazo de ratas *fa/fa* en comparación con las lean, y en bazo y timo respecto a Wistar, también muestran como la obesidad compromete la función de las células NK, una posible explicación, podría ser la desregulación de adipoquinas existente en las ratas obesas, en las que los bajos niveles de adiponectina y la resistencia a la leptina, no permiten una adecuada regulación de la funcionalidad de estas células.

Por otra parte, la activación de linfocitos es crítica en la respuesta inmunitaria, ejerciendo sus efectos reguladores o efectores (Douziech, Seres et al. 2002). Tras reconocer al antígeno los linfocitos responden proliferando, capacidad que les permite llevar a cabo el proceso de expansión clonal para generar el repertorio de células específicas frente a dicho antígeno. Por tanto, esta función es de vital importancia dentro de la inmunidad mediada por células. Por otro lado, la liberación de citoquinas por parte de los linfocitos activados permite la regulación del crecimiento y diferenciación de los mismos y de otras células diana, contribuyendo al control homeostático de la función inmunitaria. Así, tras la incubación con mitógenos, tienen lugar una serie de reacciones en los linfocitos que llevan a la liberación de IL-2 y finalmente a la proliferación (Clements and Koretzky 1999) (Kane, Lin et al. 2000).

En lo referente a la **capacidad proliferativa** de los linfocitos, en este estudio se han empleado los siguientes mitógenos: Con A y LPS, para valorar la respuesta proliferativa en linfocitos T y B respectivamente, a las concentraciones de 1, 3 y 5 µg/ml. La concentración de 1 µg/ml es la que se usa habitualmente en nuestro laboratorio, y las concentraciones de 3 y 5 se añadieron al estudio para comprobar si los linfocitos de ratas obesas respondían o no a una cantidad superior de mitógeno. Previamente, otros investigadores observaron que las concentración de 1 µg/ml de Con

A era óptima tanto para esplenocitos de ratas obesas, como para las control (Tanaka, Isoda et al. 1998). Además, se utilizó la PHA a la concentración de 25 µg/ml ampliamente utilizada en nuestro laboratorio, y también se añadieron las de 5 y 50 µg/ml con objeto de comprobar si los linfocitos T respondían a un amplio rango de concentraciones de ese mitógeno.

Con respecto a los resultados obtenidos en la respuesta proliferativa de linfocitos de **bazo**, existe una menor proliferación basal y en respuesta a los tres mitógenos en ratas Zucker respecto a las ratas Wistar, hecho que se puede apreciar tanto en las cuentas por minuto (cpm) obtenidas como en el % de proliferación. Esta menor proliferación resultó estadísticamente significativa al considerar las cpm en ratas lean con respecto a Wistar, empleando el mitógeno Con A, a las concentraciones de 3 y 5 µg/ml, LPS a 1 µg/ml y PHA a la concentración de 5 µg/ml. En el caso de las ratas *fa/fa*, este descenso de la proliferación en cpm es significativo respecto a las ratas Wistar, cuando la estimulación se realiza con Con A, a cualquier concentración, así como con LPS a 1 y 3 µg/ml y PHA a 5 µg/ml.

La proliferación de linfocitos de bazo de las ratas *fa/fa* muestra, de manera generalizada, una tendencia al deterioro, en términos de cpm, respecto a sus controles lean, aunque no resulte estadísticamente significativa. Los % de proliferación, por su parte, nos indican que aunque en algunos casos se observa una ligera disminución en ratas obesas, no existen prácticamente diferencias respecto a sus controles lean.

En cuanto al **timo**, los datos obtenidos son similares a los observados en bazo. De nuevo, las ratas Zucker presentan, de manera generalizada, un deterioro en la respuesta proliferativa a mitógenos respecto a las ratas Wistar, como se aprecia en los resultados de cpm y en el % de proliferación. Este descenso en la proliferación de linfocitos es significativo en los valores de cpm en ratas lean con respecto a Wistar utilizando el mitógeno Con A, a las concentraciones de 3 y 5 µg/ml, y el LPS a 1 µg/ml. En el caso de las ratas *fa/fa*, esta disminución en la proliferación en cpm es significativa respecto a las ratas Wistar, cuando la estimulación se realiza con Con A, a las concentraciones de 3 y 5 µg/ml, con LPS a 1 µg/ml, y con PHA a 50 µg/ml. En valores de % de proliferación, solo el descenso es significativo en ratas lean respecto a Wistar al estimular con Con A, a las concentraciones de 3 y 5 µg/ml, y en ratas *fa/fa* con los

mitógenos Con A, a 3 y 5 µg/ml, y con LPS a 1 y 3 µg/ml. La proliferación de los linfocitos de timo en las ratas *fa/fa*, al igual que en bazo, no presenta diferencias significativas respecto a los valores encontrados en ratas lean, ni en términos de cpm, ni en % de proliferación, pero en algunos casos se observa una tendencia al deterioro respecto a ratas lean.

Otro estudio de capacidad proliferativa realizado en ratas macho Zucker *fa/fa*, demostró que la proliferación de los esplenocitos en respuesta a los mitógenos Con A (1µg/ml), PHA (x200) y a la enterotoxina estafilocócica B (0,4µg/ml), estaba significativamente disminuida respecto a las ratas control no obesas a las 20 semanas (5 meses) y 38 semanas (prácticamente 10 meses) de edad (Tanaka, Isoda et al. 1998). Asimismo, Moriguchi y sus colaboradores observaron que la proliferación de linfocitos esplénicos de ratas obesas Zucker hembra con 12 meses de edad, era significativamente menor en respuesta a Con A, a todas las concentraciones empleadas, en un intervalo de concentraciones de 1-10 mg/l, respecto a las ratas lean (Moriguchi, Kato et al. 1998 (a)). Dado que la concentración óptima para inducir la máxima proliferación de los esplenocitos no resultó muy diferente entre ratas *fa/fa* y lean, la proliferación disminuida de los linfocitos esplénicos de las ratas obesas, parece debida a una menor capacidad de respuesta, y no a una insuficiente estimulación con Con A. Tanaka y sus colaboradores también estudiaron la respuesta proliferativa de los linfocitos esplénicos en un modelo de obesidad genética y diabetes en ratas Wistar macho. Así, observaron que la respuesta a Con A (1µg/ml), y PHA (X200) era significativamente menor en este modelo animal a la edad de 22 semanas (alcanzando los 6 meses) con Con A, y con ambos mitógenos a la edad de 41 semanas (10 meses), respecto a los controles (Tanaka, Isoda et al. 2000).

Otras investigaciones en humanos con obesidad han mostrado también un deterioro de la proliferación en linfocitos de sangre periférica en respuesta a mitógenos. Concretamente, la capacidad proliferativa de los linfocitos T en respuesta a Con A y PHA, y de los linfocitos B, en respuesta a un mitógeno extraído de la raíz de la planta *Phytolacca americana*, estaba significativamente disminuida en sujetos obesos que no padecían de ninguna otra complicación, incluyendo hiperglicemia, respecto a sujetos no

obesos, mejorando esta función inmunitaria si los individuos se sometían a una adecuada pérdida de peso (Tanaka, Inoue et al. 1993). En otro estudio realizado en mujeres obesas (entre 25 y 75 años, con una media de edad de 44 años) que no padecían de diabetes, cáncer, ni enfermedad coronaria, la proliferación de los linfocitos de sangre periférica en repuesta a los siguientes mitógenos en concentraciones óptimas y subóptimas, Con A (50 y 6,25 µg/ml), PHA (6,25 y 1,56 µg/ml) y a un mitógeno extraído de la raíz de la planta *Phytolacca americana* (0,25 y 0,125 µg/ml), estaba significativamente disminuida en todos los casos, excepto con el último mitógeno mencionado, a la concentración de 0,125 µg/ml (Nieman, Henson et al. 1999). Esta disminución representaba un 19-32% respecto a las mujeres no obesas, dependiendo del mitógeno empleado y su concentración. Concretamente, la Con A resultó ser el mitógeno con el que se encontraron mayores diferencias significativas.

Dado que la cantidad y la calidad de los lípidos de la dieta modulan la inmunidad celular (Gurr 1983) (Traill and Wick 1984), y el incremento en la concentración de insulina plasmática está asociado a una disminuida función inmunitaria, como la actividad NK o la proliferación de linfocitos de sangre periférica (Pallavicini and Nichols 1976) (Attallah, Abdelghaffar et al. 1987), la baja respuesta de los linfocitos esplénicos y tímicos de ratas Zucker respecto a Wistar, y la tendencia a un mayor deterioro de esa respuesta en ratas *fa/fa* respecto a lean, podría estar, en parte, relacionada con el aumento en la concentración de insulina y triacilglicerol que experimenta este modelo animal de obesidad genética (Moriguchi, Kato et al. 1998 (a)). Como se comentó anteriormente, la leptina es la adipoquina capaz de inducir la proliferación, diferenciación y activación funcional de las células hematopoyéticas (Gainsford, Willson et al. 1996) (Fantuzzi and Faggioni 2000) (Frühbeck 2001). Debido a que las ratas Zucker *fa/fa* tienen truncado el receptor de leptina, responsable de la señalización o diferenciación en esas células por medio de la leptina, esta mutación podría explicar, en parte, el deterioro proliferativo de las ratas obesas (Moriguchi, Kato et al. 1998 (a)). Por otra parte, puesto que se sabe que las ratas Zucker *fa/fa* muestran elevados niveles plasmáticos de corticosterona, además de insulina, respecto a ratas lean (Mercer, Lawrence et al. 1996), y debido a que la corticosterona deprime la función inmunitaria (Wichmann, Zellweger et al. 1996), también se ha propuesto que la elevada

concentración de corticosterona en ratas obesas *fa/fa*, podría estar asociada con la disminuida respuesta defensiva (Moriguchi, Kato et al. 1998 (a)).

La principal fuente de energía para los linfocitos maduros es la glucosa (Oka, Moriguchi et al. 1996), especialmente en el proceso de proliferación, después de la estimulación *in vitro* con mitógenos (Chakrabarti, Jung et al. 1994). En las células inmunitarias, el transportador de glucosa tipo 1 (GLUT-1), se expresa en las membranas después de ser estimuladas por mitógenos (Chakrabarti, Jung et al. 1994), lo que no es dependiente de la estimulación de la insulina (Mueckler, Caruso et al. 1985). Se ha demostrado que la expresión de GLUT-1 está significativamente disminuida en los linfocitos esplénicos de ratas obesas, respecto a ratas lean (Moriguchi, Kato et al. 1998 (a)). En base a esta menor expresión de GLUT-1, se ha propuesto que la disminuida respuesta proliferativa de los linfocitos esplénicos observada en ratas *fa/fa* obesas, se encuentra asociada a un deterioro en la captación de glucosa por los linfocitos (Moriguchi, Kato et al. 1998 (a)).

En un estudio realizado por nuestro grupo de investigación en ratas Wistar macho a lo largo de la edad, se comprobó que la actividad NK de los esplenocitos alcanza los mayores valores a la edad adulta, y a partir de esta edad comienza a disminuir. En cuanto a la capacidad proliferativa de los linfocitos de bazo, se observó que se incrementaba a lo largo de la edad, hasta los 18 meses, momento en el que comenzaba a disminuir significativamente (De la Fuente, Baeza et al. 2004). En el presente estudio, las ratas Zucker ya muestran un descenso en la actividad NK y la respuesta linfoproliferativa a la edad adulta (6 meses), respecto a la cepa de ratas Wistar, lo que podría apuntar a un envejecimiento prematuro de estas funciones.

El hecho de que en el presente trabajo las diferencias en la proliferación entre ratas *fa/fa* y lean no resultan estadísticamente significativas, podría deberse a muchos factores que han podido incidir, desde el lote de los animales, forma de estabulación, etc, no teniendo en estos momentos una explicación clara para dicho resultado.

El estudio de la **liberación de citoquinas**, se valoró en los sobrenadantes de los cultivos de 48 horas de linfocitos de bazo, tanto en condiciones basales, como estimulados con los mitógenos Con A y LPS a la concentración de 1 µg/ml, puesto que era la menor concentración a la que existían diferencias en el % de linfoproliferación entre ratas Wistar y Zucker *fa/fa*, ya que no se observaron diferencias significativas entre ratas *fa/fa* y lean.

La liberación de **IL-2** es significativamente menor en ratas Zucker respecto a la cepa de ratas Wistar, tanto en condiciones basales como en las de estimulación con los mitógenos. Únicamente en condiciones basales no es significativo este deterioro en ratas lean respecto a Wistar. También se observa una menor liberación de esta citoquina por los linfocitos, en las ratas *fa/fa* respecto a sus controles lean, en todos los casos, siendo significativa en condiciones basales y cuando se estimulan con Con A, por lo que parece que los linfocitos B están menos afectados que los T (máximos respondedores de la Con A) en cuanto a la liberación de esta citoquina. En otros estudios se ha descrito también una disminución significativa en la liberación de IL-2 por parte de los linfocitos esplénicos de ratas Zucker *fa/fa*, de 14 semanas de edad, cuando se estimulan con Con A (2,5 mg/l) en cultivos de 48 horas, respecto a la que llevan a cabo las células de ratas lean (Ruth, Taylor et al. 2008). Asimismo, en un modelo de obesidad en ratón inducido por dieta rica en grasa, también se encontró una menor liberación de IL-2 por linfocitos esplénicos en cultivo de 24 horas, estimulados por PHA, respecto a los ratones no obesos, con 14 semanas de edad (Mito, Hosoda et al. 2000). En un estudio reciente en ratones obesos adultos alimentados con una dieta rica en grasa, se observó que la liberación de IL-2 de leucocitos peritoneales en cultivo de 48 horas, estimulados con Con A y LPS (1µg/ml), estaba significativamente disminuida, respecto a los ratones no obesos (Hunsche, Hernandez et al. 2015).

La IL-2 es producida por la subpoblación Th1 de células T cooperadoras. Actúa de forma paracrina y autocrina para estimular la proliferación de las células T, amplificando de este modo la respuesta inmunitaria (Smith 1988). Por tanto, la proliferación de las células T requiere la síntesis de IL-2 y el correcto funcionamiento del receptor de esta citoquina (Chakravarti and Abraham 1999). Por esta razón, la

reducida liberación de IL-2 por los linfocitos de bazo en ratas Zucker, y de manera más acusada en ratas *fa/fa* podría explicar, en parte, el deterioro en la capacidad de proliferación de la cepa de ratas Zucker respecto a la Wistar, así como el de ratas *fa/fa* respecto a lean encontrado por otros investigadores, o la tendencia al deterioro observada en nuestro estudio.

En relación a los niveles de **IL-1 β** , únicamente se observaron diferencias en la liberación de esta citoquina proinflamatoria en ratas *fa/fa* respecto a Wistar, con un aumento de la misma, cuando los linfocitos se estimularon con LPS. No se encontraron tampoco diferencias significativas entre ratas *fa/fa* y lean, pero si puede observarse una ligera tendencia al aumento en la liberación de IL-1 β en las ratas obesas, sobretodo en la estimulación con LPS. Por su parte, Ruth y colaboradores encontraron un aumento significativo en la liberación de IL-1 β por linfocitos esplénicos de ratas Zucker *fa/fa* de 14 semanas de edad, en cultivos de 48 horas, cuando se estimulaban con LPS (0,1 g/l), y también un aumento aunque no estadísticamente significativo cuando la estimulación se realizaba con Con A (2,5 mg/l) (Ruth, Taylor et al. 2008). Por otro lado, en ratones obesos alimentados con una dieta rica en grasa, a una edad aproximada de 5 meses, se encontró un aumento de los niveles de IL-1 β en suero, respecto a los ratones no obesos (Strandberg, Verdrengh et al. 2009). Sin embargo, en un estudio en ratones obesos adultos alimentados con una dieta rica en grasa, se observó que la liberación de IL-1 β por leucocitos peritoneales en cultivo de 48 horas, estimulados con Con A y LPS (1 μ g/ml), estaba significativamente disminuida, respecto a los ratones no obesos (Hunsche, Hernandez et al. 2015). Todos estos resultados indican una desregulación en los niveles de esta citoquina en la obesidad, viéndose más afectados los linfocitos B.

Dado que la IL-1 tiene numerosas funciones, muchas de ellas no directamente relacionadas con su papel proinflamatorio, como es el hecho de actuar como segunda señal en la proliferación de linfocitos, los resultados obtenidos en esa función proliferativa podrían estar condicionados por la liberación de IL-1 en los cultivos.

En cuanto al **TNF- α** , las ratas obesas muestran un aumento significativo en su liberación respecto a sus controles lean y a la cepa de ratas Wistar, tanto en condiciones

basales como en respuesta a la estimulación por los mitógenos. Esta liberación no muestra diferencias entre las ratas lean y las Wistar, excepto cuando la estimulación se realiza con LPS, donde se pone de manifiesto un aumento en ratas lean. Resultados similares han sido observados en linfocitos esplénicos de ratas Zucker *fa/fa*, de 14 semanas, cuando se estimulan con Con A (2,5 mg/l), y más significativamente al estimular con LPS (0,1 g/l) (Ruth, Taylor et al. 2008). Además, en otro estudio se muestra una tendencia al aumento en la liberación de esta citoquina en esplenocitos mantenidos en cultivo estimulados con LPS, de ratones obesos de 14 semanas de edad alimentados con una dieta rica en grasa (Mito, Hosoda et al. 2000). También, en ratones obesos por dieta rica en grasa se ha encontrado una tendencia al aumento en los niveles de séricos TNF- α , a la edad aproximada de 5 meses (Strandberg, Verdrengh et al. 2009). Asimismo, en una investigación realizada en un modelo de obesidad genética y diabetes en ratas Wistar macho, se observó un aumento significativo de los niveles séricos de TNF- α a la edad de 10 meses (Tanaka, Isoda et al. 2000). En mujeres obesas también se ha detectado un aumento significativo de los niveles plasmáticos de TNF- α , respecto a las no obesas (Ghanim, Aljada et al. 2004). Todos estos hallazgos, junto con los resultados de nuestro estudio, parecen corroborar la idea de que el TNF- α puede contribuir de manera relevante en el estado inflamatorio en la obesidad.

Con respecto a la **IL-10**, en condiciones basales las ratas obesas muestran un aumento significativo en los niveles de esta citoquina anti-inflamatoria liberada en los cultivos, respecto a sus controles lean y a las ratas Wistar. No obstante, cuando los linfocitos se estimulan con ConA se observa una disminución significativa de la liberación de IL-10 en ratas *fa/fa* respecto a sus controles lean, y a las ratas Wistar, no siendo significativa en este último caso. En la estimulación con LPS, ambas ratas Zucker presentan una menor liberación de esta citoquina respecto a las ratas Wistar, que es significativa en el caso de las ratas obesas. Estos resultados parecen indicar que las ratas obesas en condiciones basales son capaces de liberar esta citoquina anti-inflamatoria para compensar los elevados niveles de TNF- α , sin embargo, este sistema de compensación falla en condiciones de respuesta a mitógenos, la cual mimetiza la respuesta que tiene lugar a los antígenos con los que pueden enfrentarse las células inmunitarias en el organismo.

En el estudio realizado por Ruth y sus colaboradores en ratas Zucker *fa/fa* con 14 semanas de edad, la liberación de IL-10 por los esplenocitos estimulados con Con A (2,5 mg/l) y LPS (0,1 g/l), en cultivos de 48 horas, no mostró diferencias respecto a las ratas lean (Ruth, Taylor et al. 2008). Por otra parte, en ratones adultos obesos alimentados con una dieta rica en grasa, se encontró que la liberación de IL-10 por leucocitos peritoneales en cultivo de 48 horas, estimulados con Con A y LPS (1µg/ml), estaba significativamente disminuida, respecto a los ratones control, no obesos (Hunsche, Hernandez et al. 2015). Todos los resultados apuntan a que la liberación de IL-10 por los linfocitos no se afecta o está reducida en respuesta a la estimulación de los mitógenos en la obesidad.

En definitiva, los resultados del estudio de la liberación de citoquinas muestran que la IL-2 está más disminuida en ratas *fa/fa* respecto a lean y a ratas Wistar, la IL-1β más elevada en *fa/fa* respecto a Wistar, el TNF-α significativamente aumentado en ratas obesas respecto a lean y a Wistar, y la IL-10 disminuida en ratas *fa/fa* en situaciones de respuesta a la estimulación. Por ello, se puede decir que las ratas obesas, en general, manifiestan un mayor estado de inflamación que sus controles lean y que la cepa de ratas Wistar, especialmente en condiciones basales, en las que no tienen que responder a una estimulación.

Valoración de parámetros de estrés oxidativo

La base principal de la teoría del estrés oxidativo reside en el aumento progresivo en los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS), que junto con la pérdida de capacidad neutralizadora de las defensas antioxidantes tiene como consecuencia un daño oxidativo producido a las diferentes macromoléculas. Ésto constituye uno de los principales factores causales de la pérdida de las funciones fisiológicas (Harman 1956) (Harman 1993) (Sohal and Weindruch 1996) (Miquel 1998) (Barja 2004 (a)) (De la Fuente and Miquel 2009). Dada la necesaria producción de ROS para muchas funciones celulares, un factor clave para el buen funcionamiento del organismo es el mantenimiento del equilibrio entre los niveles de agentes oxidantes (ROS) y de sistemas antioxidantes y de reparación. La pérdida de dicho equilibrio,

como consecuencia de un exceso en la producción de los primeros o bien de una menor disponibilidad de los segundos, conlleva la aparición y el desarrollo de un proceso de oxidación (Sastre, Pallardo et al. 2000 (a)) (De la Fuente and Miquel 2009).

El tripéptido glutathione (L- γ -glutamyl-L-cisteína-glicina) es el principal antioxidante tiólico intracelular (Dröge 2002) y proporciona un importante sistema de defensa frente al daño oxidativo (Dröge and Breitkreutz 2000). Esta molécula se encuentra principalmente en el citoplasma celular, aunque también está presente en el núcleo y en la mitocondria, lo que permite proteger al ADN frente al daño oxidativo (García de La Asunción, Millán et al. 1996) (Beckman and Ames 1998). Además de lo indicado, considerando el papel protector de la homeostasis celular que posee el glutathione, es importante destacar la implicación de las enzimas glutathione peroxidase (GPx) y glutathione reductase (GR) en el reciclado de este potente antioxidante.

En los mamíferos, la xantina oxido-reductasa es una enzima miembro de la familia de las molibdoenzimas (Kisker, Schindelin et al. 1997) que posee dos formas interconvertibles entre sí, la xantina deshidrogenasa (XDH) y la xantina oxidasa (XO). De este modo, la forma deshidrogenasa se transforma en oxidasa bien de forma irreversible por proteólisis o bien de forma reversible mediante la oxidación de los residuos de cisteína que forman sus puentes disulfuro (Stirpe and Della Corte 1969). *In vivo*, el 80% de la xantina oxido-reductasa se encuentra en forma de XDH, y tan solo el 20% se encuentra en forma de XO (Harrison 2002). Ambas formas catalizan la conversión de hipoxantina en xantina y de xantina en ácido úrico (Hille and Nishino 1995) (Harrison 2002), pero se diferencian en que la XO utiliza el oxígeno para llevar a cabo su reacción, mientras que la XDH puede usar tanto el oxígeno como el NAD⁺, aunque tiene más afinidad por este último (Waud and Rajagopalan 1976).

La XO es una enzima citosólica y se ha demostrado que está presente en células de hígado, intestino, riñón, pulmones, miocardio, piel, músculo, bazo, páncreas, tiroides, útero, ovarios, médula ósea, tejido adiposo, glándulas adrenales, plasma, eritrocitos y otros tejidos en diferentes especies de mamíferos, incluidos los humanos (Al-Khalidi and Chaglassian 1965) (Battelli, Corte et al. 1972) (Parks and Granger 1986) (Wajner and Harkness 1989) (Margolin and Behrman 1992) (Saugstad 1996). En

el presente trabajo se ha valorado la actividad XO, es decir, la forma enzimática que emplea como sustrato de la reacción el oxígeno y genera en consecuencia radicales libres como el anión superóxido y especies reactivas de oxígeno como el peróxido de hidrógeno.

En relación a la valoración de los parámetros de estrés oxidativo en **bazo**, los resultados muestran una ligera tendencia al incremento en los niveles de glutathion (GSH) total en ratas Zucker respecto a Wistar, que no resulta estadísticamente significativo. Por el contrario, la TAC está significativamente disminuida en ratas Zucker respecto a Wistar. Por su parte, la actividad xantina oxidasa (XO) en ratas obesas se encuentra significativamente aumentada respecto a sus controles lean. Las ratas *fa/fa* muestran un aumento significativo la actividad de la glutathion peroxidasa (GPx), respecto a las ratas Wistar, mientras que no hay diferencias en la actividad GR. A la vista de estos resultados, parece que las ratas obesas muestran una mayor oxidación unida a una menor TAC. Los niveles de glutathion puede que no resulten suficientes para compensar la oxidación o se consuman muy rápidamente dando lugar a una aceleración del mecanismo de reciclado, ya que se observa un aumento de la actividad GPx en estas ratas.

En el **timo**, se muestra más claramente el estado de oxidación de las ratas *fa/fa*, ya que presentan significativamente menores niveles de GSH total y de la actividad GR. Sin embargo, la actividad XO no se modifica en ratas Zucker, pero si es significativamente mayor a la que presentan las ratas Wistar. Dado el pequeño tamaño del timo, la muestra no permitió llevar a cabo la valoración de otros parámetros de estrés oxidativo.

Los resultados también reflejan que cada órgano presenta un estado de oxidación diferente, posiblemente porque a nivel del estado redox la obesidad no afecta por igual a los distintos tipos celulares. En este sentido, se ha demostrado que la obesidad acelera la involución tímica asociada a la edad y genera otras alteraciones en las células del timo (Yang, Youm et al. 2009), lo que podría ser una de las razones por las que en este órgano se hayan observado más afectaciones a nivel de estrés oxidativo que en bazo.

Respecto a la valoración de los parámetros de estrés oxidativo en un órgano tan metabólicamente activo como es el **hígado**, encontramos que los niveles de GSH total están significativamente disminuidos en ratas obesas respecto a ratas lean. La TAC en ratas *fa/fa*, por el contrario, está significativamente aumentada respecto a las ratas lean. La actividad XO está significativamente disminuida en ratas lean y *fa/fa*, respecto a las ratas Wistar, pero se aprecia una tendencia al aumento en ratas obesas respecto a lean. Por su parte, la actividad de las enzimas GPx y GR en ratas obesas se encuentra significativamente disminuida respecto a sus controles lean y a la cepa de ratas Wistar. Los resultados parecen indicar una alteración del ciclo del glutatión en ratas obesas, por lo que el aumento en la TAC no debe ser consecuencia del GSH, y podría tratarse de otro mecanismo compensatorio antioxidante. De hecho, se han encontrado niveles elevados de TAC en plasma de sujetos con un claro estado de oxidación e inflamación (Maté 2015).

La valoración de la actividad **xantina oxidasa** en **cerebelo** y **telencéfalo** no muestra diferencias entre ratas Zucker y Wistar, lo que indicaría que estas regiones cerebrales no tienen afectado este oxidante. En plasma, aunque se observa una tendencia al aumento en esta actividad en ratas obesas, no resulta estadísticamente significativa.

En el caso concreto del glutatión, puesto que se conoce que la valoración de su contenido intracelular tanto en forma reducida como oxidada (GSSG), así como la relación entre las mismas, constituye una medida sensible y fiable del nivel de estrés oxidativo global presente en las células (Sies 1999) (Schafer and Buettner 2001) (Jones 2002), hubiera sido interesante valorarlo en el presente estudio. Asimismo, la protección de las células frente al daño oxidativo depende también de la disponibilidad y actividad de otras enzimas antioxidantes importantes en el mantenimiento del equilibrio redox celular, como la catalasa (CAT) o la superóxido dismutasa (SOD), que tampoco se estudiaron en este trabajo, ya que no resultó factible por la cantidad de muestra disponible en bazo y timo, y por el número de animales con el que se trabajaba y el tiempo requerido para la valoración de los demás parámetros.

Por otra parte, se ha identificado que las ratas obesas *fa/fa* a la edad adulta (6 meses) muestran un incremento significativo en la producción de peróxido de hidrógeno por los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ circulantes y esplénicos, así como por los monocitos/macrófagos del bazo, en comparación con sus controles lean (Kim, Vaziri et al. 2007).

El hígado es el órgano que más se ha estudiado a nivel de estrés oxidativo. Así, en una investigación llevada a cabo en ratas Zucker *fa/fa* con 15 semanas de edad, se comprobó que el contenido total de glutatión, la actividad CAT y el tocoferol hepáticos estaban significativamente disminuidos respecto a las ratas lean. En cambio, no se encontraron diferencias en los niveles de ácido ascórbico y tampoco en las actividades de la SOD y la selenio-GPx (Soltys, Dikdan et al. 2001). En otro estudio realizado por Blakely y sus colaboradores en hígado de ratas Zucker *fa/fa* con 15 semanas de edad, se ha demostrado que las concentraciones de malondialdehído (MDA) estaban significativamente aumentadas respecto a las ratas lean. Además, la concentración de GSH total se encontraba reducida en ratas obesas, mientras que la actividad de la enzima GPx y SOD aparecían aumentadas respecto a las ratas control. Finalmente, la concentración del antioxidante α -tocopherol era algo menor en ratas obesas, pero no así la de ácido ascórbico (Blakely, Herbert et al. 2003).

Recientemente, se ha realizado un estudio del estrés oxidativo en hígado y cerebro de ratas Zucker *fa/fa* y en sus controles lean, en animales de 30-34 semanas de edad (Raza, John et al. 2015). En hígado de ratas obesas se encontró una disminución significativa en la producción total de ROS y de ROS mitocondrial, así como un aumento en la producción de óxido nítrico (NO), en la peroxidación lipídica mitocondrial y en la carbonilación de proteínas. La actividad de la enzima SOD estaba aumentada significativamente y ligeramente disminuida la actividad de la CAT. La concentración de GSH reducido citosólico y mitocondrial se encontraba significativamente disminuida, al igual que la actividad GPx y GR mitocondrial y citosólica (ésta última sin significación estadística). Por otro lado, se encontró que en hígado existía un aumento significativo en la actividad de los citocromos 2E1 (citocromo c oxidasa) y 1A1, y una menor actividad en los complejos I, II/III y IV y en

el contenido de ATP mitocondrial. También se identificó un aumento significativo en la expresión de marcadores proteicos de estrés oxidativo como iNOS, estando significativamente disminuida la expresión de p-JNK, e I κ B- α (Raza, John et al. 2015). En cuanto a las valoraciones en cerebro, estos autores encontraron que existía un aumento significativo en la producción total y mitocondrial de ROS, en la producción de NO, en la peroxidación lipídica mitocondrial y en la carbonilación de proteínas. La actividad SOD estaba moderadamente disminuida y la actividad CAT lo estaba significativamente. EL contenido en GSH reducido citosólico y mitocondrial se encontraba significativamente aumentado. Además, la actividad GPx y GR mitocondrial estaban significativamente disminuidas, la GR citosólica estaba disminuida aunque no de un modo significativo, y no existían diferencias en la GPx citosólica. Por otra parte, en este órgano no se observaron alteraciones significativas en la actividad de los citocromos 2E1 y 1A1, mientras que se identificó una menor actividad en los complejos I, II/III y IV y en el contenido de ATP mitocondrial. Al igual que en hígado, se observó un aumento en la expresión de marcadores proteicos de estrés oxidativo, y una disminuida expresión de p-JNK, e I κ B- α . Cabe destacar, por tanto, el aumento del estrés oxidativo y nitrosativo en ratas obesas, particularmente en el cerebro. El incremento de la producción de ROS en el cerebro y la disminución en hígado, sugiere una homeostasis diferencial de las ROS en estos tejidos.

En el estudio de Raza y sus colaboradores se ha demostrado que las complicaciones metabólicas en el hígado y el cerebro de ratas obesas están asociadas a un incremento del estrés oxidativo, un metabolismo redox alterado, así como a disfunciones mitocondriales, acompañadas de alteraciones en la señalización celular y un metabolismo energético comprometido (Raza, John et al. 2015).

Estos resultados y los obtenidos en el presente estudio son indicativos de que el hígado es un órgano afectado de manera importante a nivel de estrés oxidativo en ratas obesas *fa/fa* a la edad adulta. Todas estas investigaciones están de acuerdo en que existe una disminución del contenido en GSH total o reducido en el hígado, hecho que se corrobora en los resultados del presente trabajo. Los mecanismos exactos que generan el estrés oxidativo en este órgano no se conocen, pero el aumento en la producción de pro-

oxidantes y/o el incremento en los sustratos lipídicos susceptibles del ataque peroxidativo, podrían agotar las defensas antioxidantes e inducir dicho estrés oxidativo.

Raza y sus colaboradores realizaron un estudio del estrés oxidativo en otros órganos como el corazón, el riñón y el páncreas en ratas obesas Zucker con 30-34 semanas de edad. Concretamente en corazón se observó un aumento significativo en la producción de ROS, peroxidación lipídica, carbonilación oxidativa de proteínas y de la actividad CAT, GSH total y GR, mientras que no existían diferencias en la GPx, respecto a los animales control. También se identificaron alteraciones a nivel de la función respiratoria mitocondrial en ratas *fa/fa*, como una disminución significativa en la actividad de los complejos mitocondriales I y IV. Estos resultados indican un aumento del estrés oxidativo en cardiomiocitos de ratas obesas, así como disfunción mitocondrial, que junto al aumento en la concentración de GSH y GR sugiere un mecanismo defensivo compensatorio (Raza, John et al. 2012). Asimismo, también se ha encontrado un mayor estrés oxidativo en cardiomiocitos de ratas obesas a los 12 meses de edad, con un aumento significativo de la peroxidación lipídica y de los TBARS en comparación con las ratas lean (Vincent, Powers et al. 1999).

En cuanto al estrés oxidativo en el riñón y el páncreas en ratas obesas en comparación con las lean, se encontró que en ambos órganos, la producción de ROS, NO, la actividad del citocromo 2E1, la carbonilación de proteínas, así como la peroxidación lipídica estaban aumentadas respecto a las ratas lean. En cambio, los niveles de GSH reducido citosólico y mitocondrial estaban significativamente disminuidos. La actividad GPx citosólica y mitocondrial en riñón no mostró diferencias, mientras que en páncreas estaba significativamente aumentada. Por su parte, la GR citosólica y mitocondrial y la actividad del complejo IV y el contenido de ATP mitocondrial estaba significativamente disminuida en ambos órganos. Por tanto, en estos órganos se observa nuevamente un incremento en la expresión de marcadores de estrés oxidativo y una afectación en la función respiratoria mitocondrial (Raza, John et al. 2013). Todos estos estudios, así como los resultados obtenidos en el presente trabajo en bazo, timo e hígado, indican que las ratas obesas a la edad adulta presentan un aumento del estrés oxidativo, que puede generalizarse a otros órganos.

Como resumen general de este sub-apartado, se puede decir que a la edad adulta, las ratas Zucker muestran un mayor deterioro de la función inmunitaria y un mayor estado de oxidación que la cepa de ratas Wistar. Además, las ratas *fa/fa* presentan un mayor deterioro en algunos de los parámetros de inmunidad y mayor oxidación que las ratas lean, especialmente a nivel de los leucocitos del timo, y en el hígado.

5.1.1.2. Estudio de varias funciones inmunitarias, de estrés oxidativo y del perfil metabólico en ratas Zucker genéticamente obesas jóvenes y adultas.

Una vez estudiados los parámetros de función inmunitaria y estrés oxidativo a la edad adulta (6 meses) en ratas obesas, y observado el deterioro que experimentan los mismos, se propuso valorar en este segundo sub-objetivo qué ocurre con dichos parámetros a la edad juvenil (2 meses). Puesto que los resultados de los parámetros valorados a la edad de 6 meses ya se han comentado en el apartado anterior, este sub-objetivo se centra en analizar y comparar cómo están afectados dichos parámetros a la edad de 2 meses. También se discuten los resultados referentes al estudio del peso corporal y de los órganos, así como del perfil metabólico.

Estudio del peso corporal y de los órganos

Con respecto al **peso corporal obtenido en el momento del sacrificio**, ambas ratas Zucker lean y *fa/fa* presentan un peso significativamente superior a la edad de seis meses que a la de dos meses, hecho que corrobora la ganancia de peso corporal en el paso de la edad juvenil a la adulta. Por su parte, las ratas *fa/fa*, a la edad juvenil de 2 meses ya muestran un peso corporal significativamente superior a sus controles lean, por lo que se puede decir que a esta temprana edad ya estaba establecido el modelo de obesidad, y esta diferencia de peso también se sigue manteniendo a la edad adulta, como ya se comentó.

Los resultados obtenidos del **% de peso relativo** de los órganos respecto al peso corporal, muestran que en las ratas lean con el paso de dos a seis meses, el peso relativo disminuye en todos los órganos estudiados (bazo, timo, hígado, corazón y riñones),

excepto en la grasa epididimal y lumbar que aumenta significativamente, lo que indica que únicamente la grasa aumenta en peso en relación al aumento del peso corporal con la edad. De igual manera, en las ratas obesas solo la grasa epididimal y lumbar aumenta de peso significativamente respecto al peso corporal en el paso de dos a seis meses, por lo que el aumento del peso corporal se debe fundamentalmente al aumento en los depósitos de grasa.

A los dos meses, las ratas obesas tienen un mayor peso relativo del hígado y de la grasa en comparación con las ratas lean, por lo que a la edad juvenil existe ya un aumento marcado de la grasa corporal y se establece el hígado graso característico de este modelo animal de obesidad. Tanto es así, que dicho peso relativo del hígado a la edad juvenil en ratas obesas es significativamente mayor que en ratas lean a la edad adulta.

Valoración de las funciones inmunitarias en leucocitos de bazo y timo

La **actividad NK** de los leucocitos de bazo y timo de las ratas obesas a los dos meses, es significativamente menor que en ratas lean. A esta edad juvenil se observan diferencias en este parámetro que no se encuentran a la edad adulta, como ya se comentó. Estos resultados indicarían que a la edad de dos meses las ratas obesas muestran un deterioro prematuro en esta actividad frente a sus controles. Por otro lado, con el paso de los dos a los seis meses, se observa un aumento en esta actividad en ratas lean y *fa/fa*, como consecuencia de la evolución de este parámetro con la edad. Así, en un estudio realizado en rata Wistar macho con la edad, se observa como la actividad NK de leucocitos de bazo experimenta un aumento en el paso de los dos a los seis meses (De la Fuente, Baeza et al. 2004).

En la valoración de la **respuesta proliferativa**, en este estudio con animales jóvenes, se decidió utilizar una única concentración de mitógeno, ya que las muestras obtenidas también se usaron para otras valoraciones pertenecientes a un proyecto de otro grupo de investigación. Los mitógenos Con A y LPS se emplearon a la concentración de 1 µg/ml y la PHA a 25 µg/ml, que son las que se utilizan de forma rutinaria en nuestro laboratorio.

En cuanto a la proliferación basal (cpm), las ratas *fa/fa* a la edad de dos meses muestran una ligera tendencia, no significativa, al aumento respecto a sus controles. Con el paso de los dos a seis meses, ambas ratas Zucker muestran un aumento significativo en esta proliferación basal. Cuando se realiza la estimulación con los mitógenos, en **bazo** el % de linfoproliferación de las ratas obesas a los dos meses es menor que en ratas lean, hecho que se pone de manifiesto significativamente con la Con A. En vista de los resultados, parece que los linfocitos T (que son los que responden a Con A) se ven más afectados que los B en ratas obesas a los dos meses. Con el paso de los dos a los seis meses se observa una disminución de este parámetro en ambas ratas, significativo en el caso de la Con A y la PHA, y con LPS en ratas lean. En un trabajo previo sobre la evolución de este parámetro con la edad en ratas Wistar macho, se observó un aumento progresivo de los 2, 6, 12 y 14 meses y una drástica disminución a los 18 meses de edad (De la Fuente, Baeza et al. 2004), por lo que el deterioro que experimentan las ratas Zucker a la edad adulta es bastante prematuro en comparación con las Wistar. Este deterioro parece afectar tanto a las ratas *fa/fa* como a las lean, y esto podría explicar el que no se encuentren diferencias entre ambas a los seis meses en este % de proliferación.

En el **timo**, se aprecia un comportamiento similar al bazo. La proliferación en ratas obesas a la edad juvenil muestra un deterioro respecto a las ratas control, a pesar de que estas diferencias no llegan a ser significativas. A este nivel el deterioro de esta función en ratas obesas jóvenes es más notorio en bazo que en timo cuando se estimula con Con A. De nuevo, con el paso de los dos a los seis meses, en ambas ratas Zucker se aprecia un deterioro significativo de la proliferación, lo que explicaría, como se ha indicado antes para el bazo, que a los seis meses se igualan ambas ratas en este parámetro.

La valoración de la **liberación de citoquinas** se llevó a cabo en los sobrenadantes de cultivo de 48 horas de linfocitos de bazo, tanto sin estimular como estimulados con Con A y LPS a la concentración de 1 µg/ml. Los niveles de **IL-2** en ratas obesas a los dos meses, muestran una disminución respecto a las ratas lean en condiciones basales y con estimulación, siendo significativo en el caso del LPS. De acuerdo a esto, no se puede decir que el aumento en proliferación basal encontrado en

ratas obesas se deba a una mayor liberación de IL-2. Con el paso de dos a seis meses, se observa una disminución en los niveles de esta citoquina en ambas ratas en condiciones basales y de estimulación con LPS, siendo significativa para las ratas lean con LPS. Como con la Con A no se dan modificaciones, el descenso en la proliferación en bazo con la edad en presencia de este mitógeno, no se puede achacar a una disminución en los niveles de IL-2.

A la edad adulta, las ratas *fa/fa* están más deterioradas en la liberación de esta citoquina respecto a sus controles, hecho que es significativo basalmente y cuando se estimula con Con A. Estos resultados indican que en ratas obesas, en cuanto a la liberación de IL-2, los linfocitos B parecen estar más deteriorados a la edad juvenil, y los T a la edad adulta, respecto a las ratas lean. Por otra parte, la evolución en la liberación de IL-2 por linfocitos de bazo que muestran las ratas Wistar macho es creciente hasta la edad de 14 meses (De la Fuente, Baeza et al. 2004), por lo que se puede decir que las ratas Zucker presentan un deterioro prematuro en la liberación de esta citoquina.

En cuanto a la liberación de **IL-1 β** , a la edad juvenil las ratas obesas presentan una ligera tendencia, aunque no significativa, al aumento en esta citoquina proinflamatoria en todas las condiciones de estudio, respecto a sus controles lean. Es en el paso de los dos a los seis meses, donde se observa un aumento en los niveles de IL-1 β en ratas lean y *fa/fa* en todos los casos, siendo significativo en condiciones basales y con LPS. Este aumento también es mayor en ratas obesas que en lean aunque no se manifiesta de modo significativo. Estos resultados apuntan un indicio del estado inflamatorio en ratas obesas a la temprana edad de dos meses, haciéndose patente el carácter inflamatorio con el transcurso de la enfermedad a la edad adulta.

En lo que respecta al **TNF- α** , también se observa un aumento en la liberación de esta citoquina en ratas obesas respecto a ratas lean, a la edad de dos meses, que es significativo para el LPS. Al pasar de los dos a los seis meses, existe un aumento significativo en la liberación de TNF- α en ambas ratas Zucker, que es significativamente mayor en ratas obesas respecto a lean. Dado el carácter claramente proinflamatorio de esta citoquina, estos resultados podrían indicar que a la edad adulta

las ratas obesas muestran ya un mayor estado inflamatorio tanto en condiciones basales, como de estimulación con mitógenos.

Con los resultados obtenidos de la liberación de esta citoquina y de la IL-1 β se corrobora la incipiente capacidad inflamatoria que presentan las ratas obesas a la edad de dos meses, que se establece de forma patente en el transcurso del establecimiento de la obesidad, a la edad adulta.

Los niveles de **IL-10** en ratas obesas a la edad juvenil, muestran un aumento respecto a sus controles lean, que es significativo en el caso de la estimulación con LPS. Con el paso a la edad adulta, en condiciones basales ambas ratas Zucker presentan un aumento en la liberación de esta citoquina que es significativamente mayor en ratas obesas que en lean. En cambio, al estimular con Con A y LPS, las ratas lean mantienen el incremento en los niveles de esta citoquina a la edad adulta, mientras que se observa una disminución significativa en ratas obesas en el caso del LPS, y no hay modificación en la estimulación con Con A. A la vista de los resultados, parece que las ratas obesas a nivel basal son capaces de liberar una mayor cantidad de IL-10 como mecanismo anti-inflamatorio compensatorio, sin embargo dicho mecanismo falla en respuesta a la estimulación.

A pesar de que no existen referencias en la literatura científica acerca de estudios sobre función inmunitaria en ratas Zucker a la edad de dos meses, el trabajo realizado por Ruth y colaboradores comentado anteriormente, refleja los cambios en la liberación de citoquinas en ratas Zucker obesas a la edad de 14 semanas (Ruth, Taylor et al. 2008). En dicho trabajo se ha descrito una disminución significativa en la liberación de IL-2 por los linfocitos esplénicos de ratas Zucker *fa/fa* cuando se estimulan con Con A (2,5 mg/l) en cultivos de 48 horas, respecto a las ratas lean. También encontraron un aumento significativo en la liberación de IL-1 β por los esplenocitos cuando se estimulaban con LPS (0,1 g/l), y un aumento aunque no significativo cuando la estimulación se realizaba con Con A (2,5 mg/l). Respecto al TNF- α , encontraron un aumento en su liberación al estimular con Con A (2,5 mg/l), y un aumento significativo al estimular con LPS (0,1 g/l). Por su parte, la liberación de IL-10 por los esplenocitos

estimulados con Con A (2,5 mg/l) y LPS (0,1 g/l), no mostró diferencias respecto a las ratas lean (Ruth, Taylor et al. 2008). Estos resultados se reproducen, en parte, en los obtenidos en el presente trabajo con ratas Zucker obesas a los dos meses de edad.

Por otra parte, en un modelo de obesidad en ratón inducido por dieta rica en grasa, con 14 semanas de edad, también se encontró una mayor liberación de IL-4 e IFN- γ y una menor liberación de IL-2 por linfocitos esplénicos en cultivo de 24 horas, estimulados por PHA, y una tendencia al aumento en la liberación de TNF- α en cultivos estimulados con LPS, respecto a los ratones no obesos (Mito, Hosoda et al. 2000).

A la vista de todos estos estudios y los resultados obtenidos en el presente trabajo, a la temprana edad de dos meses, las ratas obesas muestran un desbalance en el perfil de liberación de citoquinas pro y anti-inflamatorias.

Finalmente, en ratas Zucker *fa/fa*, no solamente se han descrito alteraciones funcionales en las células inmunitarias. Tanaka y sus colaboradores encontraron que las ratas obesas presentan un deterioro cuantitativo progresivo de células T CD5⁺CD4⁺ helper y CD5⁺CD8⁺ supresoras en sangre periférica después de las 8 semanas de edad, así como en bazo y timo después de las 11 semanas, en comparación con sus controles lean (Tanaka, Isoda et al. 1998). Asimismo, en un modelo de obesidad genética y diabetes en rata Wistar también se observó una linfopenia progresiva de células T citotóxicas y supresoras después de las 22 semanas de edad (Tanaka, Isoda et al. 2000). Este bajo número de células T en ratas *fa/fa* podría estar contribuyendo a la menor producción de IL-2 basalmente y en respuesta a mitógenos, como ha sido encontrado en el presente estudio. A diferencia de Tanaka, Ruth y sus colaboradores no encontraron diferencias en la proporción de células T citotóxicas en ratas obesas respecto a sus controles (Ruth, Taylor et al. 2008). A pesar de ello, las ratas obesas presentaban un menor porcentaje de esplenocitos CD8⁺ que expresaban el receptor de la IL-2 (Ruth, Taylor et al. 2008), lo que sugeriría que los linfocitos T citotóxicos de las ratas obesas tendrían una menor capacidad de proliferación.

Con los resultados obtenidos en el presente trabajo y los hallazgos encontrados en la literatura, se puede decir que el establecimiento de la obesidad a la edad juvenil y su progresión hasta la edad adulta, provoca una disminución de células T y un deterioro

de la función inmunitaria. Los mecanismos responsables que subyacen a las alteraciones inmunitarias en la obesidad no están completamente elucidados. A pesar de que en el caso de la proliferación se han expuesto anteriormente algunas hipótesis, la opción más generalizada que se ha sugerido es que el deterioro en la función inmunitaria podría estar estrechamente relacionado con la severa resistencia a la leptina, característica de este modelo animal, debido a que estas ratas obesas expresan un receptor de leptina no funcional.

Como es sabido, el receptor de la leptina se expresa en diferentes tipos de células inmunitarias (Gainsford, Willson et al. 1996) (Matarese 2000) y posee funciones moduladoras en la inmunidad innata y adaptativa (Bernotiene, Palmer et al. 2006). La leptina está implicada en la activación, diferenciación, proliferación, así como en la función citotóxica de las células NK (Tian, Sun et al. 2002), y también tiene un papel regulador en la función de monocitos y macrófagos, activando la fagocitosis (Matarese, Moschos et al. 2005). Además, la leptina puede afectar a la proliferación de células T y la secreción de IL-2 por estas células (Lord, Matarese et al. 1998) (Loffreda, Yang et al. 1998) (Matarese, Procaccini et al. 2010). Por tanto, las ratas Zucker *fa/fa* al expresar el receptor truncado para la leptina, carecen de esos efectos moduladores de la respuesta inmunitaria, de ahí que en este modelo animal a la temprana edad de dos meses ya quedan patentes alteraciones a este nivel. La leptina, a su vez, estimula la ruta de la proteína kinasa C, en células mononucleares de sangre periférica (Dixit, Mielenz et al. 2003), encontrándose alteraciones en esta ruta en esplenocitos estimulados en cultivo con PMA (Ruth, Taylor et al. 2008) y en hepatocitos de ratas Zucker *fa/fa* (García-Sáinz, Alcántara-Hernández et al. 1992). Por este motivo, se ha apuntado que las alteraciones en la función de las células T observadas en ratas Zucker *fa/fa* podrían estar debidas también al deterioro en la ruta de la proteína kinasa C, a causa de la resistencia a la leptina (Ruth, Taylor et al. 2008).

Aunque la leptina estimula la producción de citoquinas proinflamatorias (Loffreda, Yang et al. 1998), y a pesar de que la resistencia a la leptina no se descarta, la respuesta inflamatoria observada en linfocitos de bazo a través de la liberación de citoquinas en los resultados del presente estudio y en el realizado por Ruth y sus colaboradores (Ruth, Taylor et al. 2008), sugiere que otros mecanismos adicionales

pueden estar participando en los mecanismos inflamatorios y, también en el deterioro funcional de las células inmunitarias. Por tanto, futuras investigaciones son necesarias para determinar cuáles son los mecanismos biológicos implicados en la disfunción inmunitaria presente en el estado de obesidad.

Valoración de parámetros de estrés oxidativo

Dado que la valoración de la actividad XO a la edad juvenil no fue posible, al no disponerse de la muestra necesaria, por tener que ser utilizada en otras valoraciones correspondientes a un proyecto diferente de otro grupo de investigación, en este apartado se discuten solamente resultados correspondientes a parámetros de defensas antioxidantes.

Con respecto al **bazo**, los datos indican que todos los parámetros valorados (GSH total, TAC, actividad GPx y GR) no presentan diferencias en ratas obesas a los dos meses respecto a las ratas lean. Con el paso a la edad adulta, se observa un deterioro significativo en todos los parámetros en ambas ratas Zucker. Por otra parte, se ha encontrado que las ratas *fa/fa* a los dos meses, muestran niveles de GSH, TAC y actividad GPx significativamente mayores que las lean adultas, lo que puede estar indicando un mecanismo antioxidante compensatorio prematuro. Los resultados también parecen indicar que los leucocitos de bazo están más oxidados a la edad adulta, y que las ratas lean a esta edad tienden a igualarse a las ratas obesas a nivel de oxidación en este órgano.

En el **timo**, al igual que en bazo, no se encuentran diferencias en los niveles de GSH total ni en la actividad GR en ratas obesas jóvenes respecto a lean. En cambio, con el paso de los dos a los seis meses, existe una disminución significativa en ambos parámetros y en ambas ratas, que en este órgano es significativamente mayor en ratas obesas respecto a lean. Estos datos indican el déficit en antioxidantes que presentan ambas ratas Zucker a la edad adulta en este órgano, que se hace más manifiesto en ratas obesas. De nuevo, al igual que en bazo, los niveles de GSH total y de la actividad GR son significativamente mayores en ratas obesas jóvenes que en lean adultas, lo que podría volver a apuntar un intento prematuro de compensación con activación de defensas antioxidantes.

Los parámetros valorados en **hígado**, muestran que las ratas obesas a la edad juvenil presentan una TAC significativamente mayor y una actividad GR significativamente menor que las ratas lean. Con el paso a la edad adulta, las ratas lean mostraron una disminución en la actividad GPx no significativa, que sí lo es en la GR, mientras que la TAC no se modifica. En ratas obesas existe una disminución significativa en ambas actividades enzimáticas a la edad adulta, que es significativamente mayor que en ratas lean. Por su parte, la TAC a los seis meses no se modifica, pero continua siendo mayor que en lean. A este respecto, las ratas obesas a la edad adulta, como ya se ha comentado, muestran niveles elevados en hígado de la actividad XO. Dicha enzima podría estar contribuyendo a una elevada síntesis de ácido úrico, lo que llevaría a la producción de grandes cantidades de peróxido de hidrógeno y anión superóxido. Este ácido úrico podría representar, como antioxidante, la mayor parte del valor detectado en la TAC hepática, dado el método utilizado de valoración de la TAC. De hecho, la actividad de esta enzima XO se ha visto elevada en numerosos procesos patológicos, como las enfermedades cardiovasculares (Granger, Stokes et al. 2001) (Tamariz, Hernandez et al. 2014) (González, Valls et al. 2014), y se ha propuesto como la principal fuente de ROS en la diabetes (Butler, Morris et al. 2000). Por tanto, los mayores niveles de TAC, que podrían estar representados fundamentalmente por el ácido úrico, estarían indicando una situación de mayor estrés oxidativo, dado que su producción va acompañada por la generación de grandes cantidades de ROS a través de la XO. De esta manera, los elevados niveles de TAC podrían estar indicando la existencia de un proceso compensatorio ante el elevado estrés oxidativo hepático. A pesar de que a los dos meses no se ha valorado la actividad XO, los niveles de TAC que también están elevados a esta edad en ratas obesas respecto a lean, podrían ser indicativos de una mayor actividad XO. Los altos niveles de TAC que también están elevados a los dos meses, podrían estar indicando la generación de un elevado estrés oxidativo a esta temprana edad.

Por los datos obtenidos se podría sugerir que a los dos meses, las ratas obesas tratan de compensar el estrés oxidativo en el hígado graso con una elevación en la TAC, pero a la edad adulta ese mecanismo compensatorio falla. Los resultados del GSH total en hígado no se muestran en este apartado, ya que se valoraron en el estudio

metabonómico, que se expone a continuación, donde se discutirán. Esta menor actividad GR en ratas obesas a los dos meses, puede estar indicando que la elevada concentración de GSH a esta edad (estudio de metabolitos) se sintetice mediante otras vías, y no intervenga de manera relevante el mecanismo de reciclado del glutathione.

Los estudios de parámetros de estrés oxidativo en modelos murinos de obesidad a la edad juvenil son muy limitados. Concretamente, se puede hacer referencia a dos estudios realizados en hígado de ratas Zucker *fa/fa* con 15 semanas de edad, que se han comentado con anterioridad. Así, en una de las investigaciones, se comprobó que el contenido total de glutathione, la actividad CAT y el tocoferol estaban significativamente disminuidos respecto a las ratas lean. Sin embargo, no se encontraron diferencias en los niveles de ácido ascórbico y tampoco en las actividades de la SOD y la selenio-GPx (Soltys, Dikdan et al. 2001). En el estudio realizado por Blakely y sus colaboradores, se observó que las concentraciones de malondialdehído (MDA) estaban significativamente aumentadas respecto a las ratas lean. Además, la concentración de GSH total se encontraba disminuida en ratas obesas, mientras que la actividad de la enzima GPx y SOD se incrementaban respecto a las ratas control. Por otro lado, la concentración del antioxidante α -tocoferol era algo menor en ratas obesas, pero no así la de ácido ascórbico (Blakely, Herbert et al. 2003). Estos resultados no apoyan los obtenidos en nuestro estudio a la edad de dos meses, donde el contenido de GSH total en ratas obesas está aumentado, por lo que el paso de los dos meses a los casi cuatro meses de edad, podría ser crítico en estos animales en cuanto al consumo de GSH.

Evidencias de la asociación entre el estrés oxidativo, la obesidad y el síndrome metabólico han sido ampliamente documentadas en humanos (Vincent and Taylor 2006) (Valdecantos, Pérez-Matute et al. 2009). En un estudio realizado en niños entre 8-11 años con obesidad se observó que mostraban elevados niveles de daño en el ADN cromosómico y una disminución en la TAC plasmática, lo que podría considerarse como un alto factor de riesgo, vinculado al desarrollo de comorbilidades asociadas a la obesidad (Rentería, Arenas Berumen et al. 2015). Erdeve y sus colaboradores en un trabajo con niños obesos comprobaron que la respuesta antioxidante de la SOD estaba aumentada en eritrocitos (Erdeve, Siklar et al. 2004). En sujetos obesos adultos y obesos

diabéticos se identificaron bajos niveles de GSH reducido y de la actividad SOD de los eritrocitos y altos de MDA plasmáticos respecto a individuos sanos (Mohora, Virgolici et al. 2006), los cuales también han sido descritos por otros autores (Skrha, Sindelka et al. 1999) (Olusi 2002). Por su parte, Ozata y colaboradores identificaron que individuos heterocigotos y homocigotos para la mutación del gen que codifica para la leptina mostraban que la actividad SOD y GPx de los eritrocitos y la GPx plasmática estaba disminuida respecto a sujetos sanos. El deterioro en actividad de las enzimas antioxidantes, parece sugerir que la leptina podría estar implicada en la modulación de la defensa antioxidante (Ozata, Uckaya et al. 2000). En un trabajo con pacientes hombres y mujeres con obesidad o sobrepeso se identificó que las concentraciones de la TAC en suero estaban disminuidas respecto a los controles con normopeso, lo que demostraba una relación inversa entre la grasa corporal y la TAC (Chrysoshoou, Panagiotakos et al. 2007). Asimismo, Lim y sus colaboradores confirmaron menores niveles de CAT en plasma en sujetos obesos, lo que es indicativo de una comprometida defensa antioxidante sistémica (Lim, Fan et al. 2012). Por otra parte, también se han encontrado niveles aumentados del marcador de peroxidación lipídica (8-isoprostaglandina F2- α) en sujetos obesos o con sobrepeso, y en pacientes con síndrome metabólico dándose una correlación positiva entre este compuesto y el IMC y la grasa corporal (Keaney, Larson et al. 2003) (Urakawa, Katsuki et al. 2003) (Couillard, Ruel et al. 2005) (Suematsu, Katsuki et al. 2005) (Fujita 2006). Otro de los marcadores oxidativos que se encuentra elevado en plasma en individuos obesos son los TBARS (Dandona, Mohanty et al. 2001) (Ozata, Mergen et al. 2002) (Konukoğlu, Serin et al. 2003) (Furukawa, Fujita et al. 2004).

En sujetos con síndrome metabólico también se han evaluado parámetros de estrés oxidativo. Así, se ha encontrado una elevada concentración de PCR sérica en hombres y mujeres adultos (Rutter, Meigs et al. 2004), así como en sujetos adultos con hipomagnesemia severa y síndrome metabólico, los cuales también presentaban elevados niveles séricos de TNF- α (Guerrero-Romero, Bermudez-Peña et al. 2011). Otros autores también han identificado un desbalance redox sistémico con mayores niveles de peroxidación lipídica y de peróxido de hidrógeno en plasma de individuos con síndrome metabólico en comparación con los controles (da Fonseca, Nunes-Souza

et al. 2014). En un estudio realizado por Venturini y sus colaboradores comprobaron que sujetos con sobrepeso y síndrome metabólico presentaban mayores concentraciones de hidróperóxido y peróxido de hidrógeno plasmáticos y elevados productos de oxidación proteica, así como reducida capacidad antioxidante, por lo que se caracterizaban por un desbalance redox en sangre periférica (Venturini, Simão et al. 2012). Por su parte, Skalicky y sus colaboradores en una investigación con individuos obesos adultos sin síndrome metabólico observaron un elevado estrés oxidativo sistémico, con altos niveles de radicales libres, MDA, y del cociente glutathion oxidado/reducido, así como inflamación sistémica caracterizada por altos niveles de PCR en plasma, respecto a sujetos sanos. Sin embargo, este aumento del estrés oxidativo estaba aún más potenciado en pacientes obesos que sí presentaban síndrome metabólico, respecto a los que no lo padecían. Este desequilibrio en el estado oxidativo y la inflamación sistémica contribuirían a las complicaciones diabéticas y ateroscleróticas en estos individuos (Skalicky, Muzakova et al. 2008). En un estudio reciente similar al anterior, se identificaron elevados niveles de estrés oxidativo en pacientes adultos obesos con y sin síndrome metabólico, evidenciado por los bajos niveles de glutathion reducido en eritrocitos y la menor actividad glutathion-S-transferasa en estas células, así como por la elevada cantidad de ROS. La actividad GPx estaba incrementada en sujetos con síndrome metabólico respecto a individuos sanos y sin síndrome metabólico, mientras que la actividad CAT estaba aumentada en individuos sanos y con síndrome metabólico respecto a los que no lo padecían, en eritrocitos. Por otro lado, los niveles de IL-6 y TNF- α en plasma resultaron estar aumentados en ambos pacientes obesos respecto a sujetos sanos, con una marcada elevación en los que padecían síndrome metabólico. La IL-10 estaba aumentada en obesos con síndrome metabólico respecto a los que no lo padecían y a sujetos sanos (Lubrano, Valacchi et al. 2015). Otro hallazgo en pacientes con síndrome metabólico es que presentan un mayor daño en el ADN de los linfocitos, mayores niveles de MDA, y una actividad SOD y GPx deterioradas en comparación con los controles (Karaman, Aydın et al. 2015), y que el incremento de los productos de oxidación proteica están más relacionados con el este síndrome que los biomarcadores de peroxidación lipídica (Venturini, Simão et al. 2015).

Tomando como referencia los resultados obtenidos en el presente trabajo y los estudios comentados, se podría concluir que en las etapas iniciales de la obesidad existe una elevación de enzimas y compuestos antioxidantes para contrarrestar el estrés oxidativo prematuro que se esté generando, y que el asentamiento de esta patología con el paso a la edad adulta agota la fuente de tales compuestos antioxidantes.

Cambios con la edad en los parámetros funcionales y de estrés oxidativo

Los parámetros de función inmunitaria innata y adaptativa valorados en estos dos sub-objetivos, presentan variaciones a lo largo del envejecimiento. Así, los fagocitos muestran una menor fagocitosis de los agentes extraños, tanto los neutrófilos circulantes, como los monocitos y macrófagos tisulares, de diversas localizaciones como el bazo, el timo y los ganglios axilares, así como del peritoneo de diferentes cepas de rata y ratón (De La Fuente 1985) (Butcher, Chahal et al. 2001) (De La Fuente, Miquel et al. 2002) (De la Fuente, Hernanz et al. 2004) (De la Fuente, Baeza et al. 2004) (Alonso-Fernández, Puerto et al. 2008) (Arranz, Fernández et al. 2008) (Arranz, Caamaño et al. 2010) (Arranz, De Castro NM et al. 2010) (Simell, Vuorela et al. 2011) (Sharma, Kapila et al. 2014). Los cambios asociados a la edad en las células “Natural Killer” han sido los más documentados, y se considera que sus alteraciones funcionales pueden contribuir de manera determinante a la mayor incidencia de enfermedades infecciosas y neoplásicas al envejecer. Además, tales alteraciones parecen estar asociadas a una mayor mortalidad en individuos de edad avanzada, tanto humanos como roedores (Bruunsgaard, Pedersen et al. 2001) (Ogata, An et al. 2001) (Mocchegiani, Muzzioli et al. 2003). La característica funcional principal de las células NK es su actividad citotóxica, dirigida contra las células infectadas por virus y cancerígenas, función que muestra alteraciones al avanzar la edad. La mayoría de los trabajos han demostrado una disminución de dicha actividad citotóxica en la vejez, tanto en células NK procedentes de sangre periférica humana de hombres y mujeres (Mariani, Sgobbi et al. 1996) (Di Lorenzo, Balistreri et al. 1999) (Mocchegiani and Malavolta 2004) (Arranz, Fernández et al. 2008) (De la Fuente, Hernanz et al. 2008), como del bazo, timo, ganglios axilares y peritoneo en roedores (Ferrández, Correa et al. 1999) (De La Fuente, Miquel et al. 2002) (De la Fuente, Baeza et al. 2004) (Guayerbas, Puerto et al.

2005 (a)). Cabe destacar que una elevada actividad citotóxica se ha correlacionado con un estado de salud óptimo, tanto en jóvenes como en personas de avanzada edad (Mysliwski, Mysliwska et al. 1993); y al contrario, una actividad citotóxica baja se ha propuesto como predictor de morbilidad (Ginaldi, De Martinis et al. 1999).

Por otro lado, también está ampliamente demostrado, mediante el uso de mitógenos *in vitro*, que la respuesta proliferativa de los linfocitos se encuentra disminuida con la edad. Este hecho se ha comprobado en linfocitos procedentes de sangre periférica humana que se han estimulado en presencia de Con A y PHA, mitógenos específicos de linfocitos T (Inkeles, Innes et al. 1977) (Gillis, Kozak et al. 1981) (Song, Kim et al. 1993) (Arranz, Fernández et al. 2008) (De la Fuente, Hernanz et al. 2008). También se ha observado esta disminución con la edad en los linfocitos extraídos de la cavidad peritoneal y de diversos órganos inmunocompetentes de roedores y que responden a Con A y LPS (el cual estimula a monocitos/macrófagos, neutrófilos y linfocitos B) (Medina, Del Rio et al. 2000) (De la Fuente, Baeza et al. 2004) (Simioni, Costa et al. 2007) (Arranz, Caamaño et al. 2010) (Arranz, De Castro NM et al. 2010). Además, otros autores han relacionado un patrón de respuesta inmunitaria caracterizado por una baja respuesta proliferativa de linfocitos T, una producción disminuida de IL-2 y un alto porcentaje y número de linfocitos CD8+, como marcadores predictivos de mortalidad (Pawelec, Adibzadeh et al. 1995).

Todas las actividades funcionales de la inmunidad innata y adaptativa anteriormente descritas, requieren la participación de las citoquinas, proteínas que desempeñan un papel fundamental regulando la función de las células que las generan y de otros tipos celulares. Todos los componentes de la inmunidad innata y adquirida producen citoquinas, siendo responsables de la comunicación intercelular, y moduladoras de la función efectora durante la respuesta inmunitaria, por lo que juegan un papel crucial en la regulación del tipo y extensión de dicha respuesta. Así, a través de la activación de receptores específicos de membrana, inducen las funciones de proliferación y de diferenciación celular, la quimiotaxis, el crecimiento y la modulación de la secreción de inmunoglobulinas (Ginaldi, De Martinis et al. 1999) (McNerlan, Rea et al. 2002). Con el envejecimiento, se ha descrito una alteración en el equilibrio de la

red de citoquinas reguladoras producidas por los leucocitos durante la respuesta inmunitaria, tanto de aquellas liberadas durante la respuesta inmunitaria innata (Gon, Hashimoto et al. 1996) (Krabbe, Bruunsgaard et al. 2001), como las secretadas por los linfocitos en la respuesta inmunitaria adaptativa (Lio, D'Anna et al. 1998) (McNerlan, Rea et al. 2002) (Linton and Dorshkind 2004). Como resultado del microambiente de citoquinas alterado, debido a los cambios en el patrón de liberación de las mismas durante la respuesta inflamatoria innata, el *crosstalk* o diálogo cruzado entre la inmunidad innata y adaptativa *in vivo* puede resultar modificado (van den Biggelaar, Huizinga et al. 2004). Las células T CD4⁺ se clasifican como T helper (Th)1 y Th2 en base al perfil de citoquinas producido, estando las Th1 relacionadas con la respuesta celular (caracterizándose por la producción de IL-2, IL-12, TNF- α e IFN- γ), y las Th2 con la humoral (las cuales liberan IL-10, IL-4, IL-6 e IL-13) (Mosmann and Sad 1996). Muchos autores proponen que a lo largo del proceso de envejecimiento, se produce un cambio en el sistema Th1/Th2, pasando de una respuesta predominante Th1 a una Th2, lo que se acompaña de una alteración en el perfil de citoquinas, como mecanismo característico de la disfunción que tiene lugar con la edad en el sistema inmunitario (Shearer 1997) (Alberti, Cevenini et al. 2006). Con el envejecimiento, el cambio más ampliamente aceptado en el patrón de citoquinas es el aumento progresivo de las proinflamatorias, lo que se atribuye al fenómeno de “inflamm-aging”, que aunque de bajo grado, es de carácter crónico (Franceschi, Bonafè et al. 2000 (b)). Así, la desregulación del perfil de citoquinas hacia un estado pro-inflamatorio, característico del envejecimiento, contribuye a procesos patológicos asociados a la edad (Bruunsgaard 2002). Además, en estudios longitudinales se ha descrito que muchos de los mediadores proinflamatorios son predictores de mortalidad por cualquier causa (Krabbe, Pedersen et al. 2004). Por lo tanto, los efectos beneficiosos de la inflamación para neutralizar los agentes nocivos para el organismo en edades tempranas de la vida, se podrían volver perjudiciales al envejecer (Franceschi, Bonafè et al. 2000 (b)).

La determinación de los niveles circulantes de citoquinas proinflamatorias con el envejecimiento, ha mostrado valores aumentados de toda una serie de citoquinas como IL-1 β (Álvarez-Rodríguez, López-Hoyos et al. 2012), mediador clave en la respuesta inflamatoria aguda, responsable de la fiebre y la producción de proteínas de fase aguda;

IL-6 (Cohen, Pieper et al. 1997) (Mysliwska, Bryl et al. 1998) (Giuliani, Sansoni et al. 2001) (Ferrucci, Corsi et al. 2005) (Himmerich, Fulda et al. 2006) (Álvarez-Rodríguez, López-Hoyos et al. 2012), citoquina multifuncional con actividad tanto pro- como anti-inflamatoria; IL-8 (Mariani, Cattini et al. 2006), potente factor quimotáctico de neutrófilos; y TNF- α (Fagiolo, Cossarizza et al. 1993) (Haack, Hinze-Selch et al. 1999) (Himmerich, Fulda et al. 2006) (Kaszubowska, Kaczor et al. 2011) (Álvarez-Rodríguez, López-Hoyos et al. 2012), citoquina proinflamatoria por excelencia, mediador temprano de la respuesta de fase aguda e implicado en el reclutamiento de leucocitos durante las reacciones inflamatorias (Bruunsgaard, Skinhøj et al. 2000). Por otro lado, también se ha descrito un aumento en plasma o suero de citoquinas anti-inflamatorias como la IL-10 (Álvarez-Rodríguez, López-Hoyos et al. 2012), inhibidor de la síntesis de citoquinas proinflamatorias, como mecanismo compensatorio. Por otra parte, la IL-2, factor de crecimiento de linfocitos T, clave en la inducción de la respuesta proliferativa de los linfocitos, disminuye con el envejecimiento en el plasma (Mysliwska, Bryl et al. 1998). Un hecho importante a tener en cuenta es que las citoquinas que se valoran en plasma no proceden únicamente de las células inmunitarias, pueden haber sido sintetizadas en diversos órganos como el tejido adiposo o el músculo, entre otros (Maté 2015).

En cuanto a la liberación de citoquinas en roedores con el envejecimiento, como ya se comentó, la IL-2 también muestra una disminución en su liberación en leucocitos de bazo y ganglios axilares estimulados con Con A en rata Wistar (De la Fuente, Baeza et al. 2004). En leucocitos peritoneales de ratón, la liberación de IL-2 en respuesta a Con A disminuye (Puerto, Guayerbas et al. 2005) (Arranz, De Castro NM et al. 2010) (Arranz, Caamaño et al. 2010), mientras que la del TNF- α en respuesta a LPS aumenta (Puerto, Guayerbas et al. 2005), o disminuye (Arranz, De Castro NM et al. 2010) (Arranz, Lord et al. 2010), en cambio dicha liberación en condiciones basales se encuentra aumentada (Arranz, Lord et al. 2010). Por su parte, los niveles de IL-1 β de leucocitos peritoneales aumenta en condiciones basales y de estimulación con LPS, mientras que los de IL-10 disminuyen con el envejecimiento (Arranz, Lord et al. 2010), lo que confirma el estado de inflamación crónica de bajo grado con el envejecimiento cronológico en roedores. Asimismo, se ha descrito un deterioro de las funciones inmunitarias ya comentadas, analizadas en este objetivo, en leucocitos peritoneales de modelos murinos de envejecimiento prematuro (Alvarado, Álvarez et al. 2006)

(Viveros, Arranz et al. 2007) (De la Fuente 2008 (a)) (De la Fuente 2008 (b)) y patológico, como los ratones triple transgénicos para la enfermedad de Alzheimer (Maté, Cruces et al. 2015).

A largo de las últimas décadas, se ha propuesto al estrés oxidativo como principal causa subyacente a los procesos relacionados con el envejecimiento, donde se incluiría la inmunosenescencia (De la Fuente 2014 (a)), así como de la patogénesis de muchas enfermedades como la obesidad (Savini, Catani et al. 2013) (Marseglia, Manti et al. 2015), y otras patologías relacionadas con la edad como la hipertensión, la aterosclerosis o las enfermedades neurodegenerativas (Ames, Shigenaga et al. 1993) (Mecocci, Polidori et al. 2000) (Daynes, Enioutina et al. 2003) (De la Fuente, Hernanz et al. 2005) (De la Fuente and Miquel 2009) (Salminen and Kaarniranta 2010). Así, como propone la teoría del envejecimiento de los radicales libres, ya enunciada en 1956, las acciones deletéreas de los radicales libres serían las responsables del deterioro funcional asociado al envejecimiento (Harman 1956). Las células inmunitarias, y principalmente las que forman parte de la inmunidad innata, constituyen una de las principales fuentes de radicales libres, ya que en ellas se generan elevadas cantidades de ROS, que actúan como componentes microbicidas altamente reactivos, con el fin de llevar a cabo la defensa del hospedador frente a organismos invasores, en el proceso conocido como estallido respiratorio (Morel, Doussiere et al. 1991). Por este motivo, el balance oxidante/antioxidante es de especial importancia en estas células, ya que es un factor determinante para su función (Meydani, Wu et al. 1995).

Con el envejecimiento se ha observado, de manera generalizada, un aumento en la formación de compuestos oxidantes y un deterioro en la capacidad de neutralizar el exceso de estos compuestos debido a la disminución de los mecanismos de defensa antioxidante de las células inmunitarias, lo que compromete la funcionalidad de las mismas (De la Fuente and Miquel 2009). Así, si bien es necesaria una cantidad apropiada de oxidantes para muchas funciones celulares, incluidas las inmunitarias, también lo es una cantidad adecuada de compuestos antioxidantes para el mantenimiento de dicha respuesta inmunitaria. En este sentido, el glutatión (GSH), uno de los sistemas de defensa endógeno más importante frente al estrés oxidativo, es un antioxidante tiólico que en su forma reducida está implicado en la síntesis de ADN y

proteínas, activación enzimática, regeneración de otros antioxidantes, transporte de aminoácidos, señalización celular, mantenimiento de los grupos-SH proteicos de la membrana en su forma reducida, y como se comentó anteriormente, en la protección celular mediante la neutralización de radicales libres (Meydani, Wu et al. 1995) (Valko, Leibfritz et al. 2007) (Pandey and Rizvi 2010). Con el envejecimiento, sufre una disminución en sus niveles, tanto en su forma reducida como total, en leucocitos peritoneales de ratón, leucocitos humanos de diversas localizaciones, y también en plasma y eritrocitos humanos (Samiec, Drews-Botsch et al. 1998) (Gil, Siems et al. 2006) (Arranz, Fernández et al. 2008) (Alonso-Fernández, Puerto et al. 2008) (Arranz, Caamaño et al. 2010) (Arranz, De Castro NM et al. 2010). En cuanto a las actividades enzimáticas GPx y GR implicadas en el ciclo del GSH, nuestro grupo ha comprobado que sufren un declive con el envejecimiento en leucocitos de ratones procedentes del peritoneo, bazo y timo, así como en el hígado. También sucede en las actividades SOD y CAT (De la Fuente, Hernanz et al. 2004) (De la Fuente 2008 (a)) (De la Fuente 2008 (b)) (De la Fuente and Miquel 2009) (Arranz, De Castro NM et al. 2010) (Arranz, Caamaño et al. 2010) (Vida, González et al. 2014).

En cuanto a las fuentes de ROS, hay que destacar la enzima oxidante, xantina oxidasa (XO), mencionada anteriormente, que es responsable del catabolismo de las purinas y que está implicada en enfermedades asociadas a la inflamación y el estrés oxidativo (Harrison 2004). La actividad de esta enzima, la cual es una de las principales fuentes citoplasmáticas de ROS, aumenta con el envejecimiento en distintas localizaciones como el plasma, timo, hígado, riñón, corteza cerebral y leucocitos peritoneales de roedores (Arranz, Caamaño et al. 2010) (Arranz, De Castro NM et al. 2010) (Vida, Corpas et al. 2011) (Vida, Rodríguez-Terés S et al. 2011) (Vida, González et al. 2014), así como en el plasma humano (Aranda, Domenech et al. 2007).

La capacidad antioxidante total (TAC), que considera la acción acumulativa de todos los antioxidantes presentes en el plasma y homogenados de tejidos, provee un parámetro integrado del estado oxidativo de un organismo (Ghiselli, Serafini et al. 2000), y es una valoración comúnmente empleada. Concretamente el plasma posee fuertes propiedades antioxidantes debido a la presencia de gran cantidad de compuestos

con capacidad reductora, entre los que destacan el ascorbato o vitamina C, el urato y el tocoferol o vitamina E (Wayner, Burton et al. 1985). A pesar de que no se ha valorado la TAC plasmática en este estudio, hay que decir que con el envejecimiento se ha descrito una disminución de la TAC en el plasma humano (Rizvi, Jha et al. 2006), aunque también se han encontrado resultados opuestos (Aejmelaeus, Holm et al. 1997) (Maté 2015). Cabe destacar el elevado número de resultados contradictorios que se han encontrado en referencia a los niveles de TAC, lo cual es debido, fundamentalmente, a la existencia de gran cantidad de protocolos empleados para su cuantificación, que además no muestran correlaciones satisfactorias entre sí, y que no valoran los mismos compuestos antioxidantes (Cao and Prior 1998) (Yeum, Russell et al. 2004) (Bartosz 2010), por lo que son muchos autores los que califican su cuantificación como problemática (Ghiselli, Serafini et al. 2000).

También se ha encontrado un aumento del estrés oxidativo en bazo, timo, hígado y leucocitos peritoneales de modelos murinos de envejecimiento prematuro (Alvarado, Álvarez et al. 2006) (Viveros, Arranz et al. 2007) (De la Fuente 2008 (a)) (De la Fuente 2008 (b)) (De la Fuente and Miquel 2009) (Vida, González et al. 2014) y en leucocitos peritoneales de ratones triple transgénicos para la enfermedad de Alzheimer (Maté, Cruces et al. 2015), cuya patología es típicamente inflamatoria (Wyss-Coray and Rogers 2012) (Heppner, Ransohoff et al. 2015).

Todos los parámetros de función inmunitaria y estado redox analizados en el presente trabajo, han sido establecidos como excelentes marcadores de salud y como indicadores de la velocidad a la que se realiza el proceso de envejecimiento (De la Fuente 2014 (a)). Dado que los resultados de los dos sub-objetivos analizados en el presente trabajo indican un deterioro prematuro de la función inmunitaria, la generación de un estado de estrés oxidativo en la obesidad y la desregulación del perfil de citoquinas hacia un estado pro-inflamatorio, similar a lo que acontece en edades avanzadas, estas condiciones podrían mostrar un acelerado proceso de envejecimiento en los individuos obesos.

Estudio del perfil metabólico

En este estudio, se han integrado las diferencias entre la dotación genética y los cambios con la edad (2 y 6 meses) en ratas Zucker obesas *fa/fa* y lean *fa/+*, concretamente en tres órganos clave implicados en el desarrollo de la obesidad y las enfermedades cardiovasculares asociadas (hígado, tejido adiposo blanco y corazón), en un estudio metabonómico, utilizando como técnica la resonancia magnética nuclear.

• Modulación temprana del metabolismo lipídico y la glucosa en ratas *fa/fa*

La rata Zucker, como es sabido, es un modelo de obesidad genética, resistencia a la insulina y diabetes, que presenta un metabolismo lipídico y de la glucosa disfuncional, causando una incontrolada homeostasis de la glucosa (Satapati, He et al. 2008). Esto se ve reflejado por el aumento en la concentración hepática de glucosa en las ratas obesas *fa/fa*, en comparación con las lean, a la temprana edad de dos meses. Como era de esperar, los resultados mostraron altos niveles de lípidos residuales hepáticos en ratas lean adultas, en comparación con las jóvenes. Un aumento similar en estos lípidos se observó en ratas *fa/fa* en el paso de dos a seis meses, los cuales se mantenían en mayores concentraciones, respecto a las ratas lean, en ambas edades estudiadas.

Los datos obtenidos también mostraron evidencias de la modulación temprana del metabolismo energético en el tejido adiposo. En ratas lean, el paso de dos a seis meses, se caracteriza por una disminución en los metabolitos implicados en el metabolismo de lípidos como el glicerol y la citidina, y en el metabolismo de los fosfágenos, como la creatina. Concretamente, los niveles de creatina están aumentados en ratas lean en comparación con los animales obesos a los dos meses, lo que indica que las ratas obesas muestran una alteración prematura en la reciclado de la creatina.

Por otro lado, los niveles de glicerofosfocolina (GPC) en tejido adiposo están aumentados en ratas lean y *fa/fa* a los dos meses, respecto a los seis meses, lo que indica un descenso común de estos niveles asociado a la edad. Se dispone de poca información acerca de los cambios en este metabolito a lo largo de la edad, en lo que respecta al metabolismo sistémico. Aun así, se ha observado un descenso significativo en los

niveles de glicerofosfocolina en plasma de monos Rhesus adultos (9 años), en comparación con los jóvenes (2 años) (Rezzi, Martin et al. 2009). Esto pone de manifiesto un patrón común del descenso en este metabolito con el paso del tiempo. Dado que todavía no existen suficientes evidencias científicas sobre el papel de la glicerofosfocolina con la edad, se podría proponer que este metabolito se genera en grandes cantidades a la temprana edad de dos meses, para el mantenimiento de la homeostasis lipídica de la membrana en crecimiento de los adipocitos.

● Alteración temprana de la ruta de metilación hepática en ratas *fa/fa*

La **figura 1** describe la ruta de metilación en el hígado y su conexión con la ruta denominada Kennedy, para la síntesis de fosfatidilcolina, y con la ruta de trans-sulfuración para la síntesis del glutatión y la hipotaurina. La ruta de metilación transfiere un grupo metilo desde un donador de metilo como es la betaina, a través de la síntesis de S-adenosilmetionina (SAM), la cual donará un grupo metilo a un aceptor de metilo, en numerosas reacciones bioquímicas. SAM pierde el grupo metilo para formar S-adenosilhomocisteína (SAH), que es hidrolizada entonces para liberar homocisteína. Este último compuesto puede ser metilado de nuevo, para volver a entrar en la ruta de metilación vía metionina, o conjugarse con la serina para formar cistationina, el precursor de la cisteína. Esta cisteína tiene dos destinos: en condiciones normales, la mayoría de la cisteína es dirigida directamente a la síntesis de glutatión, o por el contrario, cuando la cisteína está aumentada, la cisteína dioxigenasa (CDO) está sobre-activada para detoxificar la cisteína a hipotaurina. Tanto el glutatión como la hipotaurina son potentes antioxidantes, y su función hepática principal es actuar como eliminadores de las especies reactivas de oxígeno (ROS), generadas por oxigenasas y la β -oxidación lipídica.

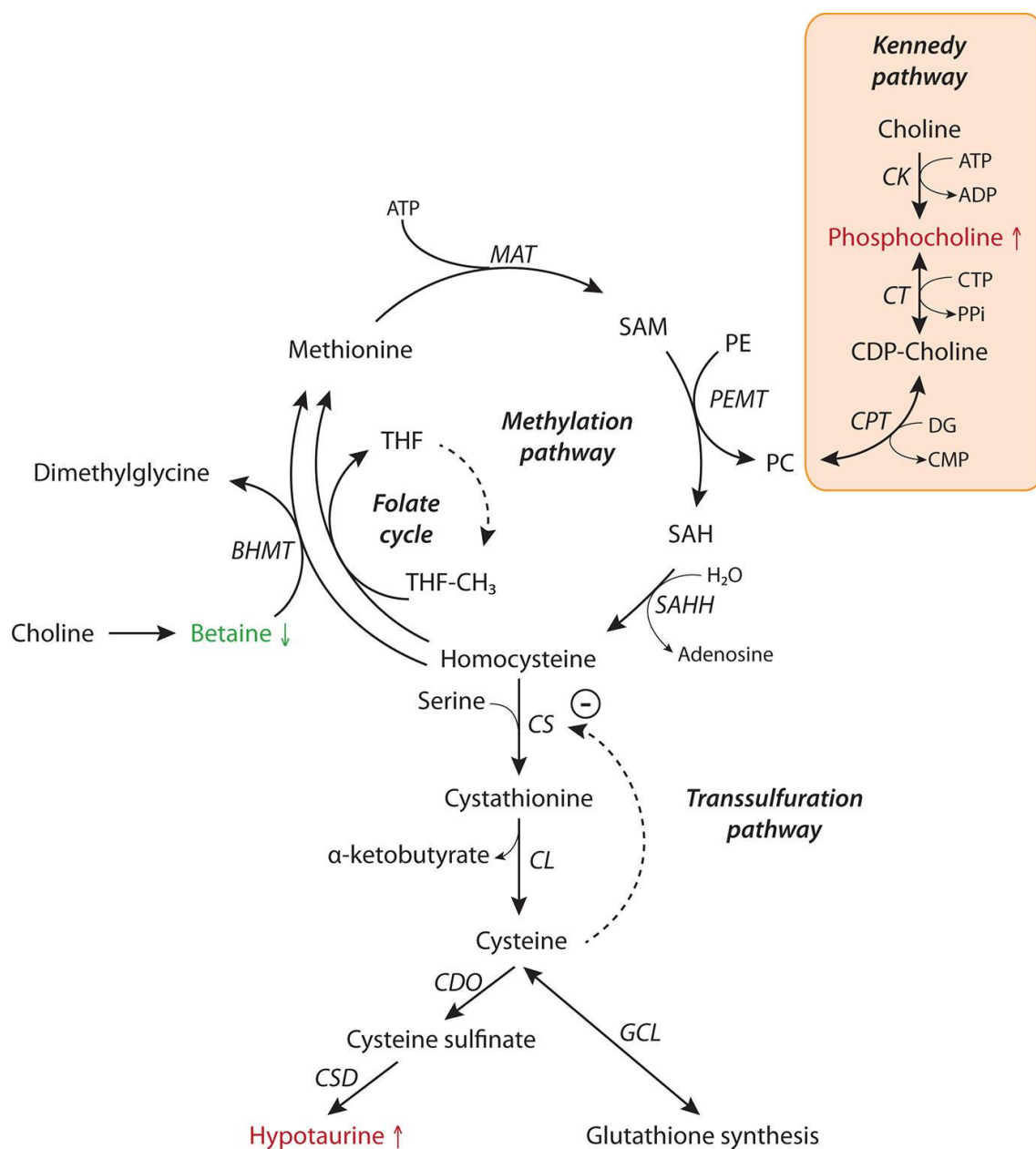


Figura 1. Ruta de metilación y su relación con la síntesis de fosfocolina e hipotaurina. Adaptado de (Kim, Choi et al. 2003).

Kennedy pathway: ruta Kennedy; Methylation pathway: ruta de metilación; Folate cycle: ciclo del folato; Transsulfuration pathway: ruta de trans-sulfuración.

BHMT: betaina homocisteína S-metiltransferasa; CDO: cisteína dioxigenasa; CK: colina quinasa; CL: cistationina-γ-liasa; CPT: colina fosfato transferasa; CS: cistationina-β-sintasa; CT: citidiltransferasa; CTP: fosfocolina citidiltransferasa; DG: diacilglicerol; GCL: γ-glutamilcisteína ligasa; MAT: metionina adenosiltransferasa; PC: fosfatidilcolina; PE: fosfatidiletanolamina; PEMT: fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa; SAH: S-adenosilhomocisteína; SAHH: S-adenosilhomocisteína hidrolasa; SAM: S-adenosilmetionina; THF: tetrahidrofolato. Adenosine: adenosine; Betaine: betaina; CDP-choline: citidina difosfato-colina; Choline: colina; Cystathionine: cistationina; Cysteine: cisteína; Cysteine sulfinato: cisteína sulfinato; Dimethylglycine: dimetilglicina; Glutathione synthesis: síntesis de glutathione; Homocysteine: homocisteína; Hypotaurine: hipotaurina; α-ketobutyrate: α-cetobutirato; Methionine: metionina; Phosphocholine: fosfocolina; Serine: serina.

Los resultados obtenidos del perfil metabólico en el presente estudio, muestran una disminución de la concentración de betaina hepática en ratas *fa/fa*, en ambas edades estudiadas. Esto también se ha observado en la enfermedad del hígado graso no-alcohólico causado por una dieta rica en grasa, donde se ha demostrado que la administración de betaina era capaz de revertir esta patología hepática (Kathirvel, Morgan et al. 2010). Dicho suplemento de betaina se asoció a la reducción de esteatosis, y a la reversión de la resistencia a la insulina en células HepG2 (hepatocitos humanos) a través de la activación del sustrato 1 del receptor de insulina (IRS1) y la normalización de la gluconeogénesis y la síntesis de glucógeno (Kathirvel, Morgan et al. 2010). Aunque la conexión entre la insulina y betaina no está completamente aclarada, cada vez son más las evidencias que demuestran que la diabetes está asociada con un deterioro del metabolismo de grupos metilo (Ratnam, Wijekoon et al. 2006). Este hecho también se apoya en el aumento de la actividad de la enzima betaina homocisteína S-metiltransferasa (BHMT), en ratas con diabetes tipo I, la cual transfiere un metilo desde la betaina a la metionina (Hartz, Nieman et al. 2006).

Las alteraciones en la ruta de metilación también se reflejan en la acumulación de fosfocolina en los hepatocitos de ratas Zucker *fa/fa*, en ambas edades. La fosfatidilcolina es el principal fosfolípido necesario para el mantenimiento de la homeostasis de las membranas en el hígado, síntesis de lipoproteínas y producción de bilis. Dos rutas coexisten en los hepatocitos para la producción de este lípido esencial: la ruta Kennedy, que se encuentra en las células de los mamíferos, y la ruta de la fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa (PEMT) (**figura 1**), que se expresa principalmente en el hígado y contribuye al 15-30% de la síntesis total de fosfatidilcolina en los hepatocitos (Sundler and Akesson 1975) (Vance, Li et al. 2007). La ruta Kennedy produce fosfatidilcolina a partir de la fosfocolina a través de la acción de la fosfocolina citidiltransferasa (CTP) (**figura 1**). En el hígado, la ruta de la PEMT es la principal consumidora de S-adenosilmetionina (SAM), y contribuye significativamente al incremento en la concentración de homocisteína en plasma, lo que se conoce como un factor de riesgo para enfermedades cardiovasculares (Hoogeveen, Kostense et al. 1998) (Jacobs, Stead et al. 2005) (Ratnam, Wijekoon et al. 2006). Se ha demostrado que la PEMT estaba sobre-expresada en diabetes tipo I, y que su actividad

dependía de una fuente de metilo folato-independiente, sugiriendo que la betaina podría ser dicha fuente (Hartz, Nieman et al. 2006). Además, bajo condiciones de una dieta rica en grasa, se ha observado que la síntesis de fosfocolina necesita incrementarse para producir más lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y transferir el exceso de lípidos a los adipocitos, lo que incrementa la demanda de grupos metilo. Como resultado, la betaina hepática se consume, aumentando la demanda de colina en la dieta, que es su principal fuente y precursor directo (Craig 2004). Se puede concluir por tanto que, en el estudio realizado, los niveles de betaina están disminuidos en ratas obesas *fa/fa* probablemente por el incremento en la actividad de la PEMT para la síntesis de fosfatidilcolina, permitiendo una menor utilización de la ruta Kennedy y una acumulación de fosfocolina.

● La alteración temprana de la ruta de trans-sulfuración hepática en ratas *fa/fa* indica un estrés oxidativo prematuro

Los niveles elevados de glutathione encontrados en todos los grupos de animales, excepto en ratas lean a los dos meses de edad, indican niveles similares de estrés oxidativo hepático en ratas lean adultas y en *fa/fa* en ambas edades estudiadas. De la misma manera, se observaron niveles elevados de hipotaurina en el hígado y el tejido adiposo de las ratas obesas *fa/fa*, en ambas edades, en comparación con sus controles lean.

Tal y como se describe en la **figura 1**, el glutathione y la hipotaurina son producidos por la ruta de trans-sulfuración. El glutathione es un metabolito celular crucial. No solamente es un importante antioxidante citosólico, que actúa como un agente protector celular de los efectos tóxicos de las ROS, sino que también juega un papel clave en otras funciones celulares vitales, como proveer un reservorio de cisteína, modular la función inmune, mantener el estado tiólico de las proteínas y modular la síntesis de ADN (Deneke and Fanburg 1989) (Lu 1999). La hipotaurina actúa como un regulador osmótico y de manera similar al glutathione, es un potente antioxidante que neutraliza el radical hidroxilo (Aruoma, Halliwell et al. 1988) (Yancey 2005). Así, la hipotaurina se sintetiza en grandes cantidades bajo condiciones de estrés oxidativo, como demuestran distintas investigaciones, las cuales ponen de manifiesto el papel protector hepático de la hipotaurina frente al daño oxidativo (Zwingmann and Bilodeau

2006) (Sakuragawa, Hishiki et al. 2010). Las altas concentraciones hepáticas de hipotaurina también se han asociado con la enfermedad del hígado graso no-alcohólico, comúnmente asociada a la obesidad y la diabetes, la cual se caracteriza por un deterioro en el metabolismo de amino ácidos sulfurados y estrés oxidativo (Kwon do, Jung et al. 2009). La alteración de la ruta de trans-sulfuración en la enfermedad del hígado graso no-alcohólico, que permite un aumento de la síntesis de hipotaurina, está fuertemente asociada a una disfunción de la ruta de metilación. De hecho, Kwon y sus colaboradores han demostrado que la suplementación de betaina ejerce un fuerte efecto hepatoprotector contra la esteatosis inducida por una dieta grasa, mediante la inhibición de la síntesis de hipotaurina a partir de la cisteína (Kwon do, Jung et al. 2009). Además, muchos estudios apoyan los múltiples efectos protectores de la betaina en el hígado, entre los que se incluye el control del metabolismo de la cisteína, la inhibición de la activación de las células Kuppfer, así como la protección frente al desarrollo de esteatosis (Kim, Choi et al. 2003) (Kathirvel, Morgan et al. 2010).

Finalmente, hay que destacar que el perfil metabólico de los animales obesos en ambas edades muestra altos niveles de glutamina, una fuente de glutamato, el cual es uno de los precursores de la síntesis de glutathione. Dado que la obesidad está asociada a una acumulación ectópica de lípidos en el interior del adipocito, y como el glutathione retrasa o protege de la apoptosis (Lu 1999), la elevada síntesis de glutathione en las ratas *fa/fa* preserva los hepatocitos de los mecanismos apoptóticos desencadenados por la acumulación excesiva de lípidos. Así, los altos niveles de glutamina son típicos de una respuesta al estrés osmótico y oxidativo en los hepatocitos, ya que este aminoácido juega un papel crucial en la protección frente a la apoptosis inducida por el estrés oxidativo, y en otros muchos mecanismos defensivos (Häussinger and Schliess 2007).

Considerando todo lo comentado, el incremento prematuro en la cantidad total de glutathione, hipotaurina y glutamina en ratas obesas puede ser interpretado como una evidencia del mecanismo hepático compensatorio, para neutralizar el estrés oxidativo generado por la disfunción metabólica del hígado graso.

● Las modificaciones del metabolismo cardiaco en animales *fa/fa* jóvenes indican una temprana disfunción cardiaca

Múltiples alteraciones metabólicas se observan en el tejido cardiaco de ratas obesas *fa/fa* jóvenes, de acuerdo a los datos obtenidos. Estas alteraciones incluyen bajos niveles de lactato y escilo-inositol, así como altos niveles de fosfocolina, creatina, colina y taurina, en comparación con sus controles lean. Además, la citidina, el acetato, la fosfocolina y la taurina se encuentran en una alta concentración en ratas obesas jóvenes, respecto a las adultas. Un hecho interesante que muestran los resultados es que no se encuentran diferencias significativas entre ratas *fa/fa* y lean adultas, lo que indica que los perfil metabólicos cardiacos convergen en la edad adulta, independientemente de la dotación genética.

En condiciones normales, el lactato es una importante fuente de energía para el músculo cardiaco, que contribuye aproximadamente a la producción del 15-25% de la acetil-CoA (Lopaschuk, Ussher et al. 2010). Para cubrir las necesidades energéticas, los cardiomiocitos absorben el lactato de la circulación general, y lo consumen de inmediato. Sin embargo, cuando la circulación de ácidos grasos libres aumenta, como es el caso en la diabetes tipo II, la actividad de la ruta de la β -oxidación se incrementa, y la oxidación del lactato se reduce significativamente (Lopaschuk, Ussher et al. 2010). También se ha demostrado que la absorción de lactato por los cardiomiocitos, está alterada en ratas diabéticas, lo que contribuye a una disminución en la utilización del lactato como combustible cardiaco (Chatham, Des Rosiers et al. 2001). Los resultados obtenidos en el presente estudio están de acuerdo con la literatura existente y podrían indicar un defecto en la absorción del lactato por los cardiomiocitos en animales obesos jóvenes, precediendo al posterior establecimiento de la diabetes tipo II.

Por otra parte, el tejido cardiaco de las ratas *fa/fa* presenta altos niveles de creatina respecto a las ratas lean, a los dos meses de edad. Al igual que el lactato, la creatina no se sintetiza en el corazón, pero es captada por los cardiomiocitos en contra de gradiente de concentración por medio del co-transportador de Na^+ y creatina (Wallis, Lygate et al. 2005). Distintos estudios en humanos y modelos animales, han demostrado reducidos niveles de fosfocreatina en miocardio, y una pérdida del “pool” de creatina

total en el fallo cardiaco (Phillips, Ten Hove et al. 2010). Asimismo, la obesidad está asociada a una sobrecarga hemodinámica y a un aumento en el gasto cardiaco, debido a la elevada demanda metabólica impuesta por la expansión del tejido adiposo y la aumentada masa libre de grasa (Vasan 2003). Estos hallazgos reflejan, por tanto, una temprana adaptación del metabolismo del fosfágeno en ratas obesas, para sustentar la elevada demanda energética en estos animales a la edad juvenil.

Otra evidencia que indica la alteración del metabolismo cardiaco en ratas obesas jóvenes es la modulación de los niveles de escilo-inositol y fosfocolina, dos componentes esenciales de la membrana. Los resultados muestran que la citidina se encuentra en altas concentraciones en ratas *fa/fa* jóvenes, en comparación con las adultas. Este dato está de acuerdo con la literatura existente, donde se demuestra que el metabolismo de las pirimidinas en el miocardio está alterado bajo condiciones patológicas (Rossi and Olivares 1998). La citidina es un nucleósido de pirimidina esencial para la síntesis de lípidos a través de la ruta Kennedy, tal y como se describe en la **figura 1**. La elevada concentración de fosfocolina y citidina en ratas obesas jóvenes, indica, por tanto, una actividad disminuida de la ruta Kennedy. También, es interesante destacar que se han descrito alteraciones en la N-metilación de fosfolípidos en cardiomiocitos de ratas diabéticas (Panagia, Taira et al. 1990). Por todo lo comentado, se puede decir que, en general, este perfil metabólico sugiere una temprana alteración en el metabolismo de lípidos, que genera alteraciones a nivel de las membranas (sarcolema), y promueve una cardiomiopatía.

Todas estas modificaciones también vienen acompañadas, en ratas obesas jóvenes, por un marcado aumento en los niveles de taurina, un metabolito crucial implicado en funciones cardiacas esenciales como la osmorregulación y la modulación de la concentración de Ca^{2+} (Huxtable 1992). Además, este metabolito juega un papel protector en los cardiomiocitos como potente antioxidante y existen evidencias de que se acumula en el músculo cardiaco bajo condiciones de estrés oxidativo (Hayes and Sturman 1981). La taurina, por tanto, posee un papel fundamental en el mantenimiento de una adecuada función contráctil y actúa como una molécula anti-inflamatoria (Schaffer, Jong et al. 2010). Asimismo, los niveles elevados de taurina en los

cardiomiocitos también se han asociado a distintas disfunciones cardíacas, lo que indica que este metabolito es un biomarcador de la temprana alteración del metabolismo cardíaco (Jones, Sang et al. 2005). Por todo lo comentado, los niveles elevados de taurina en ratas obesas a la edad de dos meses, representan un mecanismo protector frente al desarrollo de cardiomiopatía diabética y fallo cardíaco. Se puede concluir, por tanto, que los animales obesos jóvenes muestran un patrón de tempranas anomalías en la función cardíaca. Dado que no es posible distinguir diferencias significativas entre los perfiles metabólicos cardíacos de ratas *fa/fa* y lean adultas, se puede deducir que todas estos ajustes ocurren de manera natural con la edad en esta cepa de ratas, pero que la obesidad y el temprano comienzo de la diabetes tienden a acelerar este proceso.

Como resumen de este sub-apartado, se puede decir que a la temprana edad de dos meses las ratas obesas presentan un deterioro de la función inmunitaria y una respuesta proinflamatoria a la estimulación por mitógenos por las células inmunitarias, así como un estado de estrés oxidativo, que podría ser debido a una mayor producción de oxidantes en general, más que a una disminución de los compuestos antioxidantes, posiblemente porque el organismo intenta compensar el aumento de oxidantes con una mayor síntesis de moléculas con capacidad reductora.

A la edad adulta ambas ratas Zucker no presentan diferencias en cuanto a función inmunitaria, pero sí que se hace patente un mayor estrés oxidativo en ratas obesas, posiblemente por agotamiento en la producción o consumo de compuestos antioxidantes. El deterioro observado en ratas lean a nivel de función inmunitaria a esta edad, podría estar indicando que, al menos en algunos parámetros, no actuarían como buenos controles.

Las ratas obesas *fa/fa*, además, muestran una temprana alteración de la ruta de metilación y trans-sulfuración hepática, así como una disfunción prematura del metabolismo cardíaco, que podrían ser usados como marcadores tempranos del estado prediabético. En base a todo esto, el estrés oxidativo/inflamatorio y las alteraciones de los metabolitos podrían estar considerados como la vía final común para el desarrollo de los factores de riesgo de

los diferentes trastornos que acompañan a la obesidad, como la diabetes y las enfermedades cardiovasculares.

Dado que las funciones inmunitarias analizadas son excelentes marcadores de la edad biológica y de la velocidad con la que se realiza el proceso de envejecimiento de los individuos, el deterioro prematuro de dichas funciones en animales obesos, junto con la generación de un estado de estrés oxidativo/inflamatorio de las células inmunitarias y hepáticas, así como las alteraciones del metabolismo hepático y cardíaco desde edades tempranas, como ocurre al avanzar la edad, podrían estar indicando que la obesidad es un estado de envejecimiento prematuro.

5.1.2. EFECTO DEL EJERCICIO FÍSICO EN RATAS MACHO GENÉTICAMENTE OBESAS ADULTAS. ESTUDIO INMUNOLÓGICO Y DE ESTRÉS OXIDATIVO

La respuesta de los individuos al ejercicio físico no es siempre la misma ya que no solo depende del tipo, duración e intensidad del ejercicio, sino también del estado de salud del individuo. Sabiendo que la actividad física modula los sistemas reguladores del organismo, el propósito de este objetivo es valorar el efecto del ejercicio regular o habitual sobre la función inmunitaria y el estado de estrés oxidativo en animales obesos adultos, así como determinar el efecto de una sesión única de ejercicio agudo, tanto en animales obesos sedentarios como en animales previamente sometidos al ejercicio habitual o entrenamiento. Esto permitiría conocer, a su vez, las posibles adaptaciones en las respuestas inflamatorias y de estrés inducidas por el entrenamiento en animales obesos.

En este último objetivo de este apartado, se ha realizado un estudio del efecto de un protocolo de ejercicio físico de entrenamiento y de un golpe de ejercicio agudo, sobre varias funciones inmunitarias, como son la actividad “Natural Killer”, la respuesta proliferativa y los niveles de liberación de TNF- α , en ratas Zucker *fa/fa* adultas. Para

caracterizar el efecto de ambos tipos de ejercicio físico sobre distintos parámetros de estrés oxidativo, se ha valorado la capacidad antioxidante total (TAC), los niveles de GSH total, y las actividades de las enzimas XO, GPx y GR. También se recoge la determinación del peso corporal y de los órganos, así como de la glucemia de los animales.

Se estima que, en ratas, 10 minutos de calentamiento seguidos de 30-45 minutos de carrera a 21-24 m/min (35-40 cm/s), sin inclinación, podría ser una intensidad adecuada para activar las respuestas inmunofisiológicas, y observar el efecto diferencial del ejercicio habitual en relación a un golpe puntual de ejercicio (Ferrández, de la Fuente et al. 1996) (Morán, Delgado et al. 2004). Por tanto, para esta investigación, se eligió este tipo de entrenamiento.

Estudio del peso corporal y de los órganos

En relación al estudio del **peso corporal** de los animales en el momento del sacrificio, como cabía esperar, las ratas que realizaron el ejercicio de entrenamiento físico mostraron un peso menor que las ratas sedentarias, así como las ratas entrenadas que recibieron el golpe de ejercicio agudo respecto a las sedentarias que también lo recibieron. Este hecho fue debido, lógicamente, al efecto del entrenamiento. Otra investigación realizada en rata Zucker *fa/fa* también demostró una disminución significativa del peso corporal de estos animales a la finalización de un programa de entrenamiento (Hsieh, Chang et al. 2008), lo que está de acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio.

La obesidad implica un exceso de grasa corporal, que supone un importante factor de riesgo metabólico, por lo que el peso de estas ratas es mayor de lo que se considera saludable. Estos resultados corroboran, como ya apuntaron otros investigadores, que la realización de un protocolo adecuado de actividad física tiene efectos beneficiosos sobre el peso corporal (Jakicic 2009) (Chaput, Klingenberg et al. 2011). Además otros autores han encontrado que no solo el ejercicio aeróbico facilita la pérdida de peso, también mejora aspectos metabólicos como la dislipidemia y la

sensibilidad a la insulina, permitiendo así una menor incidencia de diabetes (Zinman, Ruderman et al. 2003) (de Lemos, Reis et al. 2007).

A la vista de los resultados también se puede concluir, que simplemente la realización de ejercicio físico de manera habitual y regular disminuye el peso de animales con obesidad y síndrome metabólico, independientemente de la dieta. Por otra parte, se ha comprobado que el golpe de ejercicio agudo, por sí solo, no es suficiente para provocar una reducción del peso corporal.

Con respecto al **peso relativo de los distintos órganos** estudiados, ni el ejercicio físico habitual ni el golpe de ejercicio puntual modifica significativamente el peso del hígado o la grasa en relación al peso corporal. Sin embargo, el peso del corazón sufre un aumento en ambos grupos de ratas entrenadas, respecto al correspondiente grupo de ratas sedentarias con o sin ejercicio agudo. Como es sabido, la obesidad está asociada a una sobrecarga hemodinámica y a un aumento en el gasto cardiaco, debido a la gran demanda metabólica impuesta por la expansión del tejido adiposo (Vasan 2003). En este sentido, la realización de ejercicio físico aeróbico añadiría una demanda metabólica cardiaca constante aún mayor a la existente en condiciones normales en estos animales, lo que obligaría a generar una hipertrofia del tejido muscular cardiaco con un aumento de su masa y por consiguiente de su peso. De hecho, en pacientes con obesidad donde existe un aumento del volumen sanguíneo y en consecuencia del gasto cardiaco, que genera un estrés en la pared vascular, se desencadena un aumento de los elementos contráctiles y en consecuencia de su masa, lo que conduce a una hipertrofia ventricular (Lorell and Carabello 2000) (Poirier, Giles et al. 2006).

Estudio de la glucemia

Cuando se valora la concentración de glucosa en sangre en ratas obesas, se observa que el ejercicio de entrenamiento hace que en estos animales tiendan a aumentar los niveles de glucosa circulante, aunque esta elevación no es estadísticamente significativa. Los animales entrenados podrían mantener algo elevados los niveles de glucosa porque si el entrenamiento es realizado durante un largo periodo de tiempo, conlleva una respuesta del organismo al estrés que supone ese esfuerzo físico al que

están sometidos, manteniendo ligeramente elevada la glucemia de manera constitutiva. Yi y sus colaboradores, encontraron en ratas Zucker diabéticas que un ejercicio de entrenamiento por carrera en cinta rodante 5 días a la semana durante 6 semanas, con mayor intensidad y duración que el empleado en este trabajo, disminuye los niveles de glucosa en estos animales en la edad juvenil (Yi, Hwang et al. 2009), por lo que a la edad adulta, como ocurre con los animales del presente trabajo con una obesidad y síndrome metabólico establecidos, el entrenamiento no resulta suficiente para reducir los niveles de glucosa circulantes. De esto se podría deducir que tanto el tipo de ejercicio (intensidad y duración) como la edad de los individuos intervienen en los niveles de glucosa en sangre.

Por otra parte, el golpe de ejercicio agudo no produce modificaciones significativas en la concentración de glucosa en sangre en ninguno de los dos grupos de animales estudiados, observándose mayores niveles de glucosa en los animales entrenados que realizaron el golpe de ejercicio agudo que en los sedentarios que también lo realizaron.

Valoración de la función inmunitaria en leucocitos de bazo

En relación a las valoraciones llevadas a cabo en la funcionalidad de leucocitos de bazo, ni el ejercicio de entrenamiento ni el golpe de ejercicio agudo parecen estar influyendo en la **actividad NK**. De la misma manera, este tipo de entrenamiento no afecta en sí mismo a la **capacidad proliferativa** de linfocitos T y B de bazo en respuesta a mitógenos. En cambio, se aprecian los efectos de una respuesta preservada de los linfocitos, cuando los animales se someten al efecto estresante del ejercicio agudo, ya que en animales entrenados se observó una mejor capacidad proliferativa en respuesta al estrés puntual, en comparación con los animales sedentarios.

Los estudios realizados sobre los efectos de la actividad física en la función de células inmunitarias en modelos animales de obesidad son muy limitados, pero cabe destacar un trabajo similar en ratas Zucker *fa/fa* sometidas a un programa de entrenamiento desde los dos meses de edad, hasta su finalización a los doce meses, con

una duración total de 40 semanas. El ejercicio consistió en hacer correr a los animales en una cinta rodante con un 8% de inclinación, 5 días a la semana. La velocidad y la duración del ejercicio se iban incrementando rápidamente, tanto que a la tercera semana de entrenamiento, los animales eran capaces de correr tres series de 15 min a 15m/min, separados por 5 min de reposo (Moriguchi, Kato et al. 1998 (b)). La actividad NK y la respuesta proliferativa de los linfocitos esplénicos estimulados con Con A mejoró significativamente en estas ratas obesas entrenadas respecto a las ratas obesas sedentarias. Además, en los animales entrenados se incrementó la captación de glucosa por los linfocitos esplénicos, lo que se asocia en parte, a un aumento en la expresión de GLUT-1 (Moriguchi, Kato et al. 1998 (b)). La mejora significativa en dichos parámetros funcionales de las células inmunitarias, analizados en animales entrenados a la edad madura, que no se observa en los resultados del presente trabajo a la edad adulta, podría ser debida, por tanto, al tiempo de duración del ejercicio, un total de 40 semanas, ya que el inicio de la intervención con el entrenamiento comenzó a los dos meses, al igual que en nuestro estudio.

Nieman y sus colaboradores, en un trabajo realizado en mujeres obesas adultas, que llevaron a cabo un programa de ejercicio físico durante 12 semanas, no encontraron efectos significativos en la respuesta inmunitaria innata y adaptativa, concretamente en parámetros funcionales de leucocitos de sangre periférica como la actividad NK, la proliferación en respuesta a mitógenos, así como en la fagocitosis de monocitos y granulocitos (Nieman, Nehlsen-Cannarella et al. 1998), probablemente por la edad de la intervención física o el protocolo del entrenamiento. Sin embargo, el número de días sintomáticos que pasaron las mujeres entrenadas ante una infección respiratoria, resultó menor que en mujeres sedentarias, lo que podría estar indicando que el entrenamiento ha preservado la función inmunitaria por lo que las mujeres entrenadas responden mejor ante una infección. Por otro lado, en un experimento llevado a cabo en ratas Wistar sin presentar obesidad, que realizaron un ejercicio moderado de natación (1 hora/día, 5 días a la semana durante 6 semanas), no mostraron diferencias en la proliferación de linfocitos de nódulos linfáticos en respuesta a Con A y LPS, respecto a ratas sedentarias (Santos, Caperuto et al. 2007), lo que corrobora también la importancia del diseño de entrenamiento, y su duración.

Debido a que los efectos que el ejercicio físico ejerce sobre la respuesta inmunitaria dependen del tipo, la intensidad y la duración del ejercicio, pero también del estado del propio sistema defensivo, habría sido interesante comprobar si el diseño de entrenamiento propuesto hubiera manifestado un efecto en sí mismo sobre la función inmunitaria a edades más avanzadas, como la edad madura o incluso en animales viejos en este modelo de obesidad, así como introducir modificaciones en el diseño del protocolo de ejercicio. Dichas modificaciones deberían llevarse a cabo con el conocimiento de que los programas de entrenamiento iniciados a la edad juvenil en ratas Zucker pueden retrasar pero no previenen del completo desarrollo de la obesidad, como se demostró en un trabajo con ejercicio de natación en ratas *fa/fa* durante 8 semanas (Walberg, Molé et al. 1982). Además, hay trabajos que evidencian la importancia de la edad de comienzo del entrenamiento en este modelo de rata obesa a la hora de surtir efecto en parámetros metabólicos, ya que un protocolo de ejercicio en rata Zucker que comenzó a la edad juvenil consiguió prevenir la predisposición al deterioro de la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina, mientras que el mismo protocolo de ejercicio iniciado a la edad adulta, solo mejoró la tolerancia a glucosa y la sensibilidad a la insulina, que ya habían establecido su deterioro (Becker-Zimmermann, Berger et al. 1982).

A pesar de que el tipo de entrenamiento diseñado en el presente trabajo, fue elegido de acuerdo a las referencias encontradas en las que se observó que era apropiado para desencadenar respuestas inmunofisiológicas, como se comentó anteriormente, puede existir la posibilidad de que por la intensidad y duración del mismo, y especialmente por tratarse de un modelo animal genéticamente modificado donde las alteraciones inmunológicas, fisiológicas y metabólicas comienzan a una edad temprana, no se aprecie el efecto del programa de entrenamiento en sí mismo al inicio de la edad adulta (6 meses) respecto a los animales sedentarios. Es probable que el efecto pudiese ser observado a mayor largo plazo a nivel de la función inmunitaria. En cambio, dicho programa sí resultó suficiente para preservar, al menos y de forma incipiente, la capacidad proliferativa necesaria para responder ante una situación de estrés como la generada por el ejercicio agudo. Así, en un experimento realizado en rata Wistar, se comprobó que la función fagocítica de animales sometidos a un estrés se deterioraba,

mientras que los animales sometidos a un programa de entrenamiento físico moderado durante 8 semanas, no sufrían alteraciones en la capacidad fagocítica de los macrófagos ante un estrés agudo, lo que está indicando que el programa de ejercicio atenúa los efectos del estrés agudo sobre la función de los macrófagos (Leandro, de Lima et al. 2007). Estos mismos autores en otro trabajo también con ratas Wistar, comprobaron que animales sedentarios sometidos a un estrés que consistió en una inmovilización en cilindros de cristal durante 60 minutos, presentaron un mayor porcentaje de apoptosis de linfocitos, menor proliferación linfocítica en timo y nódulos linfáticos y un aumento de los linfocitos de bazo. Ninguna de estas alteraciones se identificó en animales entrenados con un programa de entrenamiento físico moderado durante 8 semanas, que fueron sometidos al mismo mecanismo de estrés por inmovilización. De nuevo, un entrenamiento físico moderado atenúa los efectos de un mecanismo de estrés agudo y aumenta la tolerancia linfocitaria (Leandro, Martins de Lima et al. 2006). Estos hallazgos apoyan el incipiente mecanismo de preservación de la respuesta proliferativa por el entrenamiento, encontrado en el presente trabajo. Asimismo, en mujeres de edad avanzada la realización de un programa de ejercicio de resistencia no produjo efectos negativos sobre parámetros del sistema inmunitario (Neves Sda, Lima et al. 2009).

En un trabajo realizado en ratones BALB/c, que fueron sometidos a un ejercicio de entrenamiento de natación 5 días por semana, 60 minutos, durante 10 semanas, se observó que los linfocitos de bazo y células peritoneales producían menor cantidad de ROS, que los animales no entrenados. En cambio, ambos grupos de animales mostraron una inhibición de la respuesta proliferativa en condiciones de estimulación con Con A y LPS, tras la realización de un ejercicio agudo durante 2 horas, lo que podría ser debido a la excesiva producción de ROS tras la sesión de ejercicio agudo (Kwak 2006). En este estudio la duración del golpe de ejercicio agudo es de 2 horas, mientras que en el realizado en nuestro diseño experimental es de 30 minutos, y no se observa un deterioro en la respuesta proliferativa, lo que indica la importancia de la duración y el tipo de ejercicio agudo realizado.

El ejercicio de entrenamiento propuesto en ratas obesas parece estar atenuando los efectos de la inmunosenescencia que presenta este modelo animal, hecho que se

manifiesta en una respuesta proliferativa algo preservada ante los efectos del estrés provocado por un ejercicio agudo. Así, se ha comprobado que un programa de actividad física prolongado en el tiempo en mujeres de edad avanzada, es capaz de modular la síntesis de citoquinas como la IL-2, IL-4 e IFN- γ , importantes reguladores de la respuesta inmune, atenuando el estado de senescencia del sistema inmunitario (Drela, Kozdron et al. 2004).

A la vista de los resultados, podríamos proponer que un programa de entrenamiento más crónico podría haber supuesto, en sí mismo, efectos significativos en la actividad NK y la respuesta proliferativa en este modelo de obesidad, por lo que ante un ejercicio agudo probablemente se hubiera observado más claramente una función inmunitaria más preservada y mejorada. Así, está demostrado que son varios los factores que influyen en el resultado de un entrenamiento como son la edad de los animales, sus ritmos circadianos y el protocolo de ejercicio (Ghosh, Golbidi et al. 2010). Por otra parte, los animales obesos entrenados en este experimento, por el mero hecho de la realización de actividad física regular, ponen en marcha principalmente mecanismos de adaptación metabólica, pero no se ven sometidos una situación de infección o agresión por un agente nocivo, como para tener que desencadenar los mecanismos de respuesta inmunitaria, mientras que sí parece que lo comienzan a hacer como se aprecia en la capacidad proliferativa, en respuesta al estrés por ejercicio agudo. Por ello parece que el entrenamiento también podría estar preparando al organismo para una mejor respuesta inmunitaria ante una posible infección. Así, en el estudio con mujeres obesas, que anteriormente se ha comentado, la realización de un programa de entrenamiento físico, no produjo cambios significativos en la función inmunitaria, pero el número de días que estas mujeres sufrieron los síntomas de una infección respiratoria fue menor que en mujeres no entrenadas (Nieman, Nehlsen-Cannarella et al. 1998). También, la realización de un programa de ejercicio regular y moderado por un grupo de hombres y mujeres mejoró la activación de la respuesta inmunitaria frente a la estimulación por antígenos microbianos (Zheng, Cui et al. 2015). Además, se ha identificado que el ejercicio físico de intensidad moderada mejora la respuesta inmunitaria a la infección en un modelo de obesidad en ratón por dieta rica en grasa (Warren, Olson et al. 2015).

Respecto a los niveles de **TNF- α** liberados por los linfocitos de bazo estimulados con LPS, al contrario de lo que se podría esperar si atendemos a que el ejercicio posee propiedades anti-inflamatorias (Petersen and Pedersen 2005), las ratas sedentarias muestran unos niveles algo más disminuidos que las entrenadas. Por otra parte, las ratas sedentarias sometidas al ejercicio agudo presentan además, niveles de TNF- α significativamente menores que las que no lo realizaron. Dado que algunos efectos beneficiosos del ejercicio físico implican la activación de una respuesta inflamatoria controlada para proteger al organismo frente a la infección, aunque, una inflamación desregulada puede ser la causa de enfermedades inflamatorias (Medzhitov 2008), una posible interpretación que podría darse a este resultado, es que los linfocitos de las ratas entrenadas tienen la capacidad de responder ante el ejercicio, que siempre es un estrés, con una respuesta inflamatoria moderada y controlada. Sin embargo, la activación de los linfocitos en respuesta a LPS en los animales sedentarios estaría más suprimida, y en especial cuando son sometidos a un estrés mayor como un ejercicio agudo o extenuante.

Por otro lado, se sabe que la actividad física aguda o extenuante se acompaña de la generación de citoquinas proinflamatorias y de respuesta a la inflamación como el TNF- α (Pedersen, Ostrowski et al. 1998) (Pedersen 2000) (Bernecker, Scherr et al. 2013). En este sentido se demuestra que el entrenamiento es capaz de controlar una respuesta inflamatoria exacerbada de los linfocitos en ratas entrenadas cuando se someten al estrés que supone el golpe de ejercicio agudo, ya que no se aprecia una elevación significativa en los niveles de esta citoquina proinflamatoria. También se ha comprobado que ratas sometidas a un ejercicio agudo y estresante durante 102 minutos, respondieron con niveles atenuados de TNF- α plasmático *in vivo*, en comparación con la respuesta de ratas no sometidas a ese ejercicio, cuando se les administraba LPS 6 horas después de la finalización del ejercicio (Bagby, Sawaya et al. 1994). Asimismo, en varones sanos que realizaron ejercicio aeróbico extenuante, mostraron bajos niveles de TNF- α plasmáticos cuando se les administró LPS 2,5 horas después del ejercicio (Starkie, Ostrowski et al. 2003). En otro estudio con individuos adultos jóvenes sometidos a un ejercicio de alta intensidad, también se identificaron bajos niveles de esta citoquina en plasma cuando la sangre completa fue estimulada con LPS, respecto a

los valores obtenidos antes de la realización del ejercicio (Sloan, Shapiro et al. 2007). En los resultados del presente trabajo dicha disminución en los niveles de TNF- α liberados por los linfocitos *in vitro* en respuesta a LPS, también se aprecia en ratas sedentarias sometidas al ejercicio agudo, como ya ha sido comentado. A este respecto, hubiera sido interesante la valoración de la liberación de otras citoquinas para poder sacar conclusiones acerca de cómo ha afectado el entrenamiento a la globalidad del estado inflamatorio en las células inmunitarias, en ratas sedentarias y entrenadas, y comprobar así si el diseño del programa de entrenamiento es válido como una estrategia para el control de la inflamación sistémica de bajo grado en estos animales.

Por otro lado, y dado que nuestro estudio forma parte de un proyecto coordinado con otros grupos de investigación, Martin-Cordero y sus colaboradores comprobaron con en este mismo diseño experimental, que los macrófagos peritoneales de las ratas Zucker *fa/fa* entrenadas estimulados con LPS liberan mayores niveles de IL-1 β , respecto a las sedentarias (Martin-Cordero, Garcia et al. 2009), hecho que se asemeja a lo obtenido en nuestros resultados con la liberación de TNF- α por los linfocitos esplénicos, donde las ratas entrenadas tienden a una mayor liberación de esta citoquina. Los niveles más bajos de liberación de TNF- α en ratas sedentarias en respuesta a LPS, son indicativos de su deteriorada respuesta frente a antígenos bacterianos, por lo que las ratas entrenadas ven mejorada esa respuesta inmunitaria por efecto del entrenamiento, y presentarían una mejor defensa frente a las infecciones. Tras la realización del ejercicio agudo, las ratas sedentarias mostraron una mayor liberación de IL-1 β respecto a las que no lo realizaron, al contrario de lo que ocurre con la liberación de TNF- α en nuestros resultados, y las ratas entrenadas que realizaron el ejercicio agudo mostraron también niveles superiores de liberación de IL-1 β frente a las que no lo realizaron y a las ratas sedentarias que sí lo realizaron, por lo que el ejercicio agudo también está incrementando la producción de esta citoquina (Martin-Cordero, Garcia et al. 2009). Los resultados obtenidos en ratas sedentarias sometidas a ejercicio agudo en cuanto a la liberación de TNF- α demuestran, frente a los obtenidos con IL-1 β , que los linfocitos esplénicos de estos animales todavía tienen menor capacidad de respuesta a antígenos en relación a esa citoquina, TNF- α , frente al estrés provocado por del ejercicio agudo. Dado que la respuesta en ratas entrenadas con o sin ejercicio agudo siempre es superior

en cuanto a la liberación de ambas citoquinas, se puede concluir que el entrenamiento regular y moderado mejora la respuesta inmunitaria inflamatoria frente al ataque de patógenos.

Valoración de parámetros de estrés oxidativo en bazo e hígado

En relación a la determinación de los parámetros de estrés oxidativo, en bazo e hígado, se observa que el entrenamiento no parece estar elevando significativamente la **actividad XO**. En cambio, esta actividad presenta un aumento significativo en ratas sedentarias que realizaron el ejercicio agudo frente a las que no lo realizaron, mientras que no se ha visto incrementada en animales entrenados que también lo realizaron. La XO es una fuente relevante de radicales libres durante el ejercicio aeróbico (Gomez-Cabrera, Domenech et al. 2008), y la principal responsable del daño tisular por la producción de dichos radicales durante el ejercicio exhaustivo (Viña, Gimeno et al. 2000). Además, el hígado es un órgano que contiene elevados niveles de XDH, y durante el ejercicio es convertida a XO, con la consiguiente generación de ROS y daño oxidativo (Radak, Chung et al. 2008 (a)). Por tanto, los resultados están indicando que el programa de entrenamiento está ejerciendo un efecto protector frente a la oxidación que produce el efecto estresante del golpe de ejercicio agudo.

Respecto a la **TAC** analizada en ambos órganos, el entrenamiento no parece tener un efecto en sí mismo sobre este parámetro, pero al observar que frente al ejercicio agudo las ratas sedentarias presentan una disminución significativa de esta capacidad antioxidante frente a las que no lo realizaron, hecho que no sucede en ratas entrenadas, se pone de manifiesto que el entrenamiento puede haber preservado el equilibrio redox. Así, las ratas sedentarias han necesitado consumir compuestos antioxidantes para hacer frente a la oxidación por el efecto del ejercicio agudo.

Los niveles de **GSH** total, aumentaron en leucocitos de bazo de ratas entrenadas sometidas a ejercicio agudo, frente a las que no lo realizaron, lo que parece indicar que el entrenamiento está preparando a los animales para hacer frente a la estresante situación que supone el ejercicio agudo, elevando este potente antioxidante. Este incremento no parece ser debido a una mayor actividad de las enzimas **GPx** y **GR** que

participan en el reciclado del GSH, por lo que el aumento de GSH total también podría ser debido a una mayor activación de la ruta del ácido glutámico y la γ -glutamyl cisteína que aumentaría los niveles del GSH reducido. De hecho, parece que existe una tendencia al aumento de la actividad GPx en animales sedentarios, lo que podría sugerir que necesitan una incipiente mayor activación del ciclo del reciclado del GSH. En este sentido, hubiera sido interesante la valoración de los niveles de glutathion oxidado para poder saber cómo el entrenamiento y el ejercicio agudo afectan a la totalidad del ciclo del glutathion, y así conocer exactamente los niveles de GSH reducido y oxidado (GSSG), ya que se ha demostrado que el ejercicio exhaustivo causa una elevación del GSSG en músculo de rata (Gomez-Cabrera, Borrás et al. 2005) y en sangre de humanos y roedores (Sastre, Asensi et al. 1992), sin modificaciones en los niveles de GSH reducido. En el caso del hígado, parece que existe una tendencia a que el entrenamiento eleve la síntesis de GSH total, hecho que se aprecia significativamente en las ratas que realizan el ejercicio agudo frente a las sedentarias que no lo realizan. De nuevo, se comprueba como el entrenamiento preserva los niveles de GSH total frente al estrés por el ejercicio agudo. Al igual que ocurre en bazo, no se observan modificaciones de la actividad GR por el entrenamiento, y sí una tendencia al aumento de la actividad GPx en animales sedentarios, posiblemente como mecanismo incipiente para acelerar el ciclo del reciclado del GSH, como ya se ha comentado.

En una investigación sobre los efectos de un programa de entrenamiento moderado (20 m/min, sin inclinación de la cinta rodante, 1 hora/día, 7 días/semana), durante 8 semanas, sobre el estado antioxidante en hígado de ratas Zucker *fa/fa*, se demostró que los niveles de mRNA y el contenido proteico de las enzimas SOD y GPx aumentó respecto a los animales sedentarios. Además, el entrenamiento consiguió revertir la reducida actividad hepática de dichas enzimas y aumentar la concentración de glutathion, indicando un marcado efecto del entrenamiento en el sistema endógeno antioxidante (Chang, Chen et al. 2004). Por otra parte, en un modelo de obesidad en rata por dieta rica en grasa, en los animales que realizaron un entrenamiento de natación 1 hora/ día, 5 días a la semana con una sobrecarga del 5% sobre el peso corporal, durante 8 semanas, hubo una disminución de moléculas inflamatorias como JNK y NF- κ B en

tejido adiposo y hepático, así como un menor estrés oxidativo en el retículo endoplásmico (da Luz, Frederico et al. 2011).

Resultados similares a los de nuestro estudio se encuentran en un trabajo realizado por Shin y sus colaboradores en mujeres obesas adultas, que llevaron a cabo un programa de entrenamiento físico aeróbico, 3 días a la semana durante 6 meses. Antes y después del entrenamiento, se sometieron a un ejercicio agudo de dos intensidades diferentes. De forma similar a lo que ocurre en el presente estudio, el programa de entrenamiento incrementó el sistema de defensa antioxidante en los eritrocitos (actividades SOD y GPx) y reguló el estrés oxidativo (MDA en suero) en respuesta al ejercicio agudo de moderada y alta intensidad (Shin, Lee et al. 2008).

En conclusión, de acuerdo a los resultados de nuestro estudio, el ejercicio agudo es un estrés físico que aumenta la oxidación y disminuye la capacidad antioxidante, causando una situación de estrés oxidativo en animales sedentarios, que no ocurre en animales que han realizado un programa de entrenamiento. Por tanto, dicho entrenamiento es capaz de generar un adecuado estado redox, que adapta a los animales obesos para una mejor respuesta frente al estrés físico agudo, elevando concretamente los niveles de GSH, lo que es una evidencia más de que el entrenamiento regular y moderado aumenta el estado antioxidante (McArdle and Jackson 2000) (De la Fuente, Hernanz et al. 2005) (Cases, Sureda et al. 2006) (Gomez-Cabrera, Domenech et al. 2008) y mejora los sistemas de reparación para revertir el estado oxidativo (Radák, Apor et al. 2003) (Sato, Nanri et al. 2003). Estos resultados obtenidos, por consiguiente, vienen a corroborar la hipótesis propuesta en cuanto a que los radicales libres que se generan en el ejercicio moderado y regular actúan como moléculas de señalización intracelular para iniciar la adaptación al ejercicio. Por el contrario, un ejercicio de intensidad extrema parece generar mayores niveles de radicales libres que sobrepasan las defensas antioxidantes celulares, causando daño oxidativo (Sachdev and Davies 2008). Así, el estrés oxidativo generado por un ejercicio regular moderado parece estar manifestando un efecto de hormesis, ya que promueve mecanismos beneficiosos mediante la adaptación y la regulación de los mecanismos antioxidantes, manteniendo la homeostasis oxidante-antioxidante celular y previniendo el daño oxidativo (Radak,

Chung et al. 2005) (Ji, Gomez-Cabrera et al. 2006) (Goto, Naito et al. 2007) (Radak, Chung et al. 2008 (b)).

Por otra parte, al igual que los estudios en ratas obesas entrenadas sobre los parámetros de estado oxidativo, los trabajos acerca del efecto de la realización de un ejercicio de entrenamiento en ratas Zucker *fa/fa* sobre parámetros de estado inflamatorio también son escasos, pero cabe destacar que en ellos se observa que el ejercicio regular y moderado también es capaz de controlar o mejorar distintos marcadores de inflamación crónica (Teixeira-Lemos, Nunes et al. 2011) (de Lemos, Oliveira et al. 2012). Así, en uno de los estudios, estas ratas son sometidas a un ejercicio de natación inicial (15 min/día, 5 días/semana), que fue gradualmente incrementado hasta un periodo de 1 hora/día (durante 1 semana), para finalizar realizando 1 hora/día, 3 días/semana, por un periodo adicional de 11 semanas, y se observa que 48 horas después de la finalización de la última ronda de ejercicio, los niveles de PCR disminuyen, mientras que los de adiponectina aumentan en plasma (de Lemos, Reis et al. 2007). También, Teixeira de Lemos y sus colaboradores demostraron que ratas obesas *fa/fa* jóvenes sometidas al mismo entrenamiento mencionado en el estudio anterior, disminuyeron los niveles circulantes de IL-6 y TNF- α , y también presentaron una disminución en la expresión de estas citoquinas en células pancreáticas (Teixeira de Lemos, Reis et al. 2009). Estos mismos autores y con el mismo protocolo de entrenamiento, también identificaron en ratas *fa/fa* jóvenes que los niveles circulantes de adiponectina aumentaban, mientras que disminuían los de MDA, PCR y ácido úrico. Por el contrario, ratas obesas sedentarias sometidas a un ejercicio de natación agudo exhaustivo presentaron un perfil inflamatorio agravado (Teixeira de Lemos, Pinto et al. 2011). En conclusión, el ejercicio físico regular y moderado con inicio en la edad juvenil en ratas obesas *fa/fa* posee propiedades anti-inflamatorias.

Como resumen general de este objetivo, cabe destacar que el programa de entrenamiento físico regular diseñado, basado en fases de adaptación, progresión y mantenimiento en cuanto a intensidad y duración, con finalización a la edad adulta, es capaz de preservar de manera incipiente la capacidad proliferativa en ratas obesas, atenuando los efectos de la inmunosenescencia que este modelo

animal presenta en dicha función, frente al estrés provocado por el efecto de un golpe de ejercicio agudo. También, dicho entrenamiento protege frente a una posible respuesta inflamatoria linfocitaria exacerbada provocada por los efectos del ejercicio agudo, modulando la producción de TNF- α .

Por otro lado, el entrenamiento genera un adecuado estado redox en animales obesos, mejorando concretamente los niveles de glutathione, que prepara al organismo para una mejor respuesta frente al estrés físico agudo. También se podría decir, que los efectos del entrenamiento regular se manifiestan antes sobre el estado redox de los animales, que sobre la función inmunitaria.

5.2. ESTUDIOS EN RATONES HEMBRA GENÉTICAMENTE OBESOS: CONDUCTUAL, INMUNOLÓGICO Y DEL ESTADO ANTIOXIDANTE EN EL ENVEJECIMIENTO

En este objetivo se ha realizado un estudio longitudinal en ratones hembra homocigotos (db/db), heterocigotos (db/+), y salvajes, a la edad juvenil (2-3 meses), edad adulta (6 meses) y edad madura (12 meses). En primer lugar se ha realizado un estudio conductual, y seguidamente se ha valorado la actividad “Natural Killer”, la capacidad proliferativa y los niveles de liberación de citoquinas, en leucocitos peritoneales, a cada una de las edades de estudio. También se han analizado los niveles de GSH total, y la actividad de la enzima GPx como parámetros de estado antioxidante. Además, se ha determinado la evolución del peso corporal y la glucemia, y se ha realizado un estudio de la esperanza de vida de los animales.

En este objetivo se han utilizado ratones *db/db* como modelo de obesidad y diabetes, ya que muestran una mutación en homocigosis del gen que codifica para el receptor de leptina, al igual que las ratas Zucker *fa/fa* estudiadas en el objetivo anterior. Al tratarse de un estudio longitudinal, para la valoración de los parámetros de función de las células inmunitarias es necesaria la extracción de las mismas del peritoneo, al ser una localización de la cual pueden obtenerse dichas células sin sacrificar al animal.

Nuestro grupo de investigación tiene amplia experiencia en estas extracciones y ya se sabía previamente la gran dificultad que supone el extraer suspensiones peritoneales en ratones macho por su agresividad, por lo que se han elegido ratones hembra para este estudio a lo largo de la edad.

Valoración de la evolución del peso corporal

La evolución del peso corporal analizada en el transcurso de las diferentes semanas de vida, muestra como desde la octava semana los ratones homocigotos obesos presentan un peso significativamente mayor que sus controles heterocigotos y que los salvajes, por lo que a esta edad juvenil ya parece estar establecido el modelo de obesidad. A partir de esa semana, se observa que estos ratones obesos comienzan a ganar peso de una manera acelerada hasta la semana 14, a partir de la cual aumentan su peso de manera más progresiva hasta la semana 28 de edad en la que comienzan a disminuir su peso progresivamente. De cualquier manera, el peso de estos ratones es siempre superior al de sus respectivos controles (excepto en la semana 63 donde existe una bajada de peso y no muestran diferencia respecto a los ratones heterocigotos), por lo que a lo largo de todo el estudio representan un modelo de obesidad. En otros trabajos realizados en este modelo de obesidad, también se comprobó como a la edad de 3 meses, los ratones obesos presentaban un peso corporal significativamente mayor que sus controles heterocigotos (Carley, Semeniuk et al. 2004) (Hafstad, Solevåg et al. 2006).

Por otro lado, la evolución en la ganancia de peso en los animales salvajes y heterocigotos es similar y progresiva, sin embargo los ratones que presentan la mutación en heterocigosis muestran ya desde la octava semana de edad un peso superior a los salvajes que carecen de mutación. Además, a lo largo de todo el estudio, continúan teniendo un mayor peso corporal que los salvajes, lo que parece indicar que a pesar de presentar la mutación en heterocigosis y no desarrollar obesidad, su comportamiento no es el mismo que el de un control salvaje, en lo que respecta a la ganancia de peso. Se volverá a hacer un comentario sobre la variación del peso corporal más adelante en el estudio conductual.

Estudio de la glucemia

La valoración de la concentración de glucosa en sangre, indica que a la edad adulta los ratones homocigotos obesos presentan una significativa hiperglucemia respecto a sus controles heterocigotos y salvajes. Respecto a esta valoración, en estudios previos también se ha encontrado una marcada elevación de glucosa en sangre, en ratones obesos respecto a sus controles heterocigotos a la edad juvenil (Carley, Semeniuk et al. 2004) (Hafstad, Solevåg et al. 2006), por lo que se puede deducir a que esa temprana edad, ya se establece la hiperglucemia en estos ratones obesos y se mantiene a la edad adulta. En cambio, a la edad madura a pesar de que los ratones obesos continúan mostrando valores superiores en esta medida, no se encuentran diferencias significativas con respecto a sus controles, al analizar en conjunto los tres grupos estudiados, probablemente debido a la heterogeneidad que se observa en esta medida en los animales obesos a esa edad.

Estudio conductual

Basándonos en la experiencia previa de grupos de investigación expertos en análisis de parámetros conductuales en animales (Johansson, Halldner et al. 2001), (Giménez-Llort, Fernández-Teruel et al. 2002) hemos llevado a cabo diferentes pruebas comportamentales en el modelo de obesidad en ratón. Se han abordado pruebas que evalúan la capacidad sensoriomotora de los animales, y pruebas que analizan la capacidad exploratoria y la aparición de posibles conductas de ansiedad, de las que se discuten de forma general los aspectos más relevantes.

Es importante aclarar que a pesar de haber repetido las mismas pruebas conductuales a lo largo de la edad, y aun sabiendo que los animales pueden recordar el entorno de los aparatos, esto no ha afectado para el correcto desarrollo de las pruebas, ni para la valoración del efecto de la obesidad.

● *Peso de los animales*

El **peso corporal** de los animales se registró antes del comienzo de la batería de pruebas, para garantizar que todos se encontraran activos de igual manera, como ya se

especificó. Lo más relevante de esta valoración, es que los ratones homocigotos a los 6 meses, aumentan de peso respecto a la edad juvenil, pero en el paso de los 6 a los 12 meses, sufren una bajada de peso corporal debido a la heterogeneidad que presentan, ya que algunos mostraron pesos característicos de la obesidad y otros no. Por este motivo, tanto a la edad juvenil como a la adulta, su peso es mayor que el de sus controles, en cambio a la edad madura solo es significativamente superior al de los controles salvajes.

Por su parte los animales salvajes y heterocigotos aumentan de peso de forma progresiva a lo largo de la edad, siendo significativo este aumento en heterocigotos respecto a salvajes, por lo que la mutación en heterocigosis les hace comportarse como animales intermedios respecto a la ganancia de peso, pero más próximos a los salvajes.

● Capacidad sensoriomotora

Los resultados obtenidos en la valoración del **reflejo visual** indican que la obesidad no afecta a este reflejo, así como tampoco el propio envejecimiento en esta cepa de ratones ya que todos los grupos de animales y a todas las edades lo presentan. Respecto al **reflejo de extensión posterior**, se aprecia un pequeño porcentaje de animales obesos, a la edad madura, que no lo presentan, por lo que existen algunos animales especialmente afectados en este reflejo extensor por las complicaciones asociadas al avanzado estadio de la obesidad, así como por el propio envejecimiento. Este resultado confirma que existe una heterogeneidad en estos animales obesos en la edad madura.

La prueba de la **tabla de madera** sirve para estudiar la capacidad de equilibrio postural y la coordinación motora de los animales (Baeza, De Castro et al. 2010). En primer lugar cabe destacar que únicamente los animales homocigotos presentan “freezing” o “congelación”, es decir, se quedan inmóviles o petrificados en el momento en el que se apoyan en la tabla al inicio de la prueba y a lo largo de la misma. El comportamiento de “freezing” se define como la ausencia completa de movimientos del cuerpo, siendo una respuesta normal de los animales ante un inevitable estímulo de miedo o temor (Brandao, Zanoveli et al. 2008), por lo que este estado es indicativo de ansiedad (Lopes, Azevedo et al. 2009). Como en la mayoría de los casos el “freezing” presentado al inicio de entrar en contacto con la tabla, pasaba a convertirse en una inmovilización del animal a lo largo de la prueba, al mencionar el término “freezing”

nos estamos refiriendo a una inmovilización inicial y prolongada. Por tanto, los animales obesos no son capaces de andar sobre la tabla nada más entrar en contacto con ella, y en algunos casos quedaban inmovilizados a lo largo de la prueba, por lo que es una muestra de la ansiedad de estos animales desde la edad de dos meses. Con el paso de los 2 a los 6 meses, un % mucho más elevado de los animales realiza “freezing”, en cambio a la edad madura se reduce esta conducta. A la edad adulta la obesidad está establecida en este modelo animal y está provocando en los animales un marcado efecto de ansiedad. A la edad madura, podría ser que la reducción en el % de animales que realizan “freezing” sea debida más bien al efecto del envejecimiento, que a la propia obesidad, dada la heterogeneidad del grupo. Así, debido en gran parte a este comportamiento de inmovilización, ningún animal obeso es capaz de completar la prueba a ninguna de las edades estudiadas. Los animales que no realizaron “freezing”, tampoco la completan por lo que muestran un estado de deterioro en la coordinación motora, necesaria para completar la prueba, desde la edad juvenil. Por otro lado, el % de animales salvajes y heterocigotos que completan la prueba es mayor a los dos meses y se va reduciendo a lo largo de la edad, por lo que se aprecia el efecto del envejecimiento, al igual que se observó en un trabajo previo de nuestro grupo con ratones ICR-CD1 (Baeza, De Castro et al. 2010). Los ratones heterocigotos muestran un comportamiento más deteriorado en este parámetro que los salvajes, ya que a la edad adulta ningún animal completa la prueba, pero no se observan diferencias entre estos dos grupos en el tiempo que tardan en completar la prueba. Estos datos apuntan a que la obesidad genera un claro estado de ansiedad en los animales y acelera el deterioro de la coordinación motora propio del envejecimiento.

La realización de esta prueba también nos indica que el equilibrio, medido como % de no caídas, está alterado desde la edad de dos meses en animales heterocigotos y homocigotos. El mayor % de animales obesos que no se caen de la tabla, se debe sobre todo a la realización de “freezing” a la edad adulta, por lo que solamente en aquellos animales que no lo realizaron estaríamos hablando de una medida real de equilibrio. A la edad madura, el % de no caídas en obesos es menor que a la edad adulta y puede estar debido al comportamiento de “freezing” y al envejecimiento, más que al efecto de la obesidad, dada la heterogeneidad del grupo. Como ningún animal salvaje ni heterocigoto presentó “freezing” en esta prueba, el dato de % de no caídas si es

totalmente representativo de medida de equilibrio y no de estado emocional. En los salvajes se aprecia el efecto del envejecimiento a la edad madura, ya que es cuando se empiezan a caer de la tabla. En ratones heterocigotos adultos y maduros existe un menor % de animales que no se caen respecto a la edad juvenil, resultado que podría indicar que efectivamente este grupo no se comporta como un control “real” sin mutación y presenta más heterogeneidad en los resultados.

La valoración del % de animales que recorren 1 o más segmentos, vuelve a estar influenciada por el “freezing” en ratones obesos, especialmente a la edad adulta. Con dos meses, el % de animales obesos que recorren segmentos es menor que en sus controles, por lo que se aprecia que la obesidad nuevamente afecta a la coordinación motora a una edad prematura. En ratones salvajes y heterocigotos se manifiesta el efecto del envejecimiento, ya que el % de animales que recorren segmentos disminuye con la edad, y más acusadamente en heterocigotos, por lo que está influyendo la mutación en heterocigosis en el deterioro de la coordinación motora.

Como era de esperar, el número de segmentos recorridos disminuye progresivamente con el envejecimiento en animales salvajes, y en heterocigotos y homocigotos está disminuido frente a los salvajes a la edad de dos meses, y algo más en obesos, lo que es indicativo de la influencia de la obesidad.

A continuación, se llevó a cabo la prueba de la **cuerda tirante**, que nos proporciona información acerca del vigor muscular, la coordinación motora (Miquel and Blasco 1978) y el tipo de prensilidad de los animales (Baeza, De Castro et al. 2010). En los resultados de este estudio, se observa que la obesidad está afectando al vigor muscular, ya que los ratones obesos presentan desde los 2 meses un % de no caídas mucho menor que sus controles. A los 6 y 12 meses todos se caen de la cuerda, lo que indica que con una obesidad muy establecida estos animales carecen del vigor analizado. Se podría pensar que estos ratones se caen de la cuerda a la edad adulta por el propio peso corporal, pero a la edad madura el peso de los animales en general no es tan elevado y tampoco se mantienen en ella, aunque en este caso puede estar incidiendo la mayor edad. Nuestro grupo ha realizado experimentos con ratones ICR-CD1 más pesados y con la misma cuerda, y el peso de los animales no ha afectado para la realización de la prueba y la obtención de resultados fiables. En los animales salvajes se

aprecia como a lo largo de la edad, se va perdiendo el vigor muscular paulatinamente, y nuevamente en ratones heterocigotos se ve una afectación desde los dos meses, aunque no tan marcadamente como en los homocigotos, y que va agravándose a lo largo de la edad, por lo que parece que también afecta al desarrollo de esta prueba su mutación en heterocigosis. En cuanto al tiempo de latencia de caída, los ratones heterocigotos y homocigotos se caen antes que los salvajes de 6 y 12 meses, parámetro que también indica la afectación de la obesidad y de la mutación en heterocigosis sobre el vigor analizado. A lo largo de la edad, el tiempo de latencia de caída va disminuyendo en heterocigotos, mientras que en homocigotos cabe destacar la disminución de este parámetro en el paso de los 2 a 6 meses.

El % de animales que recorren 1 o más segmentos en la cuerda nos da una idea de la coordinación motora de los animales, parámetro que está significativamente disminuido en ratones obesos a los 2 meses, respecto a sus controles. Así, los animales obesos que muestran el vigor muscular suficiente para mantenerse en la cuerda, presentan una menor coordinación motora por efecto de la obesidad. Por otro lado, se observa que este % disminuye con la edad en ratones salvajes, así como en heterocigotos, en los cuales se aprecia un mayor deterioro en este parámetro en relación a los salvajes desde la edad de 2 meses. También es indicativo el efecto temprano de la obesidad en el número de segmentos que recorren los animales, ya que es mucho menor en obesos que en heterocigotos a los 2 meses.

Por otra parte, la obesidad también afecta a la coordinación motora en el % de animales que completan la prueba, ya que en ratones obesos a la edad juvenil dicho porcentaje es significativamente menor que en sus controles. En ratones salvajes y heterocigotos se observa el efecto del envejecimiento en este parámetro, siendo mayor en heterocigotos a la edad madura.

Por último, los animales obesos muestran una menor capacidad de usar los máximos elementos posibles para mantenerse suspendidos en la cuerda (patas delanteras, traseras y cola) que sus controles a los 2 meses, lo que indica como la obesidad afecta a la prensilidad óptima de los animales. Como viene ocurriendo en líneas generales, el % de animales con prensilidad óptima disminuye con el envejecimiento en ambos controles, aunque se observa un mayor deterioro en ratones heterocigotos desde la edad de 2 meses.

En resultados previos de nuestro grupo de investigación con ratones ICR-CD1 que realizaron esta prueba a lo largo de la edad, y en la que se analizaba el número de animales que completaban con éxito la prueba sin caerse de la cuerda, se observó que dicho número disminuía progresivamente a medida que avanzaba la edad de los animales (Guayerbas, Catalán et al. 2002), al igual que sucede en esta cepa de ratones salvajes y heterocigotos, apreciándose en esto últimos un efecto claro además de la mutación en heterocigosis. También se ha comprobado que animales prematuramente envejecidos ya manifestaban una peor capacidad de realización de este test a las edades tempranas con respecto a aquellos no prematuramente envejecidos de la misma edad cronológica (Guayerbas, Catalán et al. 2002) (Guayerbas, Puerto et al. 2005 (a)), de forma similar a lo que sucede en los animales obesos.

Asimismo, también existe un deterioro prematuro de las habilidades sensoriomotoras estudiadas en ratones ovariectomizados, que se han propuesto como modelo de envejecimiento prematuro (Baeza, De Castro et al. 2010), equiparándose a lo que ocurre en este modelo de obesidad en ratón.

• Comportamiento exploratorio y respuestas de ansiedad

La primera prueba que se realizó dentro de este bloque fue la **prueba de la neofobia**. En ella, el % de animales que presentan “rearing”, está disminuido en animales obesos ya desde la edad de los 2 meses, respecto a sus controles, y a la edad adulta ningún ratón obeso presenta esta conducta. A los 12 meses, sí se observa alguna conducta de “rearing” en estos animales, debido posiblemente a la heterogeneidad encontrada en el grupo, especialmente en el peso corporal, por lo que este hecho conductual no se debería fundamentalmente al efecto de la obesidad. Dado que esta conducta de “rearing” la presentan todos los ratones salvajes a cualquiera de las edades estudiadas, así como los heterocigotos (a excepción de los 6 meses), la obesidad, parece que acelera significativamente el deterioro de esta capacidad exploratoria vertical. El número total de “rearings” realizados en esta prueba resultó ser semejante en ambos grupos de animales control. Los animales homocigotos por efecto de la obesidad mostraron por su parte una disminución en el número de “rearings” realizados a la edad de 2 meses, respecto a sus controles.

La actividad exploratoria horizontal valorada como número de esquinas visitadas, es semejante en los animales salvajes y heterocigotos y va disminuyendo con la edad. También se observa que la obesidad deteriora esta actividad desde la temprana edad de 2 meses hasta los 12 meses. Aunque se evaluó la conducta de “grooming”, los resultados no aportaron información relevante.

La conducta observada en los animales obesos con una deteriorada actividad exploratoria vertical y horizontal puede ser indicativa de un comportamiento de ansiedad.

En el **campo abierto** y el **tablero de agujeros** se valoran las actividades exploratorias horizontal y vertical, el comportamiento de “grooming” y la presencia de bolas fecales y orina. Sin embargo, el tablero de agujeros incorpora un elemento más, la actividad exploratoria dirigida, es decir, la que implica la atención que muestran los animales en los cuatro agujeros que se encuentran situados en el centro del tablero.

En ambas pruebas, el % de animales que presentan “freezing”, entendido el mismo como la ausencia completa de movimientos del cuerpo debido al miedo o temor que experimentan a lo desconocido nada más entrar en contacto con los aparatos, es superior en el grupo de homocigotos, en relación a los grupos control, desde la edad juvenil. Así, a los 6 y 12 meses todos los ratones obesos experimentan esta conducta. Este dato está indicando que la obesidad provoca una conducta de ansiedad en los animales frente a lo desconocido. Los ratones salvajes no muestran esta conducta de “freezing” en el campo abierto, pero sí en el tablero de agujeros a los 2 meses, probablemente debido a su corta edad. Cabe destacar que los animales heterocigotos, a pesar de ser controles presentan “freezing” desde cualquiera de las edades, el cual va aumentando con la vejez en el tablero de agujeros, por lo que representa un grupo más ansioso que lo salvajes.

Respecto al tiempo total de inmovilidad, que representa el tiempo en el que el animal se para y queda inmóvil a lo largo de las pruebas, cabe destacar que ningún animal salvaje se inmoviliza en el campo abierto, por lo que en el tiempo de duración de la prueba no dejan de explorar el aparato. Dado que en el caso del tablero de agujeros alguno de estos animales sí se inmoviliza a los 2 meses, parece que a esta corta edad

este aparato provoca una mayor situación de ansiedad que el campo abierto. En cualquier caso, esa inmovilización no supone un porcentaje elevado de tiempo, respecto al total de la prueba. Los ratones homocigotos muestran inmovilidad desde los 2 meses, y aumenta considerablemente el tiempo de la misma a los 6 y 12 meses, hasta el punto que pasan casi la totalidad de las pruebas inmóviles y sin explorar. La inmovilización también se presenta en ratones heterocigotos desde los 2 meses, y en el caso del tablero de agujeros aumenta el tiempo de dicha inmovilización con la edad. La obesidad por tanto está influyendo en la capacidad de exploración de los animales, ya que los ratones homocigotos muestran una ausencia prácticamente total de la misma a lo largo de la prueba.

En el campo abierto, respecto al % de animales que salen del centro del aparato, se observa que todos los animales salvajes lo abandonan a las tres edades de estudio, pero algunos heterocigotos no lo hacen a los 6 meses, lo que nos indica una vez más que no se comportan como auténticos controles. A la edad de 2 meses la mayoría de los animales obesos abandonan el centro del aparato, en cambio, a los 6 y 12 meses muy pocos lo hacen, debido a que todos presentan “freezing” y la mayoría una inmovilidad por lo que no abandonan el centro para explorar el resto del aparato. Esto parece indicar que con la obesidad está teniendo lugar una falta de curiosidad y de exploración por lo desconocido a esas edades.

Por otra parte, el tiempo que tardan los animales salvajes en abandonar el centro son pocos segundos en las tres edades estudiadas. Esto podría interpretarse como una conducta de ansiedad, pero por el contrario y tras estar en permanente contacto con los animales, observamos que se trata de una cepa de ratones muy activa, por lo que este comportamiento debería interpretarse como indicativo de su elevada actividad y su capacidad por la exploración. Los ratones homocigotos a los 2 meses de edad tardan más en salir del centro que sus respectivos controles. En este caso, la obesidad provoca una respuesta de miedo y petrificación en los animales, lo que genera mayor retraso en la salida del centro a la edad juvenil, efecto que se diluye al avanzar la edad. Por tanto, son muy pocos los animales que salen del centro del aparato a los 6 y 12 meses, en cambio lo hacen también con menor retardo, en especial a la edad madura. Por su parte, los ratones heterocigotos presentan a cada una de las edades, un tiempo mayor de salida

del centro respecto a los salvajes, lo que indica su menor capacidad de activación y de salida a explorar respecto a los salvajes.

El % de animales que entra en la periferia del campo abierto, es indicativo también de la exploración que realizan los animales. Así, todos los ratones salvajes a cualquiera de las edades entran en la periferia del aparato para la exploración, motivados por lo desconocido. Los ratones heterocigotos se comportan igual que los salvajes, excepto a la edad de 6 meses donde no todos llegan a entrar. También se observa el efecto de la obesidad en los ratones homocigotos, ya que el % de animales que entra en periferia es menor que el de los grupos control ya desde los dos meses en adelante. Este % disminuye bruscamente en el paso de los 2 a los 6 y 12 meses, por lo que a partir de la edad adulta, la mayoría de los animales obesos no entra en la periferia, disminuyendo así la exploración por el aparato.

Por otro lado, los resultados muestran que los animales salvajes tardan solo unos segundos en entrar en la periferia del aparato, por su mayor actividad y capacidad de exploración, como ya se ha comentado, en cambio los obesos tardan como cinco veces más que los salvajes en entrar cuando tienen 2 y 6 meses de edad. A la edad madura, este tiempo se reduce, posiblemente debido a la heterogeneidad del grupo, pero sigue siendo superior al de los salvajes. Los ratones heterocigotos, presentan un tiempo de entrada en la periferia muy superior a los salvajes en todas las edades. Estos resultados indican que tanto la obesidad como la mutación *db/+* de los ratones heterocigotos, está provocando un retraso en la entrada a la periferia del aparato para su exploración.

La deambulación total de los animales homocigotos en ambos aparatos es significativamente menor a cualquiera de las edades estudiadas, respecto a sus controles, lo que es indicativo de nuevo del efecto de la obesidad sobre la actividad horizontal. La elevada inmovilización de estos animales, contribuye en gran parte a una reducida deambulación por los aparatos. Los animales salvajes ven reducida esta deambulación por efecto del envejecimiento, y los heterocigotos muestran un comportamiento diferente de los salvajes, en especial a los dos meses y a los 6 meses en el tablero de agujeros, donde muestran una menor deambulación.

Tanto la deambulación externa como la interna en animales obesos se encuentran más reducidas respecto a sus controles en cualquiera de las edades estudiadas, en ambos aparatos. En los animales salvajes la deambulación externa disminuye con el envejecimiento, al igual que la interna. En cuanto a los animales heterocigotos, cabe destacar una deambulación externa e interna menor en el campo abierto respecto a los salvajes a los 2 meses, en cambio en el resto de edades su comportamiento es similar. En el tablero de agujeros, estos ratones presentan una deambulación externa algo mayor a los 2 meses respecto a los salvajes, estando más igualada a los 6 y 12 meses. En cambio, la deambulación interna está más reducida a los 2 y 6 meses respecto a los salvajes. Todo esto indica que la obesidad afecta reduciendo en gran medida la actividad horizontal de los animales por los aparatos, y que la mutación en heterocigosis hace que estos ratones, como ya se ha indicado para otros parámetros conductuales, no se comporten igual que los salvajes.

Una mayor deambulación externa por los aparatos frente a la interna, es una evidencia de un estado de mayor ansiedad. En el campo abierto, los resultados parecen indicar que existe mayor deambulación externa de los animales obesos a los 2 meses, y a los 6 y 12 meses, sin embargo a estas últimas edades solo dos y tres animales respectivamente deambulan por la zona externa del aparato, lo que se relaciona con que debido al miedo y a las inmovilizaciones en la zona interna del aparato, pocos consiguen llegar a la periferia. En este caso a los 6 y 12 meses el miedo es la razón por la que ni siquiera llegan a deambular la mayoría por la periferia, en gran parte debido a que petrifican en la zona central del aparato. De hecho cuando se valora el % de deambulación interna respecto a la total, se observa que en el campo abierto es superior en animales obesos, significativamente a la edad de 6 y 12 meses respecto a sus controles, por la razón que se acaba de comentar, y porque la mayoría de los animales por el miedo deambula poco, especialmente en la zona interna del aparato.

En el tablero de agujeros, la interpretación es diferente. Los animales obesos deambulan más por la periferia del aparato porque es la región donde se colocan para comenzar la prueba. El miedo les incita a no abandonar la periferia, ya que es la zona más protegida, al estar las paredes del aparato, y por eso en esta prueba deambulan más por esa zona. Este comportamiento se conoce como tigmotaxis o tendencia a realizar desplazamientos en contacto con las superficies verticales. De hecho, los resultados

indican que por la zona interna del aparato deambula un número reducido de animales a los 6 y 12 meses. A los 2 meses, el número de animales que deambulan por la periferia y la zona interna del aparato es casi idéntico, y se aprecia una mayor deambulación externa, lo que es indicativo del efecto de la obesidad, que provoca miedo en estos animales. Así, el % de deambulación interna respecto a la total es menor en ratones homocigotos y heterocigotos respecto a los salvajes a las tres edades de estudio, y en el caso de los obesos disminuye además con la edad.

La actividad exploratoria vertical también se ve afectada por la obesidad, lo que se refleja en el menor % de animales homocigotos que presentan conducta de “rearing”, respecto a sus controles desde la edad de 2 meses, en ambos aparatos. De hecho a los 6 y 12 meses ningún animal la presenta en las pruebas realizadas en ambos aparatos. Asimismo, el número total de “rearing” a los dos meses es significativamente menor en los animales obesos, respecto a sus controles, y la latencia en realizar el primer “rearing” es mucho mayor, parámetros que de nuevo son indicativos de como la obesidad está afectando a la actividad vertical de los animales. Los ratones salvajes, por el contrario, presentan “rearing” en todas las edades de estudio, cuyo número disminuye con el envejecimiento, principalmente en el campo abierto en el paso de los 2 a los 6 meses, y la latencia del primer “rearing” aumenta con la edad.

Los animales heterocigotos no muestran el mismo comportamiento que los salvajes, concretamente en el campo abierto, ya que a los 6 y 12 meses no todos presentan conducta de “rearing”. Además, a los dos meses en este aparato el número de “rearings” es menor que en los salvajes, así como aumenta la latencia del primer “rearing” a esta temprana edad respecto a los salvajes.

En el tablero de agujeros, la exploración de los mismos constituye una medida específica del comportamiento exploratorio dirigido, que también se conoce con el término anglosajón “novelty-seeking” (Escorihuela, Fernández-Teruel et al. 1999). El % de animales homocigotos que explora los agujeros del tablero es menor a los 2 y 6 meses, respecto a sus controles. A la edad madura, ningún animal obeso realiza esta exploración, mientras que todos los ratones salvajes y heterocigotos la realizan. También, el número total de exploraciones es menor y el tiempo de latencia hasta

explorar el primer agujero es mayor en ratones obesos respecto a sus controles, a los 2 y 6 meses. Los ratones heterocigotos muestran un número total de exploraciones mayor a los 2 meses respecto a salvajes, pero el tiempo de latencia hasta explorar el primer agujero también se incrementó. Por tanto, la obesidad está afectando significativamente en el interés o la capacidad del animal (o ambos) para interactuar con su entorno, y también está influyendo en los ratones heterocigotos, en especial a los 2 meses.

La conducta de “grooming”, es una conducta de acicalamiento, que implica una acción de reorganización del pelaje por parte del animal. Este comportamiento que concierne al cuidado y limpieza de la superficie corporal, constituye un intento de eliminar la ansiedad. El % de animales obesos que realiza esta conducta en el campo abierto, es menor en ratones homocigotos a los 6 y 12 meses respecto a sus controles, posiblemente debido en su mayor parte a la inmovilidad, en cambio es mayor a los 2 meses respecto a los salvajes. En el tablero de agujeros, esta conducta es mayor que en salvajes a los 6 y 12 meses, pero menor que en heterocigotos. Además, se observa un aumento en el % de animales salvajes que realiza esta conducta con la edad en el campo abierto. El % de ratones heterocigotos que lo realiza es mayor que en salvajes a los 2 y 6 meses en el campo abierto y en las tres edades en el tablero de agujeros.

El número total de “groomings”, es mayor en el campo abierto, en animales homocigotos respecto a salvajes a los dos meses, y en heterocigotos también a las tres edades respecto a salvajes. En los salvajes, este número aumenta con la edad en este aparato. En el tablero de agujeros no se encontraron diferencias entre grupos a las distintas edades.

La valoración del tiempo de latencia, hasta realizar el primer grooming en el campo abierto, muestra que los ratones obesos tardan menos en realizar un primer “grooming” que los salvajes a los 2 meses, y más a los 6 y 12 meses, observándose que aumenta este tiempo en el paso a los 6 y 12 meses. En heterocigotos esta latencia es menor que en salvajes a cualquiera de las edades. En el tablero de agujeros, este tiempo es mayor en ratones heterocigotos y homocigotos a las 3 edades respecto a salvajes.

Aunque parece no existir un patrón establecido en la conducta de “grooming” en los animales, se puede decir que en ratones salvajes esta conducta no representaría un estado de ansiedad, si no que sería más bien de emotividad, ya que no se han observado

patrones de ansiedad en cuanto a la latencia de la salida del centro en el campo abierto, ni en la deambulación, que aunque estuviera aumentada en la periferia también representaba mayor actividad vertical por la conducta de “rearing”. Por tanto, en animales salvajes no se puede afirmar que la conducta de “grooming”, vaya asociada a la aparición de patrones de ansiedad. Por el contrario, sí se observa que la obesidad genera un aumento de la conducta de “grooming” principalmente a la edad juvenil, lo que sí se podría interpretar como un estado de ansiedad, ya que también han mostrado miedo e inmovilización en los parámetros analizados anteriormente, y existe una influencia clara de la obesidad en el estado emocional de los animales. El que no exista este patrón de “grooming” tan marcado en los ratones obesos a los 6 y 12 meses, podría ser más indicativo de la conducta apática de los animales y de su inmovilización, pero no de un menor estado de ansiedad.

El % de animales que defecan es mayor en ratones obesos a los 2 y 6 meses respecto a sus controles (excepto a los 2 meses en campo abierto que no hay diferencias respecto a los heterocigotos). A la edad madura, este % se reduce significativamente respecto a los 2 y 6 meses. Este parámetro no se ve afectado por el envejecimiento en ratones salvajes, y en ratones heterocigotos está más aumentado que en salvajes a los 2 meses en el campo abierto, y a los 6 meses en el tablero de agujeros. El número de bolas fecales apenas se modifica, excepto en ratones obesos en el tablero de agujeros a la edad de 2 y 12 meses, donde es mayor respecto a los salvajes. No se obtuvo información relevante en los datos registrados de orina.

Teniendo en cuenta que el envejecimiento implica un menor comportamiento de defecación y un aumento en la incontinencia urinaria, parece que los ratones salvajes en esta cepa a la edad madura no han comenzado a padecer estos síntomas característicos de la edad. A la vista de estos datos y los anteriormente comentados y ayudados de la observación de los animales en la realización de las pruebas, se puede deducir que lo que parece estar ocurriendo en los ratones obesos, es que el aumento de la defecación es una consecuencia fisiológica del miedo que presentaron estos animales a un entorno desconocido. Por último, los ratones heterocigotos muestran un comportamiento más parecido a los homocigotos.

Finalmente, con la prueba del **laberinto en T** se analizan las capacidades exploratorias vertical y horizontal de los animales en un entorno totalmente diferente al campo abierto y al tablero de agujeros, en cuanto a forma y dimensiones. Los datos obtenidos en esta prueba apoyan los resultados de las pruebas anteriores, es decir, el % de animales obesos que presentan “freezing” en el momento en que se colocan en el aparato, es mayor que el obtenido en los controles a las tres edades de estudio, por lo que la obesidad está generando un efecto de ansiedad en estos animales ante un entorno desconocido. A la edad de 6 y 12 meses es cuando un mayor % de animales se ve afectado por el “freezing” o congelación. Además, los ratones homocigotos muestran una reducción en el comportamiento exploratorio como se pone de manifiesto por el menor % de animales que cruzan la intersección, el mayor tiempo que tardan en cruzar dicha intersección, especialmente a los 6 y 12 meses de edad, y por el menor % de animales que completan la prueba, es decir, que exploran todo el laberinto, así como por el mayor tiempo que tardan en completar la prueba, respecto a sus controles.

Por su parte, los ratones heterocigotos no se comportan como los salvajes, debido a que alguno presenta comportamiento de “freezing” a los 2 y 6 meses, y a que el tiempo que tardan en cruzar la intersección es mayor en especial a los 2 meses, respecto a los animales salvajes.

Otra evidencia de que los datos obtenidos en esta prueba corroboran los resultados de las otras pruebas, es que la obesidad también está afectando a la actividad exploratoria vertical, ya que en animales obesos no se observa conducta de “rearing”, lo que es lógico encontrar debido al tiempo total de inmovilidad de estos animales. El comportamiento de los ratones heterocigotos respecto a esta conducta exploratoria vertical difiere significativamente de la que presentan los salvajes, ya que es menor a los 2 y 6 meses de edad. Otro dato significativo es que únicamente los animales obesos presentan conducta de “grooming”, y al tratarse el laberinto en T de una prueba que mide ansiedad, y a la vista de los resultados comentados anteriormente sobre la actividad horizontal de esta prueba, se puede decir que esta conducta es indicativa de un patrón de ansiedad establecido. Por último, se observa como un mayor % de ratones obesos defeca en el laberinto a los 2 meses, en comparación con sus controles, consecuencia del miedo y la ansiedad que genera este aparato en dichos animales. No se

observaron diferencias significativas en el número de bolas fecales y tampoco se encontró información de relevancia en los datos de orina.

Esta prueba resulta muy útil para detectar estados de envejecimiento prematuro en ratones, como ocurre con el modelo de envejecimiento prematuro en ratón que en los últimos años se viene estudiando en nuestro laboratorio. Así, se ha puesto de manifiesto que el laberinto en T es muy eficaz para diferenciar la “edad biológica” de ratones con la misma edad cronológica. Así, aquellos ratones con envejecimiento prematuro (y que poseen, por tanto, una mayor edad biológica) realizan con menos éxito el test (tardan más tiempo en alcanzar la intersección del laberinto) en comparación con los ratones que no tienen este envejecimiento prematuro y que son de la misma edad cronológica (Alvarado, Álvarez et al. 2006) (Viveros, Arranz et al. 2007) (Vida and De la Fuente 2013). Esto que ocurre en ratones prematuramente envejecidos podría equipararse al resultado que se ha obtenido en ratones obesos, por lo que de acuerdo a esta prueba, pueden representar un modelo de envejecimiento prematuro.

Se ha comprobado, en estudios previos, que los parámetros valorados en este estudio conductual se deterioran con el envejecimiento cronológico en ratones ICR-CD1 (Guayerbas 2003), y de forma prematura en un modelo de ovariectomía en ratón (Baeza, De Castro et al. 2010), al igual que ocurre en este modelo animal de obesidad.

Como resumen general de la batería de pruebas de conducta analizada se podría decir que, la obesidad acelera el deterioro de las capacidades sensoriomotoras, y de la actividad exploratoria horizontal y vertical, y afecta especialmente a la conducta emocional generando un estado de miedo y ansiedad en los animales, desde la temprana edad de 2 meses. Por tanto, la obesidad provoca un deterioro motor y cognitivo acelerado, por lo que constituye un modelo de envejecimiento conductual prematuro. En cambio, el deterioro observado de algunos de los parámetros en animales salvajes se debe al propio envejecimiento. Por su parte, los animales heterocigotos presentan un deterioro conductual más similar a los ratones homocigotos en la mayoría de los parámetros, por lo que no se comportan como auténticos controles.

La conexión entre el elevado peso corporal y los desórdenes mentales es un campo de estudio que está en expansión. En este sentido, se sabe que la obesidad se ha relacionado con la depresión, y otros desórdenes psiquiátricos como conducta antisocial, episodios maníacos, pánico, desorden bipolar, así como trastornos obsesivo compulsivos (Simon, Von Korff et al. 2006) (Petry, Barry et al. 2008). También se ha asociado esta patología con los desórdenes de ansiedad (Brumpton, Langhammer et al. 2013), hecho que se corrobora con los resultados del presente estudio, y con los de un estudio reciente en un modelo de obesidad inducida por dieta hipercalórica (André, Dinel et al. 2014), aunque los mecanismos exactos que implican esa asociación todavía no están aclarados (Lykouras and Michopoulos 2011).

Valoración de las funciones inmunitarias en leucocitos peritoneales

En lo que respecta a la **actividad “Natural Killer” (NK)** de los leucocitos peritoneales, no se observan diferencias significativas entre los grupos estudiados a la edad de 2 y 6 meses. A la edad madura, esta actividad en animales obesos es mayor que en sus controles salvajes. Por otro lado, tanto en ratones heterocigotos como homocigotos, existe un incremento de esta actividad a los 12 meses respecto a los 2 meses de edad. A pesar de que no se ha encontrado ningún trabajo publicado con este modelo animal en el que se estudien las células peritoneales, en un estudio realizado también en ratones obesos *db/db* con 8-12 semanas de edad, se observó que el número de células NK totales y la actividad citotóxica estaba disminuida en leucocitos esplénicos (Tian, Sun et al. 2002). Por el contrario, Chandra comprobó que la actividad NK de leucocitos esplénicos de ratones *ob/ob* estaba marcadamente aumentada (Chandra 1980). Por otro lado, en un trabajo ya comentado, en el que se utilizaron ratones ICR-CD1 obesos por ingestión de una dieta rica en grasa durante la adolescencia, se observó que los leucocitos peritoneales de estos animales, en comparación con los controles no obesos, mostraban una deteriorada actividad NK a la edad adulta (Hunsche, Hernandez et al. 2015). Por tanto, los resultados de la actividad NK son controvertidos, debido posiblemente al tipo de obesidad, la edad en la que se lleva a cabo la determinación de esta actividad, y el método de evaluación, entre otras cosas. De hecho, en un estudio con ratones prematuramente envejecidos se observó que

a los 8 meses de edad no se encontraban diferencias en la actividad NK de leucocitos peritoneales, respecto a los ratones no prematuramente envejecidos (Guayerbas, Puerto et al. 2005 (b)). En cambio, en otros estudios la actividad NK de los leucocitos peritoneales en ratones prematuramente envejecidos sí que se encontraba más deteriorada que en los no prematuramente envejecidos (Pérez-Álvarez, Baeza et al. 2005) (Alvarado, Álvarez et al. 2006) (Viveros, Arranz et al. 2007). En cuanto a los estudios realizados en el envejecimiento cronológico, existe mayor consenso en cuanto a que esta actividad NK está disminuida en ratones ICR-CD1 en los leucocitos peritoneales de ratones viejos y muy viejos en comparación con los adultos (Arranz, Caamaño et al. 2010) (De la Fuente and Miquel 2009) (Arranz, De Castro NM et al. 2010).

Por otra parte, es importante tener en cuenta que en los animales heterocigotos y principalmente en los obesos debido a la cantidad de grasa abdominal, se presentaba una gran dificultad en la obtención de la suspensión peritoneal sin sacrificar los animales, ya que la mayor parte del contenido de la solución de Hank junto con las células peritoneales quedaba retenido entre la grasa y los órganos de la cavidad abdominal. Por este motivo, es lógico pensar que estos parámetros de función inmunitaria no están analizados en la población celular peritoneal global, sino en la subpoblación que se pudo extraer y que, posiblemente, estaría constituida por las células menos activas, ya que las más activadas se habrían quedado adheridas o retenidas en la grasa abdominal. Es posible que los resultados hubieran sido diferentes si se hubiera dispuesto de la población leucocitaria total.

A la vista de los resultados obtenidos, la actividad NK en leucocitos peritoneales, obtenidos sin el sacrificio del animal en este modelo de obesidad genética en ratón, no constituye un buen marcador de envejecimiento prematuro en estos animales. Las diferencias que se observan a la edad madura en ratones obesos respecto a salvajes, podrían estar indicando que la muestra obtenida en estos animales, al contar ya muchos de ellos con una pérdida de grasa abdominal y masa muscular y ser un grupo más heterogéneo, sí podría ser algo más representativa de la población peritoneal total. En los animales obesos podrían tener lugar, también, mecanismos de adaptación en los

que las células NK necesitarían mayor actividad para hacer frente a infecciones, en esta edad madura.

En cuanto a la **capacidad proliferativa** representada como el % de linfoproliferación, y con la población celular que se pudo obtener del peritoneo, se observó un comportamiento diferente en los animales obesos a la edad de 2 y 6 meses, dependiendo del mitógeno con que se hayan estimulado los linfocitos. A la edad juvenil, los animales obesos son capaces de responder con una proliferación aumentada respecto a los salvajes y heterocigotos, cuando la estimulación es con Con A. En cambio con LPS, la respuesta es más baja que en salvajes. Con seis meses de edad, los ratones obesos responden con mayor proliferación al estímulo con ConA, y menos con LPS, pero en ambos casos dicha proliferación está disminuida frente a salvajes, siendo significativa en el caso del LPS. A la edad madura, los animales obesos presentan una proliferación más disminuida respecto a los salvajes.

El patrón de respuesta proliferativa que siguen los animales salvajes es típico del envejecimiento, ya que aumenta a la edad adulta, y a la madura disminuye (Guayerbas 2003). Los animales heterocigotos, por su parte, desde los dos meses y hasta la edad madura muestran una menor capacidad proliferativa que los salvajes, por lo que de nuevo esta función apunta a que la mutación en heterocigosis afecta a la capacidad proliferativa de manera temprana y no se pueden considerar como auténticos controles. Además, se empiezan a igualar a los a los homocigotos desde los seis meses, al igual que se observó en el estudio de la proliferación en rata Zucker *fa/fa*. Por tanto, la evolución a lo largo de la edad en heterocigotos es similar a la de los salvajes, aumenta a la edad adulta y disminuye a la madura, pero de forma más deteriorada.

Se puede concluir que la proliferación en ratones obesos está alterada. Parece que a la edad juvenil y adulta los linfocitos de estos animales muestran una capacidad de respuesta exacerbada cuando se estimulan con Con A, que por el contrario está más suprimida con LPS. Por tanto, a la edad juvenil la capacidad proliferativa en respuesta a Con A está desregulada. Por otro lado, desde la temprana edad de 2 meses los ratones obesos muestran una capacidad proliferativa deteriorada en comparación con sus controles salvajes y heterocigotos, que es más marcada respecto a salvajes. A la vista de los resultados, se puede decir que la población peritoneal extraída ha sido

suficientemente representativa en el análisis de este parámetro como para observar el deterioro prematuro de esta función proliferativa en animales obesos. En otro trabajo realizado en ratones *db/db* previamente inmunizados, también se observó una disminuida proliferación de células estimuladas en este caso esplénicas (Palmer, Aurrand-Lions et al. 2006), lo que está de acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio, a pesar de la diferente procedencia de las células y los métodos de análisis. En un estudio donde se utilizaron ratones *ob/ob*, la respuesta proliferativa de los esplenocitos estimulados con Con A resultó ser más elevada que en los controles lean a la edad juvenil, hecho que se reproduce en nuestros resultados. De la misma manera, y a esta misma edad la estimulación con LPS mostró que la proliferación de los esplenocitos de ratones obesos no presentaba diferencias respecto a los ratones lean (Boissonneault and Harrison 1994), al igual que en nuestros resultados con el modelo de obesidad *db/db*.

Los **niveles de citoquinas** liberados se analizaron en los sobrenadantes de cultivos de 24 horas, con objeto de comprobar si existe una respuesta inflamatoria más temprana. Por su parte, en las ratas *fa/fa* los análisis de las citoquinas se realizaron en cultivos de 48 horas. En cuanto a la estimulación con **Con A**, los ratones homocigotos presentan una menor liberación de **IL-2** que sus controles heterocigotos y salvajes a las tres edades estudiadas, mientras que los heterocigotos muestran esa disminución respecto a los salvajes, la cual es estadísticamente significativa a la edad de 6 meses. A la vista de los resultados, se puede indicar que existe un deterioro en la liberación de IL-2 con la edad en todos los grupos de animales, y además, la obesidad acelera este deterioro. Los ratones heterocigotos no se comportan como auténticos controles en este parámetro, ya que muestran un mayor deterioro que los salvajes.

Respecto a la **IL-1 β** , los ratones obesos muestran mayores niveles de esta citoquina proinflamatoria en todas las edades, siendo estadísticamente significativo este aumento respecto a sus controles, a los 2 y 12 meses de edad. Los ratones heterocigotos se comportan de manera similar a los salvajes, excepto a la edad madura donde la liberación de IL-1 β está aumentada. En el paso de los 6 a los 12 meses se observa un aumento en los niveles de esta citoquina en los salvajes, debido al propio

envejecimiento, mientras que en ratones homocigotos, la obesidad parece aumentar más aún estos niveles.

En cuanto a la liberación de **TNF- α** , se aprecia que los animales obesos y heterocigotos muestran niveles más elevados de esta citoquina proinflamatoria que los salvajes, a las tres edades, en especial a los 12 meses. De nuevo, en el paso de los 6 a los 12 meses se observa un aumento de los niveles de esta citoquina en los salvajes, posiblemente debido al envejecimiento. Los ratones heterocigotos y homocigotos también muestran a la edad madura una liberación de esta citoquina significativamente superior que a los 2 y 6 meses.

En relación a la **IL-10**, los ratones obesos muestran mayores niveles de esta citoquina respecto a los salvajes a los 2 meses, en cambio a los 6 meses presentan una disminución. Es a la edad madura cuando estos ratones homocigotos muestran una liberación de esta citoquina significativamente aumentada respecto a sus controles. Por su parte, los ratones heterocigotos se comportan de manera similar a los salvajes, excepto a los 12 meses donde la liberación de esta citoquina es mayor.

Respecto a la estimulación con **LPS**, los niveles de **TNF- α** están muy aumentados en ratones heterocigotos y homocigotos respecto a los salvajes, a las tres edades de estudio, y a los 12 meses este aumento también es mayor en homocigotos respecto a heterocigotos. En los tres grupos de animales se observa un aumento progresivo de los niveles de esta citoquina con la edad, sin embargo, es en los ratones obesos en los que existen mayores niveles de liberación de esta citoquina. Por otro lado, en general, los ratones obesos y heterocigotos muestran una mayor liberación de **IL-1 β** que sus controles salvajes. Además, a la edad madura los ratones obesos aumentan significativamente estos niveles respecto a los heterocigotos y respecto a los 2 y 6 meses de edad. En relación a la liberación de **IL-10**, en general, los ratones heterocigotos se comportan como los salvajes y en los obesos se observa una ligera elevación a los 2 y 6 meses respecto a sus controles, siendo a los 12 meses donde los niveles de esta citoquina anti-inflamatoria están significativamente aumentados respecto a sus controles y a la edad de 2 y 6 meses.

En general, en los ratones obesos se observa una menor liberación de IL-2 por los leucocitos peritoneales, que podría explicar, en parte, el deterioro en la capacidad de proliferación. Asimismo, desde la edad de dos meses estos animales se caracterizan por presentar un estado inflamatorio asociado a los niveles de IL-1 β y TNF- α que aumenta con la edad. La mayor liberación de IL-10 en los ratones obesos podría representar un mecanismo de compensación del estado de inflamación a la edad juvenil y madura, mientras que a la edad adulta, podría estar comprometido dicho mecanismo.

Por otra parte, en el trabajo ya mencionado en un modelo de obesidad en ratón por dieta rica en grasa, se observó una deteriorada capacidad proliferativa en respuesta a Con A y LPS de los leucocitos peritoneales así como una menor liberación de IL-2 e IL-10 en respuesta a Con A, a la edad adulta, lo que está de acuerdo con los resultados del presente trabajo (Hunsche, Hernandez et al. 2015). También, en otro estudio con ratones *db/db* jóvenes se comprobó que los macrófagos peritoneales producían mayor cantidad de IL-1 β en respuesta a LPS, respecto a los animales control (*db/+*) (O'Connor, Satpathy et al. 2005), lo que se reproduce en nuestros resultados. Por su parte, Bhat y sus colaboradores observaron que ratones obesos, en este caso *ob/ob*, mostraban una reducción en los niveles de liberación de IL-2 por los esplenocitos estimulados con Con A, respecto a sus controles salvajes (Bhat, Hamm et al. 2003), al igual que ocurre en nuestros resultados. Es importante destacar que nuestro grupo de investigación ha demostrado que en los ratones viejos y muy viejos, el perfil de citoquinas basal producido por los leucocitos peritoneales es proinflamatorio y está alterado en condiciones de estimulación (Arranz, Lord et al. 2010), al igual que parece ocurrir en los ratones obesos.

Por otro lado, distintos autores han puesto de manifiesto que este modelo de obesidad en ratón *db/db* se caracteriza por una inmunidad deteriorada (Mandel and Mahmoud 1978), caracterizada por una linfopenia de células T en bazo y timo (Boillot, Assan et al. 1986) (Kimura, Tanaka et al. 1998), siendo menos resistentes a la infección (Ikejima, Sasaki et al. 2005). Estos hallazgos y los resultados obtenidos en la presente tesis, corroboran de nuevo la importancia de la acción de la leptina en la modulación de la función inmunitaria en modelos de obesidad genética (Howard, Lord et al. 1999).

Valoración de parámetros de estado antioxidante en leucocitos peritoneales

Como se ha comentado, ante la dificultad en la obtención de los leucocitos peritoneales en este modelo animal de obesidad, solo fue posible la valoración del GSH total y la actividad GPx. En la población leucocitaria que se pudo extraer, los niveles de **GSH** total están aumentados en ratones homocigotos y heterocigotos a los 2 meses respecto a los salvajes, y a los 6 meses estos niveles disminuyen en ratones homocigotos respecto a los heterocigotos y a los encontrados a los 2 meses. A la edad madura, el contenido en GSH es mayor en animales obesos respecto a los heterocigotos y a la edad adulta. En líneas generales, los animales heterocigotos muestran mayores niveles de GSH a los 2 y 6 meses respecto a los salvajes, en cambio menores a los 12 meses. La actividad **GPx** está aumentada en animales heterocigotos y homocigotos respecto a los animales salvajes en las tres edades de estudio, principalmente a la edad juvenil.

A pesar de que no se han medido oxidantes en este objetivo, de manera similar a lo que se encontró en ratas obesas, los niveles elevados de GSH a los dos meses pueden ser indicativos de un mecanismo compensatorio antioxidante similar, necesario para neutralizar el estrés oxidativo prematuro en los leucocitos. Al pasar a la edad adulta, está fallando ese mecanismo de síntesis de GSH y/o estos animales lo agotan rápidamente en este estadio donde la patología y el síndrome metabólico están completamente establecidos. Con 12 meses de edad, debido a la heterogeneidad del grupo donde muchos sufrían pérdida de peso, los niveles de GSH se recuperan. Además a esta edad llegan los animales obesos con un estado antioxidante más preservado. En este modelo animal de obesidad, el aumento en la actividad GPx estaría participando en el ciclo del reciclado del GSH, aumentando sus niveles en las tres edades, a pesar de que no sean suficientes o se agoten en la edad adulta. Los animales heterocigotos no se comportan como los salvajes, necesitan de la elevación del GSH desde la edad juvenil, lo que indica un intento de compensar una mayor oxidación.

Al igual que en el presente estudio, en el modelo de obesidad en ratón por dieta rica en grasa, se observaron menores niveles de GSH total a la edad adulta en los leucocitos del peritoneo (Hunsche, Hernandez et al. 2015). Por otro lado, este modelo animal *db/db* y los ratones *ob/ob* se caracterizan por un estado de estrés oxidativo. Así,

existen evidencias de estrés oxidativo en tejido cardiaco de ratones *db/db* y *ob/ob* que se manifiesta en daño en el ADN y un aumento de la apoptosis de los cardiomiocitos (Barouch, Gao et al. 2006) (He, Pu et al. 2014). También en los ratones *ob/ob* se ha observado un aumento de estrés oxidativo en diferentes tejidos como el hígado y el cerebro, así como una defensa antioxidante alterada (Capel and Dorrell 1984). Los ratones *db/db* presentan también peroxidación lipídica en hígado y riñón (Soto-Urqueta, López-Briones et al. 2014), y estrés oxidativo en páncreas (Jin, Zhou et al. 2013).

Es importante volver a destacar que se ha comprobado, que las funciones inmunitarias analizadas en este objetivo, son indicadores de la velocidad a la que se realiza el proceso de envejecimiento, y presentan un deterioro en ratones cronológicamente envejecidos, así como en modelos murinos de envejecimiento prematuro (De la Fuente and Miquel 2009). En el presente estudio, los animales obesos muestran un deterioro de la capacidad proliferativa, y una desregulación del perfil de citoquinas hacia un estado proinflamatorio. Todo esto, unido a los mecanismos de compensación antioxidante que presentan, apunta a que en este modelo de obesidad en ratón, está aconteciendo un proceso de envejecimiento acelerado por efecto de la obesidad.

Estudio de la longevidad

Las distintas curvas de supervivencia analizadas en los tres grupos de animales, muestran que los ratones homocigotos obesos presentan una significativa menor esperanza de vida que sus controles salvajes y heterocigotos. Por su parte, los animales heterocigotos sobreviven menos tiempo que los salvajes pero no es estadísticamente significativa esta diferencia.

Distintos estudios han demostrado que en ratones con obesidad inducida por dieta, la mortalidad de los animales tras una infección, es superior a la de animales control (Smith, Sheridan et al. 2007) (Strandberg, Verdrengh et al. 2009). Además en otro estudio longitudinal con ratones *ob/ob* y *db/db*, se comprobó que también

mostraban una menor longevidad respecto a los controles salvajes (Barouch, Gao et al. 2006), que está de acuerdo con los resultados obtenidos en nuestro trabajo. Nuestro grupo de investigación también ha comprobado en un estudio a lo largo de la edad en ratones ICR-CD1, que los que están prematuramente envejecidos tienen una menor esperanza de vida (Guayerbas, Puerto et al. 2002). Por su parte, Zhang y sus colaboradores comprobaron en un modelo de obesidad por dieta hipercalórica en ratón, que la obesidad acelera el deterioro funcional asociado a la edad y aumenta la mortalidad (Zhang, Fischer et al. 2015).

A pesar de que en este modelo de obesidad en ratón no se hayan encontrado diferencias significativas en la actividad NK de leucocitos peritoneales, la respuesta inflamatoria de las células inmunitarias contribuye a la inflamación crónica de bajo grado que se asocia a la obesidad, que junto con las alteraciones conductuales encontradas, demuestran el deterioro neuroinmune y el elevado estado inflamatorio prematuros de los animales obesos. Los resultados obtenidos en el estudio de supervivencia son la prueba definitiva para proponer la obesidad como un estado de envejecimiento prematuro, ya que los animales obesos presentan una menor longevidad.

Como resumen de este estudio longitudinal, se puede decir que la obesidad genera un deterioro acelerado de las capacidades sensoriomotoras, y de la actividad exploratoria horizontal y vertical, así como un estado de miedo y ansiedad en los animales.

Este modelo de obesidad genética en ratón (*db/db*) presenta una inmunosenescencia que se manifiesta en la alteración de la capacidad proliferativa de los leucocitos peritoneales desde la edad juvenil, unida a una respuesta proinflamatoria de estas células tras su estimulación por mitógenos. La actividad NK no ha resultado un buen marcador de inmunosenescencia en este modelo animal. El aumento en los niveles del GSH observado en estos animales, apunta a un mecanismo para neutralizar un posible aumento de estrés oxidativo que aparece desde la temprana edad de dos meses.

Finalmente, la menor respuesta linfoproliferativa y el estado inflamatorio que presenta tempranamente este modelo animal, los cuales son indicativos de un envejecimiento acelerado, se podrían asociar con la menor esperanza de vida de los ratones obesos. Este hecho, apoya la propuesta de que la obesidad es un estado de envejecimiento prematuro.

5.3. ACTIVIDAD NATURAL KILLER, CAPACIDAD PROLIFERATIVA Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL EN RATAS WISTAR MACHO ADULTAS CON SOBREPESO INDUCIDO POR DIETA HIPERCALÓRICA. ESTUDIO PRELIMINAR

Una hipótesis para tratar de explicar la rapidez con la que la obesidad se ha extendido en las diferentes poblaciones, es la posibilidad de que los sistemas reguladores se vean sobrepasados por alimentos apetitosos ricos en grasa, cuya disponibilidad ha aumentado enormemente en los últimos 20-30 años. Por este motivo, se han hecho estudios en roedores (Hariri and Thibault 2010) para caracterizar las respuestas generadas por la ingestión de dietas con alto contenido en grasa. Los trabajos iniciales en este área se realizaron con una alimentación a base de dietas tipo “cafetería” que favorecen la polifagia, pero en las que la composición de macronutrientes real puede ser muy variable, lo que impide el aislamiento de factores dietéticos importantes (Speakman, Hambly et al. 2008). Debido a esto, dichas dietas se fueron sustituyendo por otras comerciales, más homogéneas donde se lleva un control más preciso de la composición nutricional, a pesar de que son las dietas de “cafetería” las que llevan a una mayor inflamación del tejido adiposo y del hígado proporcionando un modelo más robusto de síndrome metabólico (Sampey, Vanhoose et al. 2011). En este sentido, y dado que la obesidad por dieta es un modelo más relevante a nivel fisiológico de la obesidad humana, que los modelos por obesidad genética (Nilsson, Raun et al. 2012), se realizó un estudio preliminar de la actividad NK y la capacidad proliferativa en ratas Wistar alimentadas con dieta rica en grasa, con objeto de tener una primera aproximación sobre el efecto de estas dietas en la función inmunitaria y la capacidad

antioxidante total (TAC). Se eligió la cepa de ratas Wistar ya que no es resistente a la dieta con alto contenido en grasa (Nilsson, Raun et al. 2012)

Los resultados de este estudio indican que en rata Wistar adulta la alimentación con dieta hipercalórica durante 10 semanas en la que la grasa representa un 25,5%, es factible para obtener un modelo animal de sobrepeso, corroborado por el aumento de peso corporal observado en el momento del sacrificio. Otros autores también establecieron un modelo de sobrepeso con una dieta hipercalórica con un contenido en grasa del 23,6% durante 22 semanas en ratas Wistar macho (Barrientos Alvarado, Sánchez Vázquez et al. 2014). En estos animales los datos del presente estudio muestran una disminuida **actividad NK** y **respuesta proliferativa** (en condiciones de estimulación con ConA) en leucocitos de bazo y ganglio, hechos que confirman, nuevamente, el deterioro de la función inmunitaria por elevados niveles de adiposidad y grasa corporal, como ocurre en los modelos de obesidad genética ya estudiados. También se comprobó que la **TAC** plasmática estaba elevada en las ratas con sobrepeso, lo que sugiere que en el aumento de peso, sin llegar a un establecimiento de la obesidad, ya se necesita de mecanismos antioxidantes que compensen los efectos deletéreos del aumento de grasa corporal.

Estos resultados están en concordancia con los encontrados en diferentes trabajos, la mayoría ya comentados, donde también se han observado alteraciones en la función inmunitaria en modelos animales de sobrepeso y obesidad por dieta en rata y ratón. Así, en un experimento realizado en ratas Wistar alimentadas con una dieta hipercalórica de “cafetería”, rica en grasa, durante 5 semanas, se observó que la actividad NK de leucocitos de bazo tendía a ser menor que en los animales control. Además, en estas ratas con sobrepeso la proliferación de los esplenocitos estimulados con Con A resultó ser menor que en las ratas control (Lamas, Martínez et al. 2004). En ratones C57BL/6J alimentados con una dieta con alto contenido en grasa (50,3 % del total de calorías) durante 13 semanas se estableció un modelo de obesidad, en el que observaron alteraciones en la proliferación de los esplenocitos, así como un desbalance en la liberación de citoquinas, indicativo de una función inmunitaria alterada (Mito, Hosoda et al. 2000). Por otro lado, en un modelo de obesidad severa en ratón inducido por una dieta hipercalórica mantenida durante un largo periodo de tiempo, la

proliferación de los esplenocitos estimulados en cultivo con Con A, LPS y PHA resultó ser significativamente menor que en ratones alimentados con una dieta control, lo que era indicativo del deterioro en la función de células T y B (Sato Mito, Suzui et al. 2009). También en un modelo de obesidad por dieta en ratón se ha observado una menor habilidad del sistema inmunitario para responder de manera apropiada frente a la infección del virus influenza, caracterizada por una disminución sustancial de la actividad NK en células de bazo (Smith, Sheridan et al. 2007). En un estudio reciente en un modelo de obesidad en ratones adultos, que se alimentaron con una dieta rica en grasa (60,3%), durante 14 semanas en la adolescencia, se observó una función inmunitaria deteriorada de los leucocitos peritoneales, caracterizada por una menor actividad NK y respuesta proliferativa a Con A y LPS, así como una capacidad de fagocitosis de los macrófagos y una quimiotaxis de linfocitos y macrófagos muy disminuida respecto a los controles (Hunsche, Hernandez et al. 2015).

Por otro lado, en un trabajo realizado por Akiyama y sus colaboradores también se observó que la dieta rica en grasa administrada en ratas Wistar induce intolerancia a la glucosa e hiperlipidemia (Akiyama, Tachibana et al. 1996). Además, en otro modelo animal en rata Sprague-Dawley, una dieta que contenía un 32% de Kcal de grasa, administrada durante 10 semanas, causó peroxidación lipídica, hipertensión y dislipidemia (Dobrian, Davies et al. 2000). También se ha demostrado que una dieta enriquecida con un 30% de grasa administrada a ratas Sprague-Dawley durante 3-4 meses, lleva a daños hepáticos como infiltración de células mononucleares, fibrosis y esteatosis (Altunkaynak 2005). Estos y otros estudios (Woods, Seeley et al. 2003) (Keenan, Hoe et al. 2005) (Madsen, Hansen et al. 2010) (Maysami, Haley et al. 2015) dejan patente la existencia de alteraciones inflamatorias, metabólicas y endocrinas, además de las inmunitarias ya comentadas, así como un aumento del estrés oxidativo (Shen, Tang et al. 2009) en los modelos animales de obesidad por el aumento de la ingesta de grasa.

En relación a los niveles de la TAC en suero, en un estudio con hombres y mujeres tanto con sobrepeso como con obesidad, esta capacidad resultó ser menor que en individuos con normopeso (Chrysoshoou, Panagiotakos et al. 2007). Por el contrario, Venturini y sus colaboradores identificaron que la TAC en sujetos con sobrepeso sin

síndrome metabólico no mostró diferencias respecto a los sanos. En cambio, individuos con síndrome metabólico y sobrepeso presentaban una menor TAC respecto a los controles (Venturini, Simão et al. 2012). De cualquier manera, los parámetros valorados en la población humana están sujetos a la gran heterogeneidad que presentan los individuos y a los diferentes rangos de edad, siendo los pacientes analizados en el estudio de Chrysohoou de un rango de edad muy amplio. Los resultados encontrados por Venturini podrían indicar que en individuos con otras complicaciones metabólicas, además del sobrepeso, se estaría generando un mayor estrés oxidativo que implicaría un consumo mayor de antioxidantes, lo que no ocurre en el caso de los sujetos que solo presentan sobrepeso. Esto se podría aplicar a los resultados obtenidos en nuestro modelo de sobrepeso, donde la TAC podría estar elevada por el incipiente estrés oxidativo que se genera por el aumento de adiposidad, y que se consumiría posteriormente con el establecimiento de la obesidad y las demás alteraciones asociadas. De hecho en sujetos con obesidad y sujetos que presentan obesidad y síndrome metabólico la TAC es menor respecto a individuos sanos, estando más disminuida en los que padecen síndrome metabólico (Skalicky, Muzakova et al. 2008).

En cuanto a la valoración de otros parámetros antioxidantes en modelos animales de obesidad por dieta, Noeman y sus colaboradores identificaron una generación de estrés oxidativo en hígado, corazón y riñón, el cual estaba caracterizado por una elevación del MDA y una disminución de las actividades enzimáticas CAT y GPx, en ratas albinas alimentadas con dieta enriquecida con un 46% de grasa (Noeman, Hamooda et al. 2011). Concretamente en otro estudio realizado también en ratas Wistar que recibieron una dieta hipercalórica rica en grasa (32%) durante 8 semanas, se observó un aumento significativo de los TBARS en plasma, y una disminución de la actividad SOD, mientras que la GPx no se modificó. Respecto a la TAC en plasma, estos autores encontraron una disminución significativa en estos animales, respecto a los controles (Beltowski, Wojcicka et al. 2000). En el reciente trabajo de Zhang y sus colaboradores, en este caso con ratones alimentados con dieta hipercalórica (23,6% de grasa) en un experimento longitudinal, se comprobó que existía un aumento del estrés oxidativo en múltiples tejidos, caracterizado por un aumento de F2-isoprostanos en hígado y del 4-hidroxinonenal en tejido adiposo e hígado. Sin embargo, las actividades

SOD y GPx, aunque no mostraron diferencias estadísticamente significativas, sí estaban algo más elevadas en tejido adiposo, respecto a los animales que recibieron una dieta estándar (Zhang, Fischer et al. 2015). Este hecho se podría equiparar a la elevación de la TAC en plasma encontrada en nuestros resultados, con objeto de contrarrestar el posible estrés oxidativo que se hubiera producido con el aumento de grasa corporal en el tejido adiposo al generarse el sobrepeso. Los resultados contradictorios encontrados en los diferentes trabajos en lo que respecta a las defensas antioxidantes podrían deberse a los distintos estadios de sobrepeso u obesidad de los animales, las técnicas empleadas en la valoración y el grado de estrés oxidativo alcanzado en cada modelo animal.

Como resumen de este estudio preliminar, se puede decir que la dieta rica en grasa administrada es efectiva para generar un modelo animal de sobrepeso, en el que se observa una inmunosenescencia prematura y un aumento en la capacidad antioxidante total, que apunta al inicio de un desbalance redox.

6. CONCLUSIONES

A continuación se indican las conclusiones que pueden extraerse de la presente tesis:

En relación al primer objetivo, “*Caracterizar en un modelo de obesidad genética, la rata Zucker, diversos parámetros de función inmunitaria y estrés oxidativo*”, puede concluirse que:

1.1. Las ratas Zucker (lean y *fa/fa*) a la edad adulta (seis meses) presentan una inmunosenescencia prematura y un mayor estado oxidativo e inflamatorio en relación a la cepa de ratas Wistar.

1.2. Las ratas obesas *fa/fa* adultas no parecen manifestar un mayor deterioro de la función inmunitaria respecto a las lean. Sin embargo, sí muestran un mayor estado inflamatorio de las células esplénicas, y un mayor estado de oxidación en leucocitos del timo y en el hígado. Las ratas lean (*fa/+*) a la edad adulta no constituyen un buen control para los estudios de función inmunitaria y de estado oxidativo en bazo.

1.3. Las ratas obesas *fa/fa* jóvenes (dos meses de edad), muestran respecto a las lean una inmunosenescencia prematura acompañada de un estado proinflamatorio de los leucocitos esplénicos. Además, presentan alteraciones en el metabolismo hepático, cardíaco y adiposo.

1.4. Las ratas Zucker experimentan un deterioro en la función leucocitaria, un aumento de inflamación y menor defensa antioxidante en el paso de la edad juvenil a la adulta. También presentan cambios en el metabolismo hepático, cardíaco y adiposo.

En general, las ratas Zucker manifiestan tempranamente alteraciones inmunológicas, inflamatorias, de estrés oxidativo y metabólicas, especialmente las obesas *fa/fa*, no siendo las ratas lean un adecuado control en algunos de los parámetros estudiados.

Con respecto al segundo objetivo de la presente tesis, *“Estudiar los cambios en parámetros de función inmunitaria y estrés oxidativo en un modelo de obesidad genética, la rata Zucker, a la edad adulta (seis meses), tras llevar a cabo un programa de ejercicio físico con entrenamiento, así como valorar el efecto del mismo ante la realización de un ejercicio físico agudo”*, las conclusiones que se extraen son las siguientes:

2.1. Un programa de entrenamiento físico regular, basado en fases de adaptación, progresión y mantenimiento en cuanto a intensidad y duración, con finalización a la edad adulta en ratas obesas *fa/fa*, parece atenuar la inmunosenescencia que estos animales presentan en la capacidad proliferativa de linfocitos, así como modular la producción de TNF- α , ante la realización de un golpe de ejercicio agudo.

2.2. El programa de entrenamiento físico genera un adecuado estado redox en ratas obesas, que les permite generar un menor estrés oxidativo al realizar el ejercicio agudo.

En lo referente al tercer objetivo, *“Analizar en un modelo de obesidad genética en ratón, ratones *db/db*, mediante un estudio longitudinal iniciado a la edad juvenil (dos meses), los cambios en diversos parámetros conductuales, de funcionalidad y estado antioxidante en los leucocitos peritoneales, así como su relación con la longevidad de los animales”*, se puede concluir que:

3.1. Los ratones obesos *db/db* presentan un deterioro conductual prematuro y acelerado de la capacidad sensoriomotora y del comportamiento exploratorio, así como un estado temprano de ansiedad, lo que sugiere un envejecimiento prematuro.

3.2. Los ratones *db/db* muestran una inmunosenescencia de la capacidad proliferativa de los leucocitos peritoneales, que es prematura en respuesta a LPS. También presentan una desregulación temprana de las citoquinas liberadas por dichas células inmunitarias, así como cambios en sus defensas antioxidantes.

3.3. Los ratones heterocigotos (*db/+*) manifiestan un deterioro conductual y de la capacidad proliferativa de los leucocitos peritoneales, así como un estado inflamatorio de dichas células que, en general, es similar al de los ratones homocigotos *db/db*. Por ello, estos animales heterocigotos no se pueden considerar unos adecuados controles.

3.4. Los ratones *db/db*, muestran una menor esperanza de vida que sus controles (*db/+*) y salvajes, por lo que se puede proponer a la obesidad como un estado de envejecimiento prematuro.

Por último, en relación al objetivo, “*Realizar un estudio preliminar sobre el estado de algunos parámetros (actividad “Natural Killer”, capacidad proliferativa de linfocitos y capacidad antioxidante total) en un modelo de sobrepeso inducido por dieta hipercalórica, en rata Wistar adulta (seis meses)*”, se concluye que:

4. Una dieta hipercalórica, con un 25,5% de grasa es capaz de generar un estado de sobrepeso en ratas Wistar adultas, las cuales muestran una inmunosenescencia prematura en la actividad “Natural Killer” y en la capacidad proliferativa de leucocitos de bazo y ganglios axilares.

Como conclusión general, debido al deterioro conductual, de función inmunitaria y estado de inflamación y oxidación prematuros encontrados en animales de experimentación obesos, y especialmente a la menor esperanza de vida que se ha detectado en los ratones *db/db*, se puede proponer a la obesidad como un estado de envejecimiento prematuro.

6 bis. CONCLUSIONS

The conclusions drawn from the present doctoral thesis are listed below.

Regarding the first objective, “*Characterizing several immune functions and oxidative stress parameters in a model of genetic obesity, the Zucker rat*”, it can be concluded that:

1.1. Zucker rats (lean and *fa/fa*) show a premature immunosenescence and a higher oxidative and inflammatory state with respect to Wistar rats strain, at an adult age (six months).

1.2. The obese *fa/fa* adult rats do not seem to exhibit a higher immune function impairment with respect to lean rats. However, *fa/fa* rats show a higher inflammatory state of splenic cells and a higher oxidation state in thymus leucocytes and in liver. Adult lean rats (*fa/+*) do not constitute an appropriate control for the immune function and oxidative state analysis in spleen.

1.3. The *fa/fa* obese young rats (two months old), show a premature immunosenescence and a proinflammatory state of spleen leucocytes, with respect to lean rats. Furthermore, these rats show an altered hepatic, cardiac and adipose metabolism.

1.4. Zucker rats experience an impairment in the leucocitary function, a higher inflammatory state and less antioxidant defences in the course from young to adult age. Moreover, these rats also show changes in the hepatic, cardiac and adipose metabolism.

In general, Zucker rats exhibit early immunological, inflammatory, of oxidative stress and metabolic alterations, especially *fa/fa* obese rats, therefore not being lean rats an appropriate control for some of the parameters studied.

In relation to the second aim of the present thesis, “*Studying the changes in immune function and oxidative stress parameters in a model of genetic obesity, the Zucker rat, at an adult age (six months), after carrying out a physical exercise training programme, as well as assessing the effects of a physical exercise training programme when the animal has to face a bout physical exercise*”, it can be concluded that:

2.1. A regular physical exercise training programme, based on adaptation, progression and maintenance phases regarding intensity and duration, and that ends at an adult age in *fa/fa* obese rats, seems to attenuate the immunosenescence process that these animals show regarding the lymphocytes proliferative capacity, as well as to modulate the release of TNF- α when the animal has to complete a bout physical exercise.

2.2. The physical training programme produces a suitable redox state in obese rats, which allows them to maintain a lower oxidative stress after completing the bout of exercise.

With regards to the third objective, “*Analising, in a mouse model of genetic obesity, *db/db* mice, the changes in several behavioural, functional and antioxidant state parameters in peritoneal leucocytes, as well as its relationship with the longevity of the animals, with a longitudinal study started at young age (two months)*”, it can be concluded that:

3.1. The *db/db* obese mice show a premature and accelerated behavioural impairment of the sensorimotor capacity and exploratory behaviour, as well as an early anxiety state, which suggests a premature ageing state.

3.2. The *db/db* mice show immunosenescence of the proliferative capacity of their peritoneal leucocytes, which means that is a premature immunosenescence in response to LPS. In addition, they show an early deregulation in the released cytokines by these immune cells, as well as changes in its antioxidant defences.

3.3. The heterozygotic mice (*db/+*) show a behavioural and proliferative capacity impairment of peritoneal leucocytes, as well as an inflammatory state of these cells, that, in general, is similar to the one show by homozygotic *db/db* mice. Therefore, these heterozygotic animales cannot be considered appropriate controls.

3.4. The *db/db* mice show a lower life span than its controls (*db/+*) and wild type, so obesity can be proposed as a premature ageing state.

Finally, in regard to the objective, “*Carrying out a preliminary study about the state of several parameters (“Natural Killer” activity, proliferative capacity of lymphocytes and total antioxidant capacity) in an overweight model induced by hypercaloric diet in adult Wistar rats (six months)*”, it can be concluded that:

4. A hypercaloric diet, with a 25,5% of fat is able to generate a state of overweight in adult Wistar rats, which show a premature immunosenescence in the “Natural Killer” activity and the proliferative capacity of leucocytes from spleen and axillary nodes.

As a general conclusion, due to the premature behavioural and immune function impairment and the inflammation and oxidative states found in obese experimental animal models, and specially due to the shorter life span that has been detected in the *db/db* mice, obesity can proposed as a premature ageing state.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abuja, P. M. and R. Albertini (2001). "Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins." *Clin Chim Acta* 306(1-2): 1-17.
- Adamopoulos, S., J. Parissis, et al. (2001). "Physical training reduces peripheral markers of inflammation in patients with chronic heart failure." *Eur Heart J* 22(9): 791-797.
- Aejmelaeus, R. T., P. Holm, et al. (1997). "Age-related changes in the peroxyl radical scavenging capacity of human plasma." *Free Radic Biol Med* 23(1): 69-75.
- Agrawal, A., S. Agrawal, et al. (2008). "Biology of dendritic cells in aging." *J Clin Immunol* 28(1): 14-20.
- Aguilera, C. M., J. Olza, et al. (2013). "Genetic susceptibility to obesity and metabolic syndrome in childhood." *Nutr Hosp* 28 Suppl 5: 44-55.
- Ahima, R. S. (2008). "Revisiting leptin's role in obesity and weight loss." *J Clin Invest* 118(7): 2380-2383.
- Ahima, R. S. and J. S. Flier (2000). "Leptin." *Annu Rev Physiol* 62: 413-437.
- Akiyama, T., I. Tachibana, et al. (1996). "High-fat hypercaloric diet induces obesity, glucose intolerance and hyperlipidemia in normal adult male Wistar rat." *Diabetes Res Clin Pract* 31(1-3): 27-35.
- Al-Khalidi, U. A. and T. H. Chaglassian (1965). "The species distribution of xanthine oxidase." *Biochem J* 97(1): 318-320.
- Alam, I., T. P. Ng, et al. (2012). "Does inflammation determine whether obesity is metabolically healthy or unhealthy? The aging perspective." *Mediators Inflamm.* 2012:456456. doi: 10.1155/2012/456456.
- Alberti, K. G., R. H. Eckel, et al. (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(16): 1640-1645.
- Alberti, K. G., P. Zimmet, et al. (2005). "The metabolic syndrome--a new worldwide definition." *Lancet* 366(9491): 1059-1062.
- Alberti, S., E. Cevenini, et al. (2006). "Age-dependent modifications of Type 1 and Type 2 cytokines within virgin and memory CD4⁺ T cells in humans." *Mech Ageing Dev.* 127(6):560-6.
- Aleixandre de Artiñano, A. and M. Miguel Castro (2009). "Experimental rat models to study the metabolic syndrome." *Br J Nutr* 102(9): 1246-1253.
- Alessi, M. C., D. Bastelica, et al. (2000). "Plasminogen activator inhibitor 1, transforming growth factor-beta1, and BMI are closely associated in human adipose tissue during morbid obesity." *Diabetes* 49(8): 1374-1380.
- Alessi, M. C., M. Poggi, et al. (2007). "Plasminogen activator inhibitor-1, adipose tissue and insulin resistance." *Curr Opin Lipidol* 18(3): 240-245.
- Alfredo Martínez, J., L. Enríquez, et al. (2007). "Genetics of obesity." *Public Health Nutr* 10(10A): 1138-1144.
- Alonso-Fernández, P. and M. De la Fuente (2011). "Role of the immune system in aging and longevity." *Curr Aging Sci* 4(2): 78-100.

-
- Alonso-Fernández, P., M. Puerto, et al. (2008). "Neutrophils of centenarians show function levels similar to those of young adults." *J Am Geriatr Soc* 56:2244-2251.
- Altman, S. A., T. H. Zastawny, et al. (1995). "Formation of DNA-protein-cross-links in cultured mammalian cells upon treatment with iron ions." *Free Radic. Biol. Med.* 19: 897-902.
- Altunkaynak, Z. (2005). "Effects of high fat diet induces obesity on female rat livers (a histochemical study)." *Eur J Gen Med* 2 (3): 100-109.
- Alvarado, C., P. Álvarez, et al. (2005). "El daño peroxidativo en leucocitos peritoneales de ratones viejos disminuye suplementando la dieta con galletas enriquecidas con antioxidantes. Relación con la supervivencia." *Rev. Esp. Geriatr. Gerontol.* 40: 351-356.
- Alvarado, C., P. Álvarez, et al. (2006). "Dietary supplementation with antioxidants improves functions and decreases oxidative stress of leukocytes from prematurely aging mice." *Nutrition* 22(7-8): 767-777.
- Alvarado, C., P. Álvarez, et al. (2006). "Dietary supplementation with antioxidants improves functions and decreases oxidative stress of leukocytes from prematurely aging mice." *Nutrition* 22: 767-777.
- Álvarez-Rodríguez, L., M. López-Hoyos, et al. (2012). "Aging is associated with circulating cytokine dysregulation." *Cell Immunol.* 273(2):124-32.
- Álvarez, P., C. Alvarado, et al. (2006). "Improvement of leukocyte functions in prematurely aging mice after five weeks of diet supplementation with polyphenol-rich cereals." *Nutrition* 22(9): 913-921.
- Allmar, D. and J. P. Miller (2005 (a)). "B cell development and receptor diversity during aging." *Curr. Opin. Immunol.* 17: 463-467.
- Allmar, D. and J. P. Miller (2005 (b)). "The aging of early B- cell precursors." *Immunol. Rev.* 205: 18-29.
- Ames, B. N., M. K. Shigenaga, et al. (1993). "Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(17): 7915-7922.
- André, C., A. L. Dinel, et al. (2014). "Diet-induced obesity progressively alters cognition, anxiety-like behavior and lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior: focus on brain indoleamine 2,3-dioxygenase activation." *Brain Behav Immun* 41: 10-21.
- Aranda, R., E. Domenech, et al. (2007). "Age-related increase in xanthine oxidase activity in human plasma and rat tissues." *Free Radic Res* 41(11): 1195-1200.
- Arita, Y., S. Kihara, et al. (2002). "Adipocyte-derived plasma protein adiponectin acts as a platelet-derived growth factor-BB-binding protein and regulates growth factor-induced common postreceptor signal in vascular smooth muscle cell." *Circulation.* 105(24):2893-8.
- Arita, Y., S. Kihara, et al. (1999). "Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity." *Biochem Biophys Res Commun* 257(1): 79-83.
- Arner, P. (2005). "Human fat cell lipolysis: biochemistry, regulation and clinical role." *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 19(4): 471-482.
- Arranz, L., J. H. Caamaño, et al. (2010). "Preserved immune functions and controlled leukocyte oxidative stress in naturally long-lived mice: possible role of nuclear factor kappa B." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 65(9): 941-950.
-

-
- Arranz, L., De Castro NM, et al. (2010). "Environmental enrichment improves age-related immune system impairment: long-term exposure since adulthood increases life span in mice." *Rejuvenation Res.* 13(4):415-28.
- Arranz, L., C. Fernández, et al. (2008). "The glutathione precursor N-acetylcysteine improves immune function in postmenopausal women." *Free Radic Biol Med* 45(9): 1252-1262.
- Arranz, L., J. M. Lord, et al. (2010). "Preserved ex vivo inflammatory status and cytokine responses in naturally long-lived mice." *Age (Dordr)* 32(4): 451-466.
- Aruoma, O. I., B. Halliwell, et al. (1988). "The antioxidant action of taurine, hypotaurine and their metabolic precursors." *Biochem J.* 256(1):251-5.
- Attallah, A. M., H. Abdelghaffar, et al. (1987). "Cell-mediated immunity and biological response modifiers in insulin-dependent diabetes mellitus complicated by end-stage renal disease." *Int Arch Allergy Appl Immunol* 83(3): 278-283.
- Aue, W. P. (1976). "Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance." *J. Chem. Phys.* 64: 2229-2246.
- Aw, D., A. B. Silva, et al. (2007). "Immunosenescence: emerging challenges for an ageing population." *Immunology* 120:435-446.
- Bacon, K. B. and J. K. Harrison (2000). "Chemokines and their receptors in neurobiology: perspectives in physiology and homeostasis." *J. Neuroimmunol.* 104: 92-97.
- Baeza, I., N. M. De Castro, et al. (2010). "Ovariectomy, a model of menopause in rodents, causes a premature aging of the nervous and immune systems." *J Neuroimmunol* 219(1-2): 90-99.
- Baeza I., N. M. De Castro, et al. (2011). "Ovariectomy causes immunosenescence and oxi-inflamm-ageing in peritoneal leukocytes of aged female mice similar to that in aged males." *Biogerontology.* 12(3):227-38.
- Baeza I., J. Fdez-Tresguerres, et al. (2010). "Effects of growth hormone, melatonin, oestrogens and phytoestrogens on the oxidized glutathione (GSSG)/reduced glutathione (GSH) ratio and lipid peroxidation in aged ovariectomized rats." *Biogerontology.* 11(6):687-701.
- Bagby, G. J., D. E. Sawaya, et al. (1994). "Prior exercise suppresses the plasma tumor necrosis factor response to bacterial lipopolysaccharide." *J Appl Physiol* (1985) 77(3): 1542-1547.
- Bagnara, G. P., L. Bonsi, et al. (2000). "Hematopoiesis in healthy old people and centenarians: well maintained responsiveness of CD34+ cells to hematopoietic growth factors and remodeling of cytokine network." *J Gerontol* 55:B61-B66.
- Baker, R. G., M. S. Hayden, et al. (2011). "NF-kappaB, inflammation, and metabolic disease." *Cell Metab* 13(1): 11-22.
- Balducci, S., S. Zanuso, et al. (2010). "Anti-inflammatory effect of exercise training in subjects with type 2 diabetes and the metabolic syndrome is dependent on exercise modalities and independent of weight loss." *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 20(8):608-17.
- Balkau, B. and M. A. Charles (1999). "Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR)." *Diabet Med* 16(5): 442-443.
- Bandaru, P., H. Rajkumar, et al. (2013). "The impact of obesity on immune responses to infection and vaccine: an insight into plausible mechanisms." *Endocrinol Metab Syndr* 2:113. doi: 10.4172/2161-1017.1000113
-

-
- Bandy, B. and A. J. Davison (1990). "Mitochondrial mutations may increase oxidative stress: implications for carcinogenesis and aging?" *Free Radic. Biol., Med.* 8:523-539.
- Barja, G. (1997). "Radicales libres y antioxidantes." En: *Bioquímica y Fisiopatología del Estrés Oxidativo* (M. Cascales, Coord.). Real Acad. Farm. y Fundación José Casares Gil. pp: 21-44.
- Barja, G. (1999). "Mitochondrial free radical generation: sites of production in status 4 and 3, organ specificity and relationship with aging rate." *J. Bioenerg. Biomembr.* 31: 347-366.
- Barja, G. (2002 (a)). "Endogenous oxidative stress: relationship to aging, longevity and caloric restriction." *Ageing Res Rev* 1(3): 397-411.
- Barja, G. (2002 (b)). "Rate of generation of oxidative stress-related damage and animal longevity." *Free Radic Biol Med* 33(9): 1167-1172.
- Barja, G. (2004 (a)). "Free radicals and aging. ." *TRENDS in Neurosci.* 27: 595-600.
- Barja, G. (2004 (b)). "Aging in vertebrates, and the effect of caloric restriction: a mitochondrial free radical production-DNA damage mechanism?. ." *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 79: 235-251. .
- Barja, G. (2013). "Updating the mitochondrial free radical theory of aging: an integrated view, key aspects, and confounding concepts." *Antioxid Redox Signal* 19(12): 1420-1445.
- Barja, G., S. Cadenas, et al. (1994). "Low mitochondrial free radical production near critical sites as the main cause of maximum longevity of animals." *Comp. Biochem. Physiol.* 108: 501-512.
- Barja, G. and A. Herrero (2000). "Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span in the heart and brain of mammals." *FASEB J.* 14: 312-318.
- Barouch, L. A., D. Gao, et al. (2006). "Cardiac myocyte apoptosis is associated with increased DNA damage and decreased survival in murine models of obesity." *Circ Res.* 98(1):119-24.
- Barrientos Alvarado, C., J. Sánchez Vázquez, et al. (2014). "Efecto de la administración subcrónica de glucosamina oral en la regulación del peso corporal, glucemia y dislipidemias provocada por una dieta hipercalórica en rata Wistar." *Rev. Nutr., Campinas* , v. 27, n. 6, p. 689-701.
- Bartosz, G. (2010). "Non-enzymatic antioxidant capacity assays: Limitations of use in biomedicine." *Free Radic Res.* 44(7):711-20.
- Bastard, J. P., M. Maachi, et al. (2006). "Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance." *Eur Cytokine Netw.* 2006 Mar;17(1):4-12.
- Bastard, J. P., M. Maachi, et al. (2002). "Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro." *J Clin Endocrinol Metab.* May;87(5):2084-9.
- Batliwalla, F., J. Monteiro, et al. (1996). "Oligoclonality of CD8+ T cells in health and disease: aging, infection, or immune regulation?" *Hum Immunol* 48(1-2): 68-76.
- Battelli, M. G., E. D. Corte, et al. (1972). "Xanthine oxidase type D (dehydrogenase) in the intestine and other organs of the rat." *Biochem J* 126(3): 747-749.
- Bauer, M. E. (2008). "Chronic stress and immunosenescence: a review." *Neuroimmunomodulation* 15(4-6): 241-250.
-

-
- Beal, M. F. (1994). "Neurochemistry and toxin models in Huntington's disease." *Curr Opin Neurol* 7(6): 542-547.
- Becker-Zimmermann, K., M. Berger, et al. (1982). "Treadmill training improves intravenous glucose tolerance and insulin sensitivity in fatty Zucker rats." *Diabetologia* 22(6): 468-474.
- Beckman, K. B. and B. N. Ames (1998). "The free radical theory of aging matures." *Physiol Rev* 78(2): 547-581.
- Beltowski, J., G. Wojcicka, et al. (2000). "The effect of dietary-induced obesity on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and total plasma antioxidant capacity." *J Physiol Pharmacol* 51(4 Pt 2): 883-896.
- Bellinger, D. L., K. S. Madden, et al. (2001). "Age-related alterations in neural-immune interactions and neural strategies in immunosenescence." En: *Psychoneuroimmunology*. Ader, R., Felten, D.L., Cohen, N. (Eds.) Academic Press, San Diego. pp. 241-286.
- Bendich, A. (1997). "Vitamin C safety in humans." En: *Vitamin C in health and disease*. Eds. Packer, L., Fuchs, J. New York: Marcel Dekker Inc. pp. 367-379.
- Berczi, I., I. M. Chalmers, et al. (1996). "The immune effects of neuropeptides." *Baillieres Clin Rheumatol* 10(2): 227-257.
- Bernecker, C., J. Scherr, et al. (2013). "Evidence for an exercise induced increase of TNF-alpha and IL-6 in marathon runners." *Scand J Med Sci Sports* 23(2): 207-214.
- Bernotiene, E., G. Palmer, et al. (2006). "The role of leptin in innate and adaptive immune responses." *Arthritis Res Ther* 8(5): 217.
- Besedovsky, H., E. Sorkin, et al. (1977). "Hypothalamic changes during the immune response." *Eur J Immunol*. 7(5):323-5.
- Besedovsky, H., E. Sorkin, et al. (1975). "Changes in blood hormone levels during the immune response." *Proc Soc Exp Biol Med* 150(2): 466-470.
- Besedovsky, H. O. and A. del Rey (1996). "Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses." *Endocr Rev* 17(1): 64-102.
- Besedovsky, H. O. and A. del Rey (2006). "Regulating inflammation by glucocorticoids." *Nat Immunol* 7(6): 537.
- Besedovsky, H. O. and A. del Rey (2011). "Central and peripheral cytokines mediate immune-brain connectivity." *Neurochem Res* 36(1): 1-6.
- Besedovsky, H. O. and A. D. Rey (2007). "Physiology of psychoneuroimmunology: a personal view." *Brain Behav Immun* 21(1): 34-44.
- Bhat, G. K., M. L. Hamm, et al. (2003). "Does leptin mediate the effect of photoperiod on immune function in mice?" *Biol Reprod*. 69(1):30-6.
- Bianco, N. R., L. J. Chaplin, et al. (2005). "Differential induction of quinone reductase by phytoestrogens and protection against oestrogen-induced DNA damage." *Biochem J* 385(Pt 1): 279-287.
- Biasi, D., A. Carletto, et al. (1996). "Neutrophil migration, oxidative metabolism, and adhesion in elderly and young subjects." *Inflammation* 20(6): 673-681.
- Birgel, M., H. Gottschling-Zeller, et al. (2000). "Role of cytokines in the regulation of plasminogen activator inhibitor-1 expression and secretion in newly differentiated subcutaneous human adipocytes." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(6): 1682-1687.
- Bjorkstein, J. (1974). "En: Theoretical Aspects of Aging (M. Rockstein, Ed). NY Academic Press. pp.43."
-

-
- Blair, I. A. (2001). "Lipid hydroperoxide-mediated DNA damage." *Exp Gerontol* 36(9): 1473-1481.
- Blair, S. N., N. N. Goodyear, et al. (1984). "Physical fitness and incidence of hypertension in healthy normotensive men and women." *Jama* 252(4): 487-490.
- Blakely, S., A. Herbert, et al. (2003). "Lutein interacts with ascorbic acid more frequently than with alpha-tocopherol to alter biomarkers of oxidative stress in female Zucker obese rats." *J Nutr.* 133(9):2838-44.
- Blalock, J. E. (1984). "The immune system as a sensory organ." *J Immunol* 132:1067-1070.
- Blalock, J. E. (1989). "A molecular basis for bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems." *Physiol. Rev.* 69:1-32.
- Blalock, J. E. (1992). "Production of peptide hormones and neurotransmitters by the immune system." *Chem Immunol* 52: 1-24.
- Blalock, J. E. (1994 (a)). "Shared ligands and receptors as a molecular mechanism for communication between the immune and neuroendocrine systems." *Ann N Y Acad Sci.* 741: 292-298.
- Blalock, J. E. (1994 (b)). "The immune system: our sixth sense." *Immunologist* 2: 8-15.
- Blalock, J. E. (1994 (c)). "The syntax of immune-neuroendocrine communication." *Immunol. Today* 15: 504-5.
- Blalock, J. E., D. Harbour-McMenamin, et al. (1985). "Peptide hormones shared by the neuroendocrine and immunologic systems." *J Immunol* 135(2 Suppl): 858s-861s.
- Bohr, A. M. and R. M. Anson (1995). "DNA damage, mutation and fine structure DNA repair in aging." *Mutation Res.* 338: 25-34.
- Boillot, D., R. Assan, et al. (1986). "T-lymphopenia and T-cell imbalance in diabetic db/db mice." *Diabetes* 35(2): 198-203.
- Boissonneault, G. A. and D. E. Harrison (1994). "Obesity minimizes the immunopotential of food restriction in ob/ob mice." *J Nutr* 124(9): 1639-1646.
- Bollard, M. E., S. Garrod, et al. (2000). "High-resolution ^1H and ^1H - ^{13}C magic angle spinning NMR spectroscopy of rat liver." *Magn. Reson. Med.* 44: 201-207.
- Borges, F., E. Fernandes, et al. (2002). "Progress towards the discovery of xanthine oxidase inhibitors." *Curr Med Chem* 9(2): 195-217.
- Borgström, L., D. Kagedal, et al. (1986). "Pharmacokinetics of N-acetylcysteine in man." *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 31: 217-222.
- Borkan, A. and A. H. Norris (1980). "Assessment of biological age using a profile of physiological parameters. ." *J. Gerontol.* 35: 177-184.
- Borrás, C., J. Gambini, et al. (2006). "Genistein, a soy isoflavone, up-regulates expression of antioxidant genes: involvement of estrogen receptors, ERK1/2 and NF κ B." *FASEB J.* 20: E1476-E1481.
- Borrego, F., M. C. Alonso, et al. (1999). "NK phenotypic markers and IL-2 response in NK cells from elderly people." *Exp Gerontol* 34:253-265.
- Boucher, N., T. Dufeu-Duchesne, et al. (1998). "CD28 expression in T cell aging and human longevity." *Exp Gerontol* 33:267-282.
- Box, H. C., J. B. Dawidzik, et al. (2001). "Free radical-induced double lesions in DNA." *Free Radic Biol Med* 31(7): 856-868.
-

-
- Brandao, M. L., J. M. Zanoveli, et al. (2008). "Different patterns of freezing behavior organized in the periaqueductal gray of rats: association with different types of anxiety." *Behav Brain Res* 188(1): 1-13.
- Brandt, C. and B. K. Pedersen (2010). "The role of exercise-induced myokines in muscle homeostasis and the defense against chronic diseases." *J Biomed Biotechnol* 2010: 520258.
- Bray, G. A. (1977). "The Zucker-fatty rat: a review." *Fed Proc.* 36:148-53.
- Bron, D. and R. Asmis (2001). "Vitamin E and the prevention of atherosclerosis." *Int J Vitam Nutr Res* 71(1): 18-24.
- Brown-Borg, H. M. and S. G. Rakoczy (2003). "Growth hormone administration to long-living dwarf mice alters multiple components of the antioxidative defense system." *Mech Ageing Dev* 124(10-12): 1013-1024.
- Brumpton, B., A. Langhammer, et al. (2013). "The associations of anxiety and depression symptoms with weight change and incident obesity: The HUNT Study." *Int J Obes (Lond)* 37(9): 1268-1274.
- Bruun, J. M., A. S. Lihn, et al. (2005). "Monocyte chemoattractant protein-1 release is higher in visceral than subcutaneous human adipose tissue (AT): implication of macrophages resident in the AT." *J Clin Endocrinol Metab.* 90(4):2282-9.
- Bruunsgaard, H. (2002). "Effects of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in elderly populations." *Eur Cytokine Netw* 13(4): 389-391.
- Bruunsgaard, H., A. N. Pedersen, et al. (2000). "Proliferative responses of blood mononuclear cells (BMNC) in a cohort of elderly humans: role of lymphocyte phenotype and cytokine production." *Clin Exp Immunol* 119(3): 433-440.
- Bruunsgaard, H., A. N. Pedersen, et al. (2001). "Decreased natural killer cell activity is associated with atherosclerosis in elderly humans." *Exp Gerontol.* 37(1):127-36.
- Bruunsgaard, H., P. Skinhøj, et al. (2000). "Ageing, tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and atherosclerosis." *Clin Exp Immunol* 121(2): 255-260.
- Buettner, C., E. D. Muse, et al. (2008). "Leptin controls adipose tissue lipogenesis via central, STAT3-independent mechanisms." *Nat Med* 14(6): 667-675.
- Bulló, M., P. García-Lorda, et al. (2003). "Systemic inflammation, adipose tissue tumor necrosis factor, and leptin expression." *Obes Res* 11(4): 525-531.
- Burnet, F. M. (1970). "An immunological approach to ageing." *Lancet* 2(7668): 358-360.
- Burton, G. F., M. H. Kosco, et al. (1991). "Iccosomes and the secondary antibody response." *Immunology* 73: 271-276.
- Butcher, S. K., H. Chahal, et al. (2001). "Senescence in innate immune responses: reduced neutrophil phagocytic capacity and CD16 expression in elderly humans." *J Leukoc Biol* 70(6): 881-886.
- Butcher, S. K., H. Chahal, et al. (2001). "Senescence in innate immune responses: reduced neutrophil phagocytic capacity and CD16 expression in elderly humans." *J Leukoc Biol* 70:881-886.
- Butler, R., A. D. Morris, et al. (2000). "Allopurinol normalizes endothelial dysfunction in type 2 diabetics with mild hypertension." *Hypertension* 35(3): 746-751.
- Cai, D., M. Yuan, et al. (2005). "Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB." *Nat Med* 11(2): 183-190.
- Cakman, I., J. Rowher, et al. (1996). "Dysregulation between Th1 and Th2 T cell subpopulations in the elderly." *Mech Ageing Dev* 87:197-209.
-

-
- Calder, P. C., N. Ahluwalia, et al. (2011). "Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity." *Br J Nutr* 106 Suppl 3: S5-78.
- Cancello, R. and K. Clément (2006). "Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue." *BJOG*. 113(10):1141-7.
- Candore, G., G. Di Lorenzo, et al. (1992). "The effect of age on mitogen responsive T cell precursors in human beings is completely restored by interleukin-2." *Mech Ageing Dev*. 63: 297-307.
- Candore, G., G. Di Lorenzo, et al. (1993). " γ -IFN, IL-4 and IL-6 in vitro production in old subjects." *Autoimmunity* 16:275-280.
- Cao, G. and R. L. Prior (1998). "Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum." *Clin Chem* 44(6 Pt 1): 1309-1315.
- Capel, I. D. and H. M. Dorrell (1984). "Abnormal antioxidant defence in some tissues of congenitally obese mice." *Biochem J*. 219(1):41-9.
- Carley, A. N., L. M. Semeniuk, et al. (2004). "Treatment of type 2 diabetic db/db mice with a novel PPARgamma agonist improves cardiac metabolism but not contractile function." *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 286(3):E449-55.
- Carney, J. M., P. E. Starke-Reed, et al. (1991). "Reversal of age-related increase in brain protein oxidation, decrease in enzymatic activity, and loss in temporal and spatial memory by chronic administration of the spin-trapping compound N-tert-butyl-alpha-phenylnitron." *Proc. Nat. Acad. Sci.USA*. 88: 3633-3636.
- Carroll, J. F. and C. K. Kyser (2002). "Exercise training in obesity lowers blood pressure independent of weight change." *Med Sci Sports Exerc* 34(4): 596-601.
- Carroll, L., J. Voisey, et al. (2004). "Mouse models of obesity." *Clin Dermatol* 22(4): 345-349.
- Cascales, M. (1999). "Respuestas celulares a la agresión oxidativa." En: *Estrés oxidativo, envejecimiento y enfermedad*. Instituto de España. pp. 9-46.
- Cases, N., A. Sureda, et al. (2006). "Response of antioxidant defences to oxidative stress induced by prolonged exercise: antioxidant enzyme gene expression in lymphocytes." *Eur J Appl Physiol* 98(3): 263-269.
- Castle, S. C. (2000). "Clinical relevance of age-related immune dysfunction." *Clin Infect Dis* 31:578-585.
- Cerami, A. (1985). "Hypothesis. Glucose as a mediator of aging." *J. Am. Geriatr. Soc*. 33: 626-634.
- Cildir, G., S. C. Akincilar, et al. (2013). "Chronic adipose tissue inflammation: all immune cells on the stage." *Trends Mol Med* 19(8): 487-500.
- Cino, M. and R. F. Del Maestro (1989). "Generation of hydrogen peroxide by brain mitochondria: the effect of reoxygenation following postdecapitative ischemia." *Arch Biochem Biophys* 269(2): 623-638.
- Clements, J. L. and G. A. Koretzky (1999). "Recent developments in lymphocyte activation: linking kinases to downstream signaling events." *J Clin Invest*. 103(7):925-9.
- Clements, J. L. and G. A. Koretzky (1999). "Recent developments in lymphocyte activation: linking kinases to downstream signalling events." *J. Clin. Invest*. 103: 925-929.
- Clerici, M. and G. M. Shearer (1993). "A Th1>Th2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection." *Immunol Today*. 14: 107-111.
-

-
- Cloarec, O. (2011). "Cross fitted partial least squares (CF-PLS): an alternative algorithm for a more reliable PLS." *J. Chemom.* 25: 208–215.
- Cnubben, N. H. P., I. M. C. M. Rietjens, et al. (2001). "The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense." *Environmental Toxicol. Pharmacol.* 10: 141-152.
- Cohen, H. J., C. F. Pieper, et al. (1997). "The association of plasma IL-6 levels with functional disability in community-dwelling elderly." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 52(4): M201-208.
- Coimbra, S., E. Castro, et al. (2006). "The effect of green tea in oxidative stress." *Clin Nutr* 25(5): 790-796.
- Colonna-Romano, G., M. Bulati, et al. (2003). "B cells in the aged: CD27, CD5, and CD40 expression." *Mech Ageing Dev* 124(4): 389-393.
- Colonna-Romano, G., M. Bulati, et al. (2008). "B cell immunosenescence in the elderly and in centenarians." *Rejuvenation Res* 11(2): 433-439.
- Colonna-Romano, G., M. Potestio, et al. (2002). "Gamma/delta T lymphocytes are affected in the elderly." *Exp Gerontol* 37:205-211.
- Comerci, J. T., Jr., C. D. Runowicz, et al. (1997). "Induction of transforming growth factor beta-1 in cervical intraepithelial neoplasia in vivo after treatment with beta-carotene." *Clin Cancer Res* 3(2): 157-160.
- Cooke, J. P. and R. K. Oka (2002). "Does leptin cause vascular disease?" *Circulation.* 106(15):1904-5.
- Coppack, S. W. (2001). "Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue." *Proc Nutr Soc* 60(3): 349-356.
- Corsini, E., F. Battaini, et al. (1999). "A defective protein kinase C anchoring system underlying age-associated impairment in TNF-alpha production in rat macrophages." *J Immunol* 163(6): 3468-3473.
- Cossio-Bolaños, M., R. Gómez Campos, et al. (2013). "[Reference curves for assessing the physical growth of male Wistar rats]." *Nutr Hosp* 28(6): 2151-2156.
- Couillard, C., G. Ruel, et al. (2005). "Circulating levels of oxidative stress markers and endothelial adhesion molecules in men with abdominal obesity." *J Clin Endocrinol Metab* 90(12): 6454-6459.
- Craig, S. A. (2004). "Betaine in human nutrition." *Am J Clin Nutr* 80(3): 539-549.
- Csiszar, A., M. Wang, et al. (2008). "Inflammation and endothelial dysfunction during aging: role of NF-kappaB." *J Appl Physiol* (1985) 105(4): 1333-1341.
- Cunningham-Rundles, S., D. F. McNealey, et al. (2005). "Mechanisms of nutrient modulation of the immune response." *J Allergy Clin Immunol* 115(6): 1119-1128; quiz 1129.
- Curat, C. A., A. Miranville, et al. (2004). "From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes." *Diabetes* 53(5): 1285-1292.
- Cutler, R. G. (1986). "Aging and oxygen radicals." En: *Physiology of Oxygen Radicals.* American Physiology Society. USA.
- Chakrabarti, R., C. Y. Jung, et al. (1994). "Changes in glucose transport and transporter isoforms during the activation of human peripheral blood lymphocytes by phytohemagglutinin." *J Immunol* 152(6): 2660-2668.
- Chakravarti, B. and G. N. Abraham (1999). "Aging and T-cell-mediated immunity." *Mech Ageing Dev* 108(3): 183-206.
-

-
- Chandra, R. K. (1980). "Cell-mediated immunity in genetically obese C57BL/6J ob/ob mice." *Am J Clin Nutr* 33(1): 13-16.
- Chandra, R. K. (1997). "Nutrition and the immune system: an introduction." *Am J Clin Nutr* 66(2): 460S-463S.
- Chandra, R. K. (2002). "Nutrition and the immune system from birth to old age." *Eur J Clin Nutr* 56 Suppl 3: S73-76.
- Chandra, R. K. and K. M. Kutty (1980). "Immunocompetence in obesity." *Acta Paediatr Scand* 69(1): 25-30.
- Chang, C. K. and J. LoCicero, 3rd (2004). "Overexpressed nuclear factor kappaB correlates with enhanced expression of interleukin-1beta and inducible nitric oxide synthase in aged murine lungs to endotoxic stress." *Ann Thorac Surg* 77(4): 1222-1227; discussion 1227.
- Chang, S. P., Y. H. Chen, et al. (2004). "Increase of anti-oxidation by exercise in the liver of obese Zucker rats." *Clin Exp Pharmacol Physiol* 31(8): 506-511.
- Chaput, J. P., L. Klingenberg, et al. (2011). "Physical activity plays an important role in body weight regulation." *J Obes* 2011.
- Chatgililoglu, C. and P. O'Neill (2001). "Free radicals associated with DNA damage." *Exp Gerontol* 36(9): 1459-1471.
- Chatham, J. C., C. Des Rosiers, et al. (2001). "Evidence of separate pathways for lactate uptake and release by the perfused rat heart." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281(4): E794-802.
- Chen, J., K. Flurkey, et al. (2002). "A reduced peripheral blood CD4+ lymphocyte proportion is a consistent ageing phenotype." *Mech Ageing Dev.* 123:145-153.
- Chen, J. J. and B. P. Yu (1994). "Alterations in mitochondrial membrane fluidity by lipid peroxidation products." *Free Radic Biol Med* 17(5): 411-418.
- Chen, X. and J. F. Kearney (1996). "Generation and function of natural self-reactive B lymphocytes." *Semin Immunol* 8(1): 19-27.
- Cheyrier, V. (2005). "Polyphenols in foods are more complex than often thought." *Am J Clin Nutr.* 81(1 Suppl):223S-229S.
- Choi, J., S. R. Opalenik, et al. (2000). "Modulation of glutathione synthetic enzymes by acidic fibroblast growth factor." *Arch Biochem Biophys* 375(1): 201-209.
- Chrysohoou, C., D. B. Panagiotakos, et al. (2007). "The implication of obesity on total antioxidant capacity in apparently healthy men and women: the ATTICA study." *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 17(8): 590-597.
- Chung, H. Y., B. Sung, et al. (2006). "The molecular inflammatory process in aging." *Antioxid Redox Signal* 8(3-4): 572-581.
- da Fonseca, L. J., V. Nunes-Souza, et al. (2014). "Oxidative status imbalance in patients with metabolic syndrome: role of the myeloperoxidase/hydrogen peroxide axis." *Oxid Med Cell Longev* 2014: 898501.
- da Luz, G., M. J. Frederico, et al. (2011). "Endurance exercise training ameliorates insulin resistance and reticulum stress in adipose and hepatic tissue in obese rats." *Eur J Appl Physiol* 111(9): 2015-2023.
- Dagupta, A. and T. Zdunek (1992). "In vitro peroxidation of human serum catalyzed by cupric ion: antioxidant rather than prooxidant role of ascorbate." *Life Sci.* 50: 875-882.
- Damjanovich, S., R. Gaspar, Jr., et al. (2003). "Signal transduction in T lymphocytes and aging." *Exp Gerontol* 38(3): 231-236.
-

- Dandona, P., P. Mohanty, et al. (2001). "The suppressive effect of dietary restriction and weight loss in the obese on the generation of reactive oxygen species by leukocytes, lipid peroxidation, and protein carbonylation." *J Clin Endocrinol Metab* 86(1): 355-362.
- Dardenne, M., W. Savino, et al. (1983). "Thymic dysfunction in the mutant diabetic (db/db) mouse." *J Immunol* 130(3): 1195-1199.
- Davies, K. J. A. (1987). "Protein damage and degradation by oxygen radicals. General aspects." *J.Biol. Chem.* 262: 9895-9901.
- Davies, K. J. A. and M. E. Delsignore (1987). "Protein damage and degradation by oxygen radicals. Modification of secondary and tertiary structure." *J.Biol. Chem.* 262: 9908-9913.
- Davies, K. J. A., M. E. Delsignore, et al. (1987). "Protein damage and degradation by oxygen radicals. Modification of amino acids." *J.Biol. Chem.* 262: 9902-9907.
- Daynes, R. A., E. Y. Enioutina, et al. (2003). "Role of redox imbalance in the molecular mechanisms responsible for immunosenescence." *Antioxid Redox Signal* 5(5): 537-548.
- de Ferranti, S. and D. Mozaffarian (2008). "The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences." *Clin Chem* 54(6): 945-955.
- de Heredia, F. P., S. Gómez-Martínez, et al. (2012). "Obesity, inflammation and the immune system." *Proc Nutr Soc* 71(2): 332-338.
- De la Flora, S., Cesarone, C.F., Balansky, R. (1995). "Chemoprotective properties and mechanism of N-acetylcysteine. The experimental background." *J. Cell. Biol.* 22: 33-41.
- De La Fuente, M. (1985). "Changes in the macrophage function with aging." *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 81(4): 935-938.
- De la Fuente, M. (2002). "Effects of antioxidants on immune system aging." *Eur J Clin Nutr* 56:55-58.
- De la Fuente, M. (2007). "El sistema inmunitario en el envejecimiento." En: *Bioquímica y Fisopatología del sistema inmune*. Cascales Angosto, M., García Barreno, P. (eds.) pp. 193-243. Instituto de España.
- De la Fuente, M. (2008 (a)). "Role of neuroimmunomodulation in aging." *Neuroimmunomodulation* 15(4-6): 213-223.
- De la Fuente, M. (2008 (b)). "Role of the immune system in aging." *Inmunología* 27: 176-191.
- De la Fuente, M. (2010). "Desarrollo de la respuesta del sistema inmunitario." En: *Fisiología Humana*. Tresguerres, J.A.F. (ed) pp. 353-373. 4ª edición Mc Graw Hill. Mexico.
- De la Fuente, M. (2011). "Funcionamiento del sistema inmunitario." En: *Inmunonutrición. En la salud y la enfermedad*. Marcos, A. (ed) pp. 2-25. Editorial Médica Panamericana S.A. Madrid
- De la Fuente, M. (2014 (a)). "The immune system, a marker and modulator of the rate of aging." En: *Immunology of aging*. Massoud, A., Rezaei, N. (eds) pp. 3-23. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- De la Fuente, M. (2014 (b)). "Crosstalk between the nervous and the immune systems in health and sickness." *Curr Pharm Des.* 20(29):4605-7.
- De la Fuente, M., I. Baeza, et al. (2004). "Changes with ageing in several leukocyte functions of male and female rats." *Biogerontology*. 5(6):389-400.

-
- De la Fuente, M., J. Cruces, et al. (2011). "Strategies to improve the functions and redox state of the immune system in aged subjects." *Curr Pharm Des* 17(36): 3966-3993.
- De la Fuente, M. and N. M. De Castro (2012). "Obesity as a model of premature immunosenescence." *Curr Immunol Rev.* 8:63-75.
- De la Fuente, M., M. Del Río, et al. (2001). "Changes with aging in the modulation by neuropeptide Y of murine peritoneal macrophage functions." *J Neuroimmunol* 116:156-167.
- De la Fuente, M. and L. Gimenez-Llort (2010). "Models of aging of neuroimmunomodulation: strategies for its improvement." *Neuroimmunomodulation.* 17(3):213-6. .
- De la Fuente, M., A. Hernanz, et al. (2004). "Changes with age in peritoneal macrophage functions. Implication of leukocytes in the oxidative stress of senescence." *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 50 Online Pub: OL683-690.
- De la Fuente, M., A. Hernanz, et al. (2008). "Vitamin E ingestion improves several immune functions in elderly men and women." *Free Radic Res* 42:272-280.
- De la Fuente, M., A. Hernanz, et al. (2005). "The immune system in the oxidation stress conditions of aging and hypertension. Favorable effects of antioxidants and physical exercise. ." *Antioxid. Redox Signal.* 7: 1356-1366.
- De la Fuente, M., S. Medina, et al. (2000). "Effect of aging on the modulation of macrophage functions by neuropeptides." *Life Sci* 67:2125-2135.
- De la Fuente, M. and J. Miquel (2009). "An update of the oxidation-inflammation theory of aging: the involvement of the immune system in oxi-inflamm-aging." *Curr Pharm Des* 15:3003-3026.
- De La Fuente, M., J. Miquel, et al. (2002). "The amount of thiolic antioxidant ingestion needed to improve several immune functions is higher in aged than in adult mice." *Free Radic Res.* 36(2):119-26.
- De la Rosa, O., G. Pawelec, et al. (2006). "Immunological biomarkers of ageing in man: changes in both innate and adaptive immunity are associated with health and longevity." *Biogerontology* 7:471-481.
- de Lemos, E. T., J. Oliveira, et al. (2012). "Regular physical exercise as a strategy to improve antioxidant and anti-inflammatory status: benefits in type 2 diabetes mellitus." *Oxid Med Cell Longev.* 2012:741545 doi: 10.1155/2012/741545.
- de Lemos, E. T., F. Reis, et al. (2007). "Exercise training is associated with improved levels of C-reactive protein and adiponectin in ZDF (type 2) diabetic rats." *Med Sci Monit.* 13(8):BR168-74.
- De Martinis, M., C. Franceschi, et al. (2006). "Inflammation markers predicting frailty and mortality in the elderly." *Exp Mol Pathol* 80(3): 219-227.
- De Martinis, M., M. Modesti, et al. (2000). "Adhesion molecules on peripheral blood lymphocyte subpopulations in the elderly." *Life Sci* 68(2): 139-151.
- De Oliveira, C. M. B., R. K. Sakata, et al. (2011). "Citocinas y dolor." *Rev Bras Anesthesiol* 61(2): 138-142.
- de Oliveira Leal, V. and D. Mafra (2013). "Adipokines in obesity." *Clin Chim Acta* 419: 87-94.
- De Pablo, R., J. Monserrat, et al. (2005). "Balance entre citoquinas pro y antiinflamatorias en estados sépticos." *Med Intensiva* 29(3): 151-158.
- De Rosa, V., C. Procaccini, et al. (2007). "A key role of leptin in the control of regulatory T cell proliferation." *Immunity* 26(2): 241-255.
-

-
- del Rey, A., A. Kabiersch, et al. (2002). "Involvement of noradrenergic nerves in the activation and clonal deletion of T cells stimulated by superantigen in vivo." *J Neuroimmunol* 127(1-2): 44-53.
- Del Río, M., A. Hernanz, et al. (1994). "Bombesin, gastrin-releasing peptide and neuromedin C modulate murine lymphocyte proliferation through adherent accessory cells and activate protein kinase C." *Peptides* 15: 15-22.
- Denckla, W. D. (1975). "A time to die." *Life Sci.* 16: 31-44.
- Deneke, S. M. and B. L. Fanburg (1989). "Regulation of cellular glutathione." *Am J Physiol* 257(4 Pt 1): L163-173.
- Denisova, N. A., S. A. Erat, et al. (1998). "Differential effect of aging on cholesterol modulation of carbachol-stimulated low-Km GTPase in striatal synaptosomes." *Exp. Gerontol.* 33: 249-265.
- Després, J. P., C. Bouchard, et al. (1985). "Effects of aerobic training on fat distribution in male subjects." *Med Sci Sports Exerc* 17(1): 113-118.
- Devaraj, S., D. Y. Xu, et al. (2003). "C-reactive protein increases plasminogen activator inhibitor-1 expression and activity in human aortic endothelial cells: implications for the metabolic syndrome and atherothrombosis." *Circulation* 107(3): 398-404.
- Di Iorio, A., L. Ferrucci, et al. (2003). "Serum IL-1 β levels in health and disease: a population-based study. 'The InCHIANTI study'." *Cytokine* 22(6): 198-205.
- Di Lorenzo, G., C. R. Balistreri, et al. (1999). "Granulocyte and natural killer activity in the elderly." *Mech Ageing Dev* 108(1): 25-38.
- Dieterle, F., A. Ross, et al. (2006). "Probabilistic quotient normalization as robust method to account for dilution of complex biological mixtures. Application in ^1H NMR metabonomics." *Anal. Chem.* 78: 4281-4290.
- Dilman, V. M. (1986). "Ontogenetic model of ageing and disease formation and mechanism of natural selection." *J. Theor. Biol.* 118: 73-81.
- Dixit, V. D., M. Mielenz, et al. (2003). "Leptin induces growth hormone secretion from peripheral blood mononuclear cells via a protein kinase C- and nitric oxide-dependent mechanism." *Endocrinology* 144(12): 5595-5603.
- do Nascimento, C. O., L. Hunter, et al. (2004). "Regulation of haptoglobin gene expression in 3T3-L1 adipocytes by cytokines, catecholamines, and PPAR γ ." *Biochem Biophys Res Commun* 313(3): 702-708.
- Dobrian, A. D., M. J. Davies, et al. (2000). "Development of hypertension in a rat model of diet-induced obesity." *Hypertension* 35(4): 1009-1015.
- Douziech, N., I. Seres, et al. (2002). "Modulation of human lymphocyte proliferative response with aging." *Exp Gerontol* 37(2-3): 369-387.
- Drela, N., E. Kozdron, et al. (2004). "Moderate exercise may attenuate some aspects of immunosenescence." *BMC Geriatr.* 4:8.
- Dröge, W. (2002). "Aging-related changes in the thiol/disulfide redox state: implications for the use of thiol antioxidants." *Exp. Gerontol.* 37: 1333-1345.
- Dröge, W. and R. Breitkreutz (2000). "Glutathione and immune function." *Proc Nutr Soc* 59(4): 595-600.
- Dugas, A. J., Jr., J. Castaneda-Acosta, et al. (2000). "Evaluation of the total peroxyl radical-scavenging capacity of flavonoids: structure-activity relationships." *J Nat Prod* 63(3): 327-331.
- Eckel, R. H., S. M. Grundy, et al. (2005). "The metabolic syndrome." *Lancet* 365(9468): 1415-1428.
-

-
- Economos, A. C., J. Miquel, et al. (1980). "Is there intrinsic mitochondrial aging?." *Age* 3: 117. .
- Effros, R. B. (2000). "Costimulatory mechanisms in the elderly." *Vaccine* 18(16): 1661-1665.
- Elenkov, I. J. and G. P. Chrousos (2002). "Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity." *Ann N Y Acad Sci* 966: 290-303.
- Elenkov, I. J., R. L. Wilder, et al. (2000). "The sympathetic nerve- an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system." *Pharmacol. Rev.* 52: 595-638.
- Engeli, S., R. Negrel, et al. (2000). "Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system." *Hypertension* 35(6): 1270-1277.
- Engwerda, C. R., B. S. Fox, et al. (1996). "Cytokine production by T lymphocytes from young and aged mice." *J Immunol* 156(10): 3621-3630.
- Erba, D., P. Riso, et al. (2005). "Effectiveness of moderate green tea consumption on antioxidant status and plasma lipid profile in humans." *J. Nutr. Biochem.* 16: 144-149.
- Erdeve, O., Z. Siklar, et al. (2004). "Antioxidant superoxide dismutase activity in obese children." *Biol Trace Elem Res* 98(3): 219-228.
- Escorihuela, R. M., A. Fernández-Teruel, et al. (1999). "Inbred Roman high- and low-avoidance rats: differences in anxiety, novelty-seeking, and shuttlebox behaviors." *Physiol Behav* 67(1): 19-26.
- Esparza, B., H. Sánchez, et al. (1996). "Neutrophil function in elderly persons assessed by flow cytometry." *Immunol. Invest.* 25: 185-190.
- Everitt, A. V. and J. A. Burgess (1976). "Hypothalamus pituitary and aging." Charles C Thomas, Springfield IL.
- Fabris, N. (1990). "A neuroendocrine-immune theory of aging." *Int J Neurosci* 51(3-4): 373-375.
- Fabris, N. (1991). "Neuroendocrine-immune interactions: a theoretical approach to aging." *Arch Gerontol Geriatr* 12(2-3): 219-230.
- Fagiolo, U., A. Cossarizza, et al. (1993). "Increased cytokine production in mononuclear cells of healthy elderly people." *Eur J Immunol* 23(9): 2375-2378.
- Fain, J. N., S. W. Bahouth, et al. (2004). "TNF α release by the nonfat cells of human adipose tissue." *Int J Obes Relat Metab Disord* 28(4): 616-622.
- Falagas, M. E. and M. Kompoti (2006). "Obesity and infection." *Lancet Infect Dis* 6(7): 438-446.
- Fallon, K. E., S. K. Fallon, et al. (2001). "The acute phase response and exercise: court and field sports." *Br J Sports Med* 35(3): 170-173.
- Fan, T. (1996). "Metabolite profiling by one- and two-dimensional NMR analysis of complex mixtures." *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 28: 161-219.
- Fantuzzi, G. and R. Faggioni (2000). "Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis." *J Leukoc Biol* 68(4): 437-446.
- Febbraio, M., D. P. Hajjar, et al. (2001). "CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism." *J Clin Invest* 108(6): 785-791.
- Febbraio, M., E. A. Podrez, et al. (2000). "Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice." *J Clin Invest* 105(8): 1049-1056.
-

-
- Felten, D. L., S. Y. Felten, et al. (1987). "Noradrenergic sympathetic neural interactions with the immune system: structure and function." *Immunol Rev* 100: 225-260.
- Felten, S. Y. and D. L. Felten (1991). "Innervation of lymphoid tissue." En: *Psychoneuroimmunology*. 2nd ed. Ader, R., Felten, D.L., Cohen, R., Eds., pp. 27-38. Academic Press, San Diego, CA.
- Feng, L., Y. Xia, et al. (1995). "Involvement of reactive oxygen intermediates in cyclooxygenase-2 expression induced by interleukin-1, tumor necrosis factor- α and lipopolysaccharide." *J. Clin. Invest.* 95: 1669-1675.
- Fernández-Real, J. M. and W. Ricart (2003). "Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome." *Endocr Rev* 24(3): 278-301.
- Ferrández, M. D., R. Correa, et al. (1999). "Effects in vitro of several antioxidants on the natural killer function of aging mice." *Exp Gerontol* 34:675-685.
- Ferrández, M. D., R. Correa, et al. (1999). "Effects in vitro of several antioxidants on the natural killer function of aging mice." *Exp Gerontol* 34: 675-685.
- Ferrández, M. D., M. de la Fuente, et al. (1996). "Anabolic steroids and lymphocyte function in sedentary and exercise-trained rats." *J Steroid Biochem Mol Biol* 59(2): 225-232.
- Ferrante, A. W., Jr. (2007). "Obesity-induced inflammation: a metabolic dialogue in the language of inflammation." *J Intern Med* 262(4): 408-414.
- Ferrari, B., M. Arnold, et al. (2005). "Subdiaphragmatic vagal deafferentation affects body weight gain and glucose metabolism in obese male Zucker (fa/fa) rats." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289(4): R1027-1034.
- Ferrucci, L., A. Corsi, et al. (2005). "The origins of age-related proinflammatory state." *Blood* 105(6): 2294-2299.
- Fleming, J., J. Miquel, et al. (1982). "Is cell aging caused by respiration-dependent injury to the mitochondrial genome?.." *Gerontology* 28: 44-53.
- Forner, M. A., C. Barriga, et al. (1995). "A study of the role of corticosterone as a mediator in exercise-induced stimulation of murine macrophage phagocytosis." *J Physiol.* 488 (Pt 3):789-94.
- Franceschi, C. (2007). "Inflammaging as a major characteristic of old people: can it be prevented or cured?" *Nutr Rev*; 65:S173-S176.
- Franceschi, C., M. Bonafè, et al. (2000 (a)). "Human immunosenescence: the prevailing of innate immunity, the failing of clonotypic immunity, and the filling of immunological space." *Vaccine* 18(16): 1717-1720.
- Franceschi, C., M. Bonafè, et al. (2000 (b)). "Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence." *Ann N Y Acad Sci* 908: 244-254.
- Franceschi, C., S. Valensin, et al. (2000). "The network and the remodelling theories of aging: historical background and new perspectives." *Exp Gerontol* 35:879-896.
- Franceschi, C., S. Valensin, et al. (1999). "Biomarkers of immunosenescence within a evolutionary perspective: the challenge of heterogeneity and the role of antigenic load." *Exp Gerontol* 34:911-921.
- Frasca, D., D. Nguyen, et al. (2003). "Effects of aging on proliferation and E47 transcription factor activity induced by different stimuli in murine splenic B cells." *Mech Ageing Dev* 124(4): 361-369.
- Frei, B. and J. V. Higdon (2003). "Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies." *J Nutr* 133(10): 3275S-3284S.
- Fridovich, Y. (1989). "Superoxide dismutases. An adaptation to the paramagnetic gas." *J. Biol. Chem.* 264: 7761-7764.
-

-
- Friedman, E. M. and M. R. Irwin (1997). "Modulation of immune cell function by the autonomic nervous system." *Pharmacol Ther* 74(1): 27-38.
- Friedman, J. M. (2000). "Obesity in the new millennium." *Nature* 404:632-4.
- Friedman, J. M. (2011). "Leptin and the regulation of body weigh." *Keio J Med* 60(1): 1-9.
- Friedman, J. M. and J. L. Halaas (1998). "Leptin and the regulation of body weight in mammals." *Nature* 395(6704): 763-770.
- Friedman, J. M. and C. S. Mantzoros (2015). "20 years of leptin: from the discovery of the leptin gene to leptin in our therapeutic armamentarium." *Metabolism*. 64(1):1-4.
- Friedrichs, W. E., A. L. Navarrijo-Ashbaugh, et al. (1995). "Expression and inflammatory regulation of haptoglobin gene in adipocytes." *Biochem Biophys Res Commun* 209(1): 250-256.
- Frolkis, V. V. (1982). "Aging and life prolonging processes." Springer Verlag, Wien, New York.
- Frühbeck, G. (2001). "A heliocentric view of leptin." *Proc Nutr Soc* 60(3): 301-318.
- Frühbeck, G., J. Gómez-Ambrosi, et al. (2001). "The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280(6): E827-847.
- Fujita, K., Nishizawa, H., Funahashi, T., Shimomura, I., Shimabukuro, M. (2006). "Systemic oxidative stress is associated with visceral fat accumulation and the metabolic syndrome." *Circ J*. 70(11):1437-42.
- Fulop, T., Jr., N. Douziech, et al. (2001). "Cyclodextrin modulation of T lymphocyte signal transduction with aging." *Mech Ageing Dev* 122(13): 1413-1430.
- Fulop, T., Jr., C. Leblanc, et al. (1995). "Cellular distribution of protein kinase C isozymes in CD3-mediated stimulation of human T lymphocytes with aging." *FEBS Lett* 375(1-2): 69-74.
- Fulop, T., A. Larbi, et al. (2004). "Signal transduction and functional changes in neutrophils with aging." *Aging Cell* 3(4): 217-226.
- Furukawa, S., T. Fujita, et al. (2004). "Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome." *J Clin Invest* 114(12): 1752-1761.
- Fusco, D., G. Colloca, et al. (2007). "Effects of antioxidant supplementation on the aging process." *Clin Interv Aging* 2(3): 377-387.
- Gainsford, T., T. A. Willson, et al. (1996). "Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells." *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93(25):14564-8.
- Gallardo, N., E. Bonzón-Kulichenko, et al. (2007). "Tissue-specific effects of central leptin on the expression of genes involved in lipid metabolism in liver and white adipose tissue." *Endocrinology* 148(12): 5604-5610.
- García-Sáinz, J. A., R. Alcántara-Hernández, et al. (1992). "Modulation by protein kinase C of the hormonal responsiveness of hepatocytes from lean (Fa/fa?) and obese (fa/fa) Zucker rats." *Biochim Biophys Acta* 1135(2): 221-225.
- García de La Asunción, J., A. Millán, et al. (1996). "Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA." *FASEB J* 10: 333-338.
- Garrod, S., E. Humpher, et al. (2001). "High-resolution (1)H NMR and magic angle spinning NMR spectroscopic investigation of the biochemical effects of 2-
-

- bromoethanamine in intact renal and hepatic tissue." *Magn. Reson. Med.* 45: 781–790.
- Ghanim, H., A. Aljada, et al. (2004). "Circulating mononuclear cells in the obese are in a proinflammatory state." *Circulation* 110(12): 1564-1571.
- Ghigliotti, G., C. Barisione, et al. (2014). "Adipose tissue immune response: novel triggers and consequences for chronic inflammatory conditions." *Inflammation* 37(4): 1337-1353.
- Ghiselli, A., M. Serafini, et al. (2000). "Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data." *Free Radic Biol Med.* 29(11):1106-14.
- Gho, C. G., H. J. Kim, et al. (2003). "Modulation of glutathione and thioredoxin systems by caloric restriction during the aging process." *Exp. Gerontol.* 38: 539-548.
- Gholamnezhad, Z., M. H. Boskabady, et al. (2014). "Evaluation of immune response after moderate and overtraining exercise in wistar rat." *Iran J Basic Med Sci* 17(1): 1-8.
- Ghosh, S., S. Golbidi, et al. (2010). "Selecting exercise regimens and strains to modify obesity and diabetes in rodents: an overview." *Clin Sci (Lond)* 119(2): 57-74.
- Gil, A., C. María Aguilera, et al. (2007). "Altered signalling and gene expression associated with the immune system and the inflammatory response in obesity." *Br J Nutr* 98 Suppl 1: S121-126.
- Gil, L., W. Siems, et al. (2006). "Age-associated analysis of oxidative stress parameters in human plasma and erythrocytes." *Free Radic Res* 40(5): 495-505.
- Gilad, G. M. and V. H. Gilad (1987). "Age-related reductions in brain cholinergic and dopaminergic indices in two rat strains differing in longevity. ." *Brain Res.* 408: 247-250.
- Gillis, S., R. Kozak, et al. (1981). "Immunological studies of aging. Decreased production of and response to T cell growth factor by lymphocytes from aged humans." *J Clin Invest* 67(4): 937-942.
- Giménez-Llort, L., A. Fernández-Teruel, et al. (2002). "Mice lacking the adenosine A1 receptor are anxious and aggressive, but are normal learners with reduced muscle strength and survival rate." *Eur J Neurosci* 16(3): 547-550.
- Gimeno, R. E. and L. D. Klamann (2005). "Adipose tissue as an active endocrine organ: recent advances." *Curr Opin Pharmacol.* 5(2):122-8.
- Ginaldi, L., M. De Martinis, et al. (2001). "Changes in the expression of surface receptors on lymphocyte subsets in the elderly: quantitative flow cytometric analysis." *Am J Hematol* 67(2): 63-72.
- Ginaldi, L., M. De Martinis, et al. (1999). "The immune system in the elderly: III. Innate immunity." *Immunol Res* 20(2): 117-126.
- Giraldo, E., J. J. Garcia, et al. (2009). "Exercise intensity-dependent changes in the inflammatory response in sedentary women: role of neuroendocrine parameters in the neutrophil phagocytic process and the pro-/anti-inflammatory cytokine balance." *Neuroimmunomodulation* 16(4): 237-244.
- Giuliani, N., P. Sansoni, et al. (2001). "Serum interleukin-6, soluble interleukin-6 receptor and soluble gp130 exhibit different patterns of age- and menopause-related changes." *Exp Gerontol* 36(3): 547-557.

-
- Glaser, S. J., H. Schwalbe, et al. (1996). "Directed TOCSY, a method for selection of directed correlations by optimal combinations of isotropic and longitudinal mixing." *J. Magn. Reson., Ser. B* 112: 160–180.
- Globerson, A. and R. B. Effros (2000). "Ageing of lymphocytes and lymphocytes in the aged." *Immunol Today* 21(10): 515-521.
- Gomez-Cabrera, M. C., C. Borrás, et al. (2005). "Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats." *J Physiol* 567(Pt 1): 113-120.
- Gomez-Cabrera, M. C., E. Domenech, et al. (2008). "Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training." *Free Radic Biol Med.* 15;44(2):126-31.
- Gomez-Cabrera, M. C., A. Martínez, et al. (2006). "Oxidative stress in marathon runners: interest of antioxidant supplementation." *Br J Nutr* 96 Suppl 1: S31-33.
- Gómez-Hernández, A., L. Perdomo, et al. (2013). "Role of white adipose tissue in vascular complications due to obesity." *Clin Investig Arterioscler.* Jan-Mar;25(1):27-35.
- Gomez, C. R., E. D. Boehmer, et al. (2005). "The aging innate immune system." *Curr Opin Immunol* 17(5): 457-462.
- Gomez, C. R., V. Nomellini, et al. (2008). "Innate immunity and aging." *Exp Gerontol* 43(8): 718-728.
- Gon, Y., S. Hashimoto, et al. (1996). "Lower serum concentration of cytokines in elderly patients with pneumonia and the impaired blood monocytes in the elderly." *Clin. Exp. Immunol.* 106: 120-126.
- Gon, Y., S. Hashimoto, et al. (1996). "Lower serum concentrations of cytokines in elderly patients with pneumonia and the impaired production of cytokines by peripheral blood monocytes in the elderly." *Clin Exp Immunol* 106(1): 120-126.
- González, J., N. Valls, et al. (2014). "Essential hypertension and oxidative stress: New insights." *World J Cardiol* 6(6): 353-366.
- Gorgas, G., E. R. Butch, et al. (1997). "Diminished activation of the MAP kinase pathway in CD3-stimulated T lymphocytes from old mice." *Mech Ageing Dev* 94(1-3): 71-83.
- Goth, L. (2000). "Lipid and carbohydrate metabolisms in acatalasemia." *Clin. Chem.* 46: 564-566.
- Goto, S., H. Naito, et al. (2007). "Hormetic effects of regular exercise in aging: correlation with oxidative stress." *Appl Physiol Nutr Metab* 32(5): 948-953.
- Gouin, J. P., L. Hantsoo, et al. (2008). "Immune dysregulation and chronic stress among older adults: a review." *Neuroimmunomodulation* 15:251-259.
- Granger, D. N., K. Y. Stokes, et al. (2001). "Splanchnic ischaemia-reperfusion injury: mechanistic insights provided by mutant mice." *Acta Physiol Scand* 173(1): 83-91.
- Grant, R. W. and V. D. Dixit (2015). "Adipose tissue as an immunological organ." *Obesity (Silver Spring)*. 23(3):512-8.
- Gregg, R., C. M. Smith, et al. (2005). "The number of human peripheral blood CD4+ CD25 high regulatory T cells increases with age." *Clin Exp Immunol* 140:540-546.
- Gregor, M. F. and G. S. Hotamisligil (2007). "Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease." *J Lipid Res* 48(9): 1905-1914.
-

-
- Griffith, O. W. and A. Meister (1985). "Origin and turnover of mitochondrial glutathione." *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(14): 4668-4672.
- Grundy, S. M., H. B. Brewer, Jr., et al. (2004). "Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24(2): e13-18.
- Grundy, S. M., J. I. Cleeman, et al. (2005). "Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement." *Circulation* 112(17): 2735-2752.
- Grune, T. and K. J. A. Davies (2001). "Oxidative processes in aging." En: *Handbook of the biology of aging*. Masoro, E.J., Austad, S.N. (Eds.). Acad. Press, San Diego. pp: 25-28.
- Gruver, A. L., L. L. Hudson, et al. (2007). "Immunosenescence of ageing." *J Pathol* 211:144-156.
- Guayerbas, N. (2003). "Cambios con la edad en la función inmune en un modelo murino de envejecimiento prematuro. Efecto de los antioxidantes." Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Guayerbas, N., M. Catalán, et al. (2002). "Relation of behaviour and macrophage function to life span in a murine model of premature immunosenescence." *Behav Brain Res* 134(1-2): 41-48.
- Guayerbas, N. and M. De la Fuente (2003). "An impairment of phagocytic function is linked to a shorter life span in two strains of prematurely aging mice." *Dev Comp Immunol* 27:339-350.
- Guayerbas, N., M. Puerto, et al. (2005 (b)). "Effect of diet supplementation with N-acetylcysteine on leucocyte functions in prematurely aging mice." *J App Biomed* 3: 199-205.
- Guayerbas, N., M. Puerto, et al. (2005 (a)). "Thiolic antioxidant supplementation of the diet reverses age-related behavioural dysfunction in prematurely ageing mice." *Pharmacol Biochem Behav* 80(1): 45-51.
- Guayerbas, N., M. Puerto, et al. (2002). "Leukocyte function and life span in a murine model of premature immunosenescence." *Exp Gerontol.* 37(2-3):249-56.
- Guerrero-Romero, F., C. Bermudez-Peña, et al. (2011). "Severe hypomagnesemia and low-grade inflammation in metabolic syndrome." *Magnes Res* 24(2): 45-53.
- Gurr, M. I. (1983). "The role of lipids in the regulation of the immune system." *Prog Lipid Res* 22(4): 257-287.
- Gust, D. A., M. E. Wilson, et al. (2000). "Activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis is altered by aging and exposure to social stress in female rhesus monkeys." *J Clin Endocrinol Metabol* 85:2556-2563.
- Haack, M., D. Hinze-Selch, et al. (1999). "Plasma levels of cytokines and soluble cytokine receptors in psychiatric patients upon hospital admission: effects of confounding factors and diagnosis." *J Psychiatr Res.* 33(5):407-18.
- Haddad, J. J. (2002). "Oxygen homeostasis, thiol equilibrium and redox regulation of signalling transcription factors in the alveolar epithelium." *Cell Signal* 14(10): 799-810.
- Hafstad, A. D., G. H. Solevåg, et al. (2006). "Perfused hearts from Type 2 diabetic (db/db) mice show metabolic responsiveness to insulin." *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 290(5):H1763-9.
-

-
- Hakkak, R., A. W. Holley, et al. (2005). "Obesity promotes 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumor development in female zucker rats." *Breast Cancer Res* 7(5): R627-633.
- Halliwell, B. (1999). "Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning)." *Free Radic Res* 31(4): 261-272.
- Halliwell, B. and J. M. C. Gutteridge (1989). "Free radicals in aging and disease. En: Free radical in biology and medicine. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (Eds). 2nd ed. Oxford U.K. Clarendon Pree, pp. 416-508."
- Halliwell, B. and J. M. C. Gutteridge (1999). "Free Radicals in Biology and Medicine " Oxford University Press (Eds.), New York. pp. 105-245.
- Hansen, K., T. Shriver, et al. (2005). "The effects of exercise on the storage and oxidation of dietary fat." *Sports Med* 35(5): 363-373.
- Hariri, N. and L. Thibault (2010). "High-fat diet-induced obesity in animal models." *Nutr Res Rev* 23(2): 270-299.
- Harley, C. B., A. B. Futcher, et al. (1990). "Telomeres shorten during aging of human fibroblast. ." *Nature* 345: 458-460.
- Harman, D. (1956). "Aging: a theory based on free radicals and radiation chemistry." *J. Gerontol.* 11: 298-300.
- Harman, D. (1972). "The biologic clock: the mitochondria?" *J Am Geriatr Soc* 20(4): 145-147.
- Harman, D. (1993). "Free radical involvement in aging. Pathophysiology and therapeutic implications." *Drugs Aging* 3(1): 60-80.
- Harman, D. (1998). "Aging and oxidative stress." *J Int Fed Clin Chem* 10(1): 24-27.
- Harris, R. B. (2000). "Leptin--much more than a satiety signal." *Annu Rev Nutr.* 20:45-75.
- Harrison, R. (2002). "Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now?" *Free Radic. Biol. Med.* 33: 774-797.
- Harrison, R. (2004). "Physiological roles of xanthine oxidoreductase." *Drug Metab Rev* 36(2): 363-375.
- Hartz, C. S., K. M. Nieman, et al. (2006). "Hepatic phosphatidylethanolamine N-methyltransferase expression is increased in diabetic rats." *J Nutr.* 136(12):3005-9.
- Häussinger, D. and F. Schliess (2007). "Glutamine metabolism and signaling in the liver." *Front Biosci* 12: 371-391.
- Hayes, K. C. and J. A. Sturman (1981). "Taurine in metabolism." *Annu Rev Nutr* 1: 401-425.
- Hayflick, L. (1980). "Recent advances in the cell biology of aging." *Mech Ageing Dev* 14(1-2): 59-79.
- Hayflick, L. (2007). "Biological aging is no longer an unsolved problem." *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1100: 1-13.
- He, Q., J. Pu, et al. (2014). "Liver X receptor agonist treatment attenuates cardiac dysfunction in type 2 diabetic db/db mice." *Cardiovasc Diabetol* 13: 149.
- Heales, S. J. and J. P. Bolaños (2002). "Impairment of brain mitochondrial function by reactive nitrogen species: the role of glutathione in dictating susceptibility." *Neurochem. Int.* 40: 469-474.
- Heber, D. (2010). "An integrative view of obesity." *Am J Clin Nutr* 91(1): 280S-283S.
- Hector, J., B. Schwarzloh, et al. (2007). "TNF-alpha alters visfatin and adiponectin levels in human fat." *Horm Metab Res* 39(4): 250-255.
-

-
- Heijnen, C. J. and A. Kavelaars (1999). "The importance of being receptive." *J. Neuroimmunol.* 100: 197-202.
- Henriksen, E. J. (2002). "Invited review: Effects of acute exercise and exercise training on insulin resistance." *J Appl Physiol* (1985) 93(2): 788-796.
- Heppner, F. L., R. M. Ransohoff, et al. (2015). "Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease." *Nat Rev Neurosci* 16(6): 358-372.
- Herrero, A. and G. Barja (2001). "Effect of aging on mitochondrial and nuclear DNA oxidative damage in the heart and brain throughout the life-span of the rat." *J. Am. Aging Association* 24: 45-50.
- Higuchi, H. and H. Nagahata (1998). "Comparisons of superoxide production, protein kinase C and tyrosine kinase activities in neutrophils from neonatal calves and cows." *Res. Vet. Sci.* 65: 139-143.
- Hijmans, W., J. Radl, et al. (1984). "Autoantibodies in highly aged humans." *Mech Ageing Dev* 26(1): 83-89.
- Hille, R. and T. Nishino (1995). "Flavoprotein structure and mechanism. 4. Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase." *Faseb J* 9(11): 995-1003.
- Himmerich, H., S. Fulda, et al. (2006). "TNF-alpha, soluble TNF receptor and interleukin-6 plasma levels in the general population." *Eur Cytokine Netw* 17(3): 196-201.
- Hjartaker, A., H. Langseth, et al. (2008). "Obesity and diabetes epidemics: cancer repercussions." *Adv Exp Med Biol* 630: 72-93.
- Hobbs, M. V. and D. N. Ernst (1997). "T cell differentiation and cytokine expression in late life." *Dev Comp Immunol* 21:170-461.
- Homo-Delarche, F. and M. Dardenne (1993). "The neuroendocrine-immune axis." *Springer Semin Immunopathol* 14(3): 221-238.
- Hoogeveen, E. K., P. J. Kostense, et al. (1998). "Hyperhomocysteinemia is associated with an increased risk of cardiovascular disease, especially in non-insulin-dependent diabetes mellitus: a population-based study." *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 18(1):133-8.
- Hosogai, N., A. Fukuhara, et al. (2007). "Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation." *Diabetes* 56(4): 901-911.
- Hotamisligil, G. S. (2000). "Molecular mechanisms of insulin resistance and the role of the adipocyte." *Int J Obes Relat Metab Disord* 24 Suppl 4: S23-27.
- Hotamisligil, G. S., P. Arner, et al. (1995). "Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance." *J Clin Invest* 95(5): 2409-2415.
- Hotamisligil, G. S., N. S. Shargill, et al. (1993). "Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance." *Science* 259(5091): 87-91.
- Howard, J. K., G. M. Lord, et al. (1999). "Leptin protects mice from starvation-induced lymphoid atrophy and increases thymic cellularity in ob/ob mice." *J Clin Invest* 104(8): 1051-1059.
- Hoyer, S. (1986). "Senile dementia and Alzheimer's disease. Brain blood flow and metabolism." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 10(3-5): 447-478.
- Hsieh, Y. Y., C. C. Chang, et al. (2008). "Effect of exercise training on calpain systems in lean and obese Zucker rats." *Int J Biol Sci* 4(5): 300-308.
- Huang, P. L. (2005). "Unraveling the links between diabetes, obesity, and cardiovascular disease." *Circ Res.* 2005 Jun 10;96(11):1129-31.
-

-
- Huang, P. L. (2009). "A comprehensive definition for metabolic syndrome." *Dis Model Mech* 2(5-6): 231-237.
- Huh, J. Y., Y. J. Park, et al. (2014). "Crosstalk between adipocytes and immune cells in adipose tissue inflammation and metabolic dysregulation in obesity." *Mol Cells*. 37(5):365-71.
- Hummasti, S. and G. S. Hotamisligil (2010). "Endoplasmic reticulum stress and inflammation in obesity and diabetes." *Circ Res* 107(5): 579-591.
- Hunsche, C., O. Hernandez, et al. (2015). "Impaired Immune Response in Old Mice Suffering from Obesity and Premature Immunosenescence in Adulthood." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*.
- Huppert, F. A., W. Solomou, et al. (1998). "Aging and lymphocyte subpopulation: whole-blood analysis of immune markers in a large population sample of healthy elderly individuals." *Exp Gerontol* 33:593-600.
- Huxtable, R. J. (1992). "Physiological actions of taurine." *Physiol Rev* 72(1): 101-163.
- Ikejima, S., S. Sasaki, et al. (2005). "Impairment of host resistance to *Listeria monocytogenes* infection in liver of db/db and ob/ob mice." *Diabetes* 54(1): 182-189.
- Ikemoto, S., M. Takahashi, et al. (1996). "High-fat diet-induced hyperglycemia and obesity in mice: differential effects of dietary oils." *Metabolism* 45(12): 1539-1546.
- Imai, Y. and R. S. Ahima (2005). "Rodents as genetic models of obesity." *Drug Discov Today Dis Models*. 2:165-75.
- Inal, M. E., G. Kanbak, et al. (2001). "Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging." *Clin Chim Acta* 305(1-2): 75-80.
- Inkeles, B., J. B. Innes, et al. (1977). "Immunological studies of Aging. III. Cytokinetic basis for the impaired response of lymphocytes from aged humans to plant lectins." *J Exp Med* 145(5): 1176-1187.
- Ishikawa, M., J. Kitayama, et al. (2007). "Adiponectin inhibits the growth and peritoneal metastasis of gastric cancer through its specific membrane receptors AdipoR1 and AdipoR2." *Cancer Sci*. 98(7):1120-7.
- Izgüt-Uysal, V. N., A. Agac, et al. (2003). "Effects of L-carnitine on neutrophil functions in aged rats." *Mech Ageing Dev* 124(3): 341-347.
- Jacobs, R. L., L. M. Stead, et al. (2005). "Physiological regulation of phospholipid methylation alters plasma homocysteine in mice." *J Biol Chem* 280(31): 28299-28305.
- Jakicic, J. M. (2009). "The effect of physical activity on body weight." *Obesity (Silver Spring)* 17 Suppl 3: S34-38.
- Ji, L. L., M. C. Gomez-Cabrera, et al. (2006). "Exercise and hormesis: activation of cellular antioxidant signaling pathway." *Ann N Y Acad Sci* 1067: 425-435.
- Jin, H. M., D. C. Zhou, et al. (2013). "Antioxidant N-acetylcysteine protects pancreatic beta-cells against aldosterone-induced oxidative stress and apoptosis in female db/db mice and insulin-producing MIN6 cells." *Endocrinology* 154(11): 4068-4077.
- Johansson, B., L. Halldner, et al. (2001). "Hyperalgesia, anxiety, and decreased hypoxic neuroprotection in mice lacking the adenosine A1 receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(16): 9407-9412.
- Johnson, A. M. and J. M. Olefsky (2013). "The origins and drivers of insulin resistance." *Cell* 152(4): 673-684.
-

-
- Johnson, A. R., J. J. Milner, et al. (2012). "The inflammation highway: metabolism accelerates inflammatory traffic in obesity." *Immunol Rev* 249(1): 218-238.
- Johnson, B. D., K. E. Kip, et al. (2004). "Serum amyloid A as a predictor of coronary artery disease and cardiovascular outcome in women: the National Heart, Lung, and Blood Institute-Sponsored Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE)." *Circulation*.109(6):726-32.
- Jones, B. H., M. K. Standridge, et al. (1997). "Angiotensin II increases lipogenesis in 3T3-L1 and human adipose cells." *Endocrinology* 138(4): 1512-1519.
- Jones, D. P. (2002). "Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance." *Methods Enzymol* 348: 93-112.
- Jones, G. L., E. Sang, et al. (2005). "A functional analysis of mouse models of cardiac disease through metabolic profiling." *J Biol Chem*. 2005 Mar 4;280(9):7530-9.
- Kallman, F. J. (1959). "Individual differences in constitution and genetic background." En: *Handbook of ageing and the individual: Psychological and biological aspects*. Jarvik, L.F. (Ed.) University Press, Chicago. .
- Kampkötter, A., Y. Chovolou, et al. (2008). "Isoflavone daidzein possesses no antioxidant activities in cell-free assays but induces the antioxidant enzyme catalase." *Nutr. Res*. 28: 620-628.
- Kane, L. P., J. Lin, et al. (2000). "Signal transduction by the TCR for antigen." *Curr Opin Immunol* 12(3): 242-249.
- Kaneko, T., S. Tahara, et al. (1996). "Non-linear accumulation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidized DNA damage, during aging." *Mutat Res* 316(5-6): 277-285.
- Kanungo, M. S. (1975). "A model for ageing." *J Theor Biol* 53(2): 253-261.
- Karalis, K. P., P. Giannogonas, et al. (2009). "Mechanisms of obesity and related pathology: linking immune responses to metabolic stress." *Febs J* 276(20): 5747-5754.
- Karaman, A., H. Aydın, et al. (2015). "DNA damage is increased in lymphocytes of patients with metabolic syndrome." *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 782:30-5.
- Kasapis, C. and P. D. Thompson (2005). "The effects of physical activity on serum C-reactive protein and inflammatory markers: a systematic review." *J Am Coll Cardiol* 45(10): 1563-1569.
- Kasapoglu, M. and T. Ozben (2001). "Alterations of antioxidant enzymes and oxidative stress markers in aging." *Exp Gerontol* 36(2): 209-220.
- Kaschka, W. P. (1997). "Psychoneuroimmunology and neuroendocrinology-an integrative view." En: *Current update in Psychoneuroimmunology. Key topics in brain research*. pp. 1-12. Springer Wien, New York.
- Kaszubowska, L., J. J. Kaczor, et al. (2011). "Sensitivity of natural killer cells to activation in the process of ageing is related to the oxidative and inflammatory status of the elderly." *J Physiol Pharmacol*. 62(1):101-9.
- Kathirvel, E., K. Morgan, et al. (2010). "Betaine improves nonalcoholic fatty liver and associated hepatic insulin resistance: a potential mechanism for hepatoprotection by betaine." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 299(5): G1068-1077.
- Katz, J. M., J. Plowden, et al. (2004). "Immunity to Influenza: the challenges of protecting an aging populations." *Immunol. Res*. 29: 113-124.
-

-
- Keaney, J. F., Jr., M. G. Larson, et al. (2003). "Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(3): 434-439.
- Keenan, K. P., C. M. Hoe, et al. (2005). "Diabesity: a polygenic model of dietary-induced obesity from ad libitum overfeeding of Sprague-Dawley rats and its modulation by moderate and marked dietary restriction." *Toxicol Pathol* 33(6): 650-674.
- Kershaw, E. E. and J. S. Flier (2004). "Adipose tissue as an endocrine organ." *J Clin Endocrinol Metab*. Jun;89(6):2548-56.
- Khan, N. and H. Mukhtar (2007). "Tea polyphenols for health promotion." *Life Sci* 81(7): 519-533.
- Kilanczyc, E. and M. Bryszewska (2003). "The effect of melatonin on antioxidant enzymes in human diabetic skin fibroblasts." *Cell Mol. Biol. Lett.* 8: 333-336.
- Kim, C. H., N. D. Vaziri, et al. (2007). "Integrin expression and H₂O₂ production in circulating and splenic leukocytes of obese rats." *Obesity (Silver Spring)* 15(9): 2209-2216.
- Kim, J. A., M. Montagnani, et al. (2006). "Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms." *Circulation*. 113(15):1888-904.
- Kim, S. and N. Moustaid-Moussa (2000). "Secretory, endocrine and autocrine/paracrine function of the adipocyte." *J Nutr* 130(12): 3110S-3115S.
- Kim, S. K., K. H. Choi, et al. (2003). "Effect of acute betaine administration on hepatic metabolism of S-amino acids in rats and mice." *Biochem Pharmacol* 65(9): 1565-1574.
- Kimura, M., S. Tanaka, et al. (1998). "T lymphopenia in obese diabetic (db/db) mice is non-selective and thymus independent." *Life Sci*. 62(14):1243-50.
- Kinoshita, M., S. Oikawa, et al. (2000). "Age-related increases in plasma phosphatidylcholine hydroperoxide concentrations in control subjects and patients with hyperlipidaemia." *Clin. Chem*. 46: 822-828.
- Kirkman, H. N., M. Rolfo, et al. (1999). "Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry." *J Biol Chem* 274(20): 13908-13914.
- Kirman, I., K. Zhao, et al. (1996). "Treatment of old mice with IL-2 corrects dysregulated IL-2 and IL-4 production." *Int Immunol* 8(7): 1009-1015.
- Kisker, C., H. Schindelin, et al. (1997). "Molybdenum-cofactor-containing enzymes: structure and mechanism." *Annu Rev Biochem* 66: 233-267.
- Kleyn, P. W., W. Fan, et al. (1996). "Identification and characterization of the mouse obesity gene *tubby*: a member of a novel gene family." *Cell* 85(2): 281-290.
- Klimcakova, E., J. Polak, et al. (2006). "Dynamic strength training improves insulin sensitivity without altering plasma levels and gene expression of adipokines in subcutaneous adipose tissue in obese men." *J Clin Endocrinol Metab*. 91(12):5107-12.
- Klinman, N. R. (1994). "Selection in the expression of functionally distinct B-cell subsets." *Curr Opin Immunol* 6(3): 420-424.
- Knight, J. A. (2000). "Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system." *Ann Clin Lab Sci* 30(2): 145-158.
- Kobashi, C., M. Urakaze, et al. (2005). "Adiponectin inhibits endothelial synthesis of interleukin-8." *Circ Res* 97(12): 1245-1252.
-

-
- Koike, E., T. Kobayashi, et al. (1999). "Effect of aging on nitric oxide production by rat alveolar macrophages." *Exp Gerontol* 34(7): 889-894.
- Konstantinides, S., K. Schäfer, et al. (2001). "Leptin-dependent platelet aggregation and arterial thrombosis suggests a mechanism for atherothrombotic disease in obesity." *J Clin Invest* 108(10): 1533-1540.
- Konukoğlu, D., O. Serin, et al. (2003). "Plasma homocysteine levels in obese and non-obese subjects with or without hypertension; its relationship with oxidative stress and copper." *Clin Biochem.* 36(5):405-8.
- Kopelman, P. G. (2000). "Obesity as a medical problem." *Nature.* 2000 Apr 6;404(6778):635-43.
- Kordonowy, L. L., E. Burg, et al. (2012). "Obesity is associated with neutrophil dysfunction and attenuation of murine acute lung injury." *Am J Respir Cell Mol Biol.* 47(1):120-7.
- Krabbe, K. S., H. Bruunsgaard, et al. (2001). "Ageing is associated with a prolonged fever response in human endotoxemia." *Clin Diagn Lab Immunol.* 8(2):333-8.
- Krabbe, K. S., M. Pedersen, et al. (2004). "Inflammatory mediators in the elderly." *Exp Gerontol* 39(5): 687-699.
- Krinski, N. I. (1993). "Micronutrients and their influence on mutagenicity and malignant transformation." *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 686: 229-242.
- Krishnaraj, R. (1992). "Negative modulation of human NK cell activity by purinoceptors. 2. Age-associated, gender-specific partial loss of sensitivity to ATP." *Cell Immunol* 144(1): 11-21.
- Krüger, K. and F. C. Mooren (2014). "Exercise-induced leukocyte apoptosis." *Exerc Immunol Rev* 20: 117-134.
- Kulinsky, V. I. (2007). "Biochemical aspects of inflammation." *Biochemistry (Mosc)* 72(6): 595-607.
- Kurashima, C., M. Utsuyama, et al. (1995). "The role of thymus in the aging of Th cell subpopulations and age-associated alteration of cytokine production by these cells." *Int. Immunol.* 7: 97-104.
- Kutza, J. and D. M. Murasko (1994). "Effects of aging on natural killer cell activity and activation by interleukin-2 and IFN- α ." *Cell Immunol* 155(1): 195-204.
- Kutza, J. and D. M. Murasko (1996). "Age-associated decline in IL-2 and IL-12 induction of LAK cell activity of human PBMC samples." *Mech Ageing Dev* 90(3): 209-222.
- Kwak, Y. S. (2006). "Effects of training on spleen and peritoneal exudate reactive oxygen species and lymphocyte proliferation by splenocytes at rest and after an acute bout of exercise." *J Sports Sci.* 24(9):973-8.
- Kwon do, Y., Y. S. Jung, et al. (2009). "Impaired sulfur-amino acid metabolism and oxidative stress in nonalcoholic fatty liver are alleviated by betaine supplementation in rats." *J Nutr* 139(1): 63-68.
- La Cava, A. and G. Matarese (2004). "The weight of leptin in immunity." *Nat Rev Immunol* 4(5): 371-379.
- Lamas, O., A. Marti, et al. (2002). "Obesity and immunocompetence." *Eur J Clin Nutr* 56 Suppl 3: S42-45.
- Lamas, O., J. A. Martínez, et al. (2002). "T-helper lymphopenia and decreased mitogenic response in cafeteria diet-induced obese rats." *Nutr. Res.* 22(4):497-506.
-

-
- Lamas, O., J. A. Martínez, et al. (2004). "Energy restriction restores the impaired immune response in overweight (cafeteria) rats." *J Nutr Biochem* 15(7): 418-425.
- Lansing, A. I. (1959). "General biology of senescence." En: *Handbook of ageing and the individual: Psychological and biological aspects*. Jarvik L.F. (Ed.) University Press, Chicago. .
- Lanthier, N., O. Molendi-Coste, et al. (2011). "Kupffer cell depletion prevents but has no therapeutic effect on metabolic and inflammatory changes induced by a high-fat diet." *FASEB J.* 25(12):4301-11.
- Lau, D. C., B. Dhillon, et al. (2005). "Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis." *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 288(5):H2031-41.
- Laue, T., C. D. Wrann, et al. (2015). "Altered NK cell function in obese healthy humans." *BMC Obes* 2: 1.
- Lawrence, R. A. and R. F. Burk (1976). "Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver." *Biochem Biophys Res Commun* 71(4): 952-958.
- Leandro, C. G., T. M. de Lima, et al. (2007). "Stress-induced downregulation of macrophage phagocytic function is attenuated by exercise training in rats." *Neuroimmunomodulation.* 14(1):4-7.
- Leandro, C. G., T. Martins de Lima, et al. (2006). "Physical training attenuates the stress-induced changes in rat T-lymphocyte function." *Neuroimmunomodulation* 13(2): 105-113.
- Lee, D. C., J. W. Lee, et al. (2007). "Association of serum retinol binding protein 4 and insulin resistance in apparently healthy adolescents." *Metabolism* 56(3): 327-331.
- Lee, F. Y., Y. Li, et al. (1999). "Phenotypic abnormalities in macrophages from leptin-deficient, obese mice." *Am J Physiol* 276(2 Pt 1): C386-394.
- Leeuwenburgh, C., P. Wagner, et al. (1997). "Caloric restriction attenuates dityrosine crosslinking of cardiac and skeletal muscle proteins in aging mice." *Arch. Biochem. Biophys.* 346: 74-80.
- Lewis, T. (1927). "The blood vessels of the human skin and their responses." Shaw & Sons, London.
- Lezza, A. M. S., P. Mecocci, et al. (1999). "Mitochondrial DNA 4977 bp deletion and OH8dg levels correlated in the brain of aged subjects but not Alzheimer's disease patients." *FASEB J.* 13: 1083-1088.
- Li, J., F. Li, et al. (2006). "Inflammation and leptin." *Drug Discovery Today*, 3(3),387-393.
- Li, Z., M. J. Soloski, et al. (2005). "Dietary factors alter hepatic innate immune system in mice with nonalcoholic fatty liver disease." *Hepatology* 42(4): 880-885.
- Liang, C. P., S. Han, et al. (2004). "Increased CD36 protein as a response to defective insulin signaling in macrophages." *J Clin Invest.* 113(5):764-73.
- Lim, B., A. Nagao, et al. (1992). "Antioxidant activity on xanthophylls on peroxyl radical-mediated phospholipid peroxidation." *Biochim. Biophys. Acta* 1126: 178-184.
- Lim, S. H., S. H. Fan, et al. (2012). "Plasma total antioxidant capacity (TAC) in obese Malaysian subjects." *Malays J Nutr* 18(3): 345-354.
- Limon-Pacheco, J. and M. E. Gonshebat (2009). "The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress." *Mutat Res* 674(1-2): 137-147.
-

-
- Lin, Y., M. W. Rajala, et al. (2001). "Hyperglycemia-induced production of acute phase reactants in adipose tissue." *J Biol Chem* 276(45): 42077-42083.
- Lindström, P. (2007). "The physiology of obese-hyperglycemic mice [ob/ob mice]." *ScientificWorldJournal* 7: 666-685.
- Linton, P. J. and K. Dorshkind (2004). "Age-related changes in lymphocyte development and function." *Nat Immunol* 5(2): 133-139.
- Linton, S., M. J. Davies, et al. (2001). "Protein oxidation and ageing." *Exp Gerontol* 36(9): 1503-1518.
- Lio, D., C. D'Anna, et al. (1998). "Interleukin-12 release by mitogen-stimulated mononuclear cells in the elderly." *Mech Ageing Dev* 102(2-3): 211-219.
- Liu, H., H. Wang, et al. (2004). "Glutathione metabolism during aging and in Alzheimer disease." *Ann N Y Acad Sci* 1019: 346-349.
- Liu, R. and J. Choi (2000). "Age-associated decline in gamma-glutamylcysteine synthetase gene expression in rats." *Free Radic Biol Med* 28(4): 566-574.
- Liu, R. M. (2002). "Down-regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase regulatory subunit gene expression in rat brain tissue during aging." *J Neurosci Res* 68(3): 344-351.
- Lobby, P. (2007). "Inflammatory mechanisms: The molecular basis of inflammation and disease." *Nutr Rev* 65:S140-S146.
- Loffreda, S., S. Q. Yang, et al. (1998). "Leptin regulates proinflammatory immune responses." *Faseb J* 12(1): 57-65.
- Løhr, M., J. K. Folkmann, et al. (2015). "Hepatic oxidative stress, genotoxicity and vascular dysfunction in lean or obese Zucker rats." *PLoS One* 10(3): e0118773.
- Lopaschuk, G. D., J. R. Ussher, et al. (2010). "Myocardial fatty acid metabolism in health and disease." *Physiol Rev* 90(1): 207-258.
- Lopes, F. L., T. M. Azevedo, et al. (2009). "Freezing reaction in panic disorder patients associated with anticipatory anxiety." *Depress Anxiety* 26(10): 917-921.
- Lord, G. M., G. Matarese, et al. (1998). "Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression." *Nature* 394(6696): 897-901.
- Lord, J. M., S. Butcher, et al. (2001). "Neutrophil ageing and immunosenescence." *Mech Ageing Dev* 122:1521-1535.
- Lorell, B. H. and B. A. Carabello (2000). "Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis." *Circulation* 102(4): 470-479.
- Lu, S. C. (1999). "Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies." *Faseb J* 13(10): 1169-1183.
- Lubrano, C., G. Valacchi, et al. (2015). "Integrated Haematological Profiles of Redox Status, Lipid, and Inflammatory Protein Biomarkers in Benign Obesity and Unhealthy Obesity with Metabolic Syndrome." *Oxid Med Cell Longev* 2015: 490613.
- Lumeng, C. N., S. M. Deyoung, et al. (2007). "Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity." *Diabetes* 56(1): 16-23.
- Lykouras, L. and J. Michopoulos (2011). "Anxiety disorders and obesity." *Psychiatriki* 22(4): 307-313.
- Lynch, L. A., J. M. O'Connell, et al. (2009). "Are natural killer cells protecting the metabolically healthy obese patient?" *Obesity (Silver Spring)* 17(3): 601-605.
-

-
- Lloberas, J. and A. Celada (2002). "Effect of aging on macrophage function." *Exp Gerontol* 37(12): 1325-1331.
- Macia, L., M. Delacre, et al. (2006). "Impairment of dendritic cell functionality and steady-state number in obese mice." *J Immunol* 177(9): 5997-6006.
- Macho, T., A. Martí, et al. (2000). "Estudios genéticos de la obesidad en humanos." *Med Clin (Barc)*; 115:103-9.
- Madden, K. S. and D. L. Felten (1995). "Experimental basis for neural-immune interactions." *Physiol Rev* 75(1): 77-106.
- Madden, K. S. and S. Livnat (1991). "Catecholamine action and immunologic reactivity." En: *Psychoneuroimmunology*. 2nd ed. Ader R, Felten DL, Cohen N, Eds. pp. 283-310. Academic Press, San Diego, CA.
- Madsen, A. N., G. Hansen, et al. (2010). "Long-term characterization of the diet-induced obese and diet-resistant rat model: a polygenetic rat model mimicking the human obesity syndrome." *J Endocrinol* 206(3): 287-296.
- Maini, M. K., G. Casorati, et al. (1999). "T-cell clonality in immune responses." *Immunol Today* 20:262-266.
- Makki, K., P. Froguel, et al. (2013). "Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: cells, cytokines, and chemokines." *ISRN Inflamm* 2013: 139239.
- Malaguarnera, L., L. Ferlito, et al. (2001). "Immunosenescence and cancer: a review." *Arch Gerontol Geriatr* 32(2): 77-93.
- Mancuso, P., A. Gottschalk, et al. (2002). "Leptin-deficient mice exhibit impaired host defense in Gram-negative pneumonia." *J Immunol* 168(8): 4018-4024.
- Mancuso, P., R. W. McNish, et al. (2001). "Evaluation of phagocytosis and arachidonate metabolism by alveolar macrophages and recruited neutrophils from F344xBN rats of different ages." *Mech Ageing Dev* 122(15): 1899-1913.
- Mandel, M. A. and A. A. Mahmoud (1978). "Impairment of cell-mediated immunity in mutation diabetic mice (db/db)." *J Immunol* 120(4): 1375-1377.
- Mantzoros, C. S., M. Trakatelli, et al. (2007). "Circulating adiponectin levels in relation to melanoma: a case-control study." *Eur J Cancer* 43(9): 1430-1436.
- Marcell, T. J., K. A. McAuley, et al. (2005). "Exercise training is not associated with improved levels of C-reactive protein or adiponectin." *Metabolism*. 54(4):533-41.
- Marcos, A., E. Nova, et al. (2003). "Changes in the immune system are conditioned by nutrition." *Eur J Clin Nutr* 57 Suppl 1: S66-69.
- Marek, R., L. Králík, et al. (1997). "Gradient-enhanced HSQC experiments for phase-sensitive detection of multiple bond interactions." *Tetrahedron Lett.* 38: 665-668.
- Margolin, Y. and H. R. Behrman (1992). "Xanthine oxidase and dehydrogenase activities in rat ovarian tissues." *Am J Physiol* 262(2 Pt 1): E173-178.
- Mariani, E., L. Cattini, et al. (2006). "Simultaneous evaluation of circulating chemokine and cytokine profiles in elderly subjects by multiplex technology: relationship with zinc status." *Biogerontology* 7(5-6): 449-459.
- Mariani, E., A. R. Mariani, et al. (1998). "Age-dependent decreases of NK cell phosphoinositide turnover during spontaneous but not Fc mediated cytolytic activity." *Int. Immunol.* 10: 981-989.
- Mariani, E., L. Pulsatelli, et al. (2001). "Different IL-8 productin by T and NK lymphocytes in elderly subjects." *Mech Ageing Dev* 122:1383-1395.
-

-
- Mariani, E., L. Pulsatelli, et al. (2002). "RANTES and MIP-1 α production by T lymphocytes, monocytes and NK cells from nonagenarian subjects." *Exp. Gerontol.* 37: 219-226.
- Mariani, E., S. Sgobbi, et al. (1996). "Perforins in human cytolytic cells: the effect of age." *Mech Ageing Dev* 92(2-3): 195-209.
- Marinou, K., D. Tousoulis, et al. (2010). "Obesity and cardiovascular disease: from pathophysiology to risk stratification." *Int J Cardiol* 138(1): 3-8.
- Marnett, L. J. (2000). "Oxyradicals and DNA damage." *Carcinogenesis* 21(3): 361-370.
- Marnett, L. J., H. K. Hurd, et al. (1985). "Naturally occurring carbonyl compounds are mutagens in Salmonella tester strain TA104." *Mutat Res* 148(1-2): 25-34.
- Marrot, L., C. Jones, et al. (2008). "The significance of Nrf2 pathway in (photo)-oxidative stress response in melanocytes and keratinocytes of the human epidermis." *Pigment Cell Melanoma Res* 21(1): 79-88.
- Marseglia, L., S. Manti, et al. (2015). "Oxidative stress in obesity: a critical component in human diseases." *Int J Mol Sci* 16(1): 378-400.
- Martensson, J., J. C. Lai, et al. (1990). "High-affinity transport of glutathione is part of a multicomponent system essential for mitochondrial function." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 7185-7189.
- Marti, A., A. Marcos, et al. (2001). "Obesity and immune function relationships." *Obes Rev* 2(2): 131-140.
- Marti, A., M. A. Martínez-González, et al. (2008). "Interaction between genes and lifestyle factors on obesity." *Proc Nutr Soc.* Feb;67(1):1-8.
- Marti, A. and J. A. Martínez (1999). "Leptin and body weight regulation." *An Sist Sanit Navar* 22(3): 353-363.
- Martin-Cordero, L., J. J. Garcia, et al. (2009). "Influence of exercise on the circulating levels and macrophage production of IL-1 β and IFN γ affected by metabolic syndrome: an obese Zucker rat experimental animal model." *Eur J Appl Physiol* 107(5): 535-543.
- Martín-Romero, C., J. Santos-Alvarez, et al. (2000). "Human leptin enhances activation and proliferation of human circulating T lymphocytes." *Cell Immunol* 199(1): 15-24.
- Martínez-Romero, R., A. Canuelo, et al. (2006). "Aging affects but does not eliminate the enzymatic antioxidative response to hypoxia/reoxygenation in cerebral cortex." *Exp. Gerontol.* 41: 25-31.
- Martínez, J. A., M. J. Moreno, et al. (2002). "Causes of obesity." *An Sist Sanit Navar* 25 Suppl 1: 17-27.
- Martos-Moreno, G. A., J. J. Kopchick, et al. (2013). "Adipokines in healthy and obese children." *An Pediatr (Barc)* 78(3): 189 e181-189 e115.
- Massey, V. and C. H. Williams, Jr. (1965). "On the reaction mechanism of yeast glutathione reductase." *J Biol Chem* 240(11): 4470-4480.
- Matarese, G. (2000). "Leptin and the immune system: how nutritional status influences the immune response." *Eur Cytokine Netw.* 11(1):7-14.
- Matarese, G. and A. La Cava (2005). "Immune responses in obesity models." *Drug Discov Today Dis Models.* 2:177-181.
- Matarese, G., S. Moschos, et al. (2005). "Leptin in immunology." *J Immunol* 174(6): 3137-3142.
- Matarese, G., C. Procaccini, et al. (2010). "Regulatory T cells in obesity: the leptin connection." *Trends Mol Med* 16(6): 247-256.
-

-
- Maté, I. (2015). "Caracterización de marcadores inmunológicos y de estrés oxidativo en el envejecimiento humano y en un modelo de Alzheimer en ratón." Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Maté, I., J. Cruces, et al. (2015). "Function and redox state of peritoneal leukocytes as preclinical and prodromic markers in a longitudinal study of triple-transgenic mice for Alzheimer's disease." *J Alzheimers Dis.* 43(1):213-26.
- Mathur, N. and B. K. Pedersen (2008). "Exercise as a mean to control low-grade systemic inflammation." *Mediators Inflamm.* doi: 10.1155/2008/109502.
- Maury, E. and S. M. Brichard (2010). "Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome." *Mol Cell Endocrinol* 314(1): 1-16.
- Maysami, S., M. J. Haley, et al. (2015). "Prolonged diet-induced obesity in mice modifies the inflammatory response and leads to worse outcome after stroke." *J Neuroinflammation* 12: 140.
- McArdle, A. and M. J. Jackson (2000). "Exercise, oxidative stress and ageing." *J Anat* 197 Pt 4: 539-541.
- McArdle, M. A., O. M. Finucane, et al. (2013). "Mechanisms of obesity-induced inflammation and insulin resistance: insights into the emerging role of nutritional strategies." *Front Endocrinol (Lausanne)*. 10;4:52. doi: 10.3389/fendo.2013.00052.
- McArthur, W. P. (2000). "Effect of aging on immunocompetent and inflammatory cells." *Periodontology* 16: 53-79.
- McCord, J. M. (1993). "Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance." *Clin Biochem* 26(5): 351-357.
- McCord, J. M. and I. Fridovich (1969). "Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein)." *J Biol Chem* 244(22): 6049-6055.
- McEwen, B. S. (2006). "Protective and damaging effects of stress mediators: central role of the brain." *Dialogues Clin Neurosci* 8(4): 367-381.
- McFarland, R. A. (1953). "Human factors in air transportation: occupational health and safety." MacGraw-Hill, New York.
- McNelis, J. C. and J. M. Olefsky (2014). "Macrophages, immunity, and metabolic disease." *Immunity* 41(1): 36-48.
- McNerlan, S. E., I. M. Rea, et al. (2002). "A whole blood method for measurement of intracellular TNF-alpha, IFN-gamma and IL-2 expression in stimulated CD3+ lymphocytes: differences between young and elderly subjects." *Exp Gerontol.* 37(2-3):227-34.
- Mecocci, P., G. Fano, et al. (1999). "Age-independent increases in oxidative damage to DNA, lipids and proteins in human skeletal muscle." *Free Radic. Biol. Med.* 26: 303-308.
- Mecocci, P., M. C. Polidori, et al. (2000). "Plasma antioxidants and longevity: a study on healthy centenarians." *Free Radic Biol Med* 28(8): 1243-1248.
- Medina, S., M. Del Río, et al. (2000). "Age-related changes in the neuropeptide Y effects on murine lymphoproliferation and interleukin-2 production." *Peptides* 21(9): 1403-1409.
- Medina, S., M. Del Río, et al. (2000). "Age-related changes in the neuropeptide Y effects on murine lymphoproliferation and interleukin-2 production." *Peptides* 21: 1403-1409.
- Medvedev, Z. A. (1990). "An attempt at a rational classification of theories of ageing." *Biol. Rev.* 65: 375-398.
-

-
- Medzhitov, R. (2008). "Origin and physiological roles of inflammation." *Nature* 454(7203): 428-435.
- Meites, J. (1983). "Neuroendocrinology of aging." Plenum. New York. pp 1-383.
- Meites, J., R. Goya, et al. (1986). "Why the neuroendocrine system is important in aging processes?." *Exp. Gerontol.* 22: 1-15. .
- Meksawan, K., J. T. Venkatraman, et al. (2004). "Effect of dietary fat intake and exercise on inflammatory mediators of the immune system in sedentary men and women." *J Am Coll Nutr* 23(4): 331-340.
- Mercer, J. G., C. B. Lawrence, et al. (1996). "Regulation of galanin gene expression in the hypothalamic paraventricular nucleus of the obese Zucker rat by manipulation of dietary macronutrients." *Brain Res Mol Brain Res* 43(1-2): 202-208.
- Merker, K., A. Stolzing, et al. (2001). "Proteolysis, caloric restriction and aging." *Mech Ageing Dev* 122(7): 595-615.
- Merrill, J. E. (2001). "Production and influence of inflammatory cytokines in diseases of the adult central nervous system." En: *Psychoneuroimmunology*. 3rd ed. Ader R, Felten DL, Cohen N, (Eds.), pp. 547-561. Academic Press, New York.
- Meydani, S. N., D. Wu, et al. (1995). "Antioxidants and immune response in aged persons: overview of present evidence." *Am J Clin Nutr* 62(6 Suppl): 1462S-1476S.
- Milner, J. J. and M. A. Beck (2012). "The impact of obesity on the immune response to infection." *Proc Nutr Soc* 71(2): 298-306.
- Miltenberger, R. J., R. L. Mynatt, et al. (1997). "The role of the agouti gene in the yellow obese syndrome." *J Nutr* 127(9): 1902S-1907S.
- Miller, R. A. (1995). "Immune system." En: *Handbook of Physiology: Aging*. E. Masoro (ed.). Oxford University Press, New York, 555-590.
- Miller, R. A. (1996). "The aging immune system: primer and prospectus." *Science* 273(5271): 70-74.
- Miller, R. A. (2000). "Effect of aging on T lymphocyte activation." *Vaccine* 18(16): 1654-1660.
- Miquel, J. (1984). "El envejecimiento biológico desde el punto de vista del análisis de sistemas. ." *Geriatrka* 1-extra: 7-13.
- Miquel, J. (1986). "Envejecimiento fisiológico, celular y subcelular. ." En: *Bioquímica y Biología Molecular*. S. Lelois, S. Ochoa, J. Oro y A. Sols (Eds.) pp: 241-248.
- Miquel, J. (1991). "An integrated theory of aging as the result of mitochondrial-DNA mutation in differentiated cells. ." *Arch. Gerontol. Geriatr.* 12: 99-117.
- Miquel, J. (1992). "An update on the mitochondrial-DNA mutation hypothesis of cell aging. ." *Mutat. Res.* 275: 209-216.
- Miquel, J. (1998). "An update on the oxygen stress-mitochondrial mutation theory of aging: genetic and evolutionary implications." *Exp Gerontol* 33(1-2): 113-126.
- Miquel, J. (2009). "Teorías del envejecimiento: selección e integración." En: *Biogerontología Médica*. Sastre, J., Pamplona, R., Ramón, J.R. (eds) pp.1-12. Ergon Madrid.
- Miquel, J. and M. Blasco (1978). "A simple technique for evaluation of vitality loss in aging mice by testing their muscular coordination and vigor. ." *Exp. Gerontol.* 13: 389-396.
-

-
- Miquel, J. and M. Blasco (1978). "A simple technique for evaluation of vitality loss in aging mice, by testing their muscular coordination and vigor." *Exp Gerontol.* 13(6):389-96.
- Miquel, J., E. de Juan, et al. (1992). "Oxygen-induced mitochondrial damage and aging." *Exs* 62: 47-57.
- Miquel, J., A. C. Economos, et al. (1980). "Mitochondrial role in cell aging." *Exp Gerontol* 15(6): 575-591.
- Miquel, J. and J. Fleming (1983). "A two step hypothesis on the mechanism of in vitro cell aging: cell differentiation followed by intrinsic mitochondrial mutagenesis." *Exp. Gerontol.* 19: 31-36.
- Miquel, J. and H. Weber (1990). "Aging and increased oxidation of the sulfur pool." En: *Glutathione: metabolism and physiological functions* (Ed.) Viña, J. CRC Press, Boca Ratón, Florida. pp: 187-192.
- Misigoj-Duraković, M. and Z. Duraković (2009). "The early prevention of metabolic syndrome by physical exercise." *Coll Antropol.* 33(3):759-64.
- Mito, N., T. Hosoda, et al. (2000). "Change of cytokine balance in diet-induced obese mice." *Metabolism* 49(10): 1295-1300.
- Miyazawa, T., T. Suzuki, et al. (1996). "Age-related change of phosphatidylcholine hydroperoxide and phosphatidylethanolamine hydroperoxide levels in normal human red blood cells." *Mech Ageing Dev* 86(3): 145-150.
- Mocchegiani, E. and M. Malavolta (2004). "NK and NKT cell functions in immunosenescence." *Aging Cell* 3(4): 177-184.
- Mocchegiani, E., M. Muzzioli, et al. (2003). "Metallothioneins/PARP-1/IL-6 interplay on natural killer cell activity in elderly: parallelism with nonagenarians and old infected humans. Effect of zinc supply." *Mech Ageing Dev* 124(4): 459-468.
- Mocchegiani, E., L. Perissin, et al. (1999). "Melatonin administration in tumor-bearing mice (intact and pinealectomized) in relation to stress, zinc, thymulin and IL-2." *Int J Immunopharmacol* 21(1): 27-46.
- Mohacsi, A., R. Fülöp, et al. (1992). "Superoxide anion production and intracellular free calcium levels in resting and stimulated polymorphonuclear leukocytes obtained from healthy and arteriosclerotic subjects of various ages." *Clin Biochem* 15:15370-15376.
- Mohora, M., B. Virgolici, et al. (2006). "Free radical activity in obese patients with type 2 diabetes mellitus." *Rom J Intern Med* 44(1): 69-78.
- Monnier, V. M., D. R. Sell, et al. (1991). "Mechanism of protection against damage mediated by Maillard reaction in aging. ." *Gerontology* 37: 152-165.
- Monteiro, J., F. Batliwalla, et al. (1996). "Shortened telomeres in clonally expanded CD28-CD8+ T cells imply a replicative history that is distinct from their CD28+CD8+ counterparts." *J. Immunol.* 156: 3587-3590.
- Morán, M., J. Delgado, et al. (2004). "Responses of rat myocardial antioxidant defences and heat shock protein HSP72 induced by 12 and 24-week treadmill training." *Acta Physiol Scand* 180(2): 157-166.
- Morel, F., J. Doussiere, et al. (1991). "The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells. Physiological, molecular and pathological aspects." *Eur J Biochem* 201(3): 523-546.
- Moreno, M. J. and J. A. Martínez (2002). "Adipose tissue: a storage and secretory organ." *An Sist Sanit Navar* 25 Suppl 1: 29-39.
-

-
- Moriguchi, S., M. Kato, et al. (1998 (a)). "Decreased mitogen response of splenic lymphocytes in obese Zucker rats is associated with the decreased expression of glucose transporter 1 (GLUT-1)." *Am J Clin Nutr.* 67(6):1124-9.
- Moriguchi, S., M. Kato, et al. (1998 (b)). "Exercise training restores decreased cellular immune functions in obese Zucker rats." *J Appl Physiol* (1985) 84(1): 311-317.
- Moriguchi, S., K. Oonishi, et al. (1995). "Obesity is a risk factor for deteriorating cellular immune functions decreased with aging." *Nutr Res.* 15:151-160.
- Mosmann, T. R. and S. Sad (1996). "The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more." *Immunol Today* 17(3): 138-146.
- Mueckler, M., C. Caruso, et al. (1985). "Sequence and structure of a human glucose transporter." *Science* 229(4717): 941-945.
- Mukhtar, H. and N. Ahmad (2000). "Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health." *Am J Clin Nutr* 71(6 Suppl): 1698S-1702S; discussion 1703S-1694S.
- Mutch, N. J., H. M. Wilson, et al. (2001). "Plasminogen activator inhibitor-1 and haemostasis in obesity." *Proc Nutr Soc* 60(3): 341-347.
- Mysliwska, J., E. Bryl, et al. (1998). "Increase of interleukin 6 and decrease of interleukin 2 production during the ageing process are influenced by the health status." *Mech Ageing Dev* 100(3): 313-328.
- Mysliwski, A., J. Mysliwska, et al. (1993). "Elderly high NK responders are characterized by intensive proliferative response to PHA and Con A and optimal health status." *Arch Gerontol Geriatr* 16(3): 199-205.
- Nagelkerken, L., A. Hertogh-Huijbregts, et al. (1991). "Age-related changes in lymphokine production related to a decreased number of CD45RBhi CD4+ T cells." *Eur J Immunol* 21(2): 273-281.
- Nakata, M., T. Yada, et al. (1999). "Leptin promotes aggregation of human platelets via the long form of its receptor." *Diabetes* 48(2): 426-429.
- Nammi, S., S. Koka, et al. (2004). "Obesity: an overview on its current perspectives and treatment options." *Nutr J* 3: 3.
- Neves Sda, C. J., R. M. Lima, et al. (2009). "Resistance exercise sessions do not provoke acute immunosuppression in older women." *J Strength Cond Res.* 23(1):259-65.
- Nguyen, M., A. J. Pace, et al. (2005). "Age-induced reprogramming of mast cell degranulation." *J Immunol* 175(9): 5701-5707.
- Nicklas, B. J., W. Ambrosius, et al. (2004). "Diet-induced weight loss, exercise, and chronic inflammation in older, obese adults: a randomized controlled clinical trial." *Am J Clin Nutr* 79(4): 544-551.
- Nicholson, J. K., P. J. Foxall, et al. (1995). "750 MHz ¹H and ¹H-¹³C NMR spectroscopy of human blood plasma." *Anal Chem* 67(5): 793-811.
- Nieman, D. C., D. A. Henson, et al. (1999). "Influence of obesity on immune function." *J Am Diet Assoc* 99(3): 294-299.
- Nieman, D. C., S. L. Nehlsen-Cannarella, et al. (1998). "Immune response to exercise training and/or energy restriction in obese women." *Med Sci Sports Exerc.* 30(5):679-86.
- Niess, A. M., H. H. Dickhuth, et al. (1999). "Free radicals and oxidative stress in exercise--immunological aspects." *Exerc Immunol Rev* 5: 22-56.
- Nikalakantan, Y., B. T. Spear, et al. (1998). "Effect of the peroxisome proliferator ciprofibrate on lipid peroxidation and 8-hydroxydeoxyguanosine formation in
-

- transgenic mice with elevated catalase activity." *Free Radic. Biol. Med.* 24:1430-1436
- Nilsson, C., K. Raun, et al. (2012). "Laboratory animals as surrogate models of human obesity." *Acta Pharmacol Sin.* 33(2):173-81.
- Nishimura, S., I. Manabe, et al. (2009). "CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity." *Nat Med* 15(8): 914-920.
- Noeman, S. A., H. E. Hamooda, et al. (2011). "Biochemical study of oxidative stress markers in the liver, kidney and heart of high fat diet induced obesity in rats." *Diabetol Metab Syndr* 3(1): 17.
- Nordberg, J. and E. S. Arner (2001). "Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system." *Free Radic Biol Med* 31(11): 1287-1312.
- Northoff, H., C. Weinstock, et al. (1994). "The cytokine response to strenuous exercise." *Int J Sports Med* 15 Suppl 3: S167-171.
- O'Connor, J. C., A. Satpathy, et al. (2005). "IL-1beta-mediated innate immunity is amplified in the db/db mouse model of type 2 diabetes." *J Immunol.* 174(8):4991-7.
- O'Shea, D., T. J. Cawood, et al. (2010). "Natural killer cells in obesity: impaired function and increased susceptibility to the effects of cigarette smoke." *PLoS One* 5(1): e8660.
- Oberbach, A., A. Tönjes, et al. (2006). "Effect of a 4 week physical training program on plasma concentrations of inflammatory markers in patients with abnormal glucose tolerance." *Eur J Endocrinol* 154(4): 577-585.
- Obstfeld, A. E., E. Sugaru, et al. (2010). "C-C chemokine receptor 2 (CCR2) regulates the hepatic recruitment of myeloid cells that promote obesity-induced hepatic steatosis." *Diabetes.* 59(4):916-25.
- Ochoa, M. d. C., A. Martí, et al. (2004). "Obesity studies in candidate genes." *Med Clin (Barc).* Apr 17;122(14):542-51.
- Ogata, K., E. An, et al. (2001). "Association between natural killer cell activity and infection in immunologically normal elderly people." *Clin Exp Immunol.* 124(3):392-7.
- Ogata, K., N. Yokose, et al. (1997). "Natural killer cells in the late decades of human life." *Clin Immunol Immunopathol* 84(3): 269-275.
- Oka, T., S. Moriguchi, et al. (1996). "Alteration of energy substrates utilized by small and large thymocytes in resting and stimulating state." *Nutr. Res.* 16:841-50.
- Okado, M. A. and I. Fridovich (2001). "Subcellular localization of superoxide dismutases (SOD) in rat liver. Cu, Zn-SOD in mitochondria." *J. Biol. Chem.* 276: 38388-38393.
- Olefsky, J. M. and C. K. Glass (2010). "Macrophages, inflammation, and insulin resistance." *Annu Rev Physiol* 72: 219-246.
- Oliva, M. R., P. Muñoz, et al. (1997). "Radicales libres y modificación oxidativa del ADN. Implicaciones en la carcinogénesis experimental y humana. ." En: *Bioquímica y Fisiopatología del Estrés Oxidativo* (M. Cascales, Coord.) Fundación José Casares Gil.
- Oliver, C. A., B. Ahn, et al. (1987). "Age-related changes in oxidized proteins." *J. Biol. Chem.* 262: 5488-5491.

-
- Olusi, S. O. (2002). "Obesity is an independent risk factor for plasma lipid peroxidation and depletion of erythrocyte cytoprotective enzymes in humans." *Int J Obes Relat Metab Disord.* 26(9):1159-64.
- Orgel, L. E. (1963). "The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to ageing." *Proc Natl Acad Sci U S A* 49: 517-521.
- Ortega, E. (2003). "Neuroendocrine mediators in the modulation of phagocytosis by exercise: physiological implications." *Exerc Immunol Rev* 9: 70-93.
- Ortega, E., C. Barriga, et al. (1993). "Study of the phagocytic process in neutrophils from elite sportswomen." *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 66(1): 37-42.
- Ortega, E., M. E. Bote, et al. (2012). "Aquatic exercise improves the monocyte pro- and anti-inflammatory cytokine production balance in fibromyalgia patients." *Scand J Med Sci Sports* 22(1): 104-112.
- Ortega, E., M. E. Collazos, et al. (1993). "Stimulation of the phagocytic function of neutrophils in sedentary men after acute moderate exercise." *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 66(1): 60-64.
- Ortega, E., M. A. Forner, et al. (1997). "Exercise-induced stimulation of murine macrophage chemotaxis: role of corticosterone and prolactin as mediators." *J Physiol.* 498 (Pt 3):729-34.
- Ortega, E., J. J. García, et al. (2009). "Exercise in fibromyalgia and related inflammatory disorders: known effects and unknown chances." *Exerc Immunol Rev* 15: 42-65.
- Ortega, E., E. Giraldo, et al. (2007). "Neuroimmunomodulation during exercise: role of catecholamines as 'stress mediator' and/or 'danger signal' for the innate immune response." *Neuroimmunomodulation.* 14(3-4):206-12.
- Ortega Rincón, E. (1994). "Physiology and biochemistry: influence of exercise on phagocytosis." *Int J Sports Med* 15 Suppl 3: S172-178.
- Ortega Rincón, E., J. M. Marchena, et al. (2001). "Phagocytic function in cyclists: correlation with catecholamines and cortisol." *J Appl Physiol* (1985) 91(3): 1067-1072.
- Osborn, O. and J. M. Olefsky (2012). "The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease." *Nat Med* 18(3): 363-374.
- Ostan, R., L. Bucci, et al. (2008). "Immunosenescence and immunogenetics of human longevity." *Neuroimmunomodulation* 15(4-6): 224-240.
- Ottaviani, E. and C. Franceschi (1997). "The invertebrate phagocytic immunocyte: clues to a common evolution of immune and neuroendocrine system." *Immunol Today* 18:169-174.
- Ouchi, N., S. Kihara, et al. (1999). "Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin." *Circulation* 100(25): 2473-2476.
- Ouchi, N., S. Kihara, et al. (2001). "Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages." *Circulation* 103(8): 1057-1063.
- Ouchi, N., S. Kihara, et al. (2000). "Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway." *Circulation.* 102(11):1296-301.
- Ouchi, N. and K. Walsh (2007). "Adiponectin as an anti-inflammatory factor." *Clin Chim Acta.* 380(1-2):24-30.
-

-
- Ouedraogo, R., Y. Gong, et al. (2007). "Adiponectin deficiency increases leukocyte-endothelium interactions via upregulation of endothelial cell adhesion molecules in vivo." *J Clin Invest* 117(6): 1718-1726.
- Ozata, M., M. Mergen, et al. (2002). "Increased oxidative stress and hypozincemia in male obesity." *Clin Biochem* 35(8): 627-631.
- Ozata, M., G. Uckaya, et al. (2000). "Defective antioxidant defense system in patients with a human leptin gene mutation." *Horm Metab Res* 32(7): 269-272.
- Ozcan, U., Q. Cao, et al. (2004). "Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes." *Science* 306(5695): 457-461.
- Paganelli, R., I. Quinti, et al. (1992). "Changes in circulating B cells and immunoglobulin classes and subclasses in a healthy aged population." *Clin Exp Immunol* 90(2): 351-354.
- Pahlavani, M. A. and A. Richardson (1996). "The effect of age on the expression of interleukin-2." *Mech Ageing Dev* 89(3): 125-154.
- Palmer, G., M. Aurrand-Lions, et al. (2006). "Indirect effects of leptin receptor deficiency on lymphocyte populations and immune response in db/db mice." *J Immunol* 177(5): 2899-2907.
- Pallavicini, M. G. and W. K. Nichols (1976). "Inhibition of lymphocyte blastogenesis by factor(s) in alloxan-diabetic rat plasma." *Diabetes* 25(7): 614-622.
- Panagia, V., Y. Taira, et al. (1990). "Alterations in phospholipid N-methylation of cardiac subcellular membranes due to experimentally induced diabetes in rats." *J Clin Invest.* 86(3):777-84.
- Pandey, K. B. and S. I. Rizvi (2010). "Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans." *Oxid Med Cell Longev* 3(1): 2-12.
- Paolini, M., P. Perocco, et al. (2004). "Induction of cytochrome P450, generation of oxidative stress and in vitro cell transforming and DNA-damaging activities by glucoraphanin, the bioprecursor of the chemopreventive agent sulphoraphane found in broccoli." *Carcinogenesis* 25: 61-67.
- Park, H. K. and R. S. Ahima (2015). "Physiology of leptin: energy homeostasis, neuroendocrine function and metabolism." *Metabolism* 64(1): 24-34.
- Park, S. M., Y. S. Kwak, et al. (2015). "The Effects of Combined Exercise on Health-Related Fitness, Endotoxin, and Immune Function of Postmenopausal Women with Abdominal Obesity." *J Immunol Res* 2015: 830567.
- Parker, C. R. J. (1999). "Dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate production in the human adrenal during development and aging." *Steroids* 64:640-647.
- Parks, D. A. and D. N. Granger (1986). "Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology." *Acta Physiol Scand Suppl* 548: 87-99.
- Pasceri, V., J. T. Willerson, et al. (2000). "Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells." *Circulation.* 102(18):2165-8.
- Pastrana, J. and G. García-Casasola (2013). "Fisiopatología de la inflamación. Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS)." En: *Fisiopatología y patología general básicas para ciencias de la salud*. Pastrana Delgado, J., García de Casasola Sánchez, G. (eds) pp. 9-16. Elsevier. España.
- Patel, P. S., E. D. Buras, et al. (2013). "The role of the immune system in obesity and insulin resistance." *J Obes* 2013: 616193.
- Pawelec, G. (1999). "Immunosenescence: impact in the young as well as the old?" *Mech. Ageing Dev.* 108:1-7.
-

-
- Pawelec, G., M. Adibzadeh, et al. (1995). "Immunosenescence: ageing of the immune system." *Immunol Today* 16(9): 420-422.
- Pawelec, G., Y. Barnett, et al. (2002). "T cells and aging, January 2002 update." *Front Biosci* 7: d1056-1183.
- Pawelec, G., K. Hirokawa, et al. (2001). "Altered T cell signalling in ageing." *Mech Ageing Dev* 122(14): 1613-1637.
- Pawelec, G., R. Solana, et al. (1998). "Impact of aging on innate immunity." *J Leukoc Biol* 64(6): 703-712.
- Peake, J., K. Nosaka, et al. (2005). "Characterization of inflammatory responses to eccentric exercise in humans." *Exerc Immunol Rev* 11: 64-85.
- Pedersen, B. K. (2000). "Special feature for the Olympics: effects of exercise on the immune system: exercise and cytokines." *Immunol Cell Biol* 78(5): 532-535.
- Pedersen, B. K. (2011). "Exercise-induced myokines and their role in chronic diseases." *Brain Behav Immun*. 25(5):811-6.
- Pedersen, B. K., H. Bruunsgaard, et al. (2000). "Cytokines in aging and exercise." *Int J Sports Med* 21 Suppl 1: S4-9.
- Pedersen, B. K. and L. Hoffman-Goetz (2000). "Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation." *Physiol Rev*. 80(3):1055-81.
- Pedersen, B. K., K. Ostrowski, et al. (1998). "The cytokine response to strenuous exercise." *Can J Physiol Pharmacol*. 76(5):505-11.
- Pedersen, W. A., R. Wan, et al. (2001). "Impact of aging on stress-responsive neuroendocrine systems." *Mech Ageing Dev* 122(9): 963-983.
- Peralbo, E., C. Alonso, et al. (2007). "Invariant NK and NKT-like lymphocytes: two different T cell subsets that are differentially affected by ageing." *Exp. Gerontol*. 42: 703-708.
- Pérez-Álvarez, L., I. Baeza, et al. (2005). "Behavioral, endocrine and immunological characteristics of a murine model of premature aging." *Dev Comp Immunol* 29(11): 965-976.
- Perry, H. M., 3rd (1999). "The endocrinology of aging." *Clin Chem* 45(8 Pt 2): 1369-1376.
- Petersen, A. M. and B. K. Pedersen (2005). "The anti-inflammatory effect of exercise." *J Appl Physiol* (1985) 98(4): 1154-1162.
- Peterson, P. K., C. C. Chao, et al. (1994). "Levels of tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, interleukin-10 and transforming growth factor beta are normal in the serum healthy elderly." *Clin. Infect. Dis*. 19:1158-1159.
- Petry, N. M., D. Barry, et al. (2008). "Overweight and obesity are associated with psychiatric disorders: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions." *Psychosom Med* 70(3): 288-297.
- Phillips, D., M. Ten Hove, et al. (2010). "Mice over-expressing the myocardial creatine transporter develop progressive heart failure and show decreased glycolytic capacity." *J Mol Cell Cardiol*. 48(4):582-90.
- Plackett, T. P., E. D. Boehmer, et al. (2004). "Aging and innate immune cells." *J Leukoc Biol* 76(2): 291-299.
- Plotkin, B. J., D. Paulson, et al. (1996). "Immune responsiveness in a rat model for type II diabetes (Zucker rat, fa/fa): susceptibility to *Candida albicans* infection and leucocyte function." *J Med Microbiol*. 44(4):277-83.
- Poirier, P., T. D. Giles, et al. (2006). "Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: an update of the 1997
-

- American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease from the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism." *Circulation* 113(6): 898-918.
- Poitou, C., N. Viguerie, et al. (2005). "Serum amyloid A: production by human white adipocyte and regulation by obesity and nutrition." *Diabetologia* 48(3): 519-528.
- Posnett, D. N., R. Sinha, et al. (1994). "Clonal populations of T cells in normal elderly humans: the T cell equivalent to "benign monoclonal gammopathy"." *J. Exp. Med.* 179: 609-618.
- Powers, S. K., L. L. Ji, et al. (1999). "Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review." *Med Sci Sports Exerc* 31(7): 987-997.
- Procaccini, C., E. Jirillo, et al. (2012). "Leptin as an immunomodulator." *Mol Aspects Med.* 33(1):35-45.
- Pryor, W. A. (1986). "Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes and reaction." *Annu. Rev. Physiol.* 48:657-667.
- Pryor, W. A., D. G. Prier, et al. (1983). "Detection of free radicals from low temperature ozone-olefin reactions by ESR spin trapping: evidence that the radical precursor is atrioxide." *J. Am. Chem. Soc.* 105: 2883-2888.
- Puerto, M., N. Guayerbas, et al. (2005). "Modulation of neuropeptide Y and norepinephrine on several leucocyte functions in adult, old and very old mice." *J Neuroimmunol* 165:33-40.
- Racanelli, V. and B. Rehermann (2006). "The liver as an immunological organ." *Hepatology.* 43(2 Suppl 1):S54-62.
- Radák, Z., P. Apor, et al. (2003). "Marathon running alters the DNA base excision repair in human skeletal muscle." *Life Sci* 72(14): 1627-1633.
- Radak, Z., H. Y. Chung, et al. (2005). "Exercise and hormesis: oxidative stress-related adaptation for successful aging." *Biogerontology* 6(1): 71-75.
- Radak, Z., H. Y. Chung, et al. (2008 (a)). "Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise." *Free Radic Biol Med* 44(2): 153-159.
- Radak, Z., H. Y. Chung, et al. (2008 (b)). "Exercise, oxidative stress and hormesis." *Ageing Res Rev* 7(1): 34-42.
- Rah, D. K., D. W. Han, et al. (2005). "Prevention of reactive oxygen species-induced oxidative stress in human microvascular endothelial cells by green tea polyphenol." *Toxicol Lett* 155(2): 269-275.
- Ratnam, S., E. P. Wijekoon, et al. (2006). "Effects of diabetes and insulin on betaine-homocysteine S-methyltransferase expression in rat liver." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290(5): E933-939.
- Rattan, S. I. (1995). "Gerontogenes: real or virtual?" *FASEB J* 9:284-286.
- Raza, H., A. John, et al. (2012). "Alterations in glutathione redox metabolism, oxidative stress, and mitochondrial function in the left ventricle of elderly Zucker diabetic fatty rat heart." *Int J Mol Sci* 13(12): 16241-16254.
- Raza, H., A. John, et al. (2013). "Increased metabolic stress in Zucker diabetic fatty rat kidney and pancreas." *Cell Physiol Biochem* 32(6): 1610-1620.
- Raza, H., A. John, et al. (2015). "Increased oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Zucker diabetic rat liver and brain." *Cell Physiol Biochem* 35(3): 1241-1251.
- Rea, I. M., M. Stewart, et al. (1996). "Changes in lymphocyte subsets, interleukin 2, and soluble interleukin 2 receptor in old and very old age." *Gerontology.* 42: 69-78.

-
- Reaven, G. M. (1998). "Insulin resistance and human disease: a short history." *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 9(2-4): 387-406.
- Reaven, G. M. (2006). "The metabolic syndrome: is this diagnosis necessary?" *Am J Clin Nutr.* 2006 Jun;83(6):1237-47.
- Rebrin, I., S. Kamzalov, et al. (2003). "Effects of age and caloric restriction on glutathione redox state in mice." *Free Radic Biol Med* 35(6): 626-635.
- Reiter, R. J., J. M. Guerrero, et al. (1998). "Reactive oxygen intermediates, molecular damage, and aging. Relation to melatonin." *Ann N Y Acad Sci* 854: 410-424.
- Remita, R. (2001). "Radioinduced lipid peroxidation: factors determining the oxidizability of lipids." *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 79: 144-153.
- Rentería, I., E. Arenas Berumen, et al. (2015). "[Factors affecting oxidative damage in obese children: an exploratory study]." *Nutr Hosp* 31(4): 1499-1503.
- Revskey, S. and E. Redei (2000). "Decreased in vitro sensitivity to dexamethasone in corticotropes from middleage rats." *Exp Gerontol* 35:237-242.
- Reyes, E., A. Prieto, et al. (1997). "Morphological variants of leukemic cells in B chronic lymphocytic leukemia are associated with different T cell and NK cell abnormalities." *Am J Hematol* 55(4): 175-182.
- Rezzi, S., F. P. Martin, et al. (2009). "Metabolic shifts due to long-term caloric restriction revealed in nonhuman primates." *Exp Gerontol.* 44(5):356-62.
- Richter, C. (1995). "Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relationship to ageing." *Int J Biochem Cell Biol* 27(7): 647-653.
- Ridker, P. M. (2003). "Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention." *Circulation* 107(3): 363-369.
- Riley, R. L., B. B. Blomberg, et al. (2005). "B cells, E2A, and aging." *Immunol Rev* 205: 30-47.
- Riley, R. L., M. G. Kruger, et al. (1991). "B cell precursors are decreased in senescent BALB/c mice, but retain normal mitotic activity in vivo and in vitro." *Clin. Immunol. Immunopathol.* 59: 301-313.
- Ritcher, M. and C. A. Jodouin (1993). "The delay in the synthesis and secretion of immunoglobulins by the B cells of healthy ambulatory elderly is due to subtle defects in the null cells and the B cells." *Aging Immunol. Infect. Dis.* 4: 1-16.
- Rizvi, S. I., R. Jha, et al. (2006). "Erythrocyte plasma membrane redox system in human aging." *Rejuvenation Res* 9(4): 470-474.
- Roberts, C. K. and R. J. Barnard (2005). "Effects of exercise and diet on chronic disease." *J Appl Physiol* (1985) 98(1): 3-30.
- Roberts, C. K., D. Won, et al. (2006). "Effect of a short-term diet and exercise intervention on oxidative stress, inflammation, MMP-9, and monocyte chemotactic activity in men with metabolic syndrome factors." *J Appl Physiol* (1985) 100(5): 1657-1665.
- Robinson, J. M. and J. A. Badwey (1994). "Production of active oxygen species by phagocytic leukocytes." *Immunol Ser* 60: 159-178.
- Rodríguez, V. M., M. T. Macarulla, et al. (2002). "Papel de las proteínas desacoplantes en la obesidad." *Anales del sistema sanitario de Navarra*; 25 (supl 1):65-7.
- Rolink, A., D. Haasner, et al. (1993). "Changes in frequencies of clonable pre B cells during life in different lymphoid organs of mice." *Blood* 81(9): 2290-2300.
- Rossi, A. and J. Olivares (1998). "Basis of pyrimidine nucleotide metabolism in the myocardium." *Cardiovasc Drugs Ther* 12 Suppl 2: 171-177.
-

-
- Roszman, T. L., J. C. Jackson, et al. (1985). "Neuroanatomic and neurotransmitter influences on immune function." *J Immunol* 135(2 Suppl): 769s-772s.
- Roush, W. (1996). "Live long and prosper?" *Science* 273(5271): 42-46.
- Ruiz-Larrea, M. B., A. R. Mohan, et al. (1997). "Antioxidant activity of phytoestrogenic isoflavones." *Free Radic Res* 26(1): 63-70.
- Ruth, M. R., C. G. Taylor, et al. (2008). "Abnormal immune responses in fa/fa Zucker rats and effects of feeding conjugated linoleic acid." *Obesity (Silver Spring)* 16(8): 1770-1779.
- Rutter, M. K., J. B. Meigs, et al. (2004). "C-reactive protein, the metabolic syndrome, and prediction of cardiovascular events in the Framingham Offspring Study." *Circulation* 110(4): 380-385.
- Sachdev, S. and K. J. Davies (2008). "Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise." *Free Radic Biol Med* 44(2): 215-223.
- Sadeghi, H. M., J. F. Schnelle, et al. (1999). "Phenotypic and functional characteristics of circulating monocytes of elderly persons." *Exp Gerontol* 34(8): 959-970.
- Sakuragawa, T., T. Hishiki, et al. (2010). "Hypotaurine is an Energy-Saving Hepatoprotective Compound against Ischemia-Reperfusion Injury of the Rat Liver." *J Clin Biochem Nutr.* 46(2):126-34.
- Sakurai, H., H. Yasui, et al. (2005). "Detection of reactive oxygen species in the skin of live mice and rats exposed to UVA light: a research review on chemiluminescence and trials for UVA protection." *Photochem. Photobiol. Sci.* 4: 715-720.
- Salas-Salvado, J., M. A. Rubio, et al. (2007). "SEEDO 2007 Consensus for the evaluation of overweight and obesity and the establishment of therapeutic intervention criteria." *Med Clin (Barc)* 128(5): 184-196; quiz 181 p following 200.
- Salminen, A. and K. Kaarniranta (2010). "Genetics vs. entropy: longevity factors suppress the NF-kappaB-driven entropic aging process." *Ageing Res Rev* 9(3): 298-314.
- Salvioli, S., M. Bonafé, et al. (2001). "Mitochondria, aging and longevity-a new perspective. ." *FEBS Lett.* 492: 9-13.
- Samiec, P. S., C. Drews-Botsch, et al. (1998). "Glutathione in human plasma: decline in association with aging, age-related macular degeneration, and diabetes." *Free Radic Biol Med* 24(5): 699-704.
- Sampey, B. P., A. M. Vanhoose, et al. (2011). "Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet." *Obesity (Silver Spring)*. 19(6):1109-17.
- Sánchez-Margalet, V., C. Martín-Romero, et al. (2003). "Role of leptin as an immunomodulator of blood mononuclear cells: mechanisms of action." *Clin Exp Immunol.* 133(1):11-9.
- Sanders, V. M. (2006). "Interdisciplinary research: noradrenergic regulation of adaptative immunity." *Brain, Behav. Immun.* 20: 1-8.
- Sandhu, S. K. and G. Kaur (2002). "Alterations in oxidative stress scavenger system in aging rat brain and lymphocytes." *Biogerontology* 3(3): 161-173.
- Sandstrom, B. A. and S. L. Marklund (1990). "Effects of variation in glutathione peroxidase activity on DNA damage and cell survival in human cells exposed to hydrogen peroxide and t-butylhydroperoxide." *Biochem. J.* 271: 17-23.
-

-
- Sansoni, P., F. Fagnoni, et al. (1997). "T lymphocyte proliferative capability to defined stimuli and costimulatory CD28 pathway is not impaired in healthy centenarians." *Mech. Ageing Dev* 96:127-136.
- Santos, R. V., E. C. Caperuto, et al. (2007). "Effects of acute exhaustive physical exercise upon glutamine metabolism of lymphocytes from trained rats." *Life Sci.* 80(6):573-8.
- Sanz, A., P. Caro, et al. (2005). "Dietary restriction at old age powers mitochondrial oxygen radical production and leak at complex I and oxidative DNA damage in rat brain." *J. Bioenerg. Biomembr.* 37: 83-90.
- Sartipy, P. and D. J. Loskutoff (2003). "Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(12): 7265-7270.
- Sasaki, T., M. Senda, et al. (2001). "Age-related changes of glutathione content, glucose transport and metabolism, and mitochondrial electron transfer function in mouse brain." *Nucl Med Biol* 28(1): 25-31.
- Sastre, J., M. Asensi, et al. (1992). "Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione status in blood: prevention by antioxidant administration." *Am J Physiol* 263(5 Pt 2): R992-995.
- Sastre, J., F. V. Pallardo, et al. (2000 (a)). "Mitochondria, oxidative stress and aging." *Free Radic Res* 32(3): 189-198.
- Sastre, J., F. V. Pallardo, et al. (2000 (b)). "Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis." *IUBMB Life* 49(5): 427-435.
- Satapati, S., T. He, et al. (2008). "Partial resistance to peroxisome proliferator-activated receptor- α agonists in ZDF rats is associated with defective hepatic mitochondrial metabolism." *Diabetes*. 57(8):2012-21.
- Sato Mito, N., M. Suzui, et al. (2009). "Long term effects of high fat and sucrose diets on obesity and lymphocyte proliferation in mice." *J Nutr Health Aging* 13(7): 602-606.
- Sato, Y., H. Nanri, et al. (2003). "Increase of human MTH1 and decrease of 8-hydroxydeoxyguanosine in leukocyte DNA by acute and chronic exercise in healthy male subjects." *Biochem Biophys Res Commun* 305(2): 333-338.
- Saugstad, O. D. (1996). "Role of xanthine oxidase and its inhibitor in hypoxia: reoxygenation injury." *Pediatrics* 98(1): 103-107.
- Savini, I., M. V. Catani, et al. (2013). "Obesity-associated oxidative stress: strategies finalized to improve redox state." *Int J Mol Sci* 14(5): 10497-10538.
- Scalbert, A., C. Manach, et al. (2005). "Dietary polyphenols and the prevention of diseases." *Crit Rev Food Sci Nutr* 45(4): 287-306.
- Schacter, E. (2000). "Quantification and significance of protein oxidation in biological samples." *Drug Metab. Rev.* 32: 307-326.
- Schafer, F. Q. and G. R. Buettner (2001). "Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple." *Free Radic. Biol. Med.* 30: 1191-1212.
- Schaffer, S. W., C. J. Jong, et al. (2010). "Physiological roles of taurine in heart and muscle." *J Biomed Sci* 17 Suppl 1: S2.
- Schapira, A. H., J. M. Cooper, et al. (1990). "Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease." *J Neurochem* 54(3): 823-827.
- Schapira, A. H., V. M. Mann, et al. (1990). "Anatomic and disease specificity of NADPH CoQ1 reductase (complex I) deficiency in Parkinson's disease. ." *J. Neurochem.* 54: 823-827.
-

-
- Schweigert, F. J. (2001). "Inflammation-induced changes in the nutritional biomarkers serum retinol and carotenoids." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 4(6): 477-481.
- Sebastian, C., M. Espia, et al. (2005). "MacrophageAging: a cellular and molecular review." *Immunobiology* 210(2-4): 121-126.
- Semsei, I. (2000). "On the nature of aging." *Mech Ageing Dev* 117(1-3): 93-108.
- Sengenès, C., A. Miranville, et al. (2007). "The role of endothelial cells in inflamed adipose tissue." *J Intern Med* 262(4): 415-421.
- Serafeim, A. and J. Gordon (2001). "The immune system gets nervous." *Curr Opin Pharmacol* 1(4): 398-403.
- Seyle, H. (1936). "Thymus and adrenals in the response of the organism to injuries and intoxications." *Br. J. Exp. Pathol.* 17: 234-248.
- Shanker, A. (2004). "Is thymus redundant after adulthood?" *Immunol Lett.* 91: 79-86.
- Sharma, K., P. McCue, et al. (2003). "Diabetic kidney disease in the db/db mouse." *Am J Physiol Renal Physiol* 284(6): F1138-1144.
- Sharma, R., R. Kapila, et al. (2014). "Age-associated aberrations in mouse cellular and humoral immune responses." *Aging Clin Exp Res* 26(4): 353-362.
- Shearer, G. M. (1997). "Th1/Th2 changes in aging." *Mech Ageing Dev* 94(1-3): 1-5.
- Shen, X., Q. Tang, et al. (2009). "Effect of vitamin E supplementation on oxidative stress in a rat model of diet-induced obesity." *Int J Vitam Nutr Res* 79(4): 255-263.
- Sheridan, P. A., H. A. Paich, et al. (2012). "Obesity is associated with impaired immune response to influenza vaccination in humans." *Int J Obes (Lond)*. 36(8):1072-7.
- Sherwood, E. M., B. B. Blomberg, et al. (1998). "Senescent BALB/c mice exhibit decreased expression of lambda5 surrogate light chains and reduced development within the pre-B cell compartment." *J. Immunol.* 161: 4472-4475.
- Shin, Y. A., J. H. Lee, et al. (2008). "Exercise training improves the antioxidant enzyme activity with no changes of telomere length." *Mech Ageing Dev.* 129(5):254-60.
- Shock, N. W. (1979). "Physiological and chronological age." En: *Aging, its chemistry*. Dietz, A.A. (Ed.) The American Association for Clinical Chemistry.
- Shoelson, S. E., J. Lee, et al. (2006). "Inflammation and insulin resistance." *J Clin Invest* 116(7): 1793-1801.
- Shore, S. A. (2007). "Obesity and asthma: lessons from animal models." *J Appl Physiol* (1985) 102(2): 516-528.
- Sies, H. (1993). "Strategies of antioxidant defense." *Eur J Biochem* 215(2): 213-219.
- Sies, H. (1999). "Glutathione and its role in cellular functions." *Free Radic Biol Med* 27(9-10): 916-921.
- Sies, H. and M. E. Murphy (1981). "Role of tocopherols in the protection of biological systems against oxidative damage." *J. Photochem. Photobiol. B.* 8: 211-224.
- Simell, B., A. Vuorela, et al. (2011). "Aging reduces the functionality of anti-pneumococcal antibodies and the killing of *Streptococcus pneumoniae* by neutrophil phagocytosis." *Vaccine* 29(10): 1929-1934.
- Simioni, P. U., E. H. Costa, et al. (2007). "Aging reduces the primary humoral response and the in vitro cytokine production in mice." *Braz J Med Biol Res* 40(8): 1111-1120.
- Simon, G. E., M. Von Korff, et al. (2006). "Association between obesity and psychiatric disorders in the US adult population." *Arch Gen Psychiatry.* 63(7):824-30.
- Sims, N. R., J. M. Finegan, et al. (1987). "Mitochondrial function in brain tissue in primary degenerative dementia." *Brain Res* 436(1): 30-38.
-

-
- Skalicky, J., V. Muzakova, et al. (2008). "Evaluation of oxidative stress and inflammation in obese adults with metabolic syndrome." *Clin Chem Lab Med* 46(4): 499-505.
- Skrha, J., G. Sindelka, et al. (1999). "Insulin action and fibrinolysis influenced by vitamin E in obese Type 2 diabetes mellitus." *Diabetes Res Clin Pract* 44(1): 27-33.
- Sloan, R. P., P. A. Shapiro, et al. (2007). "Aerobic exercise attenuates inducible TNF production in humans." *J Appl Physiol* (1985) 103(3): 1007-1011.
- Smith, A. G., P. A. Sheridan, et al. (2007). "Diet-induced obese mice have increased mortality and altered immune responses when infected with influenza virus." *J Nutr.* 137(5):1236-43.
- Smith, C. D., J. M. Carney, et al. (1991). "Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(23): 10540-10543.
- Smith, E. M. (1988). "Hormonal activities of lymphokines, monokines, and other cytokines." *Prog Allergy* 43: 121-139.
- Sohal, R. S., S. Agarwal, et al. (1994). "Effect of age and caloric restriction on DNA oxidative damage in different tissues of C57BL/6 mice." *Mech Ageing Dev* 76(2-3): 215-224.
- Sohal, R. S., S. Agarwal, et al. (1995). "Oxidative stress and aging in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*)." *Mech Ageing Dev* 81(1): 15-25.
- Sohal, R. S. and R. Weindruch (1996). "Oxidative stress, caloric restriction, and aging." *Science* 273(5271): 59-63.
- Solana, R., M. C. Alonso, et al. (1999). "Natural killer cells in healthy aging." *Exp Gerontol* 34(3): 435-443.
- Solana, R. and E. Mariani (2000). "NK and NK/T cells in human senescence." *Vaccine* 18(16): 1613-1620.
- Solana, R. and G. Pawelec (1998). "Molecular and cellular basis of immunosenescence." *Mech Ageing Dev* 102(2-3): 115-129.
- Solana, R., G. Pawelec, et al. (2006). "Aging and innate immunity." *Immunity* 24(5): 491-494.
- Soler, A. and J. Miquel (2009). "Objetivar el envejecimiento mediante marcadores biológicos de la edad." En: *Biogerontología Médica*. Sastre, J., Pamplona R., Ramón J.R. (eds) pp. 235-242. Ergon Madrid.
- Solerte, S. B., M. Fioravanti, et al. (1999). "Dehidroepiandrosterone sulfate enhances natural killer cell cytotoxicity in humans via locally generated immuno-reactive insuline-like growth factor I." *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84: 3260-3267.
- Soltys, K., G. Dikdan, et al. (2001). "Oxidative stress in fatty livers of obese Zucker rats: rapid amelioration and improved tolerance to warm ischemia with tocopherol." *Hepatology* 34(1): 13-18.
- Song, L., Y. H. Kim, et al. (1993). "Age-related effects in T cell activation and proliferation." *Exp Gerontol* 28(4-5): 313-321.
- Soto-Urquieta, M. G., S. López-Briones, et al. (2014). "Curcumin restores mitochondrial functions and decreases lipid peroxidation in liver and kidneys of diabetic db/db mice." *Biol Res* 47(1): 74.
- Spangelo, B. L. and R. M. Macleod (1990). "The role of immunopeptides in the regulation of anterior pituitary hormone release." *Trends Endocrinol Metab* 1(8): 408-412.
-

-
- Speakman, J., C. Hambly, et al. (2008). "The contribution of animal models to the study of obesity." *Lab Anim* 42(4): 413-432.
- Srinivasan, K. and P. Ramarao (2007). "Animal models in type 2 diabetes research: an overview." *Indian J Med Res* 125(3): 451-472.
- Stadman, E. R. (1991). "Ascorbic acid and oxidative inactivation of proteins." *Am. J. Clin. Nutr.* 54: 1125-1128.
- Stadman, E. R. and B. S. Berlett (1997). "Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease." *Chem. Res. Toxicol.* 10: 485-494.
- Stadtman, E. R. and R. L. Levine (2000). "Protein oxidation." *Ann N Y Acad Sci* 899: 191-208.
- Starke-Reed, P. E. and C. N. Oliver (1989). "Protein oxidation and proteolysis during aging and oxidative stress." *Arch. Biochem. Biophys.* 275: 559-567.
- Starkie, R., S. R. Ostrowski, et al. (2003). "Exercise and IL-6 infusion inhibit endotoxin-induced TNF- α production in humans." *Faseb J* 17(8): 884-886.
- Steger, M. M., C. Maczek, et al. (1997). "Peripheral blood dendritic cells reinduce proliferation in in vitro aged T cell populations." *Mech Ageing Dev* 93(1-3): 125-130.
- Stephan, R. P., V. M. Sanders, et al. (1996). "Stage-specific alterations in murine B lymphopoiesis with age." *Int Immunol* 8(4): 509-518.
- Steppan, C. M., S. T. Bailey, et al. (2001). "The hormone resistin links obesity to diabetes." *Nature* 409(6818): 307-312.
- Sternberg, E. M. (2006). "Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens." *Nat Rev Immunol* 6(4): 318-328.
- Stirpe, F. and E. Della Corte (1969). "The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O)." *J Biol Chem* 244(14): 3855-3863.
- Stofkova, A. (2009). "Leptin and adiponectin: from energy and metabolic dysbalance to inflammation and autoimmunity." *Endocr Regul* 43(4): 157-168.
- Stout, R. D. and J. Suttles (2005). "Immunosenescence and macrophage functional plasticity: dysregulation of macrophage function by age-associated microenvironmental changes." *Immunol Rev* 205: 60-71.
- Strandberg, L., M. Verdrengh, et al. (2009). "Mice chronically fed high-fat diet have increased mortality and disturbed immune response in sepsis." *PLoS One*. 28;4(10):e7605. doi: 10.1371/journal.pone.0007605.
- Straub, R. H., M. Cutolo, et al. (2001). "The process of aging changes the interplay of the immune, endocrine and nervous systems." *Mech Ageing Dev* 122(14): 1591-1611.
- Straub, R. H., L. E. Miller, et al. (2000). "Cytokines and hormones as possible links between endocrinosenescence and immunosenescence." *J Neuroimmunol* 109:2197-2202.
- Strehler, B. L. (1977). "Time, cells and aging." NY Academic Press.
- Strehler, B. L. (2000). "Understanding aging. En: Aging methods and protocols. Y.A. Barnett, C.R. Barnett (Eds.). Totowa, New Jersey, Humana Press. pp. 1-19."
- Strehlow, K., S. Rotter, et al. (2003). "Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen." *Circ Res* 93(2): 170-177.
- Stulnig, T. M., E. Buhler, et al. (1995). "Altered switch in lipid composition during T-cell blast transformation in the healthy elderly." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 50(6): B383-390.
-

-
- Suematsu, M., A. Katsuki, et al. (2005). "Decreased circulating levels of active ghrelin are associated with increased oxidative stress in obese subjects." *Eur J Endocrinol* 153(3): 403-407.
- Sugiura, H., H. Nishida, et al. (2001). "Effects of different durations of exercise on macrophage functions in mice." *J Appl Physiol* (1985) 90(3): 789-794.
- Sundler, R. and B. Akesson (1975). "Regulation of phospholipid biosynthesis in isolated rat hepatocytes. Effect of different substrates." *J Biol Chem* 250(9): 3359-3367.
- Suzuki, K., S. Nakaji, et al. (2002). "Systemic inflammatory response to exhaustive exercise. Cytokine kinetics." *Exerc Immunol Rev* 8: 6-48.
- Suzuki, Y. and Y. Ono (1999). "Involvement of reactive oxygen species produced via NADPH oxidase in tyrosine phosphorylation in human B- and T-lineage lymphoid cells." *Biochem Biophys Res Commun* 255(2): 262-267.
- Szabo, P., S. Shen, et al. (1999). "Age-associated defects in B lymphocyte development." *Exp Gerontol* 34(3): 431-434.
- Szelényi, J. (2001). "Cytokines and the central nervous system." *Brain Res Bull* 54(4): 329-338.
- Szweda, L. I., K. Uchida, et al. (1993). "Inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase by 4-hydroxy-2-nonenal. Selective modifications of an active-site lysine." *J. Biol. Chem.* 268: 3342-3347.
- Szweda, P. A., B. Friguet, et al. (2002). "Proteolysis, free radicals and aging." *Free Radic. Biol. Med.* 33: 29-36.
- Taes, Y. E., D. De Bacquer, et al. (2005). "Haptoglobin and body mass index." *J Clin Endocrinol Metab* 90(1): 594; author reply 594-595.
- Tahara, S., M. Matsuo, et al. (2001). "Age-related changes in oxidative damage to lipids and DNA in rat skin." *Mech Ageing Dev* 122(4): 415-426.
- Tahergorabi, Z. and M. Khazaei (2013). "The relationship between inflammatory markers, angiogenesis, and obesity." *ARYA Atheroscler.* 9(4):247-53.
- Takahashi, K., S. Mizuarai, et al. (2003). "Adiposity elevates plasma MCP-1 levels leading to the increased CD11b-positive monocytes in mice." *J Biol Chem* 278(47): 46654-46660.
- Tamariz, L., F. Hernandez, et al. (2014). "Association between serum uric acid and atrial fibrillation: a systematic review and meta-analysis." *Heart Rhythm.* 11(7):1102-8.
- Tanaka, S., S. Inoue, et al. (1993). "Impaired immunity in obesity: suppressed but reversible lymphocyte responsiveness." *Int J Obes Relat Metab Disord* 17(11): 631-636.
- Tanaka, S., F. Isoda, et al. (2000). "T lymphopenia in genetically obese-diabetic Wistar fatty rats: effects of body weight reduction on T cells." *Metabolism* 49(10): 1261-1266.
- Tanaka, S., F. Isoda, et al. (1998). "T lymphopenia in genetically obese rats." *Clin Immunol Immunopathol* 86(2): 219-225.
- Tanasescu, M., M. F. Leitzmann, et al. (2003). "Physical activity in relation to cardiovascular disease and total mortality among men with type 2 diabetes." *Circulation.* 107(19):2435-9.
- Tang, Y., L. Di Pietro, et al. (2000). "Increased TNF-alpha and PFI2, but not NO release from macrophages in 18 months old rats." *Mech Ageing Dev* 114:79-88.
-

-
- Tarazona, R., O. De la Rosa, et al. (2000). "Increased expression of NK cell markers on T lymphocytes in aging and chronic activation of the immune system reflects the accumulation of effector/senescent T cells." *Mech Ageing Dev* 121(1-3): 77-88.
- Tateya, S., F. Kim, et al. (2013). "Recent advances in obesity-induced inflammation and insulin resistance." *Front Endocrinol (Lausanne)*. 8;4:93. doi: 10.3389/fendo.2013.00093.
- Tatton, G. W. and C. W. Olanow (1999). "Apoptosis in neurodegenerative diseases: the role of mitochondria." *Biochim. Biophys. Acta* 1410: 195-213.
- Teixeira-Lemos, E., S. Nunes, et al. (2011). "Regular physical exercise training assists in preventing type 2 diabetes development: focus on its antioxidant and anti-inflammatory properties." *Cardiovasc Diabetol* 10: 12.
- Teixeira de Lemos, E., R. Pinto, et al. (2011). "Differential effects of acute (extenuating) and chronic (training) exercise on inflammation and oxidative stress status in an animal model of type 2 diabetes mellitus." *Mediators Inflamm* 2011: 253061.
- Teixeira de Lemos, E., F. Reis, et al. (2009). "Exercise training decreases proinflammatory profile in Zucker diabetic (type 2) fatty rats." *Nutrition* 25(3): 330-339.
- Tham, D. M., B. Martin-McNulty, et al. (2002). "Angiotensin II is associated with activation of NF-kappaB-mediated genes and downregulation of PPARs." *Physiol Genomics*. 11(1):21-30.
- Thoman, M. L. and W. O. Weigle (1989). "The cellular and sub-cellular bases of immunosenescence." *Adv. Immunol.* 46: 221-261.
- Tian, Z., R. Sun, et al. (2002). "Impaired natural killer (NK) cell activity in leptin receptor deficient mice: leptin as a critical regulator in NK cell development and activation." *Biochem Biophys Res Commun.* 298(3):297-302.
- Tietze, F. (1969). "Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione." *Anal Biochem* 17: 502-522.
- Torjesen, P. A., K. I. Birkeland, et al. (1997). "Lifestyle changes may reverse development of the insulin resistance syndrome. The Oslo Diet and Exercise Study: a randomized trial." *Diabetes Care*. 20(1):26-31.
- Tortorella, C., G. Piazzolla, et al. (2000). "Regulatory role of extracellular matrix proteins in neutrophil respiratory Bursa during aging." *Mech. Ageing Dev.* 119: 69-82.
- Tortorella, C., O. Simone, et al. (2007). "Age-related impairment of GM-CSF-induced signalling in neutrophils: role of SHP-1 and SOCS proteins." *Ageing Res Rev* 6(2): 81-93.
- Traill, K. N. and G. Wick (1984). "Lipids and lymphocyte function." *Immunol Today* 5(3): 70-76.
- Trayhurn, P. (2005). "Endocrine and signalling role of adipose tissue: new perspectives on fat." *Acta Physiol Scand* 184(4): 285-293.
- Trayhurn, P. (2013). "Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity." *Physiol Rev* 93(1): 1-21.
- Trayhurn, P. and J. H. Beattie (2001). "Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ." *Proc Nutr Soc.* Aug;60(3):329-39.
- Trayhurn, P., N. Hoggard, et al. (1999). "Leptin: fundamental aspects." *Int J Obes Relat Metab Disord* 23 Suppl 1: 22-28.
-

-
- Trayhurn, P., B. Wang, et al. (2008 (a)). "Hypoxia and the endocrine and signalling role of white adipose tissue." *Arch Physiol Biochem* 114(4): 267-276.
- Trayhurn, P., B. Wang, et al. (2008 (b)). "Hypoxia in adipose tissue: a basis for the dysregulation of tissue function in obesity?" *Br J Nutr* 100(2): 227-235.
- Trayhurn, P. and I. S. Wood (2004). "Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue." *Br J Nutr* 92(3): 347-355.
- Trayhurn, P. and I. S. Wood (2005). "Signalling role of adipose tissue: adipokines and inflammation in obesity." *Biochem Soc Trans* 33(Pt 5): 1078-1081.
- Treuth, M. S., A. S. Ryan, et al. (1994). "Effects of strength training on total and regional body composition in older men." *J Appl Physiol* (1985) 77(2): 614-620.
- Troen, B. R. (2003). "The biology of aging." *Mt Sinai J Med* 70(1): 3-22.
- Trøseid, M., K. T. Lappegård, et al. (2004). "Exercise reduces plasma levels of the chemokines MCP-1 and IL-8 in subjects with the metabolic syndrome." *Eur Heart J* 25(4):349-55.
- Trounce, I., E. Byrne, et al. (1989). "Decline in skeletal muscle mitochondrial respiratory chain function: possible factor in ageing." *Lancet*. 1: 637-639.
- Trzonkowski, P., E. Szmit, et al. (2006). "CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of CTL and NK cells in humans-impact of immunosenescence." *Clin Immunol* 119:307-316.
- Urakawa, H., A. Katsuki, et al. (2003). "Oxidative stress is associated with adiposity and insulin resistance in men." *J Clin Endocrinol Metab*. 88(10):4673-6.
- Ursini, F., M. Maiorino, et al. (1995). "Diversity of glutathione peroxidases." *Methods Enzymol* 252: 38-53.
- Valdecantos, M. P., P. Pérez-Matute, et al. (2009). "[Obesity and oxidative stress: role of antioxidant supplementation]." *Rev Invest Clin* 61(2): 127-139.
- Valko, M., D. Leibfritz, et al. (2007). "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." *Int J Biochem Cell Biol* 39(1): 44-84.
- Valsecchi, A. E., S. Franchi, et al. (2008). "Genistein, a natural phytoestrogen from soy, relieves neuropathic pain following chronic constriction sciatic nerve injury in mice: anti-inflammatory and antioxidant activity." *J Neurochem* 107(1): 230-240.
- van den Biggelaar, A. H., T. W. Huizinga, et al. (2004). "Impaired innate immunity predicts frailty in old age. The Leiden 85-plus study." *Exp Gerontol* 39(9): 1407-1414.
- Van Harmelen, V., P. Ariapart, et al. (2000). "Increased adipose angiotensinogen gene expression in human obesity." *Obes Res* 8(4): 337-341.
- Van Heek, M., D. S. Compton, et al. (1997). "Diet-induced obese mice develop peripheral, but not central, resistance to leptin." *J Clin Invest*. 99(3):385-90.
- Vance, D. E., Z. Li, et al. (2007). "Hepatic phosphatidylethanolamine N-methyltransferase, unexpected roles in animal biochemistry and physiology." *J Biol Chem* 282(46): 33237-33241.
- Vasan, R. S. (2003). "Cardiac function and obesity." *Heart* 89(10): 1127-1129.
- Vaziri, H. and S. Benchimol (1996). "From telomere loss to p53 induction and activation of a DNA-damage pathway at senescence: the telomere loss/DNA damage model of cell aging." *Exp. Gerontol*.31: 295-301.
-

-
- Venturini, D., A. N. Simão, et al. (2015). "Advanced oxidation protein products are more related to metabolic syndrome components than biomarkers of lipid peroxidation." *Nutr Res.* 35(9):759-65.
- Venturini, D., A. N. Simão, et al. (2012). "Evaluation of oxidative stress in overweight subjects with or without metabolic syndrome." *Obesity (Silver Spring)*. 20(12):2361-6. .
- Verwaerde, C., A. Delanoye, et al. (2006). "Influence of high-fat feeding on both naive and antigen-experienced T-cell immune response in DO10.11 mice." *Scand J Immunol.* 64(5):457-66.
- Veselkov, K. A., J. C. Lindon, et al. (2009). "Recursive segment-wise peak alignment of biological ^1H NMR spectra for improved metabolic biomarker recovery." *Anal. Chem.* 81: 56–66.
- Vida, C., I. Corpas, et al. (2011). "Age-related changes in xanthine oxidase activity and lipid peroxidation, as well as in the correlation between both parameters, in plasma and several organs from female mice." *J Physiol Biochem.* 67(4):551-8.
- Vida, C. and M. De la Fuente (2013). "Stress-related behavioural responses, immunity and ageing in animal models." In: *Immunosenescence: Psychosocial and Behavioral Determinants*. Bosch, J.A., Phillips, A.C., Lord, J.M. (eds) chapter 8, pp.125-144. Springer, Science+Business Media NY.
- Vida, C., E. M. González, et al. (2014). "Increase of oxidation and inflammation in nervous and immune systems with aging and anxiety." *Curr Pharm Des* 20(29): 4656-4678.
- Vida, C., Rodríguez-Terés S, et al. (2011). "The aged-related increase in xanthine oxidase expression and activity in several tissues from mice is not shown in long-lived animals." *Biogerontology.* 12(6):551-64.
- Vincent, H. K., S. K. Powers, et al. (1999). "Obesity is associated with increased myocardial oxidative stress." *Int J Obes Relat Metab Disord.* 23(1):67-74.
- Vincent, H. K. and A. G. Taylor (2006). "Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans." *Int J Obes (Lond)* 30(3): 400-418.
- Viña, J., A. Gimeno, et al. (2000). "Mechanism of free radical production in exhaustive exercise in humans and rats; role of xanthine oxidase and protection by allopurinol." *IUBMB Life* 49(6): 539-544.
- Viña, J., J. Sastre, et al. (2003). "Mitochondrial theory of aging: importance to explain why females live longer than males." *Antiox. Redox Signal.* 5: 549-556.
- Viña, J., J. Sastre, et al. (2008). "Modulation of longevity-associated genes by estrogens or phytoestrogens." *Biol Chem* 389(3): 273-277.
- Viña, J.R., G. T. Sáez, et al. (1989). "The physiological functions of glutathione." En: *Handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine*. CRC press. Boca Ratón, Florida. pp. 121-132.
- Vitale, C., G. Marazzi, et al. (2006). "Metabolic syndrome." *Minerva Med* 97(3): 219-229.
- Viveros, M. P., L. Arranz, et al. (2007). "A model of premature aging in mice based on altered stress-related behavioral response and immunosenescence." *Neuroimmunomodulation* 14(3-4): 157-162.
- Vladimirov, Y. A. (1986). "Free radical peroxidation in biomembranes: mechanism, regulation and biological consequences." En: *Free radicals, aging and degenerative diseases* (Eds. Johnsson, J.E., Walford, R., Harman, D., Miquel, J.) Alan, R. Liss, New York pp: 141-195.
-

-
- Voss, S. D., P. M. Sondel, et al. (1992). "Characterization of the interleukin 2 receptors (IL-2R) expressed on human natural killer cells activated in vivo by IL-2: association of the p64 IL-2R gamma chain with the IL-2R beta chain in functional intermediate-affinity IL-2R." *J Exp Med* 176(2): 531-541.
- Wajner, M. and R. A. Harkness (1989). "Distribution of xanthine dehydrogenase and oxidase activities in human and rabbit tissues." *Biochim Biophys Acta* 991(1): 79-84.
- Walberg, J. L., P. A. Molé, et al. (1982). "Effect of swim training on development of obesity in the genetically obese rat." *Am J Physiol* 242(3): R204-211.
- Walford, R. L. (1969). "En: The immunological theory of aging." Musksgaard, Copenhagen. pp. 1-248.
- Walford, R. L. (1974). "Immunologic theory of aging: current status." *Fed Proc* 33(9): 2020-2027.
- Wallace, D. C. (2005). "A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine." *Annu Rev Genet* 39: 359-407.
- Wallis, J., C. A. Lygate, et al. (2005). "Supranormal myocardial creatine and phosphocreatine concentrations lead to cardiac hypertrophy and heart failure: insights from creatine transporter-overexpressing transgenic mice." *Circulation* 112(20): 3131-3139.
- Wang, H., H. Liu, et al. (2003). "Gender difference in glutathione metabolism during aging in mice." *Exp Gerontol* 38(5): 507-517.
- Wärnberg, J., K. Cunningham, et al. (2010). "Physical activity, exercise and low-grade systemic inflammation." *Proc Nutr Soc* 69(3): 400-406.
- Warren, K. J., M. M. Olson, et al. (2015). "Exercise Improves Host Response to Influenza Viral Infection in Obese and Non-Obese Mice through Different Mechanisms." *PLoS ONE* 10(6):1-27 doi: 10.1371.
- Waters, N. J., E. Holmes, et al. (2002). "NMR and pattern recognition studies on liver extracts and intact livers from rats treated with alpha-naphthylisothiocyanate." *Biochem Pharmacol* 64(1): 67-77.
- Waud, W. R. and K. V. Rajagopalan (1976). "Purification and properties of the NAD⁺-dependent (type D) and O₂-dependent (type O) forms of rat liver xanthine dehydrogenase." *Arch Biochem Biophys* 172(2): 354-364.
- Wayne, S. J., R. L. Rhyne, et al. (1990). "Cell-mediated immunity as a predictor of morbidity and mortality in subjects over 60." *J. Gerontol.* 45: 45-98.
- Wayner, D. D., G. W. Burton, et al. (1985). "Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma proteins." *FEBS Lett.* 22;187(1):33-7.
- Wei, E. K., E. Giovannucci, et al. (2005). "Low plasma adiponectin levels and risk of colorectal cancer in men: a prospective study." *J Natl Cancer Inst* 97(22): 1688-1694.
- Weigle, W. O. and E. B. Chu (1994). "Age-related changes in the immune system and associated autoimmunity." *Aging Immunol. Infect Dis.* 5:133-146.
- Weisberg, S. P., D. McCann, et al. (2003). "Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue." *J Clin Invest.* Dec;112(12):1796-808.
- Weksler, M. E. (2000). "Changes in the B-cell repertoire with age." *Vaccine* 18(16): 1624-1628.
-

-
- Weksler, M. E. and P. Szabo (2000). "The effect of age on the B-cell repertoire." *J Clin Immunol* 20:240-249.
- Wellen, K. E. and G. S. Hotamisligil (2003). "Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue." *J Clin Invest* 112(12): 1785-1788.
- Wellen, K. E. and G. S. Hotamisligil (2005). "Inflammation, stress, and diabetes." *J Clin Invest* 115(5): 1111-1119.
- Weng, N. P. (2006). "Aging of the immune system: how much can the adaptive immune system adapt?" *Immunity* 24: 495-499.
- Wenish, C., S. Patruta, et al. (2000). "Effect of age on human neutrophil function." *J Leukoc Biol* 67:40-45.
- Weyand, C. M., J. C. Brandes, et al. (1998). "Functional properties of CD4+CD28- T cells in the aging immune system." *Mech Ageing Dev* 102:131-147.
- Whisler, R. L., Y. G. Newhouse, et al. (1991). "Proliferative responders of B cells from elderly humans: Abnormalities in early responsiveness are related in B cell activation molecules." *Lymphokine Cytokine Res.* 10: 1-6.
- White, B. D. and R. J. Martin (1997). "Evidence for a central mechanism of obesity in the Zucker rat: role of neuropeptide Y and leptin." *Proc Soc Exp Biol Med* 214(3): 222-232.
- Wick, G. and B. Grubeck-Loebenstein (1997). "The aging immune system: primary and secondary alterations of immune reactivity in the elderly." *Exp Gerontol* 32(4-5): 401-413.
- Wichmann, M. W., R. Zellweger, et al. (1996). "Mechanism of immunosuppression in males following trauma-hemorrhage. Critical role of testosterone." *Arch Surg* 131(11): 1186-1191; discussion 1191-1182.
- Wilcox, G. (2005). "Insulin and insulin resistance." *Clin Biochem Rev* 26(2): 19-39.
- Wojtaszewski, J. F., J. N. Nielsen, et al. (2002). "Invited review: effect of acute exercise on insulin signaling and action in humans." *J Appl Physiol* (1985) 93(1): 384-392.
- Wood, I. S., F. P. de Heredia, et al. (2009). "Cellular hypoxia and adipose tissue dysfunction in obesity." *Proc Nutr Soc* 68(4): 370-377.
- Woodall, A. A. and B. N. Ames (1997). "Diet and oxidative damage to DNA: The importance of ascorbate as an antioxidant." En: *Vitamin C in health and disease*. Eds. Packer, L., Fuchs, J. New York: Marcel Dekker Inc. pp. 193-203.
- Woods, J. A., V. J. Vieira, et al. (2006). "Exercise, inflammation, and innate immunity." *Neurol Clin* 24(3): 585-599.
- Woods, S. C., R. J. Seeley, et al. (2003). "A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats." *J Nutr* 133(4): 1081-1087.
- Wrona, D. (2006). "Neural-immune interactions: an integrative view of the bidirectional relationship between the brain and immune systems." *J. Neuroimmunol.* 172 (1-2): 38-58.
- Wyss-Coray, T. and J. Rogers (2012). "Inflammation in Alzheimer disease-a brief review of the basic science and clinical literature." *Cold Spring Harb Perspect Med* 2(1): a006346.
- Xiang, L., J. Naik, et al. (2005). "Exercise-induced increase in skeletal muscle vasodilatory responses in obese Zucker rats." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288(4): R987-991.
-

-
- Xu, B. (2001). "The importance of beta-adrenergic receptors in immune regulation: a link between neuroendocrine and immune system." *Med. Hypotheses* 56: 273-276.
- Xu, H., G. T. Barnes, et al. (2003). "Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance." *J Clin Invest* 112(12): 1821-1830.
- Yagi, T., A. Sato, et al. (1997). "Failure of aged rats to accumulate eosinophils in allergic inflammation on the airway." *J. Allergy Clin. Immunol.* 99: 38-47.
- Yamauchi, T., J. Kamon, et al. (2003). "Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and ApoE-deficient mice from atherosclerosis." *J Biol Chem* 278(4): 2461-2468.
- Yancey, P. H. (2005). "Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses." *J Exp Biol.* 208(Pt 15):2819-30.
- Yang, H., Y. H. Youm, et al. (2009). "Obesity accelerates thymic aging." *Blood* 114(18): 3803-3812.
- Yang, Q., T. E. Graham, et al. (2005). "Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes." *Nature* 436(7049): 356-362.
- Yang, X. H., J. Stedra, et al. (1996). "Relative contribution of T and B cells to hypermutation and selection of the antibody repertoire in germinal centres of aged mice." *J. Exp. Med.* 183: 959-970.
- Yeum, K. J., R. M. Russell, et al. (2004). "Biomarkers of antioxidant capacity in the hydrophilic and lipophilic compartments of human plasma." *Arch Biochem Biophys* 430(1): 97-103.
- Yi, S. S., I. K. Hwang, et al. (2009). "Effects of treadmill exercise on cell proliferation and differentiation in the subgranular zone of the dentate gyrus in a rat model of type II diabetes." *Neurochem Res* 34(6): 1039-1046.
- Yoon, S. O., C. H. Yun, et al. (2002). "Dose effect of oxidative stress on signal transduction in aging." *Mech Ageing Dev* 123(12): 1597-1604.
- You, T. and B. J. Nicklas (2008). "Effects of exercise on adipokines and the metabolic syndrome." *Curr Diab Rep* 8(1): 7-11.
- Young, A. J. and G. M. Lowe (2001). "Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids." *Arch. Biochem. Biophys.* 385: 20-27.
- Yuan, H., J. C. Zheng, et al. (2007). "Pathogenesis of Parkinson's disease: Oxidative stress, environmental impact factors and inflammatory process." *Neurosci Bull* 23:125-130.
- Yudkin, J. S., M. Kumari, et al. (2000). "Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link?" *Atherosclerosis.* 148(2):209-14.
- Zeyda, M. and T. M. Stulnig (2009). "Obesity, inflammation, and insulin resistance--a mini-review." *Gerontology* 55(4): 379-386.
- Zhang, W. and L. E. Samelson (2000). "The role of membrane-associated adaptors in T cell receptor signalling." *Semin Immunol* 12(1): 35-41.
- Zhang, Y., K. E. Fischer, et al. (2015). "Obesity-induced oxidative stress, accelerated functional decline with age and increased mortality in mice." *Arch Biochem Biophys* 576: 39-48.
- Zheng, Q., G. Cui, et al. (2015). "Regular Exercise Enhances the Immune Response Against Microbial Antigens Through Up-Regulation of Toll-like Receptor Signaling Pathways." *Cell Physiol Biochem.* 37(2):735-46.
-

- Zhou, Y. and A. S. Lee (1998). "Mechanism for the suppression of the mammalian stress response by genistein, an anticancer phytoestrogen from soy." *J Natl Cancer Inst* 90(5): 381-388.
- Ziegler, R. G., E. A. Colavito, et al. (1996). "Importance of alpha-carotene, beta-carotene, and other phytochemicals in the etiology of lung cancer." *J Natl Cancer Inst* 88(9): 612-615.
- Zimmer, P., K. G. M M Alberti, et al. (2005). "A new international diabetes federation worldwide definition of the metabolic syndrome: the rationale and the results." *Rev Esp Cardiol* 58(12): 1371-1376.
- Zinman, B., N. Ruderman, et al. (2003). "Physical activity/exercise and diabetes mellitus." *Diabetes Care* 26 Suppl 1: S73-77.
- Zissel, G., M. Schlaak, et al. (1999). "Age-related decrease in accessory cell function of human alveolar macrophages." *J Invest Med* 47:51-56.
- Zs-Nagy, I. (1974). "The role of membrane structure and function in cellular aging: a review. ." *Mech. Ageing Dev.* 9: 237-246.
- Zulet, M. A., B. Puchau, et al. (2007). "Inflammatory biomarkers: the link between obesity and associated pathologies." *Nutr Hosp. Sep-Oct;22(5):511-27.*
- Zwingmann, C. and M. Bilodeau (2006). "Metabolic insights into the hepatoprotective role of N-acetylcysteine in mouse liver." *Hepatology.* 43(3):454-63.

ANEXO

A continuación se expone la relación de los trabajos científicos derivados de la presente tesis:

1. De la Fuente, M. and **De Castro, N. M.** Obesity as a model of premature immunosenescence. Curr Immunol Rev. 2012 8:63-75.
2. **de Castro, N.M.**, Yaqoob, P., de la Fuente, M., Baeza, I., Claus, S.P. Premature impairment of methylation pathway and cardiac metabolic dysfunction in fa/fa obese Zucker rats. J Proteome Res. 2013 Apr 5;12(4):1935-45.