

# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA  
Departamento de Nutrición y Bromatología I  
(Nutrición)



## TESIS DOCTORAL

**Efectos del surimi de calamar enriquecido con glucomanano y-o  
espirulina sobre marcadores del síndrome metabólico en ratas Zucker  
*fa-fa***

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

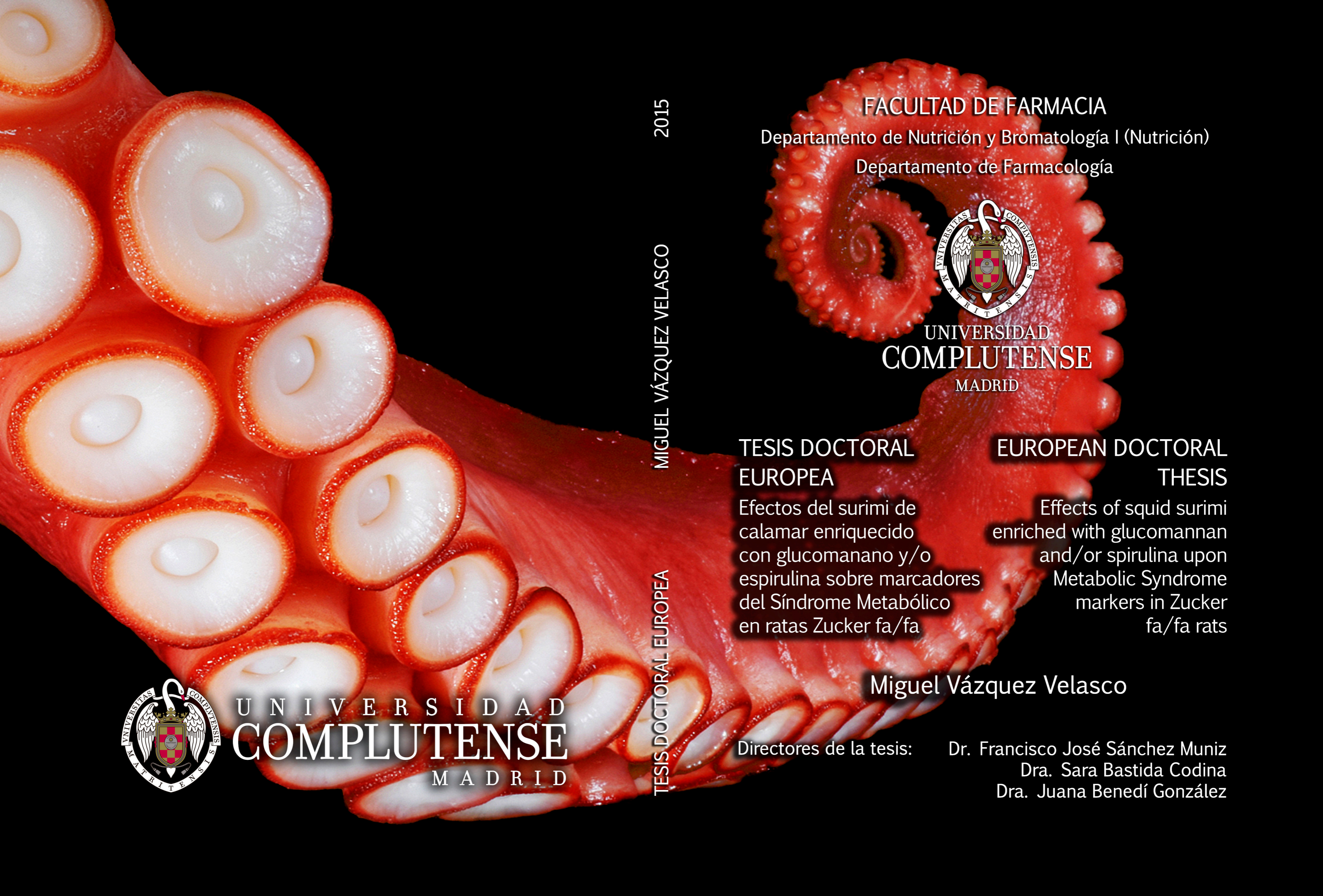
PRESENTADA POR

**Miguel Velasco Vázquez**

Directores

Francisco J. Sánchez  
Muniz, Sara Bastida Codina  
Juana Benedí González

**Madrid, 2016**



2015

MIGUEL VÁZQUEZ VELASCO

TESIS DOCTORAL EUROPEA

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición)

Departamento de Farmacología



UNIVERSIDAD  
COMPLUTENSE  
MADRID

TESIS DOCTORAL  
EUROPEA

Efectos del surimi de  
calamar enriquecido  
con glucomanano y/o  
espirulina sobre marcadores  
del Síndrome Metabólico  
en ratas Zucker fa/fa

EUROPEAN DOCTORAL  
THESIS

Effects of squid surimi  
enriched with glucomannan  
and/or spirulina upon  
Metabolic Syndrome  
markers in Zucker  
fa/fa rats

Miguel Vázquez Velasco

Directores de la tesis:

Dr. Francisco José Sánchez Muniz  
Dra. Sara Bastida Codina  
Dra. Juana Benedí González



UNIVERSIDAD  
COMPLUTENSE  
MADRID

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA I (NUTRICIÓN) | FARMACOLOGÍA



UNIVERSIDAD  
**COMPLUTENSE**  
MADRID

**Efectos del Surimi de Calamar Enriquecido con  
Glucomanano y/o Espirulina sobre Marcadores del  
Síndrome Metabólico en Ratas Zucker fa/fa**

TESIS DOCTORAL EUROPEA

**MIGUEL VÁZQUEZ VELASCO**

MADRID, 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA I (NUTRICIÓN) | FARMACOLOGÍA



UNIVERSIDAD  
**COMPLUTENSE**  
MADRID

**Effects of Squid Surimi Enrich with Glucomannan  
and/or Spirulina upon Metabolic Syndrome Markers in  
Zucker fa/fa Rats**

EUROPEAN DOCTORAL THESIS

**MIGUEL VÁZQUEZ VELASCO**

MADRID, 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE FARMACIA  
NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA I (NUTRICIÓN) | FARMACOLOGÍA



UNIVERSIDAD  
**COMPLUTENSE**  
MADRID

**Efectos del Surimi de Calamar Enriquecido con  
Glucomanano y/o Espirulina sobre Marcadores del  
Síndrome Metabólico en Ratas Zucker fa/fa**

Trabajo de investigación presentado por Miguel Vázquez Velasco para optar al grado  
de Doctor Europeo por la Universidad Complutense de Madrid

Vº Bº del Director:

Vº Bº de la Directora:

Vº Bº de la Directora

Dr. Francisco J. Sánchez  
Muniz

Dra. Sara Bastida Codina

Dra. Juana Benedí  
González

MADRID, 2015



El **Dr. Francisco José Sánchez Muniz**, Catedrático del Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición) de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, la **Dra. Sara Bastida Codina**, Profesora Titular del Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición) de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, y la **Dra. Juana Benedí González**, Profesora Titular del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN que el trabajo de investigación titulado

**“Efectos del surimi de calamar enriquecido con glucomanano y/o espirulina sobre marcadores de Síndrome Metabólico en ratas Zucker fa/fa”**

constituye la memoria que presenta el Licenciado **Miguel Vázquez Velasco** para optar al grado de Doctor y ha sido realizado en los Departamentos de Nutrición y Bromatología I (Nutrición) y de Farmacología, ambos de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, bajo nuestra dirección. Asimismo, en el marco del proceso de evaluación requerido, damos nuestro consentimiento para su presentación y defensa en la Universidad Complutense de Madrid.

Para que conste a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Madrid a treinta de octubre de dos mil quince.

Fdo.: Dr. Francisco J.  
Sánchez Muniz

Fdo.: Dra. Sara Bastida  
Codina

Fdo.: Dra. Juana Benedí  
González



El trabajo de investigación que ha dado origen a esta memoria ha sido realizado en el *Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición)* y en el *Departamento de Farmacología* de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, al amparo de los proyectos AGL 2008-04892-C03-02, del Ministerio de Educación y Ciencia, Secretaría de Estado de Universidades e Investigación y Secretaría General de Política Científica y Tecnológica, AGL 2011-29644-C02-02 del Ministerio de Ciencia e Innovación, Secretaría de Estado de Investigación y AGL 2014-53207-C2-2-R del Ministerio de Ciencia e Innovación, Secretaría de Estado de Investigación.

Asimismo, ha sido parcialmente financiado por el Proyecto de Red Consolidar-Ingenio 2010 referencia CSD 2007-00016.



## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, deseo expresar mi agradecimiento a los directores de esta Tesis Doctoral, especialmente al Dr. Francisco José Sánchez Muniz, por su apoyo, su paciencia infinita y rigor, sin olvidarme de la Dra. Sara Bastida ni de la Dra. Juana Benedí, sin cuyo ánimo jamás se habría podido llegar a este momento.

Asimismo agradezco a todos y cada uno de mis compañeros de los departamentos de Nutrición y Bromatología I (Nutrición) y Farmacología por los grandes momentos que hemos pasado, y por ser un cabo al que agarrarse en los momentos de zozobra... Y muy cariñosamente debo acordarme de mi “núcleo duro”, Laura, M<sup>a</sup> Ángeles y Patricia, que hacen que me sienta siempre en deuda con ellas por los gratos momentos vividos.

Ha sido encomiable también la labor del Dr. Jaap Keijer y el Dr. Evert von Schothorst al enseñarme la disciplina y el rigor científico propios de las tierras holandesas.

Gracias a mi familia, y en especial a mi madre, la Dra. M<sup>a</sup> Ángeles Velasco Cañas por su infinita paciencia y flexibilidad. Y a mi hermano Luis por su ayuda en los momentos más tensos de la Tesis.

Mil gracias a mis amigos, a los alcorconeros, a la “santa C” y a la Muy Noble, Leal y Osada Tuna de Farmacia por recordarme que la vida es divertida y merece la pena exprimirla.

Y a Laura, que se ha portado como una campeona, soportando el mal humor de un tesinando a punto de finalizar con una gran sonrisa.

Y, en general, a todo aquel que sienta que deba leerse aquí y que por descuido imperdonable, piense que no está en mi corazón.

A todos, muchas gracias.



# ÍNDICE

	<u>Página</u>
<b>Abreviaturas</b> .....	<b>17</b>
<b>1. Introducción</b> .....	<b>19</b>
1.1. El síndrome metabólico.....	21
1.1.1. La obesidad.....	22
1.1.2. La diabetes mellitus tipo 2.....	26
1.1.2.1. Resistencia a la insulina.....	28
1.1.3. Las dislipemias.....	32
1.1.4. Otros factores de riesgo.....	37
1.1.4.1. El estrés oxidativo.....	37
1.1.4.2. La inflamación crónica.....	43
1.1.4.3. La hiperuricemia.....	45
1.1.5. Prevención y tratamiento.....	47
1.2. Los alimentos funcionales.....	48
1.2.1. Generalidades.....	48
1.2.2. El pescado y derivados de la pesca como alimentos funcionales.....	50
1.2.2.1. El surimi de calamar.....	52
1.2.3. La fibra soluble: harina de <i>Amorphophallus Konjac</i> .....	53
1.2.4. La espirulina.....	56
1.3. Evaluación de los alimentos funcionales.....	61
1.3.1. Marcadores del síndrome metabólico.....	62
1.3.1.1. Hígado.....	62
1.3.1.1.1. Histología.....	67
1.3.1.1.2. Marcadores de estrés oxidativo.....	68
1.3.1.1.3. Marcadores de inflamación.....	69
1.3.1.2. Tejido adiposo.....	70
1.3.1.2.1. Densidad mitocondrial.....	72
1.3.1.3. El plasma sanguíneo.....	72
1.3.1.3.1. Marcadores de metabolismo hidrocarbonado.....	72
1.3.1.3.2. Marcadores de metabolismo lipoprotéico.....	73
1.3.1.3.3. Enzimas de daño hepático.....	73
1.3.1.3.4. Otros marcadores de daño.....	74

	<u>Página</u>
1.4. Modelos animales de síndrome metabólico.....	75
1.4.1. La rata fa/fa. Peculiaridades fisiometabólicas .....	76
<b>2. Interés del estudio .....</b>	<b>81</b>
<b>3. Hipótesis y objetivos .....</b>	<b>87</b>
<b>4. Material y métodos .....</b>	<b>91</b>
4.1. Preparación de las dietas experimentales. Surimi de calamar .....	93
4.2. Diseño experimental .....	96
4.3. Métodos analíticos .....	96
4.3.1. Ingesta dietética, crecimiento e índice de eficacia alimentaria.....	96
4.3.2. Obtención de muestras .....	97
4.3.3. Determinación de parámetros en hígado .....	97
4.3.3.1. Estudio histológico.....	97
4.3.3.2. Concentración de proteínas en tejido .....	98
4.3.3.3. Perfil antioxidante .....	99
4.3.3.3.1. Actividades enzimáticas.....	99
4.3.3.3.2. Sistema del glutathion.....	102
4.3.3.3.3. Expresión génica de enzimas antioxidantes y no antioxidantes. Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-qPCR .....	104
4.3.3.3.4. Cuantificación de enzimas antioxidantes y marcadores de inflamación hepáticos. Western-Blot.....	105
4.3.4. Determinación de marcadores en plasma.....	108
4.3.4.1. Glucosa.....	108
4.3.4.2. Insulina .....	108
4.3.4.3. Índices de evaluación de sensibilidad a la insulina .....	109
4.3.4.4. Determinación de lípidos plasmáticos .....	110
4.3.4.4.1. Colesterol .....	110
4.3.4.4.2. Triglicéridos.....	111
4.3.4.4.3. Fosfolípidos.....	112
4.3.4.4.4. Lipoproteínas .....	112
4.3.4.4.5. Arilesterasa .....	113
4.3.4.4.6. Marcadores de daño hepático.....	144
4.3.5. Determinación de marcadores de tejido adiposo .....	114
4.4. Análisis estadístico.....	114
<b>5. Exposición de Resultados/Publicaciones.....</b>	<b>117</b>
5.1. Publicación nº 1 .....	119
5.2. Publicación nº 2 .....	131

	<u>Página</u>
5.3. Publicación nº 3 .....	159
5.4. Publicación nº 4 .....	169
5.5. Publicación nº 5 .....	183
<b>6. Discusión.....</b>	<b>201</b>
6.1. Objetivo 1. Cuantificar los efectos sobre la ingesta, ganancia de peso y tasas de crecimiento entre las cinco y las trece semanas de vida.....	203
6.2. Objetivo 2. Analizar su impacto sobre el tamaño y la estructura de los órganos internos de dicho animales, con especial mención del hígado y corazón .....	206
6.3. Objetivo 3. Determinar su influencia sobre la lipemia y la cantidad y composición de las lipoproteínas plasmáticas .....	212
6.4. Objetivo 4. Estudiar los efectos sobre la expresión génica, actividad y niveles de enzimas y otros biomarcadores de la actividad antioxidante .....	216
6.5. Objetivo 5. Evaluar su influencia sobre los marcadores de daño e inflamación celular y tisular .....	221
6.6. Objetivo 6. Conocer su impacto sobre la glucemia, insulinemia y marcadores de resistencia a la insulina y/o Diabetes Mellitus tipo 2 .....	223
6.7. Objetivo 7. Determinar la incidencia sobre el metabolismo graso en el tejido adiposo, midiendo la densidad mitocondrial .....	228
6.8. Discusión integradora .....	230
6.8.1. Integrated discussion .....	239
<b>7. Resumen y Conclusiones .....</b>	<b>247</b>
7.1. Summary and Conclussions .....	254
<b>8. Bibliografía .....</b>	<b>259</b>
<b>9. Anexo.....</b>	<b>277</b>



## LISTADO DE ABREVIATURAS

<b>ACAT</b>	Acil-CoA-colesterol-aciltransferasa
<b>ACC1</b>	Acetil-CoA carboxilasa 1
<b>ACC2</b>	Acetil-CoA carboxilasa 2
<b>ADA</b>	Asociación Americana de Diabetes
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ALP</b>	Fosfatasa alcalina
<b>ALT</b>	Alanina aminotransferasa
<b>AMPK</b>	Proteínquinasa activada por adenosín monofosfato
<b>Apo</b>	Apolipoproteína
<b>AST</b>	Aspartato aminotransferasa
<b>CAT</b>	Catalasa
<b>CETP o LPT-1</b>	Proteína transferidora de ésteres de colesterol
<b>CuZn-SOD</b>	Superóxido dismutasa dependiente de cobre y cinc
<b>CYP7A1</b>	Colesterol-7- $\alpha$ -hidroxilasa
<b>DMT2</b>	Diabetes mellitus tipo 2
<b>DPP-4</b>	Dipeptidil peptidasa-4
<b>EGIR</b>	Grupo Europeo para el Estudio de la Resistencia a la Insulina
<b>eNOS</b>	Óxido nítrico sintasa inducible
<b>FOSHU</b>	Alimentos para uso específico en la salud
<b>GLP-1</b>	Péptido similar al glucagón tipo 1
<b>GPx</b>	Glutation peroxidasa
<b>GR</b>	Glutation reductasa
<b>GSH</b>	Glutation reducido
<b>GSSG</b>	Glutation oxidado
<b>HDL</b>	Lipoproteínas de alta densidad
<b>HOMA-B</b>	Modelo de evaluación de la homeostasis para la función de las células beta
<b>HOMA-D</b>	Modelo de evaluación de la homeostasis para disponibilidad de insulina
<b>HOMA-IR</b>	Modelo de evaluación de la homeostasis para la resistencia a la insulina
<b>HOMA-S</b>	Modelo de evaluación de la homeostasis para la sensibilidad a la insulina
<b>IDF</b>	Federación Internacional de la Diabetes
<b>IDL</b>	Lipoproteínas densidad intermedia
<b>IGFBP-1</b>	Proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina-1
<b>I<math>\kappa</math>B</b>	Inhibidor del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleuquina 1 beta
<b>IL-6</b>	Interleuquina 6
<b>ILSI</b>	Instituto internacional de las Ciencias de la Vida
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintasa endotelial
<b>IOTF</b>	Equipo de trabajo internacional sobre la obesidad
<b>JNK</b>	Quinasa c-Jun N-terminal
<b>LCAT</b>	Lecitina-colesterol-aciltransferasa
<b>LDL</b>	Lipoproteínas de baja densidad

<b>LH</b>	Lipasa hepática
<b>Lp (a)</b>	Lipoproteína (a)
<b>LPL</b>	Lipoproteína lipasa
<b>LPT</b>	Proteínas transferidoras de lípidos
<b>MCP1</b>	Proteína quimioatrayente de monocitos 1
<b>MDA</b>	Malondialdehído
<b>Mn-SOD</b>	Superóxido dismutasa dependiente de manganeso
<b>MODY</b>	Diabetes juvenil
<b>NADPH</b>	Nicotinamina adenina dinucleótido fosfato
<b>NAFLD</b>	Hígado graso no alcohólico
<b>NCEP ATP-III</b>	Panel II para el tratamiento en adultos del Programa Nacional de Educación sobre el colesterol
<b>NF-kB</b>	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
<b>nNOS</b>	Óxido nítrico sintasa neuronal
<b>Non-Se-GPx</b>	Glutathion peroxidasa no dependiente de selenio
<b>NOS</b>	Óxido nítrico sintasa
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PPAR-γ</b>	Receptor activado por proliferadores peroxisomales gamma
<b>QM</b>	Quilomicrones
<b>QUICKI</b>	Índice para la determinación cuantitativa de la sensibilidad a la insulina
<b>RNS</b>	Especies reactivas de nitrógeno
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>SEEDO</b>	Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad
<b>Se-GPx</b>	Glutathion peroxidasa dependiente de selenio
<b>SUR-1</b>	Receptor transmembrana de sulfonilureas 1
<b>TNF-α</b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>VLDL</b>	Lipoproteínas muy baja densidad
<b>ZDF</b>	Rata Zucker diabética y obesa

# 1. INTRODUCCIÓN

---





## 1.1. EL SÍNDROME METABÓLICO

Se conoce como síndrome metabólico al acervo de varias alteraciones metabólicas que incluyen, al menos, la obesidad central y dos de las siguientes patologías: hipertensión, hiperglucemia en ayunas, hipertrigliceridemia y niveles bajos de colesterol transportado por las lipoproteínas de alta densidad, también conocidas como HDL (Alberti y cols., 2006; Zimmet y cols., 2001; Zimmet y cols., 2005).

Fue descrito por primera vez en 1923 como la conjunción de obesidad, hipertensión, hiperglucemia e hiperuricemia (Nilsson y cols., 2007). En 1988, definió lo que él llamó “síndrome X”, hipotetizando sobre el papel de la resistencia a la insulina como eje central en la etiología de la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), la hipertensión arterial y la enfermedad de las arterias coronarias, pero sin citar la obesidad. La interrelación de estas alteraciones, junto con otros aspectos tales como inflamación y alteraciones en la hemostasia y fibrinólisis (Meigs y cols., 2003; Sánchez-Muniz y Sesmero, 2005) conducen a la definición de lo que se conoce como síndrome metabólico. También ha recibido nombres como “el cuarteto mortal” (Kaplan, 1989) o “síndrome de resistencia a la insulina” (Haffner y cols., 1992) aunque en la actualidad es generalmente aceptado el término síndrome metabólico como la definición más adecuada y ampliamente usada.

El National Cholesterol Education Program’s Adult Treatment Panel III (NCEP ATP III) (Ashwell, 2002), la Organización Mundial de la Salud (OMS), el European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR), y la Internacional Diabetes Federation (IDF) (Alberti y cols., 2006) han formulado, desde un punto de vista clínico, los parámetros más extendidos para identificar y diagnosticar el síndrome metabólico (**tabla 1.1**).

Se trata de una afección ampliamente extendida por todo el mundo y con un gran impacto socioeconómico. En Estados Unidos, se estima que un 34% de la población adulta lo padece, cifra que aumenta con la edad de los pacientes (Amihaesei y Chelaru, 2014) y en España, esta prevalencia se situaría alrededor del 4% en adolescentes (Galera-Martinez y cols., 2015), llegando hasta un máximo de 61,7% en mujeres post-menopáusicas (Orgaz Gallego y cols., 2015). Existen estudios que relacionan, además, a los trabajadores que padecen esta enfermedad con un incremento significativo de los costes médicos y farmacológicos; y del absentismo laboral y bajas por enfermedad (Schultz y Edington, 2009) cual no hace sino resaltar la importancia de tratar y prevenir efectivamente el síndrome metabólico.

Tabla 1.1. Puntos de corte para diagnosticar el síndrome metabólico según las diferentes definiciones.				
Factor de riesgo	OMS 1999	EGIR 1999	NCEP ATP-III 2001	IDF 2005
	Intolerancia a la glucosa, diabetes, resistencia a la insulina y al menos dos de los siguientes:	Resistencia a la insulina (insulinemia >P <sub>75</sub> de la población sana) y al menos dos de los siguientes:	Tres o más de los siguientes factores:	Obesidad central y al menos dos de los siguientes:
Glucemia en ayunas		≥ 110 mg/dL sin diabetes mellitus	≥ 100 mg/dL	≥ 100 mg/dL
Presión arterial	≥ 140 / 90 mmHg	≥ 140 / 90 mmHg o tratamiento	≥ 130 / 85 mmHg	≥ 130 / ≥ 85 mmHg
Trigliceridemia	≥ 150 mg/dL y/o...	≥ 178 mg/dL o tratamiento y/o...	≥ 150 mg/dL	≥ 150 mg/dL o tratamiento
Niveles de HDL-col	< 35 mg/dL ♂ < 39 mg/dL ♀	< 39 mg/dL o tratamiento	< 40 mg/dL ♂ < 50 mg/dL ♀	< 40 mg/dL ♂ < 50 mg/dL ♀ o tratamiento
Obesidad	ICC > 0.9 ♂ ICC > 0.85 ♀ y/o IMC > 30 kg/m <sup>2</sup>	Perímetro abdominal > 94 ♂ ó > 80 ♀	Perímetro abdominal > 102 ♂ ó > 88 ♀	Según etnia
Microalbuminuria	≥ 20 µg/min o albumina/creatinina ≥ 30 mg/g			

Adaptado de Alberti, Zimmet y Shaw (2006)

Fisiológicamente, el síndrome metabólico se caracteriza por la presencia conjunta de varias alteraciones metabólicas, que abordaremos brevemente en los siguientes apartados.

### 1.1.1. La obesidad

La obesidad es una enfermedad metabólica crónica con gran trascendencia económica y socio-sanitaria, que constituye un grave problema de salud pública por su creciente prevalencia (Ogden y cols., 2013; Serrano-Ríos M, 2011). Tanto es así, que ha sido definida como la pandemia del siglo XXI por la International Obesity Task Force (IOTF) y la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Se trata de la acumulación excesiva del tejido adiposo de reserva y, por tanto, un aumento del peso corporal, por encima del correspondiente hasta el punto que puede perjudicar la salud o poner en peligro la vida. Hennekens y Andreotti (2013)

sostienen que las personas con índices de masa corporal<sup>1</sup> entre 22-25 kg/m<sup>2</sup> presentan la menor tasa de mortalidad, incrementando la mortalidad un 30% por cada 5 kg/m<sup>2</sup> que aumenta el citado índice. También es importante la distribución de dicho exceso de tejido adiposo. Se distinguen dos patrones de obesidad, la denominada abdominal, androide o central, donde el exceso de grasa es principalmente almacenado en el abdomen, y la de tipo ginoide o periférica. Según un meta-análisis realizado por Carmienke y cols. (2013), la obesidad abdominal está directamente relacionada con la mortalidad y con otros estados patológicos.

La obesidad se caracteriza por disminuir la calidad y la esperanza de vida de quien la padece, siendo un factor de riesgo para: DMT2, intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina, dislipidemias, hipertensión arterial, hiperuricemia, accidentes cerebrovasculares, gasto cardíaco aumentado, reflujo gastroesofágico, cálculos vesiculares, hígado graso, apnea del sueño, roncopatías, dificultad respiratoria, psoriasis, alteraciones menstruales, varices, artritis y artrosis de grandes articulaciones, compresión de la columna y algunos tipos de cáncer (Finelli y cols., 2014;Friedman, 2003). Además, se calcula que entre el 2 y el 8% del total del gasto sanitario en nuestro país es atribuible a esta patología (Villagrán Pérez y cols., 2010).

Esta enfermedad se define por la superación de unos puntos de corte determinados: un índice de masa corporal superior a 30 kg/m<sup>2</sup> (**Tabla 1.2**) o un perímetro abdominal<sup>2</sup> mayor de 94 o 80 cm para varones o mujeres europeos, respectivamente -o  $\geq 102$  y  $\geq 88$  cm según la NCEP ATP-III, ver **tabla 1.1**- (Oliveros y cols., 2014). Al medir la cantidad o porcentaje de grasa corporal, ya sea por pesada bajo el agua, pliegues cutáneos, tomografía computarizada, la resonancia magnética o bioimpedancia, se define la obesidad a partir del 20% de grasa corporal para los varones y el 30% para las mujeres (Rodríguez-Rodríguez y cols., 2011).

Aunque en obesidad siempre se da un desajuste crónico del balance entre la energía consumida en la dieta y el gasto energético, no se conocen con exactitud los mecanismos implicados en el desarrollo de la obesidad, viéndose implicados factores genéticos, ambientales, neurológicos, psicológicos, sociológicos, microbiológicos y endocrinos (Villagrán Pérez y cols., 2010; Cascales-Angosto, 2015). Entre dichos factores se encuentran:

---

<sup>1</sup> El índice de masa corporal es un método común para estimar la proporción de grasa corporal desarrollado por el estadístico y antropometrista belga Adolphe Quetelet en 1842. Éste es calculado dividiendo el peso del sujeto (en kilogramos) por el cuadrado de su altura (en metros), por lo tanto es expresado en kg/m<sup>2</sup>. La OMS establece unos puntos de corte, acordados en 1997, publicados en 2000 y ajustados en el 2010.

<sup>2</sup>El perímetro abdominal debe medirse en un plano horizontal a una altura media entre el límite de las costillas y el comienzo de la cresta iliaca. Otro parámetro válido para el diagnóstico de la obesidad sería el índice cintura/cadera (>0,9 para hombres y >0,85 para mujeres) .

- Alimentación incorrecta: exceso de energía, grasas saturadas y azúcares refinados.
- Escasa actividad física.
- Entre los factores genéticos caben destacar mutaciones en el receptor 4 de la melanocortina, en la leptina o en su receptor. En el caso de la leptina, la deleción de un nucleótido en el codón 133 provoca una gran disminución de su secreción, mientras que una mutación en el exón 16 hace que se altere su receptor<sup>3</sup>. En la actualidad, se estudian cientos de genes que también podrían estar implicados de alguna forma con la obesidad (Villagrán-Pérez y cols., 2010; Shahid y cols., 2015).
- Factores endocrinos: hipotiroidismo, síndrome de Cushing, hipogonadismo, lesiones hipotalámicas, déficit de la hormona del crecimiento, etc. (Chen y cols., 2013; Yassin y cols., 2014). Es importante citar, entre los muchos factores endocrinos, el papel de la leptina, que actúa inhibiendo el neuropéptido Y (NY), y activando la secreción de corticotropina, reduciendo, por tanto, el consumo de energía<sup>4</sup>. En la obesidad, sin embargo, se han visto niveles elevados de leptina, lo que sugiere que se desarrolla resistencia a esta proteína. También se ha comprobado correlación de la leptinemia con la resistencia a la insulina, lo que sugiere que en situaciones de hiperinsulinemia puede estimularse el apetito (Suzuki y cols., 2012).
- Factores psicológicos, como lo serían el consumo compulsivo de comida o la adicción a los alimentos (De Franca y cols., 2014). Los factores neurológicos y psicológicos son tremendamente variados. En la regulación de la ingesta participa el hipotálamo, respondiendo a hormonas, neurotransmisores y neuropéptidos, y éste también recibe información de la corteza cerebral, que responde a factores psicológicos, socioculturales y a las propias características del alimento.
- Factores socio-culturales: el estilo de vida actual promueve dietas poco recomendables.
- Contaminantes ambientales: son los llamados disruptores endocrinos. Por su similitud estructural con determinadas hormonas interactúan en rutas metabólicas promoviendo la obesidad, incluso a dosis ínfimas.
- Factores microbiológicos: la microbiota fermenta hidratos de carbono no digeribles; sintetiza algunas vitaminas, es esencial en la recirculación de los

---

<sup>3</sup> El gen codificante para la leptina se suele encontrar en la bibliografía como (*ob*), mientras que el receptor de la misma, como (*OBR* o *LEPR*)

<sup>4</sup> El NY es un potente estimulador de la ingesta, mientras que la corticotropina activa el centro de la saciedad

ácidos biliares y aumenta la capacidad de metabolizar el sustrato alimenticio, lo que puede resultar en aumento de peso. Así, la proporción entre firmicutes y bacteroidetes se decanta hacia los primeros en el caso de la obesidad, por lo que en la actualidad la investigación en obesidad se centra hacia el estudio de la microbiota intestinal a fin de conseguir una mezcla de microorganismos menos obesogénica. (Cascales-Angosto, 1999; Corella y Ordovás, 2015; Flier y Mekalanos, 2009).

- Otros factores: edad, sexo, condición fisiológica, estrés, tabaquismo, drogas, exposición solar, etc. (Egger y Dixon, 2014).

Tabla 1.2. Puntos de corte para diagnosticar la obesidad por IMC según diferentes definiciones.		
	OMS	SEEDO
Peso insuficiente		< 18.5 kg/m <sup>2</sup>
Normopeso	18.5 - 24.9 kg/m <sup>2</sup>	18.5 – 24.9 kg/m <sup>2</sup>
Sobrepeso grado I	25 -29.9 kg/m <sup>2</sup>	25 – 26.9 kg/m <sup>2</sup>
Sobrepeso grado II (preobesidad)		27 – 29.9 kg/m <sup>2</sup>
Obesidad grado I	30 – 34.9 kg/m <sup>2</sup>	30 – 34.9 kg/m <sup>2</sup>
Obesidad grado II	35 – 39.9 kg/m <sup>2</sup>	35 – 39.9 kg/m <sup>2</sup>
Obesidad grado III (mórbida)	> 40 kg/m <sup>2</sup>	40 – 49.9 kg/m <sup>2</sup>
Obesidad grado IV (extrema)		> 50 kg/m <sup>2</sup>

Adaptado de “the Expert Panel on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults” (OMS, 1999) y las directrices del consenso de la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO, 2000)

La obesidad también se considera un estado de inflamación crónica leve, caracterizado por una elevada producción de citoquinas y adipoquinas proinflamatorias, que contribuyen a las alteraciones metabólicas que pueden sufrir estos individuos de forma permanente. Las concentraciones de mediadores inmunológicos, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), la interleuquina (IL) 6, la IL-1 $\beta$ , la proteína quimio-atrayente MCP1 y la leptina, suelen estar elevadas en sangre periférica de sujetos obesos, mientras que las de adiponectina, que parece tener efectos antiinflamatorios en la obesidad y mejorar la sensibilidad a la insulina, están reducidas (Cascales-Angosto, 2015).

El tratamiento de la obesidad ha de ser personalizado para cada paciente, comenzando siempre por el tratamiento de la causa desencadenante, si existe, la dieta de restricción calórica y el ejercicio, llegando si es necesario al tratamiento conductual, farmacológico y cirugía bariátrica, tal y como indican Wirth y cols. (2014); Sánchez-Muniz y Sanz-Pérez (2015).

La prevención de esta patología es muy difícil, ya que se basa en la divulgación de hábitos saludables y en el cambio de patrones de dieta y ejercicio muy arraigados

en la sociedad, así como en las intervenciones psicológicas en centros de trabajo o enseñanza.

### 1.1.2. La Diabetes Mellitus tipo 2

La diabetes es una patología caracterizada por una reducción de los efectos de la insulina, resultando en una hiperglucemia prolongada. Los síntomas clásicos son sed excesiva (polidipsia), micción frecuente (poliuria) y hambre constante (polifagia). Dependiendo de sus características fisiopatológicas, existen varios tipos de diabetes claramente diferenciados:

- Diabetes mellitus tipo 1: también conocido como síndrome de dependencia de insulina. Las células  $\beta$  del páncreas son destruidas por una reacción autoinmune<sup>5</sup> y, por lo tanto, el paciente es incapaz de producir insulina. Suele manifestarse en la infancia o la adolescencia, debido a factores genéticos y/o ambientales. (Michels y cols., 2015)
- Diabetes mellitus tipo 2: se produce por una deficiencia de la producción de insulina, una resistencia de los tejidos a la misma o una combinación de ambas situaciones (Maleckas y cols., 2015). Más del 90% de los diabéticos padecen este tipo de diabetes, y es la que está más relacionada con el síndrome metabólico. Su aparición depende de factores genéticos<sup>6</sup>, ambientales, socioeconómicos y de estilo de vida. Incluso la disponibilidad de nutrientes del feto durante el embarazo afectaría al riesgo de padecer este tipo de diabetes (Sanchez-Muniz y cols., 2013).
- Diabetes gestacional: aparece o se detecta durante el embarazo, poniendo en riesgo la salud de la madre y del feto. Se caracteriza por una intolerancia a la glucosa que vuelve a la normalidad tras el parto, si bien aumenta el riesgo de la

---

<sup>5</sup> Existe la diabetes mellitus tipo 1 no autoinmune o idiopática, observada muy raramente en algunas poblaciones africanas y asiáticas.

<sup>6</sup> Se trata de un factor hereditario, ya que individuos con familiares de primer grado diabéticos tienen de dos a cuatro veces más probabilidades de desarrollar esta enfermedad. Ordovás cita como candidatos a los genes causantes de la diabetes tipo 2, entre otros, a los del sustrato del receptor de la insulina (*irs1* e *irs2*), los del receptor  $\beta$ -adrenérgico (*adrb2* y *adrb3*), los de las proteínas desacoplantes (*ucp2* y *ucp3*) y los del receptor activado por proliferación de peroxisomas  $\gamma$  (*ppar- $\gamma$* ).

mujer de padecer posteriormente DMT2 (Sanchez-Muniz y cols., 2013; Cosson, 2010).

- Otras diabetes: Pueden derivar de patologías como pancreatitis, fibrosis quística, síndrome de Cushing, inducidas por fármacos como los glucocorticoides o neurolépticos, o debidas a infecciones o a trastornos genéticos. Por ejemplo, la diabetes tipo MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young) aparece antes de los 25 años, siendo un defecto en la producción de insulina sin resistencia a la misma, debido a un defecto hereditario en el factor nuclear hepático 1- $\alpha$  o en la glucokinasa hepática, disminuyendo así la función de las células  $\beta$  (Kerner y Bruckel, 2014).

Los criterios diagnósticos propuestos por la Asociación Americana de Diabetes (ADA) en 1997 y que han sido aceptados por el comité asesor de la OMS y el Consenso Europeo (European Diabetes Policy Group, 1999) son los siguientes:

- Glucemia basal en plasma venoso  $\geq 126$  mg/dL ( $\geq 7$  mmol/L). Debe realizarse dos determinaciones en días diferentes para confirmar el diagnóstico.
- Síntomas típicos de diabetes y glucemia al azar  $\geq 200$  mg/dL ( $\geq 11,1$  mmol/L). No es necesaria una segunda determinación.
- Glucemia a las 2 h de la sobredosificación oral con 75 g de glucosa  $\geq 200$  mg/dL ( $\geq 11,1$  mmol/L).

Se consideraría un estado de prediabetes si la glucosa basal se situará entre 100 y 126 mg/dL o entre 140 y 200 mg/dL tras el test de glucemia con 75 g de glucosa. En este estado existiría una alteración de la glucemia en ayunas, intolerancia a la glucosa o una combinación de ambas (Portero Mclellan y cols., 2014). En esta situación, que frecuentemente pasa desapercibida, comienzan a producirse daños vasculares que aceleran el desarrollo de la enfermedad, y que aumentan su morbilidad. Los daños en los vasos sanguíneos pueden producir patologías cardiacas (angina de pecho, infartos, etc.) o enfermedades vasculares periféricas que llevarían incluso a demandar, en caso de gangrena o bloqueo periférico con necrosis, la amputación de extremidades. Los daños microvesiculares, por su parte, pueden generar retinopatías, llegando a la ceguera, fallos renales y pérdidas de sensibilidad en las extremidades (Bate y Jerums, 2003).

### 1.1.2.1. Resistencia a la insulina

La insulina es una hormona que se forma en las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans del páncreas y cuya secreción viene dada por los niveles plasmáticos de glucosa, aunque también pueden intervenir otras sustancias como los ácidos grasos o diferentes aminoácidos como la arginina (Carpentier y cols., 2001). Una vez liberada, actúa sobre los tejidos sensibles a la insulina, produciendo diferentes acciones (**figura 1.1.**):

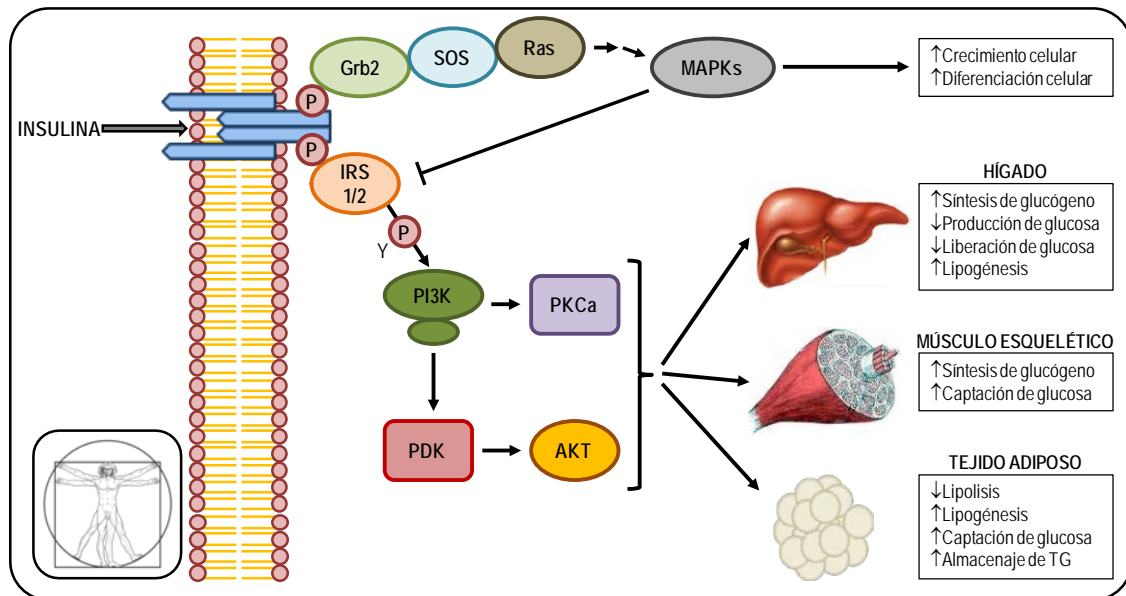
- A nivel de músculo esquelético y adipocitos, los receptores de glucosa GLUT-4 migran a la membrana celular favoreciendo así la entrada de glucosa a estos tejidos para su metabolismo. El exceso de glucosa se transforma en glucógeno en el tejido muscular, mientras que en los adipocitos pasaría a transformarse en glicerofosfato y almacenarse en forma de triglicéridos.
- En el hígado, la insulina estimula la síntesis de glucógeno y limita la gluconeogénesis y la glucogenolisis, evitando liberación de glucosa al plasma.
- En los adipocitos y a nivel hepático, estimula la lipogénesis, inhibe la oxidación de ácidos grasos y aumenta la salida a plasma de ácidos grasos libres.

La bajada de glucemia provocada por la insulina hace que la secreción de esta hormona se reduzca o cese, formando un bucle de retroalimentación que mantiene la homeostasis glucídica.

Cuando la respuesta a la insulina por los tejidos no es la adecuada, las células pancreáticas producen una mayor cantidad de esta hormona para tratar de reducir la glucemia. Con el tiempo, la hiperinsulinemia generada no es suficiente para controlar el exceso de glucosa plasmática, produciéndose glucotoxicidad en los tejidos. Si la enfermedad sigue progresando, las células  $\beta$  terminan por degenerar y se reduce enormemente la producción de insulina, lo que lleva a una menor captación de glucosa a nivel tisular y a una mayor producción y liberación de dicho sustrato a nivel hepático, llegando a un círculo vicioso que va agravando la situación hasta desembocar en la DMT2.

Como hemos comentado, en este punto la lipogénesis estaría incrementada, y los ácidos grasos no se oxidarían de manera apropiada, lo que generaría acumulación de grasa ectópica. En el hígado, puede producir esteatosis, hígado graso, fibrosis o esteatohepatitis no alcohólica, llevando al fallo hepático. En cuanto a la producción de lipoproteínas y triglicéridos, se ha observado que se estimula la producción de VLDL,

que bajan los niveles de colesterol unido a HDL y aumenta la trigliceridemia, lo que puede desembocar en lipotoxicidad.



**Figura 1.1.** Efectos de la insulina sobre los diferentes tejidos en el ser humano. AKT, proteína quinasa B; Grb2, Proteína unida al factor de crecimiento 2; IRS, Sustrato del receptor de insulina; MAPKs, proteínas quinasas activadas por mitógenos; PDK, proteína quinasa dependiente del 3-fosfoinositol; PI3K, fosfatidil inositol-3-quinasa; PKCa, proteína quinasa C atípica. Adaptado de Cordero-Herrera, 2015.

Para determinar la resistencia tisular a la glucosa, existen varios métodos diagnósticos (Borai y cols., 2011):

- El test del *clamp* euglucémico-hiperinsulinémico. Se considera el método más apropiado para evaluar *in vivo* la resistencia a la insulina. Sin embargo, se requiere una infusión intravenosa de insulina y glucosa, así como frecuentes determinaciones séricas durante 3 horas, por lo que se considera poco práctico y muy invasivo.
- Modelos de evaluación de la homeostasis de la glucosa o como el *homeostasis model assessment* (HOMA; (Matthews y cols., 1985) o el *Quantitative insulin sensitivity check index* (QUICKI; (Katz y cols., 2000), de menor sensibilidad pero más rápidos y poco invasivos. Son los más utilizados. En ellos se utilizan los datos de glucemia e insulinemia en ayunas para detectar la resistencia a la insulina (HOMA-IR), la sensibilidad de los tejidos (HOMA-IS y QUICKI), la

funcionalidad de las células  $\beta$  pancreáticas (HOMA-%B) y la disponibilidad de la insulina (HOMA-D)<sup>7</sup>.

- Marcadores bioquímicos como la proteína-1 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP-1, insulin-like growth factor binding protein-1) también proporcionan información sobre el estado de la resistencia a la insulina.

El control de la DMT2 se centra en intervenciones del estilo de vida, la reducción de otros factores de riesgo cardiovascular y el mantenimiento de la glucemia en el intervalo normal (Hivert y cols., 2014).

Una dieta adecuada y el ejercicio son los fundamentos de la atención y prevención de la DMT2. Una dieta de bajo índice glucémico promueve la pérdida de peso y ha demostrado mejorar el control de la glucemia. Aunque el ejercicio aeróbico conduce a una disminución de la glucemia y mejora la sensibilidad a la insulina, la combinación con entrenamiento de fuerza ha resultado ser más eficaz. Si los cambios en el estilo de vida en la DMT2 leve no resultaran en una mejor glucemia pasadas seis semanas, debe considerarse el uso de medicamentos.

Los tratamientos antidiabéticos orales se pueden clasificar en:

a) Secretagogos:

- Sulfonilureas (glibencamida, glicazida, glimepirida, etc.). Mejoran la sensibilidad de las células  $\beta$  a la glucosa y se unen al receptor transmembrana de sulfonilureas (SUR-1), despolarizando su membrana y promoviendo la liberación de gránulos preformados de insulina. Sumados estos dos efectos, se incrementa la respuesta celular a la glucosa y a otros secretagogos (p. ej. ácidos grasos o aminoácidos), de manera que aumenta la insulinemia. Constituyen un tratamiento válido para pacientes con la función de las células  $\beta$  no totalmente deprimida.

b) Sensibilizantes a la insulina:

- Biguanidas (metformina). Son el tratamiento más habitual en DMT2, tanto de forma aislada como en combinación con otros antidiabéticos orales o insulina. Reducen la producción hepática de glucosa inhibiendo la gluconeogénesis y la glucogenólisis, así como mejorando la sensibilidad periférica a la insulina (en el

---

<sup>7</sup> HOMA-IR = insulina en ayunas (mUI/L) x glucosa en ayunas (mmol/L) / 22.5

HOMA-IS = 1 / HOMA R

HOMA-%B = insulina en ayunas (mUI/L) x 20 / (glucosa en ayunas (mmol/L) - 3.5)

HOMA-D = HOMA S x HOMA B

QUICKI = 1 / [log (insulina en ayunas (mUI/L)) + log (glucosa en ayunas (mg/dL))]

músculo esquelético y adipocitos se ha observado un aumento de los receptores GLUT-1 y GLUT-4, transportadores transmembrana de glucosa), lo que reduce la glucemia. La metformina activa la proteínquinasa activada por adenosín monofosfato (AMPK), que, como se verá, actúa como sensor energético celular que regula el metabolismo lipídico y glucídico. El AMPK actúa promoviendo la oxidación de ácidos grasos y la lipólisis, el metabolismo glucídico y reduciendo la trigliceridemia.

- Tiazolidinedionas (TZD, pioglitazona, rosiglitazona). Se unen al receptor activado por proliferadores peroxisomales gamma (PPAR- $\gamma$ ), situado principalmente en el tejido adiposo, activando genes relacionados con el metabolismo lipídico y glucídico, y reduciendo la expresión del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Actualmente están en desuso.

c) Inhibidores de la glicosidasas (acarbose). Las glicosidasas son enzimas presentes en las células de las vellosidades intestinales. Estos fármacos previenen la escisión de polisacáridos a ese nivel, con lo que se reduce la absorción intestinal de hidratos de carbono. Al reducir de esa forma la glucemia postprandial, promueven que no sea necesaria una gran producción de insulina.

d) Nuevas terapias (incretinas). Basadas en la actividad antidiabética del péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1), que no puede ser administrado debido a su rápida degradación por la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4)

- Miméticos del péptido similar al glucagón tipo 1 (liraglutida, exenatida), resistentes a la DPP-4, reducen significativamente la hemoglobina glicosilada, estimulando la liberación de insulina dependiente de glucosa. Además, inducen una moderada pérdida de peso.
- Inhibidores de la dipeptidil peptidasa-4 (sitagliptina, vildagliptina, saxagliptina, linagliptina). Estimulan la liberación de insulina dependiente de glucosa. Tienen efecto beneficioso sobre las células hepáticas existiendo estudios que indican su capacidad potencial para reducir o incluso revertir el fallo de las células  $\beta$ .

En el caso de que ninguna de estas medidas fuera capaz de normalizar la glucemia, habría que iniciar un tratamiento con insulina exógena.

### 1.1.3. Las Dislipemias

Los lípidos son transportados en el plasma sanguíneo bien unidos a la albúmina sérica o bien incorporados a unas partículas esféricas denominadas lipoproteínas. Esta segunda forma resulta mucho más práctica, ya que permite el transporte de cantidades mucho mayores de lípidos y su aporte selectivo a los tejidos, mediante la interacción con las proteínas de la superficie de las lipoproteínas y los receptores específicos de los tejidos (Sánchez-Pozo y cols., 2010)

En el interior de las lipoproteínas se sitúan los lípidos no polares (triglicéridos, colesterol esterificado, etc.), recubiertos por una cubierta muy similar a las membranas celulares, en la que se encuentran las proteínas y los fosfolípidos, con la parte polar situada hacia el exterior. Estas proteínas pueden tener función señalizadora e interactuar con receptores u otras enzimas, llamándose apolipoproteínas (o apos); o presentar alguna función enzimática o intercambiadora de lípidos.

Tabla 1.3. Principales lipoproteínas y su función.		
Lipoproteína	Proteínas	Función
QM	B-48	Transporte de TG a los tejidos
VLDL	B-100, E, C-II	Transporte de TG a los tejidos
IDL	B-100, E	Transporte de TG al hígado
LDL	B-100	Transporte de colesterol a los tejidos
Lp (a)	B-100, (a)	Transporte de colesterol
HDL <sub>2</sub>	A-I, LCAT, LPT	Transferencia de colesterol
HDL <sub>3</sub>	A-I, LCAT, LPT	Esterificación de colesterol
HDL-colesterol	A-I	Transporte de colesterol a los tejidos

HDL, lipoproteínas de alta densidad; IDL, lipoproteínas de densidad intermedia; LCAT, lecitina-colesterol-aciltransferasa; LDL, lipoproteínas de baja densidad; Lp (a), lipoproteína (a); LPT, proteínas transferidoras de lípidos; QM, quilomicrones; TG, triglicéridos; VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad. Adaptado de (Sánchez-Pozo y cols., 2010).

Dependiendo de las cantidades de proteínas y lípidos que contengan, las lipoproteínas presentan diferente densidad y función (**Tabla 1.3**). De forma general, las lipoproteínas que contienen gran cantidad de proteínas son las de mayor densidad (HDL, high density lipoproteins), y van reduciendo su densidad a medida que su contenido lipídico es mayor (LDL, low density lipoproteins; IDL, intermedium density lipoproteins; y VLDL, very low density lipoproteins). Aunque se suelen representar

como esferas, su forma varía también según su contenido, siendo más esféricas las más ricas en lípidos y colesterol esterificado, y de forma discoidal las que menos contenido lipídico poseen<sup>8</sup>.

Como se indica en la **figura 1.2**, los triglicéridos (TG) procedentes de la dieta, después de su hidrólisis y reestructuración se empaquetan en los quilomicrones (QM), que son transportados a los tejidos para su uso o bien al hígado. En el hígado, los ácidos grasos provenientes de los QM, de la síntesis a partir del exceso de hidratos de carbono o del tejido adiposo blanco forman las VLDL.

Los tejidos, principalmente músculo y tejido adiposo, obtienen los ácidos grasos y el glicerol al disponer de una gran cantidad de la enzima lipoproteín-lipasa (LPL) en sus membranas, que se une con la apo-CII de las VLDL y QM, y comienza a hidrolizar dichos TG, liberando los ácidos grasos al interior del tejido. Una vez que la LPL ha hecho su efecto, las lipoproteínas se deshacen de parte de su cubierta y se hacen más pequeñas, llamándose QM remanentes e IDL.

Las HDL se forman en el hígado y a partir de las cubiertas que se desprenden al formarse los QM remanentes y las IDL. La enzima lecitina-colesterol-aciltransferasa (LCAT) transfiere un ácido graso desde un fosfolípido al colesterol, esterificándolo. El colesterol esterificado se internaliza, haciendo que las pequeñas HDL<sub>3</sub> vayan llenándose de colesterol esterificado y adquiriendo forma la esférica típica de las HDL<sub>2</sub> (**figura 1.3**).

En la actualidad se acepta que todas las células corporales, aunque fundamentalmente las hepáticas e intestinales tienen capacidad para formar HDL nacientes. El mecanismo es dependiente de un transportador, el ATP-binding cassette (ABC), habiéndose propuesto diferentes isoformas (Lee y cols., 2003).

Las HDL, a través de las proteínas transferidoras de lípidos (LPT) como la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP o LPT-1), intercambian los ésteres de colesterol por TG con las IDL, de manera que las IDL pasarían a ser LDL y las HDL cargadas de triglicéridos podrían ser sustrato de la LPL tisular o bien ser captados por la lipasa hepática (LH) para su destrucción.

Las LDL transportan colesterol a los tejidos con receptor específico apo B100/E, quedan circulando o son recogidas por los macrófagos y destruidas. Si existe una gran cantidad de LDL circulantes, aportarían un exceso de colesterol a las células,

---

<sup>8</sup> En este sentido, se suelen observar esferas y discoides en el metabolismo de las HDL, mientras que en el caso de las LDL, sólo se observan formas esféricas.

lo que podría comprometer su funcionalidad al perder flexibilidad las membranas celulares.

Para evitar este exceso, las células esterifican el colesterol por medio de la acil-CoA-colesterol-aciltransferasa (ACAT)<sup>9</sup> o bien impiden su entrada, de modo que la cantidad de LDL circulante aumentaría<sup>10</sup>.

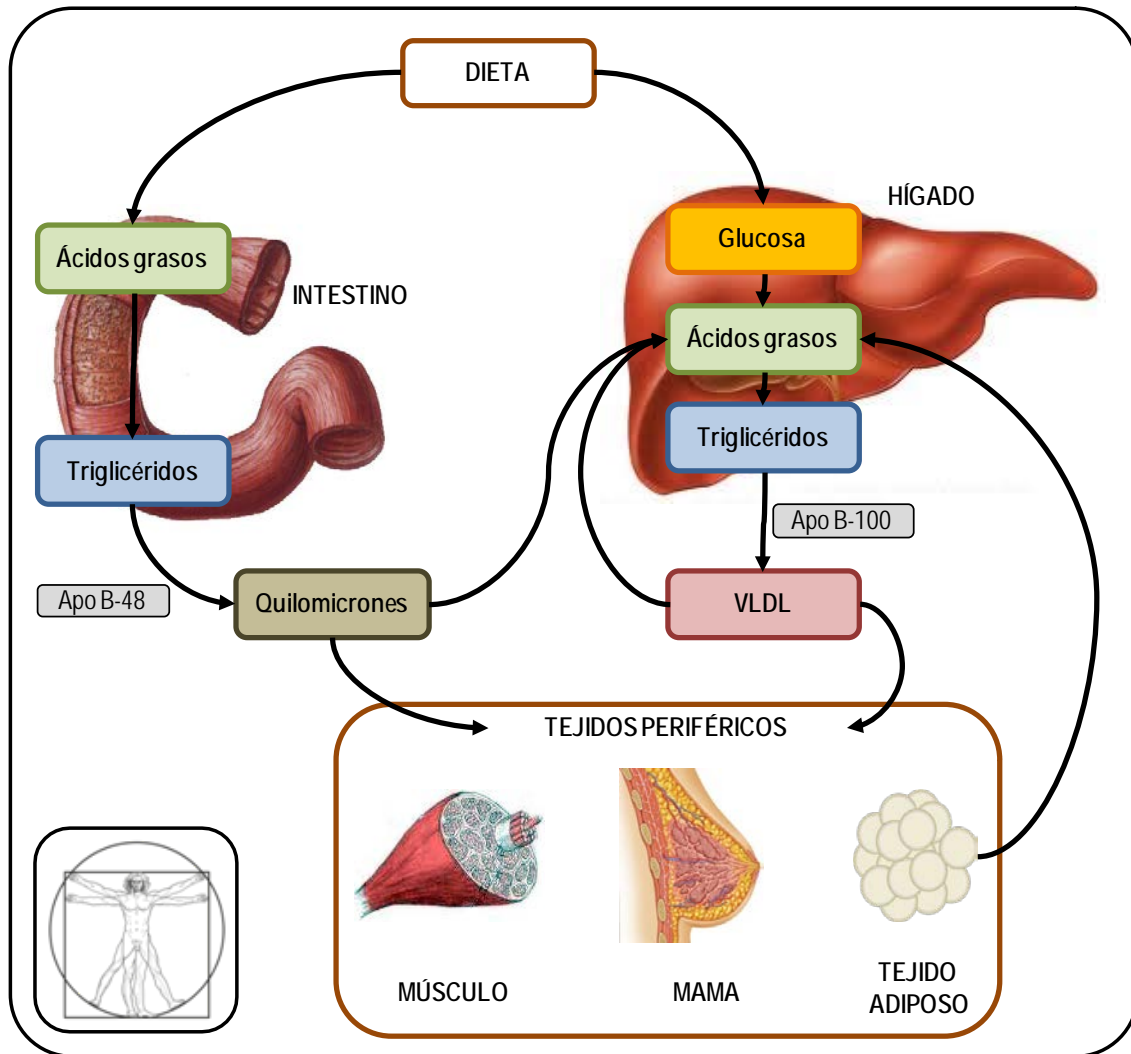


Figura 1.2. Origen y destino de la grasa de la dieta. Adaptado de Sánchez-Pozo y Gil-Hernández, 2010.

Todo este proceso de intercambio lipídico entre las lipoproteínas se encuentra resumido en la **figura 1.3**.

<sup>9</sup> Si se almacena en exceso, éste proceso podría llevar a la vacuolización celular, como ocurre con los macrófagos al formar "células espumosas".

<sup>10</sup> Una de las alternativas para reducir la colesterolemia es la estimulación de la salida de ácidos biliares, reduciendo los niveles hepáticos de colesterol para que aumenten los receptores hepáticos.

Además se ha propuesto que las HDL son aclaradas del plasma al ser reconocidas por receptores “scavenger” tipo I (SR-B1), mecanismo que cerraría el transporte reverso de colesterol y aportaría este esteroles al hígado para ser transformado en ácido cólico por la acción de una isoforma de citocromo P450, la colesterol-7- $\alpha$ -hidroxilasa (CYP7A1).

El organismo regula las concentraciones de lipoproteínas plasmáticas mediante la modificación de su síntesis o su eliminación. Si existe un exceso de grasas, especialmente de colesterol, transportadas en sangre, pueden surgir diferentes patologías a largo plazo. Es muy conocida la relación de un aumento del colesterol plasmático con los riesgos de sufrir un infarto de miocardio o cualquier otra afección cardiovascular.

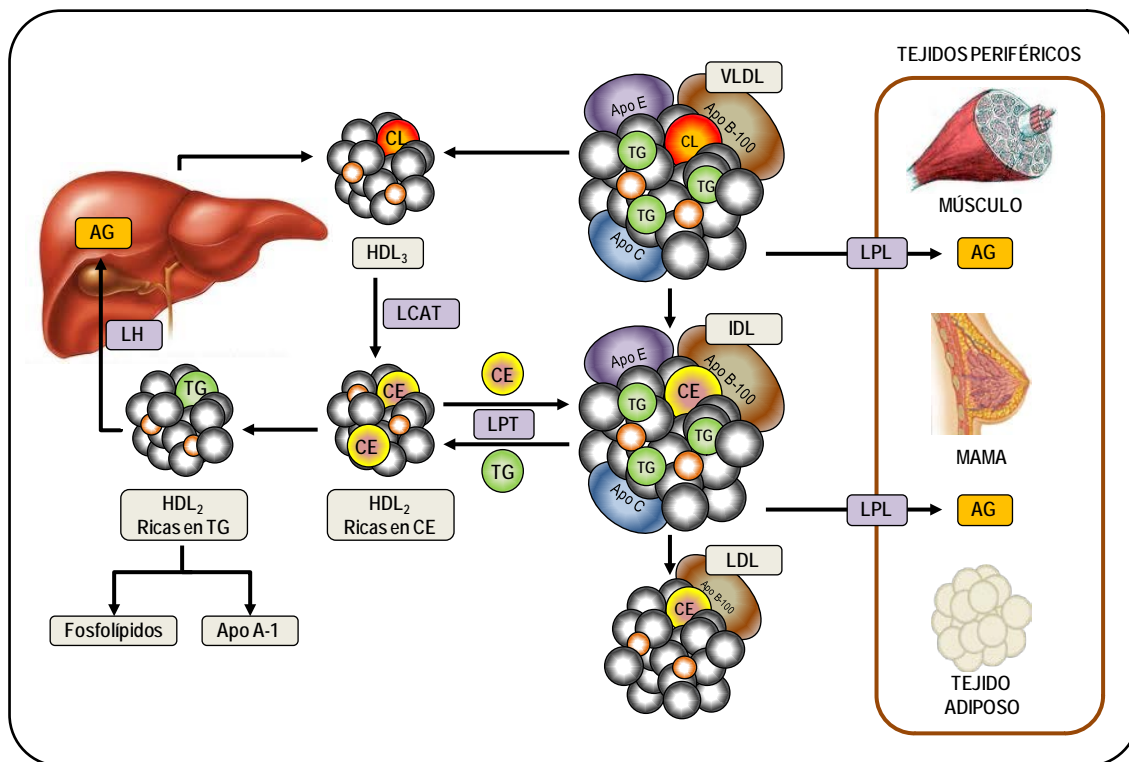
Se conoce como hiperlipidemia a los valores anormalmente elevados de colesterol, triglicéridos o ambos en el plasma sanguíneo. Los valores de LDL suelen aumentar con la edad, y son mayores en los varones y en las mujeres postmenopáusicas (Carmena, 2010). Existen otros factores relacionados con valores anormales de lípidos en sangre, como los antecedentes familiares, la obesidad, dieta alta en grasas, sedentarismo, consumo de alcohol, tabaquismo o hipertiroidismo.

Las hiperlipidemias son generalmente asintomáticas, y sólo en casos extremos (hiperlipemias familiares o monogénicas) se pueden observar depósitos de grasa en tendones y piel denominados xantomas y xantelasmas a nivel de los párpados. Los triglicéridos muy elevados pueden producir hipertrofias de hígado y bazo; e inducir pancreatitis, entre otras lesiones. En la mayoría de los casos, las hiperlipidemias se deben a un desequilibrio en el consumo de los macronutrientes de la dieta (particularmente exceso de hidratos de carbono refinados y/o grasa saturada), aunque no se debe descartar el componente genético y la interacción dieta-genética en su origen y desarrollo (Ordovás, Jm, 2010b; Nus y cols., 2008).

Cuando los valores de LDL-colesterol superan los intervalos de normalidad (**tabla 1.4**), el tratamiento consiste en una dieta baja en grasas saturadas y moderada en grasa monoinsaturada y ácidos grasos poliinsaturados  $\omega$ -3 para reducir LDL, ejercicio moderado, que reduce LDL y aumenta HDL, pérdida de peso, evitar el tabaco o el exceso de alcohol<sup>11</sup>, y si fuera necesario, utilizar fármacos hipolipemiantes.

---

<sup>11</sup> Una pequeña cantidad de alcohol al día puede elevar el colesterol HDL y disminuir el LDL, aunque a partir de dos vasos el efecto sería el contrario.



**Figura 1.3.** Transferencia de lípidos entre lipoproteínas, sin tener en cuenta el de fosfolípidos. AG, ácidos grasos; CE, colesterol esterificado; CL, colesterol libre; HDL, lipoproteínas de alta densidad; LCAT, lecitina colesterol aciltransferasa; LDL, lipoproteínas de baja densidad; LH, lipasa hepática; LPL, lipoproteína lipasa; LPT, proteína transferidora de lípidos; TG, triglicéridos, VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad. Adaptado de Sánchez-Pozo y Gil-Hernández, 2010.

En el caso de hipertrigliceridemia, el tratamiento implica reducir el consumo de alcohol, hidratos de carbono refinados, especialmente fructosa e incrementar el consumo de ácidos grasos poliinsaturados  $\omega$ -3.

Tabla 1.4. Valores normales de lípidos plasmáticos	
Exámenes complementarios	Intervalo de normalidad
Colesterol total	$\leq 200$ mg/dL
QM	Ausencia (tras 12 horas de ayuno)
VLDL	$< 30$ mg/dL
LDL	$< 130$ mg/dL
HDL	40 - 60 mg/dL ♂; 50 - 60 mg/dL ♀
Cociente Colesterol total/HDL-colesterol	$< 4,5$
Cociente LDL colesterol/HDL-colesterol	$< 3,5$
TG	$\leq 150$ mg/dL

Adaptado de García-Quismondo, 2015

En cuanto al tratamiento farmacológico, los fármacos disponibles en la actualidad se resumen en la **tabla 1.5**.

Tabla 1.5. Mecanismos de acción y efectos sobre los lípidos de los principales grupos de fármacos hipolipemiantes				
		Cambios en los lípidos (%)		
Fármacos	Mecanismo de acción	LDL-c	TG	HDL-c
Estatinas	Inhibición HMG-CoA reductasa	↓ 20-60	↓ 15-30	↑ 5-10
Resinas de intercambio iónico	Inhibición de la recaptación de ácidos biliares Estímulo LPL	↓ 15-30	↑ 5-15	-
Fibratos	Aumento de la oxidación de ácidos grasos	↓ 5-30	↓ >30	↑ 15-20
Ácido nicotínico	Aumento de la oxidación de ácidos grasos de tejidos periféricos	↓ 15-30	↓ 15-30	↑ 15-25
Ezetimiba	Inhibición de la absorción intestinal de colesterol	↓ 15-20	↓ 5-10	↑ 4-8
Icosapento/doconexento	Supresión de la lipogénesis hepática e incremento de la oxidación de ácidos grasos tanto a nivel hepático como en el músculo esquelético	↑ 20-30	↓ 30-40	↑ 2

HDL-c, colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad; HMG-CoA, hidroxil-metil-glutaril-coenzima A; LPL, lipoproteína lipasa; LDL-c, colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad. Extraído de Mannu y cols. (2012).

#### 1.1.4. Otros factores

El síndrome metabólico genera numerosas alteraciones fisiológicas, de forma que a las principales patologías asociadas (obesidad, DMT2, dislipidemias, hipertensión arterial) le siguen una serie de cambios, tales como el estrés oxidativo y la inflamación, que son causa y/o consecuencia de las mismas. Además, la hiperuricemia se relaciona fuertemente con el síndrome metabólico, aunque numerosos autores declaran controvertido el utilizarlo como indicador del mismo. Los principales factores asociados serán explicados en detalle en los siguientes apartados.

##### 1.1.4.1. Estrés oxidativo

Las dietas hiperenergéticas, ricas en grasas saturadas y colesterol, típicas de los países más industrializados, generan desequilibrios en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) o de nitrógeno (RNS) (Bondia-Pons y cols., 2012). Cuando un átomo o molécula presente en un organismo posee electrones desapareados en su capa más externa se convierte en un átomo o molécula muy reactivo, y tiende a oxidar los tejidos circundantes. Muy a menudo, las reacciones

enzimáticas que cursan con transferencia de electrones producen radicales libres en el interior celular, como, por ejemplo, sucede en la cadena respiratoria mitocondrial, en la que se libera la energía de los nutrientes generando radicales superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). Una proliferación excesiva de estas reacciones generadoras de radicales libres podría dar lugar a oxidaciones de otras enzimas, de componentes de la membrana o incluso del mismo ácido desoxirribonucleico (ADN), generando toxicidad celular y daños tisulares; por lo que son necesarios mecanismos endógenos de defensa antioxidante (Yuan y Kitts, 1997).

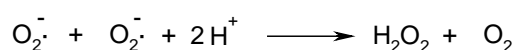
Los radicales libres y ROS son considerados como cruciales en el desarrollo de enfermedades degenerativas como la obesidad, las enfermedades cardiovasculares y la DMT2 (Martínez, 2006). Además, la hipercolesterolemia incrementa la producción de radicales libres y mecanismos de inflamación relacionados (Cooper y cols., 2002). Se define al estrés oxidativo como una alteración metabólica en la que las ROS y las RNS presentan un desequilibrio positivo con respecto a la capacidad antioxidante del organismo. El sistema antioxidante endógeno está formado por enzimas que catalizan reacciones de reducción-oxidación y de moléculas con capacidad antioxidante que interaccionan con las mismas (**figura 1.4**).

A día de hoy sólo se han descrito enzimas destoxicantes para el radical anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y para el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), por lo que el modo de evitar la formación de otro tipo de radicales, como por ejemplo el radical hidroxilo, consistirá en eliminar esas dos especies activas (Yu, 1994). Dentro de los mecanismos enzimáticos, algunos actúan en el interior de las células, mientras que otros parecen ser más eficaces en el medio extracelular.

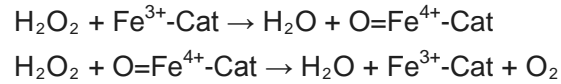
El sistema de defensa enzimático responsable de la desintoxicación de las ROS está integrado por:

- Superóxido dismutasa dependiente de cobre y cinc (CuZn-SOD). Se encuentra en el citoplasma de la célula y tiene como función la transformación de radicales  $O_2^{\cdot-}$  en  $H_2O_2$ , que es menos reactivo. La eliminación se realiza a través de una reacción en la que un radical superóxido se oxida hasta  $O_2$  molecular, mientras que la otro se reduce a  $H_2O_2$  en presencia de agua.

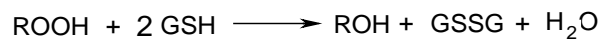
SOD



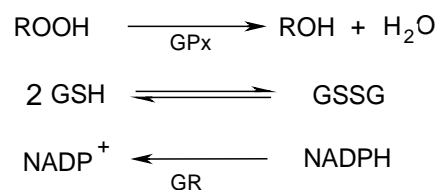
- Catalasa (CAT). Se encuentra presente en el citoplasma, mitocondrias, peroxisomas y otros orgánulos celulares. Esta enzima se encarga de catalizar dos tipos de reacciones, actuando muy eficazmente sobre el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de dos formas:



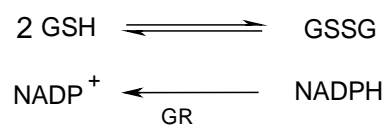
- Glutation peroxidasa (GPx). La glutacion peroxidasa dependiente de selenio (Se-GPx) se encuentra tanto en citoplasma y como en las mitocondrias de la célula; contiene selenio en su centro activo, que es esencial para su actividad y controla la síntesis de la propia proteína enzimática. Es específica para su donante de hidrógeno, el GSH, no siendo específica para el hidroperóxido, lo que aumenta la capacidad de acción de la GPx, pudiendo actuar además sobre el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o los hidroperóxidos orgánicos (Mataix, 2001). Por su parte, la glutacion peroxidasa no dependiente de selenio (Non-Se-GPx), se encuentra en el citoplasma de las células, no contiene selenio, y sólo elimina radicales hidroperoxilos (-OOH<sup>•</sup>). Su función es la de catalizar la descomposición de hidroperóxidos, de forma que se reducen a formas más estables como los radicales hidroxilos (-OH<sup>•</sup>). Su sustrato reductor específico es el GSH, que da lugar a glutacion oxidado (GSSG) tal y como indicó (Yu, 1994). La reacción se detalla en el siguiente esquema:



La GPx se encuentra en los mismos compartimientos subcelulares que la SOD, lo que genera un acoplamiento de las reacciones de formación y destrucción de peróxidos de hidrógeno. La GPx no reacciona con las fracciones lipídicas alteradas, por lo que sólo es capaz de transformar los ácidos grasos peroxidados liberados por las fosfolipasas desde la membrana al citoplasma hasta R-OH.



- Glutation reductasa (GR). Es una flavoproteína presente en el citosol y en las mitocondrias. Su función es recuperar los niveles de GSH necesarios para ser usados como sustrato de la GPx, catalizando la reducción del GSSG a dos moléculas de GSH. Para que esta reacción se lleve a cabo debe estar presente el nicotinamina adenina dinucleótido fosfato (NADPH). El balance entre las moléculas de glutacion oxidadas y reducidas se determina por el cálculo del índice redox  $[GHS/(GSH+GSSG)]$ , cuyos valores reducidos pueden ser síntoma de toxicidad celular. Debido a que las reservas de GSH son limitadas, el buen funcionamiento de esta reacción encimática es muy importante para el equilibrio redox (Yu, 1994):



- La reacción anterior depende de la presencia de NADPH, de manera que se considera a las enzimas glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfatogluconato deshidrogenasa, de la vía de las pentosas fosfato, como una segunda línea de defensa antioxidante, por su implicación en la producción de NADPH, (Yu, 1994; Martínez-Cayuela, 2010).
- Glutation-S-transferasa: produce conjugados de glutacion, catalizando la reacción de conjugación entre el GSH y compuestos electrofílicos, xenobióticos y carcinógenos. Se considera como el tercer componente del sistema redox del glutacion, siéndola la GR y la GPx son las principales enzimas de este sistema antioxidante.

En cuanto al sistema de defensa no enzimático del organismo, éste se compone de:

- Glutation reducido. Se trata de un tripéptido que se encuentra en el citoplasma y las mitocondrias de las células, y es considerado como el sistema central de muchos sistemas detoxificantes. Contiene un grupo sulfhidrilo (-SH) que le hace esencial como cofactor en diversos sistemas enzimáticos (Martínez-Cayuela, 2010). A pesar que este antioxidante está extendido por todo el organismo, es sintetizado en mucha mayor proporción por el hígado. Se origina cuando no están presentes las sistemas normales de síntesis de proteínas, por lo que pueden ser formados inclusive por una célula desprovista de núcleo, como es el eritrocito maduro (Grune y cols., 2000). Los niveles de glutacion

pueden disminuir con la edad, debido a un incremento de la tasa de oxidación o una disminución del recambio de GSH debido a una mayor utilización o degradación y/o por una menor biosíntesis (Martínez-Cayuela, 2010).

- Malondialdehído (MDA), es un aldehído de tres átomos de carbono, que se produce por la oxidación de determinados ácidos grasos poliinsaturados peroxidados (Kenaston y cols., 1955; Chow, 2008). El MDA se forma principalmente a partir del ácido araquidónico, y es uno de los principales productos de la peroxidación lipídica (Suttnar y cols., 1997). Los compuestos de bajo peso molecular, como el MDA, se absorben muy fácilmente en la pared intestinal. La enzima aldehído deshidrogenasa hepática es la principal responsable de la metabolización del MDA, aunque Esterbauer (1993), propuso que la alcohol deshidrogenasa y la glutatión-transferasa desempeñan un papel en la eliminación del MDA.

Además del sistema antioxidante endógeno, existen infinidad de sustancias exógenas con capacidad antioxidante, como serían, por ejemplo, las vitaminas, algunos tipos de fibras solubles o compuestos procedentes de algas marinas (Bocanegra, A. y cols., 2009). La incorporación a la dieta en forma de ingredientes funcionales de algunas de estas sustancias tendría, pues, la capacidad de mejorar la capacidad antioxidante del organismo.

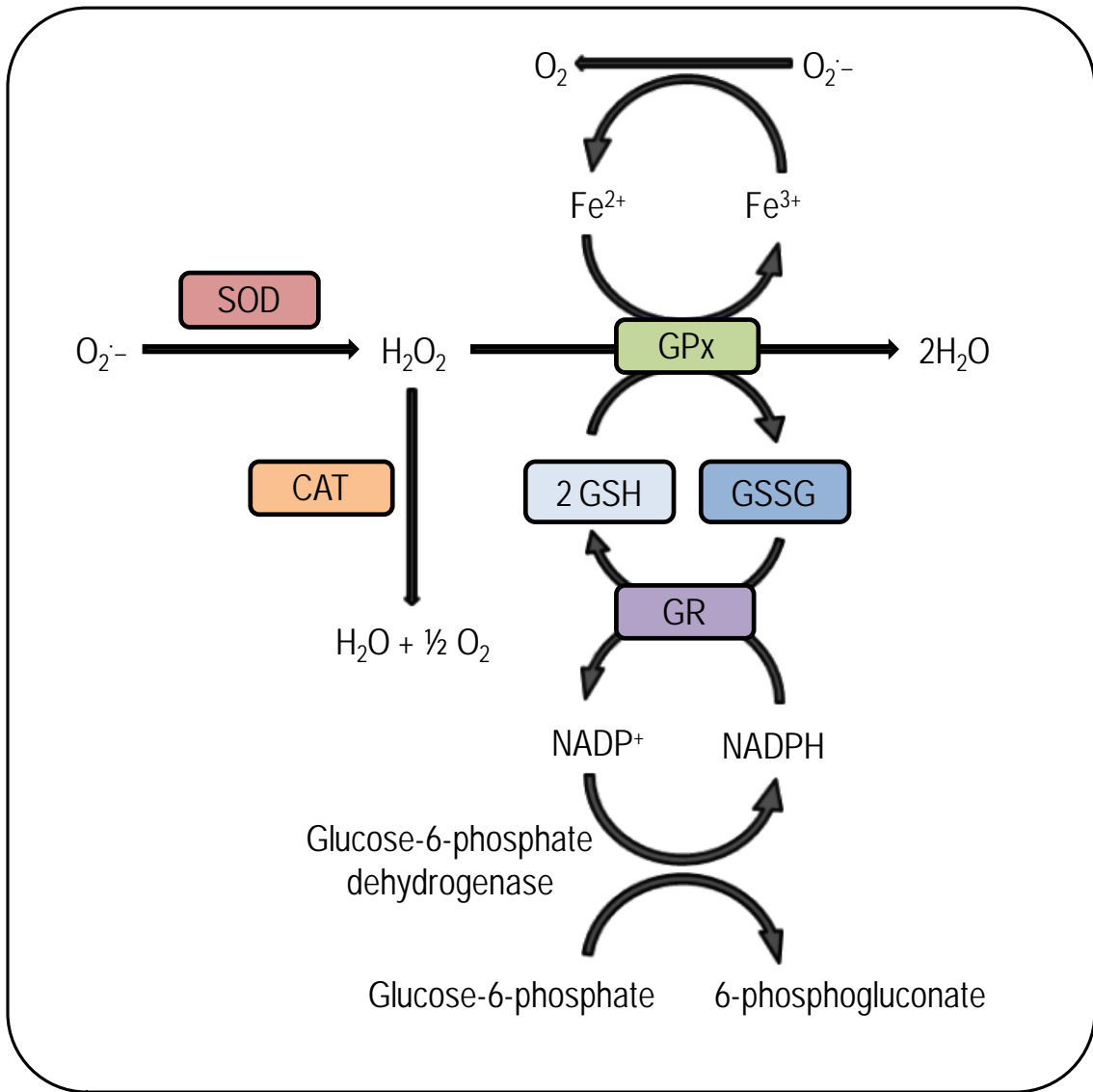


Figura 1.4. Esquema del sistema antioxidante endógeno.

#### 1.1.4.2. *Inflamación crónica*

En pacientes afectados por el Síndrome Metabólico se encuentran elevados los niveles de marcadores inflamatorios y citoquinas proinflamatorias (Hotamisligil y cols., 1995), sugiriendo una relación directa entre inflamación y el citado síndrome.

Dandona y cols. (2005) establecen una hipótesis para explicar la patogénesis del síndrome metabólico: un estado proinflamatorio induciría la resistencia a la insulina y conduciría a las manifestaciones clínicas y bioquímicas de este síndrome. La resistencia a la insulina promovería a su vez el estado inflamatorio, al anular los efectos antiinflamatorios de la insulina, dando lugar a un círculo vicioso que agrava cada vez más esta situación. La fosforilación anómala del receptor de la insulina se activaría por citoquinas inflamatorias, que favorecen la transcripción de mediadores y enzimas críticos en la señalización de la inflamación como IL-6, iNOS y TNF- $\alpha$ , lo que relaciona aún más el desarrollo de DMT2 con la inflamación.

Por otra parte, el tejido adiposo es capaz de producir moléculas proinflamatorias (Hotamisligil y cols., 1993), y lo hace de forma exacerbada en situación de obesidad (Dandona y cols., 1998; Kern y cols., 2001). En la última década, varios autores se plantearon la posibilidad de que la obesidad fuera una enfermedad inflamatoria crónica, recogiendo numerosas pruebas epidemiológicas de esta asociación entre obesidad y un estado de inflamación crónica subclínica (Hotamisligil, 2006). Tanto es así, que la ingesta de determinados macronutrientes origina la aparición de estrés oxidativo y da lugar a una respuesta inflamatoria: las dietas ricas en azúcares y grasas saturadas, en consumo crónico, son el patrón dietético que desencadena una mayor respuesta inflamatoria (Aljada, A y cols., 2004; De Santa Olalla y cols., 2009). Es más, un aumento en la concentración de ácidos grasos libres en plasma puede provocar una reacción oxidativa e inflamatoria (Itani y cols., 2002; Mohanty y cols., 2002; Tripathy y cols., 2003). Así, una reducción en la ingesta calórica y un balance adecuado de macronutrientes lleva a una disminución en los marcadores señalados (Dandona y cols., 2001).

El TNF- $\alpha$  es una proteína de 17 kDa secretada como trímero de 51 kDa que toma su nombre a su identificación inicial como factor proapoptótico en células tumorales. La evidencia directa de la participación de esta citoquina en la resistencia a la insulina se obtuvo al observar que la infusión aguda de TNF- $\alpha$  inhibía la disponibilidad de glucosa estimulada por la insulina tanto en roedores obesos (Hotamisligil y cols., 1995; Hofmann y cols., 1994; Hotamisligil y cols., 1994a), como

en humanos sanos (Plomgaard y cols., 2005). La inhibición de la señalización del TNF- $\alpha$  o su neutralización mediante el uso de receptores solubles restauró la sensibilidad a la insulina en ratas obesas Zucker (Hotamisligil y cols., 1994b), pero no fue efectiva en humanos tratados durante 6 semanas (Ofei y cols., 1996).

Aunque la producción de TNF- $\alpha$  fue en un principio atribuida a los adipocitos, se ha observado que en la obesidad se produce una gran infiltración de macrófagos en el tejido adiposo, que son la principal fuente de TNF- $\alpha$  y otras citoquinas (Ferrante, 2007; Weisberg y cols., 2003). En individuos obesos, los macrófagos se encuentran en un estado proinflamatorio caracterizado por aumentar la activación del NF- $\kappa$ B, disminuir el inhibidor del NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B), y por aumentar la transcripción de genes proinflamatorios como el TNF- $\alpha$  (Ferrante, 2007). A pesar de que el mecanismo de acción de este proceso no ha sido desentrañado por completo, se especula con un papel muy importante de los ácidos grasos libres en el plasma: se encuentran en concentraciones muy elevadas en el síndrome metabólico y existen estudios que sugieren que tratamientos capaces de elevar la concentración plasmática de ácidos grasos libres provocan un aumento en la concentración de plasmática de TNF- $\alpha$  (Itani y cols., 2002); o que los ácidos grasos libres activan en los macrófagos las vías proinflamatorias, a través de los receptores tipo Toll, o mediante reacciones de lipotoxicidad resultado de la acumulación ectópica de derivados lipídicos (Lee y cols., 2003).

El TNF- $\alpha$  también tiene la capacidad de activar rutas lipolíticas en el tejido adiposo (Zhang y cols., 2002), lo que elevaría la cantidad de ácidos grasos libres en el plasma. Este hecho contribuiría a generar resistencia a la insulina, tanto como el efecto directo de el TNF- $\alpha$ , activando quinasas c-Jun N-terminal (JNKs) y NF- $\kappa$ B (Arkan y cols., 2005; Cai y cols., 2005), lo que llevaría a la inhibición de la cascada de señalización de la insulina.

El TNF- $\alpha$  causa además una inhibición en la protein-kinasa activada por 5'-AMP (AMPK) (Steinberg, 2007), lo que resulta en una activación de la acetil-CoA carboxilasa 2 (ACC2) que reduciría la oxidación de ácidos grasos libres (Hardie y cols., 2003). Se especula que este descenso de la tasa de oxidación de ácidos grasos cause alteraciones metabólicas en los tejidos afectados por la resistencia a la insulina como son el hígado y músculo esquelético, preferentemente.

Otra propiedad de las citoquinas proinflamatorias es reducir la expresión de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), lo que reduciría la producción de óxido nítrico

en el tejido vascular, produciendo un empeoramiento del estrés oxidativo (Dandona y cols., 2002; Aljada, Ahmad y cols., 2002).

#### *1.1.4.3. Hiperuricemia*

El ácido úrico es el producto final del catabolismo de las purinas en el ser humano. Las purinas pueden ser originadas de forma endógena, por la degradación de ácidos nucleicos constitutivos; o exógena, a través de las purinas contenidas en la dieta.

El metabolismo de purinas en el ser humano sigue el siguiente esquema: la adenosina, por la acción de la adenosina desaminasa forma inosina. La inosina y la guanosina, tras la acción de la purina nucleósido fosforilasa, liberan ribosa-1-fosfato y una base de purina. La hipoxantina y la guanina forman xantina en reacciones catalizadas por la xantina oxidasa y la guanasa, respectivamente. La xantina formada se oxida a ácido úrico en una segunda reacción catalizada por la xantina oxidasa.

La mayor parte del ácido úrico se incorpora a la sangre y viaja a los riñones, donde sale a través de la orina. Si el cuerpo produce demasiado ácido úrico o no lo elimina lo suficiente, su concentración en sangre aumenta y si supera los intervalos de normalidad (3,4-7 mg/dL en hombres y 2,4-6 mg/dL en mujeres), se considera hiperuricemia. Inicialmente es asintomática pero suele acabar desencadenando la gota aguda o crónica al depositarse cristales de urato monosódico en los tejidos avasculares (cartílago) o los tejidos relativamente avasculares (tendones, ligamentos) alrededor de las articulaciones periféricas más frías, manifestándose con dolor articular, inflamación e impotencia funcional. En la enfermedad grave de larga evolución, los cristales se pueden depositar en articulaciones centrales de gran tamaño y en el parénquima de órganos como el riñón.

Numerosos estudios epidemiológicos relacionan la hiperuricemia con las enfermedades cardiovasculares y el síndrome metabólico, incluso correlacionándose con valores en el límite superior del intervalo de normalidad, aunque este es un hecho controvertido, ya que, por ejemplo, en el estudio Framingham indican tener en cuenta únicamente los factores de riesgo clásicos por no considerar plenamente demostrado el uso de valores de ácido úrico como factor de riesgo cardiovascular (Aguilera-García y cols., 2010). El papel de la dieta en la hiperuricemia es limitado, ya que la mayoría

del ácido úrico circulante procede de fuentes endógenas<sup>12</sup>. Sin embargo, según Aguilera-García y cols. (2010), existen varias estrategias dietéticas para tratar la hiperuricemia:

- Consumo de 2,5 a 3 litros diarios de agua para aumentar la excreción urinaria de los uratos. Se recomiendan aguas alcalinas (bicarbonatadas) para aumentar la solubilidad de los mismos.
- Las dietas hipocalóricas con restricción de hidratos de carbono, reducen peso y dislipidemias, además de disminuir la periodicidad e intensidad de los ataques de gota. Es posible que se deba a una mejora de la sensibilidad a la insulina, lo que aumenta el aclaramiento renal de uratos y en general del síndrome metabólico.
- Preferencia de los hidratos de carbono complejos frente a hidratos de carbono simples y grasa. La dieta rica en cereales, féculas y verduras favorece la excreción del ácido úrico.
- Reducción de sacarosa y fructosa. El metabolismo de la sacarosa aumenta las concentraciones de lactato sérico, lo que eleva la uricemia por incremento de su síntesis y bloqueo de la secreción de urato por los túbulos renales. La fructosa, sustrato de gluconeogénesis y lipogénesis, contribuye a elevar la uricemia.
- Evitar la ingesta de alcohol, ya que su metabolismo genera sustancias que bien compiten por la excreción de ácido úrico, o bien o la inhiben, como el ácido láctico. Además, tras la ingesta de alcohol se ha observado un consumo acelerado de ATP que conlleva un aumento de oxipurinas en plasma.
- Limitar el consumo de alimentos ricos en purinas puede reducir un 15% la uricemia.
- Restricción de la ingesta de proteínas, limitando el consumo de proteína de origen animal a 5 raciones a la semana.
- Limitar el consumo de sal a 6 gramos diarios.
- Consumo de 800 mg de calcio al día, preferentemente procedente de lácteos.

---

<sup>12</sup> La síntesis de purinas aparece incrementada en anomalías primarias o por exacerbación del metabolismo de nucleoproteínas en trastornos hematológicos como linfoma, leucemia o anemia hemolítica; o en trastornos con aumento de la proliferación y muerte celular, como por ejemplo psoriasis. En la mayoría de los casos de gota la síntesis de ácido úrico se incrementa por causas desconocidas, aunque algunos casos se pueden deber a la deficiencia de hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa, que se asocia con cálculos renales, nefropatía y gota grave a una edad temprana; o a hiperactividad de la fosforribosilpirofosfato sintetasa.

La xantina oxidasa, al ser un paso obligado en el metabolismo de purinas, es una diana para la intervención farmacológica en los pacientes con hiperuricemia y gota. El alopurinol es un inhibidor de la xantina oxidasa que reduce la uricemia debida al metabolismo de purinas. En tratamientos crónicos, generalmente basta con dosis de 200 a 600 mg/día. En ocasiones se asocian diuréticos para aumentar la eliminación de uratos. En casos de gota, hay que recurrir a antiinflamatorios no esteroídicos y/o colchicina, que disminuye el flujo leucocitario a la zona y frena de la producción de ácido láctico, manteniendo un pH local normal.

La rata posee una enzima denominada uricasa que transforma el ácido úrico en allantoina, altamente hidrosoluble, por lo que son capaces de eliminar el ácido úrico.

### **1.1.5. Prevención y tratamiento**

Como se ha señalado, el síndrome metabólico es una enfermedad multifactorial, y su tratamiento pasa por la atenuación de las causas y los síntomas de sus diferentes componentes: pérdida de peso, ejercicio moderado, reducción de hidratos de carbono simples y grasas saturadas en la dieta, poniendo especial atención a la sustitución de las grasas saturadas por otras monoinsaturadas y poliinsaturadas, fundamentalmente  $\omega$ -3, manteniendo la relación  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 en 4 a 1 o menos. En cierto modo su tratamiento es muy similar al que se realiza en hipertrigliceridemia (Sanchez-Muniz y cols., 2013). Además, los tratamientos farmacológicos pertinentes para regular estos factores: hipoglucemiantes, antihipertensivos, hipolipemiantes, inhibidores de la xantin oxidasa, antiinflamatorios, antioxidantes, etc.

Es necesario señalar que los tratamientos farmacológicos son crónicos y conllevan un elevado coste, y que las complicaciones derivadas de estas patologías incrementan los gastos socio-sanitarios y a nivel de productividad empresarial a cotas insostenibles. Por ello, en la actualidad se tiende a la prevención del síndrome metabólico como la opción más viable, tanto económicamente como por el impacto que la reducción de la prevalencia del conjunto de enfermedades que lo integra tiene en la esperanza y calidad de vida de la población.

La prevención se ha centrado tradicionalmente en la promoción de la mejora de la calidad de las dietas y de un estilo de vida saludable, factores que contribuyen de

una forma clara a la mejora de la prevalencia del síndrome metabólico. Si bien son factores esenciales e irrenunciables, también se ha comprobado que son muy difíciles de modificar, ya que afectan a costumbres y hábitos muy afianzados tanto individualmente como a nivel poblacional, afectando incluso a rasgos culturales únicos.

En la actualidad, las nuevas tecnologías permiten la modificación de los alimentos convencionales en otros “mejorados”, capaces de reducir los síntomas o prevenir o retrasar la aparición de determinadas enfermedades crónicas. La inclusión de estos alimentos modificados en una dieta habitual puede ser una tercera vía para la prevención del síndrome metabólico y sus complicaciones.

## **1.2. LOS ALIMENTOS FUNCIONALES**

### **1.2.1. Generalidades**

Se definen como los alimentos diseñados específicamente para producir efectos beneficiosos para la salud. También se les ha denominado alimentos de diseño, nutracéuticos, farma-alimentos o agentes quimiopreventivos. El profesor Mataix los definía como “todos aquellos alimentos o componentes alimentarios que poseen unas propiedades beneficiosas para la salud, que van más allá de las claramente atribuidas a los nutrientes esenciales que contienen”.

Legalmente, se consideran alimentos funcionales a aquellos que, con independencia de aportar nutrientes, han demostrado científicamente que afectan beneficiosamente a una o más funciones del organismo, de manera que proporcionan un mejor estado de salud y bienestar y reducen el riesgo de padecer una enfermedad degenerativa (Ashwell, 2002).

La idea y uso de los alimentos concretos en determinadas patologías es muy antigua, y estaba fundamentada en la visión del alimento como un fármaco. El concepto de alimento funcional nace en Japón en la década de los ochenta del pasado siglo, cuando las autoridades alimentarias japonesas tomaron conciencia de que, para controlar los gastos globales en salud, era necesario desarrollar alimentos que mejoraran la calidad de vida de la población, cubriendo ciertas “deficiencias

pandémicas”. En esta época se establece por primera vez en Japón el concepto nutricional de "Alimentos para Uso Específico en la Salud", (en inglés Foods for Specified Health Use, cuyo acrónimo es: FOSHU) (Sánchez-Muniz, 2004). La demanda de este tipo de alimentación ha crecido espectacularmente en este país asiático desde finales del siglo XX.

Poco a poco fue apareciendo en diversos países europeos la necesidad de regular este tipo de alimentación, y nacen proyectos específicos dentro del área de alimentación funcional bajo el auspicio del ILSI (International Life Sciences Institute). A finales del siglo XX, la preocupación sobre este tipo de alimentación se hizo internacional. La aparición de patentes relativas al diseño de alimentos funcionales y su beneficio económico ha disparado el interés por parte de la industria alimentaria.

Un alimento, según Jiménez-Colmenero y cols. (2010) puede acabar siendo funcional si durante su procesado se le ha realizado alguna de estas operaciones:

- Eliminación de un componente alimenticio conocido como causante o determinante de una enfermedad. Ejemplos pueden ser las proteínas causantes de procesos alérgicos de ciertos alimentos o la eliminación de la lactasa de ciertos productos lácteos.
- Incremento en la concentración de un componente alimenticio. Esta operación de fortificación, o adición de un componente activo, hace que la dosis diaria del mismo se acerque a las recomendaciones de los organismos reguladores, lo que a la larga redundará en una disminución de riesgos de enfermedad.
- Añadiendo un componente que no está presente en la mayoría de los alimentos. No necesariamente debe ser un macronutriente o un micronutriente.
- Reemplazo de macronutrientes: cambiar el tipo de ácidos grasos de un alimento por otros más saludables sería el ejemplo más frecuente.
- Incrementando la biodisponibilidad o estabilidad de un componente conocido con el objeto de producir un efecto funcional o reducir la aparición de enfermedades.

Con este tipo de alimentos se corre el riesgo de crear una falsa sensación de seguridad en el consumidor, ya que lo más importante es tener en cuenta el patrón dietético total, y no el consumo de algún alimento en particular que, aunque beneficioso, podría no ser suficiente para obtener el efecto deseado.

Como ya se ha dicho, tanto el término como la regulación de los alimentos funcionales tienen su origen en Japón, concretamente por las "Nutrition Improvement Law Enforcement Regulations" de 1991, modificadas en 1996 y en 2001.

Tal y como expone Recuerda Girela (2006): “La comercialización de alimentos funcionales bajo la denominación FOSHU requiere de la concesión de una autorización administrativa que se puede obtener después de una evaluación científica que pruebe la eficacia y la seguridad del alimento. Esta autorización no es necesaria cuando la comercialización de alimentos funcionales se realiza sin hacer mención a sus propiedades funcionales: Esto ha hecho que existan dos grupos de alimentos funcionales: por un lado aquellos que se comercializan recurriendo a las alegaciones de salud, y por otro lado, aquellos que se comercializan sin hacer mención a sus propiedades funcionales, ya que el sistema FOSHU es un sistema voluntario”.

El anterior párrafo pone de manifiesto algunos defectos en las leyes japonesas, ya que en la práctica supone que se vendan algunos alimentos funcionales sin advertirlo para evitar el estudio científico caso por caso; y que las referencias a las propiedades beneficiosas no están expresamente prohibidas. Además, el profesor Recuerda añade: “...se ha afirmado que la legislación japonesa puede conducir a la aprobación de alimentos funcionales que, teniendo características funcionales, contengan ingredientes poco saludables como la sal y el azúcar que contribuyen a la hipertensión y a la obesidad”.

### **1.2.2. Pescado y derivados de la pesca como alimentos funcionales**

Se considera al pescado como un alimento con un alto valor nutritivo, dada su fácil digestibilidad, diversidad de sabores y composición equilibrada, que depende en gran medida de la especie a la que pertenecen, edad del animal, medio en el que viven, alimentación o tamaño, entre otros factores (Hernandez, 2010).

En términos generales, se puede decir que tienen un gran contenido de proteínas de alto valor biológico, y sus aminoácidos se encuentran en una proporción adecuada. Mención especial a este respecto recibe el cociente lisina/arginina más reducido que el de la carne, lo que se ha relacionado con una reducción de la colesterolemia (Vázquez y Sánchez-Muniz, 1994).

Dependiendo del contenido de lípidos, los pescados se dividen en *magros* (< 2% de grasa), *semigrasos* (2-7% de grasa) y *grasos*, también conocidos como “pescado azul” (8-15% de grasa). A diferencia de la carne, rica en grasa saturada, el

pescado es rico en ácidos grasos poliinsaturados  $\omega$ -3, que tienen una incidencia positiva en la prevención y tratamiento de las enfermedades cardiovasculares.

El pescado es, además, una importante fuente de calcio, yodo fósforo y magnesio. Los pescados grasos aportan también vitaminas B<sub>12</sub> y D.

España, como el resto de los países mediterráneos, tiene una cultura gastronómica en la que el consumo de pescado tiene una gran importancia. Tanto es así, que dicho consumo es de 26,4 kilogramos por persona y año, lo que representa aproximadamente unas dos millones de toneladas anuales (MAGRAMA, 2014). Por un lado, es el tercer país a nivel mundial en cuanto a importaciones, hecho en el que influye de manera importantísima la limitación de capturas impuesta desde la Unión Europea; por otro, nuestros niveles de captura son de los primeros del mundo, por delante de países como Francia, Italia o Inglaterra (FAOSTAT, 2014).

Entre la gran producción, cientos de toneladas de pescado sin valor comercial<sup>13</sup> son destruidas o enviadas a empresas harineras, sin ser empleadas en la industria, lo que podría suponer una oportunidad para su estudio en Ciencia y Tecnología Alimentaria posibilitando la adecuación de dichas especies para ser utilizadas, biotransformadas y posteriormente incluidas como materia prima para producir nuevos alimentos derivados de productos de la pesca.

Los nuevos productos derivados de la pesca pueden, además, poseer mayor valor nutritivo que los diferentes pescados de los que proceden. Generalmente, el músculo del animal de procedencia es lavado, picado y se le añaden diferentes productos para modificar sus propiedades organolépticas y de estabilidad para adaptarlas al consumidor, de forma que habitualmente estos productos se conocen como “reestructurados”.

Con los productos reestructurados se pueden fabricar análogos o sucedáneos, en los que se imita un producto con propiedades muy similares a otro que ya existe en el mercado, o incluso crear un nuevo producto con características propias. A su vez, pueden dividirse en *surimis*, reestructurados totales de origen japonés o *fish-blocks*, elaborados a partir de bloques enteros o filetes de pescado.

La principal ventaja con la que nos encontramos al usar productos reestructurados es la posibilidad de reformular completamente el producto final, de modo que se pueden eliminar algunos componentes e incorporar, además, otros

---

<sup>13</sup> Especies que poseen muchas espinas, de músculo muy blando, de pequeño tamaño, que dificultan sobremanera su procesado, o de muy alto contenido en grasa, y que, por lo tanto, no son consideradas comercialmente aptas para el consumo directo.

componentes deseados(Sánchez-Alonso y cols., 2007; Sanchez-Alonso y cols., 2007), que además podrían incorporar propiedades funcionales, lo que es importante tanto a nivel de mejoras de la salud como de márketing del producto.

#### *1.2.2.1. Surimi de calamar*

Los cefalópodos, como el calamar gigante o pota del Pacífico (*Dosidicus gigas*), son una excelente fuente de nutrientes. Sus proteínas tienen un alto valor biológico, siendo digeribles casi al 100%, y su contenido en aminoácidos y cómputo químico es elevado y equilibrado, presentando un cociente lisina/arginina aún menor que el del pescado. Su contenido otros nutrientes no es muy elevado, ya que el proceso de fabricación del mismo incluye disolución del músculo en ácido, lavados y precipitación isoeléctrica de las proteínas, convirtiéndolo en un concentrado proteico con trazas de otros componentes.

### 1.2.3. La fibra soluble. Harina de *Amorphophallus Konjac*

*Amorphophallus konjac*, planta de la familia *Araceae* originaria de China y la India, fue descrita por Karl Heinrich Emil Koch en 1858. Su nombre genérico deriva de las palabras griegas: *amorphos* (deforme) y *phallos* (pene), dada la forma característica de sus inflorescencias. Se trata de una planta que alcanza el metro y medio de altura con unas llamativas flores rojas que se agrupan en una inflorescencia en forma de lanza rodeada por una bráctea violácea llamada *espata*. Aunque se puede utilizar para crear entornos arbolados con una finalidad puramente estética, su principal función deriva de las peculiares características de la harina obtenida a partir de su tubérculo.

Cultivado principalmente en China, Japón y Corea, la harina de konjac es un producto alimentario con un historial de uso saludable en Japón que se remonta al año 900, donde se usa como gelificante en la elaboración de platos como oden, sukiyaki o mermeladas (González Canga y cols., 2004).

El glucomanano es el principal polisacárido de reserva de los tubérculos de la citada planta, representando un 30-50% de su peso seco. Se obtiene tras el secado, trituración, molienda y posterior extracción y purificación con etanol de dichos tubérculos. La estructura del glucomanano, determinada mediante hidrólisis ácida y enzimática, es la de un polisacárido lineal, constituido por D-glucosa y D-manosa (en una proporción 5:8, respectivamente), unidas por enlace  $\beta(1\rightarrow 4)$ . Cada 50-60 unidades de monosacárido existen ramificaciones de la cadena principal, unidas a la misma mediante enlace  $\beta(1\rightarrow 3)$  y formadas, cada una de ellas, por 11-16 monosacáridos. Asimismo, existe un grupo acetilo cada 9-19 residuos de azúcar (**figura 1.5**).

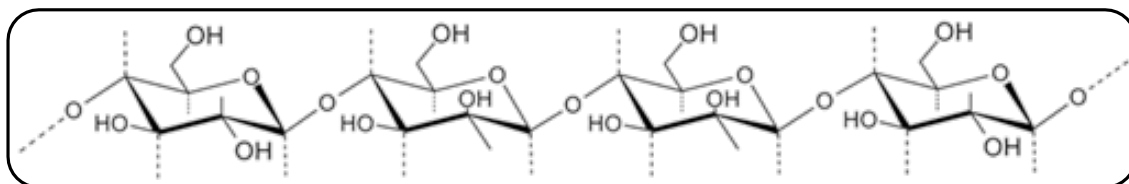


Figura 1.5. Molécula de glucomanano: unidad estructural

Posee un peso molecular entre 200 y 2000 kDa, según su grado de purificación: las menos purificadas conservan las enzimas  $\beta$ -manasas que lo degradan

en varios oligosacáridos de menor peso. Un gramo de esta fibra puede captar hasta 200 mL de agua, formando soluciones de una viscosidad muy elevada (Kishida y cols., 1978; Maekaji, 1974), variable según la concentración de la solución<sup>14</sup>. Se trata de una de las fibras solubles que forman soluciones más viscosas (Kiryama y cols., 1974), con la peculiaridad de que a pH 7-11, las soluciones de glucomanano son capaces de formar geles elásticos, debido a que se produce la hidrólisis de sus grupos acetilo, favoreciendo la formación de puentes de hidrógeno. Esta capacidad de gelificación ha sido observada desde hace siglos en Japón, donde fue aplicada a su cocina tradicional. Hoy en día esta propiedad es estudiada por su potencial para reducir la glucosa y el colesterol plasmáticos.

Tras la ingesta del glucomanano, se han descrito numerosos efectos fisiológicos que pueden derivar en aplicaciones terapéuticas:

- **Efecto saciante:** el glucomanano posee una elevada capacidad de absorción de agua que hace aumentar el volumen del estómago, lo que resulta en una sensación de saciedad. También, debido a su capacidad de aumentar la viscosidad del contenido gastrointestinal, retrasa el vaciado gástrico, prolongando así el efecto de plenitud. Es por esto que algunos autores recomiendan el consumo de entre 2 y 3 gramos diarios de esta fibra como coadyuvante en regímenes de adelgazamiento.
- **Efectos sobre el estreñimiento crónico:** Una cantidad de 3-4 gramos diarios de fibra durante el tiempo de duración de diversos estudios, que varió entre 10 días y 3 meses, mejoró los síntomas de esta patología. Se aconseja el uso de glucomanano al paciente estreñado, ya que el consumo de esta fibra contribuye a normalizar el ritmo de evacuación intestinal y favorece la producción de heces blandas y voluminosas. El aumento de volumen fecal se debe principalmente al aumento de la masa bacteriana colónica, capaz de fermentar el glucomanano, lo que da lugar a un incremento de la producción de gases y ácidos grasos de cadena corta como son el acético, el butírico y el propiónico, con actividades beneficiosas para el organismo, pero potencialmente irritantes en dosis excesivas.
- **Efecto hipoglucemiante:** la adición de glucomanano a la dieta reduce la glucemia y la insulinemia postprandiales en individuos sanos y en pacientes diabéticos (Doi y cols., 1979). El mecanismo por el que se produce este efecto sería a través del incremento de la viscosidad del contenido del tracto gastrointestinal: en el estómago, que retrasa el vaciado gástrico y en el intestino y

---

<sup>14</sup> La viscosidad de una solución al 1% de glucomanano puro (98,2%), se sitúa, en una hora, en unos 45.000 mPa·s, alcanzando en seis horas la viscosidad máxima (125.000 mPa·s), que se mantiene durante 120 horas.

reduce la velocidad de absorción de nutrientes al formar una matriz que los engloba, protegiéndolos de las acciones enzimáticas y dificultando su acceso a la mucosa intestinal. De nuevo, el efecto hipoglucemiante se relaciona con la pureza del glucomanano, ya que las soluciones más purificadas (de alta extracción) producen soluciones más viscosas, que presentan mejores propiedades antidiabéticas.

- **Efecto hipolipemiante:** esta fibra ha demostrado capacidad de reducción de los lípidos plasmáticos debida a su elevada capacidad para formar geles: Los ácidos biliares quedan atrapados en el interior de este gel, excretándose posteriormente con las heces, disminuyendo la absorción intestinal de colesterol. Para compensar la pérdida de ácidos biliares, las células hepáticas los sintetizan a partir del colesterol, descendiendo así la colesterolemia. Este efecto tiene la contrapartida de la reducción de la absorción de las vitaminas liposolubles. Por esta capacidad para reducir el colesterol total, y especialmente la fracción LDL, el consumo de glucomanano se ha enfocado hacia la prevención de las enfermedades cardiovasculares (Sanchez-Muniz, 2012). Se ha indicado que esta fibra no limita la absorción de minerales como el calcio, el hierro, el cobre o el cinc.

Si bien es cierto que la inclusión del glucomanano en la dieta ha demostrado una serie de propiedades beneficiosas para la salud, su consumo en elevadas dosis podría también resultar en algún efecto deletéreo:

- Flatulencia y molestias abdominales: al incrementar la flora bacteriana intestinal y, por tanto, la cantidad de gases generada por su fermentación. Para evitar estas molestias, es conveniente introducir el glucomanano en la dieta de forma gradual.
- Obstrucción esofágica: tradicionalmente, se ha usado en gastronomía la harina de konjac sin purificar y ya cocinada, con lo que la absorción de agua ha sido previa a la ingestión. Cuando el glucomanano purificado se usa con finalidades funcionales, puede absorber agua en el tracto gastrointestinal, hinchándose rápidamente y dando lugar a potenciales obstrucciones. Por tanto, se recomienda su ingestión junto con un vaso de agua, para ayudar a fluidificar la zona, facilitar su tránsito y evitar el riesgo de obstrucción.
- Efectos sobre la biodisponibilidad de fármacos: esta fibra forma una matriz que puede disminuir la absorción de fármacos, sobre todo si se toma en forma purificada. Es recomendable ingerir el glucomanano de forma separada a cualquier tratamiento farmacológico oral para evitar interacciones que afecten a la biodisponibilidad del fármaco.

#### 1.2.4. La espirulina

La Espirulina (*Arthrospira*), es una cianobacteria perteneciente a la familia *Oscillatoraceae*. Pertenece a la clase de cianobacterias con características de capacidad fotosintética (Deng y Chow, 2010). El término “Espirulina” ha sido utilizado para referirse indistintamente a dos géneros: *Arthrospira*, reportado por primera vez por Stizenberger en 1852, y *Spirulina*, que fue descrito por Turpin en 1829; así como a dos especies de cianobacterias, *Spirulina platensis* (Geitler, 1932) y *Spirulina maxima* (Geitler, 1925), con relevancia económica y sanitaria, ya que son cultivadas y vendidas para elaborar una gran cantidad de productos a los que se les atribuyen propiedades nutritivas y de prevención de la salud (Ramírez-Moreno y Olvera-Ramírez, 2006).

Los principales aspectos que diferencian el género *Spirulina* del género *Arthrospira* son el tipo de hélice que presentan los tricomas, la ausencia de septos celulares visibles al microscopio óptico y el patrón que presentan los poros de la pared celular. Además, las especies del género *Spirulina* son de menor tamaño que las del género *Arthrospira* y no contienen ácido  $\gamma$ -linolénico, mientras que *Arthrospira* sí. Los géneros *Arthrospira* y *Spirulina*, por tanto, son distintos y, en realidad, las especies *S. platensis* y *S. maxima* pertenecen al género *Arthrospira* (Sánchez y cols., 2003; Sili y cols., 2012; Sotiroidis y Sotiroidis, 2013; Tomaselli y cols., 1997). En la actualidad, ninguna especie perteneciente al género *Spirulina* es comestible (Sili y cols., 2012).

El uso del término ha generado gran controversia, de forma que en la bibliografía pueden encontrarse referencias a estas cianobacterias como microalgas verde-azuladas (Miranda y cols., 1998). De cualquier forma, en la actualidad el término “espirulina” se usa tan ampliamente que parece inevitable que dicha terminología se siga manteniendo, especialmente en el caso de las especies cultivadas comercialmente y vendidas como “espirulina”; sin embargo, debe ser escrito “espirulina” es decir, sin itálicas Vonshak, (1997). Por tanto, durante la presente Memoria de Tesis Doctoral se empleará la palabra espirulina para hablar de la especie *Arthrospira platensis* empleada en el estudio.

La Espirulina crece de forma natural en reservas de agua alcalina con un alto contenido en sales, en zonas subtropicales y tropicales de Norteamérica, Asia, y África central (Sili y cols., 2012; Vonshak, 1997). Existen evidencias sobre el uso de esta cianobacteria en el México precolombino: en el lago de Texcoco la *A. maxima* era abundante y los habitantes de esa región la utilizaban como alimento, llamado *tecuítlatl* (nombre náhuatl que significa “excremento de piedras”), en una dieta basada en maíz,

frijol, calabaza, jitomate, chile, chíá, amaranto y espirulina, entre otros (Barros y Buenrostro, 1999). En Kanem, un pueblo de en la región del Lago de Chad, se consume un puré seco llamado *dihé* ("madre de la salsa") en forma de galletas o bizcochos. Tras su análisis se descubrió que esencialmente contenían a la cianobacteria *A. platensis* (Ramírez-Moreno y Olvera-Ramírez, 2006).

Entre el gran número de especies de espirulina, las especies *A. platensis* y *A. maxima* se han investigado de manera más amplia, debido a que son comestibles, con alto valor nutricional y con alto potencial terapéutico (Sili y cols., 2012; Vonshak, 1997; Iyer, 2008; Kahn y Flier, 2000; Karkos y cols., 2008).

El valor nutricional de la espirulina se debe a su alto contenido en proteína (60-70% de peso seco) y su riqueza en vitaminas, minerales, ácidos grasos esenciales y otros nutrientes (Sili y cols., 2012). La **tabla 1.7** muestra el contenido en macro y micronutrientes de la espirulina, así como el de fitonutrientes. Debido a ese valor nutricional, en la década de los setenta del pasado siglo se creó el "Instituto intergubernamental para el uso de la micro-alga espirulina contra la malnutrición", para promover a la espirulina como alimento de gran valor nutricional en la lucha del hambre y malnutrición en el mundo (Ahsan y cols., 2008). También fue recomendada tanto por la Administración Nacional de Aeronáutica y el Espacio (NASA) como por la Agencia Europea del Espacio (ESA) como uno de los alimentos principales durante las misiones espaciales de larga duración.

El consumo de espirulina como suplemento dietético ha demostrado beneficios para la salud en la prevención o tratamiento de enfermedades cardiovasculares, DMT2 y otras enfermedades metabólicas (Deng y Chow, 2010; Kahn y Flier, 2000; Karkos y cols., 2008), relacionándose con mejoras sobre el estatus antioxidante, el perfil lipídico (efectos hipocolesterolemiantes e hipolipemiantes), el control de la glucemia, la protección hepática, la vasorregulación y la inmunomodulación; y efectos contra diversas mutaciones y virus, entre otros (Fujimoto y cols., 2012; Jensen y cols., 2015; Samuels y cols., 2002; Torres-Duran y cols., 2007).

Los citados beneficios de la espirulina pueden atribuirse a los diferentes compuestos de interés que contiene:

- **$\beta$ -carotenos:** Los carotenos son un grupo de pigmentos liposolubles, responsables de una amplia variedad de colores de los vegetales, (Ramírez-Moreno y Olvera-Ramírez, 2006). *A. platensis* contiene  $\beta$ -carotenos, que se metabolizan a retinol (vitamina A), por lo que también se les conoce como provitamina A. Estos compuestos han demostrado propiedades antioxidantes

(Jáuregui y cols., 2011) e inmunomoduladoras<sup>15</sup>. Estudios epidemiológicos han demostrado una correlación entre el incremento en el consumo de carotenos y la reducción de enfermedades coronarias y ciertos tipos de cáncer, así como de una posible acción hepatoprotectora (Ramirez-Moreno 2006).

- **Ficobiliproteínas:** macromoléculas componentes del aparato fotosintético de las cianobacterias, se dividen en tres grupos: ficoeritrina, ficocianina y aloficocianina. Estas moléculas están contenidas en partículas llamadas ficobilisomas (Apt y Behrens, 1999). La ficocianina es un componente de gran importancia en las algas verde-azules, constituyendo hasta un 15% de su peso seco (Jensen y cols., 2015). Algunas de las propiedades farmacológicas de la ficocianina son: actividad antioxidante<sup>16</sup>, hepatoprotectora, antiinflamatoria<sup>17</sup>; y en el tratamiento de la colitis. Mejoras en perfil lipídico y glucemia también son atribuibles a esta ficobiliproteína (Jensen y cols., 2015).
- **Polifenoles:** actúan como captadores de radicales libres, e inducen proteínas moduladoras de la defensa antioxidante celular así como su expresión génica. En un estudio específico sobre la capacidad antioxidante de extractos de *A. maxima*, se encontró que los compuestos fenólicos responsables de sus propiedades antioxidantes son ácidos orgánicos como el caféico, clorogénico, quinico, salicílico, sinápico y trans-cinámico (Jensen y cols., 2015).
- **Exopolisacáridos:** la espirulina, posee estructuras superficiales adicionales tales como vainas, cápsulas o mucílago disperso, compuestos principalmente de polisacáridos y que durante el crecimiento de las células en cultivos estacionarios son liberados al medio provocando que éste se vuelva más viscoso. Estos polisacáridos solubles en el medio son fácilmente recuperables, por lo que se han sugerido diferentes aplicaciones en biomedicina y en la industria cosmética y de alimentos, como agentes emulsificantes, estabilizantes o espesantes (Chamorro y cols., 2002). Particularmente, de *Arthrospira* se ha aislado el polisacárido sulfatado llamado Ca-SP, que inhibe la replicación del VIH, *Herpes simplex*, citomegalovirus humano, virus de la influenza A, paperas y sarampión (Chamorro y cols., 2002). También, desde 1992 los japoneses han producido continuamente los exopolisacáridos de esta cianobacteria como substitutos del agar-agar (Ramirez-Moreno 2006).

---

<sup>15</sup> Se produjeron incrementos en la resistencia a infecciones virales, bacterianas y fúngicas (Ramirez-Moreno 2006).

<sup>16</sup> Esta actividad antioxidante se debe a la presencia de su grupo cromóforo, la ficocianobilina. Estudios in vitro señalan a la ficocianina como captadora de radicales peroxilo, hidroxilo, así como reactiva con peroxinitros y ácido hipocloroso, reduciendo así el estrés oxidativo (Hirata y cols., 1999; JensenGitte 2015)

<sup>17</sup> La actividad antiinflamatoria se produce por inhibición selectiva de la actividad de ciclooxigenasa-2 (COX-2)

- **Lípidos:** El contenido de lípidos presente en la espirulina oscila entre un 6 y 13%, del cual la mitad son ácidos grasos. De los ácidos grasos presentes los que se encuentran en mayor proporción son los ácidos palmítico,  $\gamma$ -linolénico, linoleico y oleico. El ácido  $\gamma$ -linolénico es un ácido graso insaturado, que rara vez está presente en la dieta diaria y que desempeña un papel importante en la modulación de la respuesta inflamatoria, siendo precursor del ácido dihomo- $\gamma$ -linolénico y del ácido araquidónico. A partir del ácido dihomo- $\gamma$ -linolénico se produce tromboxano A1, prostaglandinas de la serie 1 y leucotrienos de la serie 3; mientras que el ácido araquidónico origina tromboxano A2, prostaglandinas de la serie 2 y leucotrienos de la serie 4. Los eicosanoides derivados del ácido dihomo- $\gamma$ -linolénico son menos activos y, en algunos casos, se ha definido que pueden ser antiinflamatorios, mientras que los derivados del ácido araquidónico son proinflamatorios y quimioatrayentes, en el caso del tromboxano A2, potente vasoconstrictor y proagregante plaquetario (Sánchez-Muniz, 2003). El ácido  $\gamma$ -linolénico reduce también, en cierta medida, la colesterolemia (Sánchez y cols., 2003; Jensen y cols., 2015), por lo que representa una alternativa en el manejo de enfermedades cardiovasculares y en el control de peso. Entre las fuentes que contienen  $\gamma$ -linolénico, la espirulina es la que presenta mayor concentración (Jensen y cols., 2015). Se piensa que el ácido  $\gamma$ -linolénico tiene efectos positivos en el Parkinson y la esclerosis múltiple, en la síntesis de la membrana celular (Ramírez-Moreno y Olvera-Ramírez, 2006; Gutiérrez-Salmeán y cols., 2015).
- **Proteínas, vitaminas y minerales:** La espirulina es un alimento altamente nutritivo, dado su alto contenido de proteínas (60-70% de peso seco) y aminoácidos esenciales. Estas proteínas son de fácil digestión y metabolización, recomendándose como complemento de cereales comunes. En cuanto a vitaminas se refiere, como lo muestra la tabla 1.7, la espirulina es rica en provitamina A y vitamina B<sub>12</sub>, la primera importante en la prevención de enfermedades oculares y la segunda de gran valor para el tratamiento de la anemia perniciosa (Sánchez y cols., 2003). Los minerales que aporta este alimento serían hierro, calcio y fósforo, de gran valor biológico por su elevada absorción y biodisponibilidad.

Tabla 1.7. Composición de macro- y micronutrientes por cada 100 g. de la <i>A. platensis</i> .			
Composición proximal (g)		Vitaminas (mg)	
Humedad	4-9	Vitamina A (como $\beta$ -caroteno)	140
Proteína	63	Vitamina K	1,09
Cenizas	3-11	Tiamina HCl (Vitamina B1)	0,5
Energía	1504 kJ	Rivoflavina (Vitamina B2)	4,53
Macronutrientes		Niacina (Vitamina B3)	14,9
Grasa total (g)	4,3	Vitamina B6 (Piridox. HCl)	0,96
Grasas saturadas	1,95	Vitamina B12	0,16
Grasas poliinsaturadas	1,93	Minerales (mg)	
Ac. Palmítico (16:0)	0,48-0,87	Calcio	468
Ac. Palmotólico (16:1, $\omega$ -6)	0,04-0,08	Hierro	87,4
Ac. Esteárico (18:0)	0,03-0,04	Fósforo	961
Ac. Oléico (18:1, $\omega$ -6)	0,19-0,34	Yodo	0,14
Ac. Linoléico (18:2, $\omega$ -6)	0,21-0,23	Magnesio	319
Ac. Gamma linoléico (18:3, $\omega$ -6)	0,33-0,77	Zinc	1,45
Grasas monoinsaturadas	0,26	Selenio	0,03
Colesterol	< 0,1	Cobre	0,47
Carbohidratos totales (g)	17,8	Manganeso	3,26
Fibra dietética	7,7	Cromo	<0,40
Azúcares	1,3	Potasio	1,66
Lactosa	< 0,1	Sodium	641
Aminoácidos esenciales (mg)		Fitonutrientes (mg)	
Histidina	1000	Ficocianina	17,2%
Isoleucina	3500	Chlorophyll	1,2%
Leucina	5380	Carotenoides totales	504
Lisina	2960	$\beta$ -caroteno	211
Metionina	1170	Zeaxantina	101
Fenilalanina	2750		
Treonina	2860		
Triptófano	1090		
Valina	3940		
Aminoácidos no esenciales (mg)			
Alanina	4590		
Arginina	4310		
Ácido aspártico	5990		
Cisteína	590		
Ácido glutámico	9130		
Glicina	3130		
Prolina	2380		
Serina	2760		
Tirosina	2500		

Tomado y modificado de: (Holman y Malau-Aduli, 2013) y Gutiérrez-Salmeán y cols. (2015).

La espirulina lleva utilizándose como alimento desde hace cientos de años sin mostrar toxicidad aparente. En los últimos tiempos se han llevado a cabo distintos

ensayos clínicos para comprobar su poca o nula toxicidad, se ha demostrado su nula toxicidad –ni aguda ni crónica- por lo tanto, puede usarse de manera segura como un alimento humano. Los niveles de este alga, probados durante el análisis toxicológico fueron mayores que los de cualquier consumo humano previsto. Por lo tanto, podría asumirse que no existe ningún riesgo toxicológico que se relacione con el uso actual de esta cianobacteria como una fuente de proteína en los alimentos (Gutierrez-Salmeán 2015).

### **1.3. EVALUACIÓN DE LOS ALIMENTOS FUNCIONALES**

Como se señaló en el capítulo 1.2, para que un alimento pueda ser considerado funcional, ha de demostrar de una manera objetiva unas propiedades beneficiosas en la reducción de riesgo de padecer una enfermedad o en la mejora de la misma o de alguno de sus síntomas. Para poder realizar una evaluación científicamente válida, es necesario en primer lugar establecer unos parámetros o marcadores biológicos que cambien entre la situación normal del organismo y en el padecimiento de la enfermedad a estudiar (Olmedilla-Alonso y cols., 2013).

Una vez decididos estos parámetros, se trata de decidir el método más adecuado y/o viable para estudiar el cambio en los mismos.

Por último hay que evaluar los resultados y, desde un punto de vista estadístico, determinar si los alimentos utilizados han producido cambios significativos, y en sentido positivo o beneficioso para la salud, en los marcadores estudiados.

Nuestro equipo de investigación tiene una amplia experiencia en la evaluación de alimentos funcionales, como demuestra la participación en los proyectos AGL 2001-2398-C03-03 sobre el desarrollo de productos cárnicos funcionales, AGL 2005-07204-C02-01 sobre la elaboración de cárnicos conteniendo algas marinas, CSD2007-00016 sobre reestructurados cárnicos saludables, AGL 2008-04892-C03-02 sobre los alimentos estudiados en la presente Memoria de Tesis Doctoral, AGL-2011-29644-C02-02, sobre la incorporación de aceite de chía a reestructurados cárnicos o el AGL 2014-53207-C2-2-R sobre el desenterol en una matriz de proteína animal.

### 1.3.1. Marcadores del síndrome metabólico

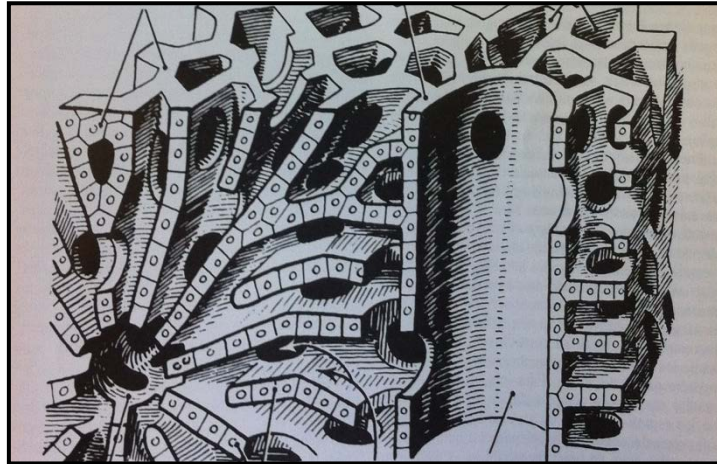
Durante todo el capítulo de introducción de la presente Memoria de Tesis Doctoral se han descrito los principales cambios fisiometabólicos que se producen en el síndrome metabólico. Siguiendo el razonamiento del apartado anterior, hemos tratado de seleccionar aquellos parámetros que de una forma más sencilla y fiable nos puedan indicar los posibles beneficios de nuestros alimentos potencialmente funcionales. En los siguientes apartados se detallan dichos marcadores, así como su significado fisiológico.

#### 1.3.1.1. Hígado

El hígado es el órgano más voluminoso del organismo, situándose en la cavidad abdominal, debajo del diafragma y ocupa la mayor parte del hipocondrio derecho y del epigastrio. En una rata adulta pesa entre 8 y 10 g. y está dividido en cuatro lóbulos: el lóbulo medio o cavidad quística, lóbulo lateral derecho, lóbulo izquierdo y el lóbulo caudado (American College of Laboratory Animal Medicine Series, 1979) (**figura 1.6**) Cada lóbulo está dividido en numerosos lobulillos por vasos sanguíneos de pequeño calibre y por cordones fibrosos que forman el armazón de sostén (cápsula de Glisson) para los mismos.

Los lobulillos hepáticos, unidades anatómicas que forman esta víscera son cilindros hexagonales o pentagonales pequeños. Por el centro de cada lobulillo hepático pasa una rama de pequeño calibre de la vena hepática; alrededor de la vena central o intralobulillar los hepatocitos están dispuestos en columnas que irradian hacia afuera (**figuras 1.6 y 1.7**). Tres conjuntos de tubos diminutos: ramas de la arteria hepática, de la vena porta (venas intralobulillares) y del conducto hepático (vías biliares interlobulillares) se disponen alrededor de cada lobulillo. De estas zonas se extienden ramas irregulares (sinusoides) de las venas interlobulillares entre las columnas radiadas de hepatocitos para desembocar en la vena central. De esta manera análoga hay ramas de las vías biliares interlobulillares que se disponen entre cada dos hileras de células hepáticas. En la rata no existe vesícula biliar, por lo que el

hígado drena bilis al intestino directamente sin almacenamiento en dicha vesícula American College of Laboratory Animal Medicine Series, 1979).



**Figura 1.6.** Estructura tridimensional hepática mostrando los cordones hepáticos y los espacios porta. Tomado de Schultz-Moreira (2013).

Desde el punto de vista histológico, la unidad estructural de los elementos parenquimatosos y vasculares de hígado es el acino hepático. Está dispuesto de tal manera que le permite cumplir su función de guardián interpuesto entre la entrada de sustancias procedentes del trato digestivo y el resto del organismo. De esta forma está capacitado para captar sustratos, transformarlos, almacenarlos, distribuirlos o eliminarlos.

El hígado cuenta con un número muy abundante de células principales o hepatocitos. Es responsable de multitud de funciones endocrinas y metabólicas, gracias a que dispone de un polo vascular (sinusoides) y otro biliar (canalículos), lo que les permite realizar multitud de funciones metabólicas y exocrinas. El hígado desempeña un papel esencial en el metabolismo de los nutrientes. Los excesos y defectos en la dieta, la presencia de ciertos xenobióticos (tóxicos, fármacos), o la ruta de administración de los nutrientes (parenteral) pueden originar lesiones hepáticas.

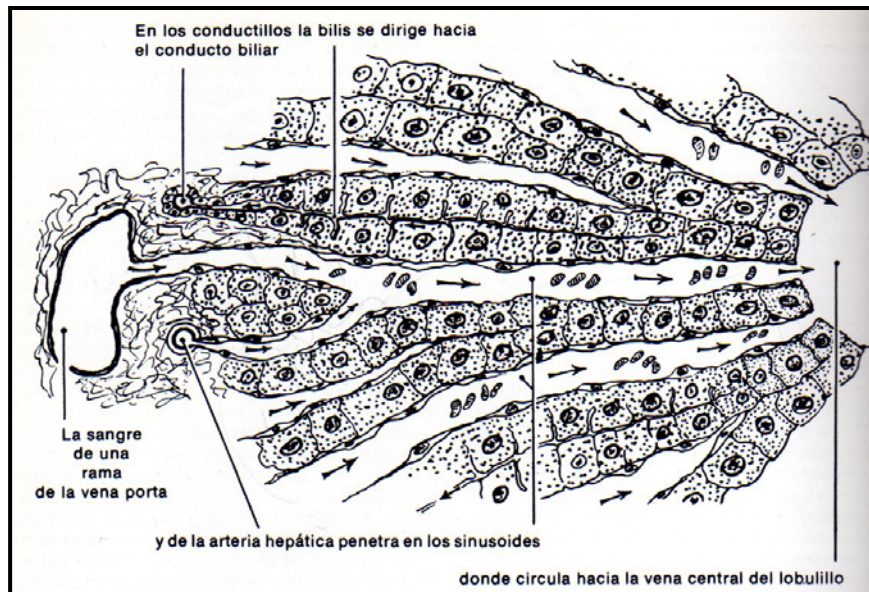


Figura 1.7. Estructura hepática mostrando la estructura de los espacios porta y las relaciones entre sistema vascular y sistema biliar. Tomado de Schultz-Moreira (2013).

Las principales funciones del hígado, y por tanto de los hepatocitos, están relacionadas con el:

**a) Metabolismo de los hidratos de carbono**

- Glucogenogénesis
- Glucogenolisis
- Gluconeogénesis

**b) Metabolismo de las proteínas y aminoácidos**

- *Pool* de aminoácidos libres
- Síntesis proteica

**c) Metabolismo de los lípidos**

- Síntesis hepática de ácidos grasos
- Metabolismo hepático de colesterol
- Síntesis de apos
- Empaquetamiento de VLDL (y posiblemente de LDL)
- Captación de QM, VLDL, IDL, LDL, Lp(a), HDL

**d) Síntesis de sales biliares**

**e) Destoxificación de sustancias endógenas (bilirrubina, colesterol) o exógenas (xenobióticos).**

Por tanto, su importancia nutricional es innegable, ya que proporciona una fuente continua de energía para el organismo. La capacidad hepática para almacenar y modular la disponibilidad de nutrientes está regulada por diversos factores locales y por la demanda energética de los órganos periféricos y del cerebro. Está regulado por señales endocrinas pancreáticas, suprarrenales, tiroideas, y nerviosas. El hígado regula el flujo de nutrientes durante la fase postprandial para una metabolización rápida celular y almacenamiento en el propio hígado, en el tejido adiposo o en otras células. Durante la fase postabsortiva (interprandial, ayuno) el hígado contribuye, mediante la liberación o síntesis *de novo* de nutrientes a satisfacer las necesidades metabólicas del organismo. Además de los hepatocitos se encuentran otras células cuyas funciones se detallan en la **tabla 1.8**.

El hígado puede alterar su funcionalidad por diversas causas debidas a infecciones, tóxicos, xenobióticos, isquemia, trastornos genéticos etc. Según En términos generales el hígado presenta tres tipos de repuestas patológicas a las diferentes noxas etiológicas: a) la necrosis hepatocitaria, asociada a grados variables de inflamación, que usualmente no producen insuficiencia hepatocelular o lo hacen de forma leve y que se recupera completamente por regeneración; b) una respuesta similar a la anterior pero con insuficiencia hepatocelular aguda grave y fallo multiorgánico que en muchos casos conduce a la muerte del paciente, pero a veces presenta recuperación total; c) necrosis hepatocitaria moderada con carácter inflamatorio de carácter crónico que se acompaña tanto de fenómenos de regeneración como de fibrosis. Esta última conduce al cuadro de cirrosis. La obstrucción del flujo biliar, denominada colestasis, es la manifestación habitual de las enfermedades de las vías biliares. Cuando dicha obstrucción afecta al árbol biliar extrahepático, su etiología es litiásica o tumoral. La colestasis intrahepática que afecta a ramas menores del árbol biliar, puede tener consecuencias fisiopatológicas graves.

La inclusión en las dietas experimentales de colesterol y ácido cólico para aumentar la absorción del esteroles es una pauta experimental muy frecuente que conduce a la elevación del colesterol plasmático transportado fundamentalmente por VLDL enriquecidas en colesterol ( $\beta$ -VLDL, similares a las IDL humanas). Aunque no se conocen bien los mecanismos íntimos este proceso bloquea parcialmente la excreción de bilis y tiende a inducir hipertrofia hepática con acúmulo de grasa (esteatosis) caracterizado por elevación marcada tanto de colesterol esterificado, principalmente en forma de colesterol oleato, pero también de triglicéridos (Viejo y cols., 2003). En situaciones crónicas de consumo de colesterol y ácido cólico, la rata desarrolla hipercolesterolemia severa, presentando el hígado un aspecto blanquecino, siendo

totalmente friable. En esta situación es común observar inflamación lobular o portal con lesión celular o fibrosis y presencia de infiltrados de células mononucleares. En muchos casos se observan hepatocitos con vacuolizaciones grasas de distinta forma y tamaño y número (Bocanegra, A. y cols., 2009; Schultz, Moreira y cols., 2013). Es muy probable que este acúmulo de lípidos conduzca a estrés oxidativo, lo que provoca peroxidación de las lipoproteínas de membrana del hepatocito produciendo citoquinas y ligando Fas. No hay olvidar que el colesterol también es susceptible de ser oxidado formando oxisteroles, que iniciarían un proceso inflamatorio y degenerativo. En muchos casos este hígado graso se presenta habitualmente en pacientes o animales de experimentación con cierto grado de obesidad y mayor elevación de la enzima alanina aminotransferasa (ALT), que se localiza fundamentalmente en el citosol del hepatocito, por lo que se la denomina (unilocular), mientras que la enzima aspartato aminotransferasa (AST) está localizada sobre todo en la mitocondria y en el citosol, por lo que se la llama enzima bilocular. Esta última está presente, además del hígado, en otros órganos y células como son, en orden de abundancia, miocardio, músculo esquelético, riñones, cerebro, páncreas, pulmón, leucocitos y eritrocitos.

Tabla 1.8. Funciones más relevantes de las células hepáticas	
Tipo celular no parenquimatosos	Funciones
Células endoteliales	Barrera funcional entre sangre y hepatocitos Captación mediada por receptores Pinocitosis Endocitosis (partículas <0,1 µm) Presentación de ectoenzimas (lipasas) Síntesis de moléculas efectoras (PEG <sub>2</sub> , citoquinas, etc.)
Células de Kupffer (macrófagos)	Fagocitosis (microorganismos, células tumorales, eritrocitos) Endocitosis (endotoxinas, complejos inmunitarios) Procesado de antígenos Citotoxicidad (superóxido, efectos antitumorales) Señalizadores comunicación intercelular (PI3K, TNF)
Células estelares (de Ito, lipocitos)	Almacenes de vitamina A Síntesis de proteínas de la matriz extracelular Regulación contráctil del flujo sanguíneo Expresión y secreción de factores de crecimiento
Células de Pit	Citolíticas naturales (natural killer)

Tomado de Schultz-Moreira (2013).

#### 1.3.1.1.1. Histología

La esteatosis no alcohólica, también conocida como “hígado graso” (NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease), es la forma más frecuente de esteatosis. Aunque no siempre se acompaña de lesión hepática, se trata de una de las causas fundamentales de cirrosis hepática. Se puede observar hepatomegalia y el hígado adopta un aspecto moteado y blando. Al microscopio óptico se observa como los hepatocitos muestran gotas lipídicas que pueden ser pocas y de gran tamaño, típico de lesiones crónicas; o ser pequeñas y abundantes, más frecuentemente en lesiones agudas. Según las causas que la genere, las gotas lipídicas se pueden acumular en diferentes partes del órgano: en la congestión hepática la grasa se acumula preferentemente en el centro del lobulillo (esteatosis centrolobulillar). Tras largos períodos de ayuno, por ejemplo, se observaría esteatosis perilobulillar. Si estos procesos se acompañan de hepatitis se acaba produciendo necrosis que desembocará en fibrosis hepática. La esteatosis suele aparecer a causa de la ingesta de azúcares o grasas en grandes cantidades, relacionándose con obesidad, DMT2, hiperlipidemia y, por lo tanto, con el síndrome metabólico. Se valora objetivamente siguiendo unos valores de puntuación o “scores” determinados:

- Esteatosis: Suele predominar el tipo macrovesicular. Si los depósitos son importantes puede llegar a afectar a todo el lobulillo. Pueden asociarse lipogranulomas y quistes grasos. Se cuantifica en función del % de lobulillo afectado: leve (0-33%), moderada (33-66%) y grave (>66%). Si existen zonas de esteatosis microvesicular contiguas, añaden valor al “score”.
- Balonización hepatocelular: Se trata de hepatocitos hinchados, tumefactos, finamente granulares. Se localizan típicamente cerca de los hepatocitos con esteatosis. Su lisis provoca fenómenos de “dropout” identificables con la técnica de reticulina. Se cuantifica en: leve o moderada/marcada.
- Inflamación: Suele ser leve, de tipo mixto y con afectación lobulillar más que portal. Se cuantifica en ausencia o presencia valorando el número de focos por 20 campos en la afectación lobulillar y la inflamación portal.
- Fibrosis: Inicialmente se observa con disposición pericelular o en “red de gallinero”. Posteriormente puede desarrollar fibrosis portal, fibrosis en puentes y cirrosis.
- Lipogranulomas: Nódulo de tejido graso necrótico asociado a una inflamación granulomatosa o a una reacción de cuerpo extraño que rodea al depósito de un material inyectado que contiene una sustancia oleosa. Se cuantifican por el

número de focos por 20 campos. Los de tamaño grande anaden valor al “score”.

#### *1.3.1.1.2. Marcadores de estrés oxidativo*

El estrés oxidativo genera alteraciones en todo el organismo, desde pequeñas alteraciones mitocondriales a inflamación crónica, por lo que sus biomarcadores son innumerables. En esta memoria de Tesis Doctoral se decidió estudiar el sistema antioxidante endógeno, que tal y como se explica en el capítulo 1.1.5.1, consiste en:

- Superóxido dismutasa. Tiene como función la transformación de radicales  $O_2^{\cdot -}$  en  $H_2O_2$ .
- Catalasa, cataliza dos tipos de reacciones, actuando muy eficazmente sobre el  $H_2O_2$ .
- Glutation peroxidasa. Su sustrato reductor específico es el GSH, que da lugar a glutacion oxidado.
- Glutation reductasa, cataliza la reducción del GSSG a dos moléculas de GSH.
- Glutation reducido, puede disminuir con la edad, debido a un incremento de la tasa de oxidación o una disminución del recambio de GSH debido a una mayor utilización o degradación y/o por una menor biosíntesis.
- El balance entre las moléculas de glutacion oxidadas y reducidas se determina por el cálculo del índice redox  $[GHS/(GSH+GSSG)]$ , cuyos valores reducidos pueden ser síntoma de toxicidad celular.
- La enzima colesterol-7- $\alpha$ -hidroxilasa (CYP7A1) es una enzima de la familia del citocromo P450, que ayuda a liberar el colesterol hepático a través de los ácidos biliares, generando radicales libres en este proceso.
- Se ha determinado la actividad arilesterasa (AE), una de las actividades de la paraoxonasa (PON-1). Esta enzima juega un papel central evitando la presencia de lipoproteínas oxidadas (Vázquez-Velasco y cols., 2011), preferentemente LDL (LDL-ox), pero también ha demostrado que puede ejercer de enzima “suicida” (Aviram y Rosenblat, 2004), actuando y gastándose para proteger a otros

sistemas antioxidantes, con lo que se le atribuye un efecto pleiotrópico (Aviram y cols., 1998).

De forma general, se puede señalar que los niveles elevados de cualquiera de estas sustancias, a excepción de la CYP7A1, sería un síntoma de protección antioxidante. La elevación de la CYP7A1, si bien indica una mejora en la reducción de colesterolemia a través de los conductos biliares, implicaría un aumento del estrés oxidativo.

#### *1.3.1.1.3. Marcadores de inflamación*

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) es una citoquina liberada por las células del sistema inmunitario que interviene en la inflamación. En el hígado estimula la reacción inflamatoria aguda, activando la síntesis de proteína C reactiva y otros mediadores celulares. Se encuentra elevada en caso de inflamación o diversos grados de daño celular.

El óxido nítrico forma parte de la regulación de numerosos procesos como la dilatación vascular, bajada de presión arterial, neurotransmisión y funciones cardiovasculares y renales (Bian y cols., 2008). Se sintetiza a partir de la L-arginina en presencia de NADPH y O<sub>2</sub>, con la participación de las óxido nítrico sintasas (NOS). Los distintos miembros de la familia NOS están codificados por diferentes genes, de modo que existen tres isoformas: dos son constitutivas (nNOS, óxido nítrico sintasa neuronal; y eNOS, óxido nítrico sintasa endotelial) y la tercera es inducible (iNOS, óxido nítrico sintasa inducible). Las isoformas constitutivas están presentes en las células del organismo y libean óxido nítrico a niveles basales. En caso de daño tisular debido a inflamación y/o estrés oxidativo, se estimula la producción de iNOS, que genera cantidades mucho mayores y mucho más eficientemente que las otras dos enzimas. Por lo tanto, se puede establecer un índice de inflamación eNOS/(eNOS+iNOS) que nos daría una idea del estado de inflamación tisular. El óxido nítrico formado en grandes cantidades tiene propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, si bien se ha reportado que el exceso en su producción podría tener cierto efecto citotóxico (Bian y cols., 2008).

### 1.3.1.2. Tejido adiposo

El tejido adiposo consiste en una agrupación de células grasas o adipocitos que se mantienen unidos mediante fibras de colágeno. Otros tipos de células que se encuentran en el interior de este tejido, formando el denominado estroma vascular, son los fibroblastos, células del estroma, pre-adipocitos, leucocitos y macrófagos.

Hasta 1994 el tejido adiposo fue considerado principalmente como un depósito de triglicéridos tras el consumo de energía y la liberación de ácidos grasos cuando el gasto energético superaba la ingesta. Otra función conocida de este tejido fue la de aislamiento térmico, ayudando a mantener la temperatura corporal. Ese mismo año se descubrió el gen obesógeno que codifica la leptina; lo que supuso la nueva concepción del tejido adiposo como órgano endocrino regulador de procesos metabólicos e inmunitarios a través de la secreción y percepción de hormonas peptídicas y citoquinas.

Como órgano de reserva energética, el tejido adiposo blanco puede acumular, en forma de triglicéridos, cerca del 90% de la grasa corporal. Esta capacidad de almacenamiento se ve regulada por el crecimiento o disminución de la masa adiposa total. Tal hipertrofia se produce mediante la adipogénesis, en la que los fibroblastos se diferencian a pre-adipocitos, que más tarde madurarán a adipocitos cargados de grasa. De este modo, el tamaño y la forma de los adipocitos se adaptan a las demandas del balance energético. Este balance, a su vez, se determina por la cantidad de síntesis de ácidos grasos a partir de acetil-coenzima A y su catabolismo y oxidación. Algunos de los ácidos grasos liberados tras la lipólisis son reesterificados en triglicéridos en los adipocitos. En la obesidad, la cantidad elevada de ácidos grasos libres circulantes se relaciona con un aumento de la resistencia a la insulina y aterosclerosis. El acúmulo excesivo de estos ácidos grasos puede dar lugar a lipotoxicidad en otros órganos como músculo, hígado o páncreas.

El tejido adiposo, como órgano endocrino, secreta sustancias que modifican tanto el apetito como el metabolismo de hormonas sexuales. Dichas sustancias reciben el nombre de adipocitoquinas (**tabla 1.9**) y juegan un papel importante en la regulación fisiológica, tanto tisular como sistémica. Un desequilibrio de estas sustancias está relacionado con la patogénesis de la obesidad. La expresión de algunas adipocitoquinas, como TNF- $\alpha$ , IL-6 o la adiponectina es dependiente del tamaño y localización de los adipocitos.

Entre las adipocitoquinas, merecen especial mención leptina y la adiponectina. La leptina es un marcador que regula la homeostasis energética a través de la supresión del apetito e incremento del gasto de energía. Sus niveles son proporcionales a la cantidad de tejido adiposo, estando muy elevados en obesidad. Sin embargo, en esta situación patológica, la leptina no es capaz de reducir el apetito, por lo que se sugiere una resistencia a la leptina. La adiponectina, por el contrario, se relaciona de forma inversa a la masa del tejido adiposo, y sus niveles se reducen durante la obesidad. No obstante, la elevación artificial de la adiponectinemia no indujo pérdida de peso (Bakker y cols., 2010) Se acepta que su función principal sea la de regular la glucemia, a través del aumento de la sensibilidad a la insulina.

Tabla 1.9. Principales citoquinas secretadas por el tejido adiposo		
Adipocitoquina	Fuente	Función
Leptina	Adipocitos	Saciante
Adiponectina	Adipocitos	Sensibilizante a la insulina Antiinflamatorio
Resistina	Adipocitos	Incrementa la resistencia a la insulina Promueve disfunción endotelial
Adipsina	Adipocitos, monocitos, macrófagos	Limitante del factor del complemento Estimula almacenaje de TG
Proteína de estimulación de la acilación	Adipocitos	Estimula almacenaje de TG
Apelina	Adipocitos	Fisiología cardiovascular
Amiloide sérico A	Adipocitos	Inflamación sistémica Aterosclerosis
Vaspina	Adipocitos	Sensibilidad a la insulina
Omentina	Células del estroma	Captación de glucosa mediada por insulina
Glucoproteína Cinc- $\alpha$ 2	Adipocitos	Movilización de lípidos
Lipocalina 2	Adipocitos, Macrófagos	Secreción de TNF- $\alpha$
<i>Secreted frizzled-related protein</i>	Adipocitos	Mimético de la insulina
Proteína de unión al retinol	Adipocitos, Hígado, Macrófagos	Resistencia a la insulina
<i>Chemerin</i>	Adipocitos	Adipogénesis y captación de glucosa
Inhibidor del factor activador del plasminógeno 1	Células del estroma	Fibrinólisis
Visfatina	Adipocitos, Macrófagos	Quimiotáctico sobre monocitos
Proteína similar a la angiopoyetina	Adipocitos	Inflamación local y vascular
Proteína quimioatrayente de monocitos	Adipocitos	Recluta monocitos a zonas de daño e inflamación
TNF- $\alpha$	Adipocitos, Células del estroma	Inflamación Antagoniza las señales de la insulina
Angiotensinógeno	Adipocitos	Diferenciación de adipocitos Sensibilidad a la insulina
IL-6	Adipocitos, Células del estroma	Según la fuente y la diana
IL-18	Células del estroma	Inflamación de amplio espectro

Modificado a partir de (Hoevenaars, 2014).

#### *1.3.1.2.1. Densidad mitocondrial*

Las mitocondrias son las principales fuentes energéticas de la célula, ya que transforman los nutrientes en energía a través del proceso de respiración celular (Wallace, 2005). Numerosas patologías están relacionadas con alteraciones de la función mitocondrial (Petersen y cols., 2003), hecho que se ha comprobado por la conjunción observada entre factores de riesgo cardiovascular y metabólico y baja capacidad aeróbica o la reducción de la expresión en músculo de genes relacionados con la biogénesis mitocondrial y la fosforilación oxidativa (Wisløff y cols., 2005). En humanos, la resistencia a la insulina en el músculo esquelético se ha asociado con menor proporción entre fibras musculares de tipo 1 u oxidativas y las de tipo 2 o glucolíticas; con una capacidad reducida de generación de adenosín trifosfato (ATP) y con una menor expresión de los genes que controlan la actividad mitocondrial (Petersen y cols., 2003; Mootha y cols., 2003; Patti y cols., 2003). Por lo tanto, una disminución de la expresión de los genes mitocondriales con respecto a la expresión de los genes nucleares indicaría el grado de densidad mitocondrial del tejido adiposo y, por lo tanto, sería un indicador de resistencia a la insulina y estatus metabólico de ese tejido.

#### *1.3.1.3. Plasma*

##### *1.3.1.3.1. Marcadores de metabolismo hidrocarbonado*

Para evaluar la presencia de DMT2 y resistencia a la insulina, se han usado los siguientes parámetros e índices calculados a partir de ellos:

- Glucosa: con puntos de corte  $\geq 126$  mg/dL para hiperglucemia y  $\geq 200$  mg/dL para hiperglucemia severa.
- Insulina: con puntos de corte  $\geq 6$  U/L para hiperinsulinemia y  $\geq 15$  U/L para hiperinsulinemia severa.
- HOMA-IR, cuyos valores elevados dan idea de una mayor resistencia a la insulina.
- HOMA-IS, al elevarse indica una mayor sensibilidad a la insulina.

- HOMA-B, indica funcionalidad de las células  $\beta$  pancreáticas.
- HOMA-D, considerado un índice de la disponibilidad de insulina para las células.
- QUICKI, de manera similar al HOMA-IS, indica la sensibilidad a la insulina.
- TyG, considerado recientemente como un marcador de la resistencia a la insulina y síndrome metabólico.

#### *1.3.1.3.2. Metabolismo lipoproteico*

Para los animales de experimentación estudiados, se han empleado los siguientes puntos de corte señalados por (Sanchez-Muniz y Bastida, 2008):

- Colesterolemia:  $\geq 100$  mg/dL para hipercolesterolemia;  $\geq 200$  mg/dL para hipercolesterolemia severa.
- Índice colesterol/fosfolípidos: 1-2 para hipercolesterolemia moderada;  $> 2$  para hipercolesterolemia severa.
- Trigliceridemia: 100-150 mg/dL para hipertrigliceridemia moderada;  $> 150$  mg/dL para hipercolesterolemia severa.

#### *1.3.1.3.3. Enzimas de daño hepático*

La aspartato aminotransferasa (AST) es una enzima que se encuentra en varios tejidos del organismo de los mamíferos, especialmente en el corazón, el hígado y el tejido muscular. Se encuentran cantidades elevadas de esta enzima en el suero en casos de hepatopatía aguda, por el empleo de determinados fármacos y en cualquier enfermedad o trastorno en el cual resulten seriamente dañadas las células. También se encuentra presente en hematíes, miocardio, músculo esquelético, riñón y cerebro, por lo cual ante la presencia de daño en cualquiera de estos sitios también elevará su concentración sérica. La AST forma parte del perfil hepático que se realiza en la clínica

con el fin de evaluar la función del hígado y sus intervalos de normalidad oscilan entre las 6-8 y las 34-40 UI/L, dependiendo del sexo.

La alanina aminotransferasa (ALT) es eminentemente hepática, aunque puede aparecer en pequeñas concentraciones en riñones, corazón y tejido muscular. Los intervalos de normalidad de esta enzima son de 7-33 UI/L en mujeres y 8-50 UI/L en hombres. Si existe una lesión en cualquiera de estos órganos, la ALT aumenta en el plasma. La ALT aparece más elevada en determinadas patologías del hígado que la AST, ya que es más específica de este órgano. El cociente AST/ALT ha sido definido como un importante indicador de la esteatohepatitis no alcohólica, en cuyo caso el valor será menor de 1.

La fosfatasa alcalina (ALP) es una hidrolasa más efectiva en un entorno alcalino, responsable de eliminar grupos fosfatos de varios tipos de moléculas como nucleótidos, proteínas y alcaloides. Estas enzimas proceden de la ruptura normal de las células sanguíneas y de otros tejidos, muchas de ellas no tienen un papel metabólico en el plasma excepto las enzimas relacionadas con la coagulación y con el sistema del complemento. Las fosfatasas alcalinas son enzimas que se encuentran presentes en casi todos los tejidos del organismo, siendo particularmente alta en huesos, hígado, placenta, intestinos y riñón. Tanto el aumento, así como su disminución en plasma tienen significado clínico. Las causas de un aumento de ALP: anemia, obstrucción biliar, enfermedad ósea, consolidación de una fractura, hepatitis, hiperparatiroidismo, leucemia, enfermedad hepática, cánceres óseos osteoblásticos, osteomalacia, enfermedad de Paget y raquitismo.

#### *1.3.1.3.4. Otros marcadores de daño*

Como parámetros plasmáticos relevantes en la evaluación de potenciales efectos funcionales sobre el síndrome metabólico, se han seleccionado, además de los expuestos en los apartados anteriores, las enzimas creatinquinasa (CK) y láctico deshidrogenasa (LDH). Ambas presentan altas concentraciones en el músculo cardíaco, y en casos de inflamación o daño tisular, serían vertidas al torrente sanguíneo. Sus niveles serían, por lo tanto, proporcionales al daño cardíaco. Garcimartin y cols. (2015) considera a la LDH un marcador de necrosis celular; y según Sanchez-Muniz y cols. (1995), esta enzima podría utilizarse como marcador de daño hepático.

#### 1.4. MODELOS ANIMALES DE SÍNDROME METABÓLICO

Cuando se realizan estudios en humanos, existen una amplia variedad de parámetros que hacen que la interpretación de los datos sea muy complicada. (Thorburn y cols., 1990; Bantle y cols., 2000). Los factores sociológicos, etnológicos o proporción y tipo de grasa consumidos en la dieta, por ejemplo, se unen a la susceptibilidad individual generando confusión en la discusión de resultados.

Sin embargo, existen modelos animales en los que estas variables pueden ser acotadas, lo que sin duda alguna resulta de gran ayuda para esclarecer los mecanismos fisiopatológicos de las alteraciones propias del síndrome metabólico. Existen diversos modelos de experimentación animal para el estudio de las dislipidemias, DMT2 o la resistencia a la insulina, clasificándose estos en modelos inducidos o espontáneos (TABLA 1.9).

Los modelos inducidos son los que no desarrollan la patología de forma normal sino que precisan de alguna intervención a través de cirugía o algún tratamiento farmacológico para llegar a las condiciones fisiopatológicas óptimas para el estudio, como, por ejemplo, el uso de rotenona en ratas Wistar para la inducción de Parkinson (Gomez Del Rio y cols., 2013).

Los modelos espontáneos son aquellos cuya estirpe permanece relativamente inalterada mediante cruces endogámicos a partir de animales en los que se ha detectado la patología de forma espontánea, o bien mediante cruces selectivos favoreciendo un determinado fenotipo. Aunque generalmente desarrollan la patología de forma natural, hay veces que requieren modificaciones dietéticas que colaboren a su desarrollo.

Existen diferentes animales modificados genéticamente que desarrollan síndrome metabólico y DMT2. Entre los más estudiados se encuentran los ratones ob/ob, que carecen de leptina funcional y presentan hiperfagia, obesidad, intolerancia a la glucosa e hiperinsulinemia. El metabolismo de los ratones ob/ob es normal al nacimiento, pero tras el destete aparece la hiperinsulinemia y obesidad. Sus células  $\beta$  pancreáticas producen más insulina de forma basal que los ratones normales, de modo que desarrollan resistencia a la insulina. El síndrome metabólico en los individuos adultos se puede revertir mediante la administración de leptina o la transfección del gen para la leptina. Otros modelos para el síndrome metabólico relacionados con la carencia del receptor de leptina son los ratones db/db o las ratas fa/fa. En estos casos, la administración de leptina no es capaz de modificar los

marcadores de síndrome metabólico. La limitación en estos estudios es que la leptina, además de participar en la obesidad y DMT2, tiene otros efectos en el organismo, lo que condiciona otras variables en este modelo (Larqué y cols., 2011).

Tabla 1.9. Clasificación de los modelos animales de diabetes mellitus tipo 2	
A. Modelos espontáneos	
1. Modelos análogos	
– La rata Goto-Kakizaki (GK)	
– El ratón obeso de Nueva Zelanda (NZO)	
– El ratón KK	
– <i>Psammomys obesus</i> (rata israelí de la arena)	
– La rata OLETF ( <i>Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rat</i> )	
2. Modelos intrínsecos	
– El ratón <i>db/db</i>	
– El ratón <i>ob/ob</i>	
– El ratón <i>Agouti</i>	
– La rata Zucker ( <i>fa/fa</i> )	
B. Modelos inducidos	
1. Inducción hormonal	
2. Administración de fármacos	
3. Manipulación genética	

Modificado a partir de Arias-Díaz y Balibrea (2007).

#### 1.4.1. La rata *fa/fa*

También conocida como ZDF (Zucker Diabetic Fatty rat), aludiendo a su característico fenotipo obeso. La mutación “fatty” (*fa*) fue publicada por Zucker and Zucker en 1961, siendo un cruce entre la cepa M de Merck y ratas Sherman. Los animales homocigotos para el alelo *fa* (*fa/fa*) poseen un receptor de la leptina afuncional. Esta deficiencia modifica el balance de péptidos a nivel del sistema nervioso central y concretamente en las áreas del cerebro involucradas en la regulación del peso corporal. Su efecto final es un aumento de péptidos orexigénicos, como son el neuropéptido Y, la galanina, las orexinas, la hormona concentradora de melanina o la ghrelina.

Debido a todo lo citado, desarrollan una importante hiperfagia, que se puede apreciar a partir de los diecisiete días de edad. Esta hiperfagia se acusa especialmente durante el período de crecimiento, que comprende las primeras dieciséis semanas de vida. Entre la tercera y la quinta semana se advierten síntomas

claros de obesidad. En el proceso de crecimiento, las ratas desarrollan una importante expansión del tejido adiposo, tanto por un aumento del número como por el del volumen de sus adipocitos, especialmente en el tejido adiposo subcutáneo. La lipogénesis es muy intensa en las ratas jóvenes, tanto que alrededor de su decimocuarta semana de vida, su composición corporal consta de más de un 40% de lípidos. Al llegar a adultas, pueden llegar a tener un peso hasta un 60% más elevado que una rata normal de su misma edad.

Algunos tratamientos farmacológicos y dietéticos han conseguido reducir la hiperfagia de estos animales y su peso corporal. Sin embargo, no se ha conseguido normalizar la composición corporal, que ronda siempre una proporción de lípidos del 50% aproximadamente. Este es un dato relevante, ya que implica que no es necesaria la hiperfagia para la expresión de las alteraciones que acompañan al síndrome de obesidad de las ratas Zucker. Al restringir el aporte calórico, estos animales responden con una disminución del número de adipocitos, pero no con una disminución de su volumen.

Por todo ello, la rata Zucker es el modelo genético de obesidad humana de comienzo precoz mejor conocido y más ampliamente usado.

La obesidad, como ya se ha comentado, se relaciona con la inflamación crónica, observándose una producción anormal de mediadores inflamatorios, como el TNF- $\alpha$  e iNOS. Hovernars (2014) propone que la rápida expansión del tejido adiposo no sucede en paralelo a la vascularización del mismo, produciéndose cierto grado de hipoxia que lleva a la síntesis y liberación de adipocitoquinas, entre las que se incluyen varias moléculas muy activas. Entre ellas figuran la leptina y también otras citocinas clásicas, como TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1 e IL-185. Por eso el TNF- $\alpha$  está sobreexpresado en la obesidad, y este factor, entre otros, induce la resistencia a la insulina que caracteriza a este modelo de obesidad. La sobreexpresión de esta adipocitoquina induce una activación de la NADPH oxidasa, y por ello en estos animales se produce más cantidad de anión superóxido y disfunción endotelial, lo que relacionaría la obesidad con la inflamación y el estrés oxidativo.

La rata Zucker obesa es también un modelo experimental de resistencia a la insulina, DMT2 y de dislipemia tipo IV muy extendido (Mathe, 1995), ya que presenta rasgos muy semejantes a los que caracterizan el síndrome metabólico humano, así como hiperinsulinemia secundaria a la resistencia periférica a la insulina. Hay que señalar que el modelo presenta limitaciones porque, a diferencia de los ratones db/db y ob/ob, su hiperglicemia es discreta, existiendo variaciones entre colonias. Este

modelo presenta tanto resistencia a la insulina, como inadecuada compensación por parte de la célula  $\beta$ . Esto último parece depender de un defecto transcripcional en la célula  $\beta$ , que se hereda independientemente de la mutación del receptor de la leptina y la resistencia a la insulina. Por tanto, pueden considerarse como un modelo de DMT2.

Además de resistencia a la insulina, esta rata desarrolla dislipemia, intolerancia a la glucosa e hiperinsulinemia. La hiperinsulinemia se puede apreciar a partir de la tercera semana de vida, y se cronifica en estos animales. A nivel histológico, se observa cómo los islotes de Langerhans aumentan en número y se hipertrofian moderadamente. Es frecuente además apreciar daños renales.

Diversas investigaciones señalan al incremento en la actividad de la LPL del tejido adiposo como una de las primeras lesiones relacionadas con la mutación de la rata fa/fa, ya que, por ejemplo, se correlaciona con el aumento en la captación de TG por este tejido. Esta alteración precede en el tiempo al incremento de la lipogénesis hepática y la hiperinsulinemia. El incremento de la actividad LPL del tejido adiposo de estas ratas es rebelde al tratamiento dietético, y se ha propuesto que sería capaz de potenciar la hiperfagia de este modelo animal.

Estas ratas presentan una sobreproducción de lipoproteínas en el hígado que promueve hiperlipemia e hiperlipoproteinemia, teniendo el plasma de estos animales aspecto lechoso, ya que contenido de ácidos grasos y colesterol es respectivamente unas 4 y 10 veces mayor que lo normal. Presentan un aumento de VLDL y HDL pero, aunque presentan una disminución de la expresión de los receptores hepáticos para las LDL, no tienen aumento del LDL-colesterol, lo que podría suponer una limitación como modelo de aterogénesis. Sin embargo, se puede incrementar el LDL-colesterol en estos animales con suplementos dietéticos de grasa saturada y colesterol. De este modo, se puede decir que el incremento de los TG totales se acumula en las VLDL; y el de de colesterol, a las fracciones VLDL y HDL. (Lin, 1985) puso de manifiesto claras diferencias entre las ratas fa/fa machos y hembras, ya que el aumento sérico de colesterol en las hembras obesas estaba causado principalmente por el alto contenido de colesterol libre asociado a las VLDL, mientras que en los machos el colesterol sérico, se transportaba prioritariamente como ésteres de colesterol con HDL. La alta concentración de colesterol libre en las hembras no se debía a una deficiencia en la actividad de la LCAT, pero la actividad de esta enzima aumentaba en los machos obesos Lin., 1985). La actividad de la hidroximetilglutaril-CoA reductasa hepática iba disminuyendo cuando las ratas maduraban, y disminuía de forma más acusada en los machos.

A continuación se reseñan diversas diferencias entre el metabolismo de las lipoproteínas en humanos y en ratas:

- El punto de corte según la densidad entre las LDL y las HDL varía, siendo en la rata 1,057 g/mL, en lugar de los 1,063 g/mL propios de la especie humana.
- Según Sánchez-Muniz y Bastida (2008), la rata presente normocolesterolemia cuando sus niveles de colesterol son <100 mg/dL (<2,58 mmol/L). También se considera marcador de normocolesterolemia cuando la relación colesterol/fosfolípidos es <1. En este animal se diagnostica hipercolesterolemia moderada el colesterol del plasma se encuentra entre 100 y 200 mg/dL (2,58 - 5,17 mmol/L) o cuando existe una relación colesterol/fosfolípidos >1; mientras que la hipercolesterolemia severa con niveles de colesterol  $\geq$ 200 mg/dL ( $\geq$ 5,17 mmol/L).
- En la rata, la concentración de LDL es muy inferior a la de humanos ya que sólo un 10% de la apo B de las VLDL es transferida a las LDL (Bilheimer y cols., 1972), siendo el 90% restante aclarado del plasma principalmente por vía hepática (**figura 1.3**), como indicaron (Fidge y Poulis, 1975)
- En la rata, a diferencia del hombre, las HDL constituyen la fracción lipoprotéica que más colesterol transporta. La fracción principal es la HDL<sub>2</sub>, y su contenido lipídico es similar al de los humanos, pero no su contenido en apo, ya que tienen más apo A-IV y apo E, y menos apo A-II.
- Las ratas carecen de CETP, por lo que las HDL no transfieren su contenido a otras lipoproteínas, sino sólo al hígado, por lo que estos animales constituyen un modelo muy útil para estudiar la tasa de transporte reverso de colesterol.

Nuestro equipo lleva años estudiando el efecto que produce la ingesta de dietas hipercolesterolemiantes en la rata. La inclusión de colesterol y ácido cólico o bilis en la dieta induce en la rata hipercolesterolemia grave (Bocanegra, y cols., 2006). Las ratas hipercolesterolemicas se caracterizan por presentar niveles elevados de  $\beta$ -VLDL (VLDL enriquecidas en colesterol similares a las IDL humanas) y bajos niveles de HDL (Sánchez-Muniz y cols., 2006). Esta disminución de HDL puede ser debida al aumento del transporte reverso de colesterol para normalizar la colesterolemia, posiblemente ligado a un incremento en la actividad de los receptores ABCA1 y SR-B1 (Bastida y cols., 2007). En estas mismas ratas, los ácidos grasos poliinsaturados  $\omega$ -3 parecen incrementar el transporte reverso de colesterol y disminuyen tanto las VLDL+LDL como las HDL (Bastida y cols, 2007) normalizando los niveles de colesterol y el perfil lipoprotéico.

Por otra parte, la presión arterial sistólica de las ratas obesas es menor que la de las ratas delgadas control entre las ocho y las doce semanas de vida. A las veinticuatro semanas se observa que el fenómeno se invierte, y a las veintiocho semanas la presión arterial sistólica de las ratas obesas es significativamente mayor que la de las ratas delgadas. Este hecho no depende la hiperfagia ni del incremento de peso corporal o de la retención renal de sodio, lo que hace que resulte controvertido el empleo de ratas fa/fa como modelo de tensión arterial elevada. Kurtz y cols. (1989) señalan que las ratas Zucker podrían considerarse prehipertensas cuando son jóvenes e hipertensas a partir de las 25-30 semanas de vida. Sin embargo, emplear ratas Zucker fa/fa de tan avanzada edad no sería adecuado, ya que generalmente su salud se encuentra ya muy deteriorada.

Las ratas envejecidas presentan una respuesta disminuida a la acetilcolina, lo que justificaría parcialmente la hipertensión de estos animales. Existen evidencias de la producción de angiotensina II en el tejido adiposo. La hipertrofia de este tejido aumentaría sus niveles, provocando vasoconstricción y generando gran cantidad de ROS, vinculado con cierta disfunción endotelial.

En resumen, las ratas Zucker obesas son un modelo de obesidad genética que se asemeja en muchos aspectos al síndrome metabólico humano, ya que estos animales, además de la obesidad que los caracteriza, acusan varias anomalías endocrinas habituales también en estos pacientes. Algunos de los conocimientos actuales sobre la asociación entre obesidad e inflamación están ayudando a comprender mejor las características de este modelo experimental.

## **2. INTERÉS DEL ESTUDIO**

---





Durante los últimos años se ha observado un importante aumento de la prevalencia del síndrome metabólico, así como de todas sus patologías constituyentes (obesidad, DMT2, dislipidemias, hipertensión, etc.). Estas enfermedades provocan una disminución considerable de la esperanza y calidad de vida, así como de la productividad de las personas que las padecen, y un incremento del gasto sanitario que compromete la viabilidad de los diferentes sistemas sanitarios.

La prevención, mediante la modificación de la dieta y el estilo de vida, constituye una estrategia emergente para paliar o reducir tales efectos adversos atribuidos a dichas enfermedades crónicas. Esta atención creciente hacia todos los aspectos que mejoran la calidad de vida de los consumidores está favoreciendo además el desarrollo de nuevos alimentos funcionales, para así mejorar la salud y prevenir la aparición de ciertas enfermedades.

Existe amplia evidencia científica de los beneficios de un mayor consumo de pescado en la dieta. Los pescados y los derivados de la pesca de un valor comercial más bajo pueden servir para la elaboración de surimis que, además de mantener un alto valor nutricional, son una excelente matriz para la incorporación de ingredientes funcionales.

Por su parte, el estudio de la fibra dietética, especialmente aquella de naturaleza soluble y fermentable, constituye un campo de investigación muy activo, existiendo numerosos nuevos alimentos que la contienen, dadas las propiedades de salud que se atribuyen a dicho componente de nuestra alimentación. A este respecto, el *Amorphophallus konjac*, con una amplia tradición de consumo en países asiáticos, genera una harina muy rica en fibra soluble, fermentable y formadora de geles, con propiedades saciantes, hipocolesterolemiantes y antidiabéticas.

La *Spirulina platensis*, una microalga rica en minerales y compuestos antioxidantes, consumida en forma de tortas en países africanos, también está siendo objeto de activa investigación y desarrollo de alimentos a los que se añade.

De hecho, una búsqueda bibliográfica por fechas (**Figura 2.1-3**) en la base de datos PubMed, desvela que el número de publicaciones en los que se estudian estos compuestos se ajusta a un modelo exponencial, lo que sugiere el interés creciente, tanto científico como metodológico, por estos productos que permita justificar su incorporación en nuevos alimentos y la comprobación de su funcionalidad tanto en modelos experimentales como en el ser humano. A este respecto conviene señalar

que existen muy pocos estudios sobre las propiedades del consumo de surimi de calamar, y ninguno anterior a las investigaciones de nuestro equipo referente al surimi de calamar enriquecido con glucomanano o glucomanano con espirulina.

La incorporación a una matriz de amplia aceptación e imagen saludable como es el surimi de calamar, tanto de Konjac glucomanano como de espirulina, permitiría por un lado mejorar su contenido en fibra, micronutrientes y otros componentes, dando un “valor añadido” a este producto; y por otro, obtener alguno de los beneficios atribuidos al glucomanano y/o espirulina (p. ej. antioxidantes y facilitadoras del metabolismo de carbohidratos y lípidos), cuando se consuman de forma adecuada y en el contexto de dietas equilibradas y balanceadas. Este valor sería aun mayor si se demostrara beneficios del consumo de estos derivados de la pesca conteniendo ingredientes potencialmente funcionales en el contexto de dietas desequilibradas e incorrectas como las consumidas en la actualidad por la población de países occidentales.

### Estudios sobre surimi indexados por año

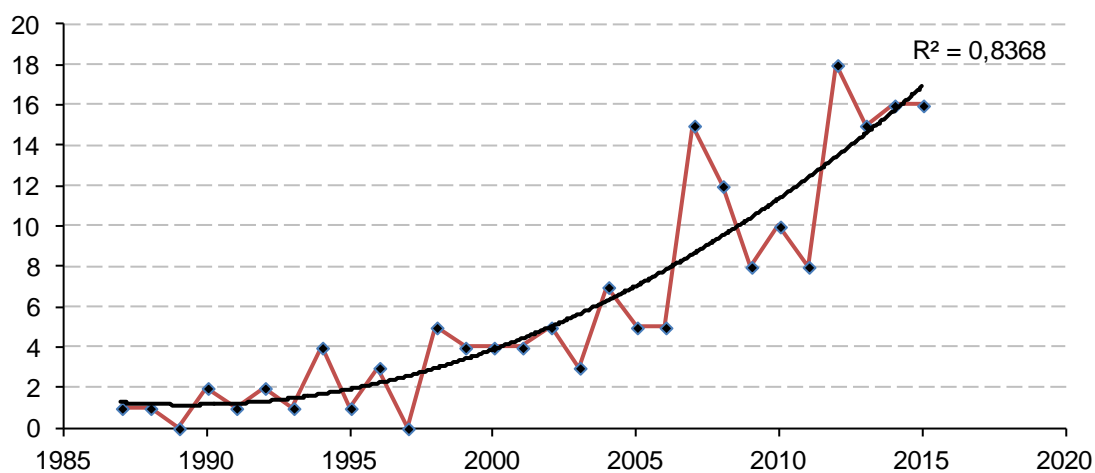


Figura 2.1. Análisis de los estudios encontrados sobre “surimi” en la base de datos PubMed

### Estudios sobre glucomanano indexados por año

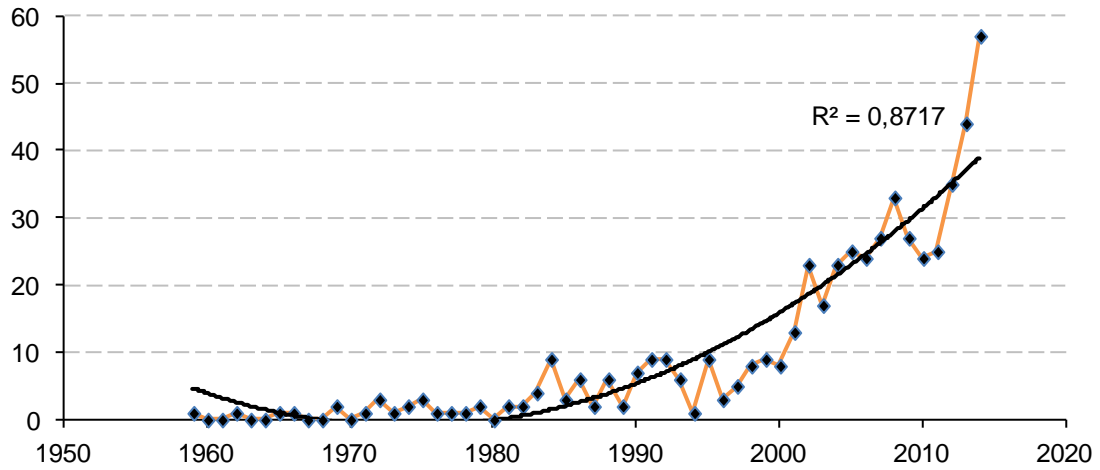


Figura 2.2. Análisis de los estudios encontrados sobre "glucomanano" en la base de datos PubMed

### Estudios sobre espirulina indexados por año

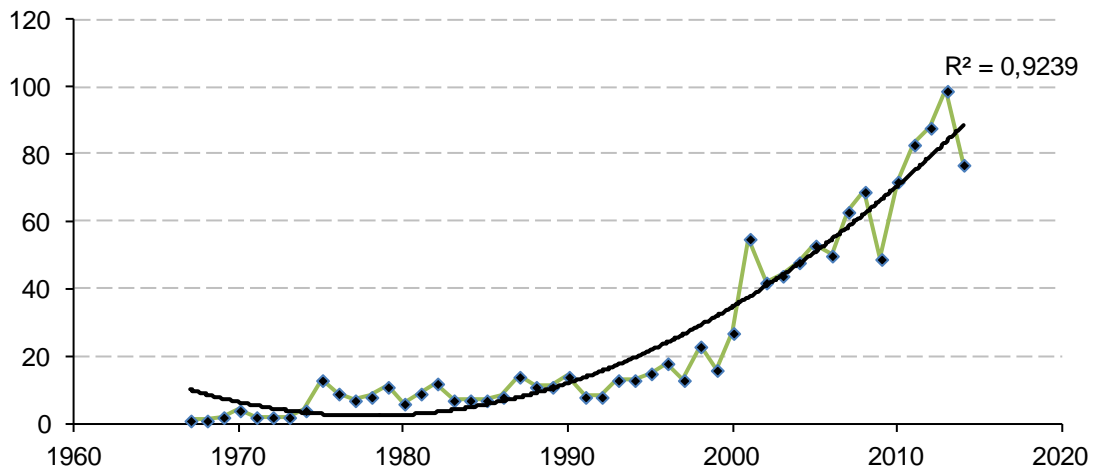


Figura 2.3. Análisis de los estudios encontrados sobre "espirulina" en la base de datos PubMed



### **3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

---





El desarrollo de alimentos funcionales se basa en modificar la composición de los alimentos tradicionales, de manera que se una vez obtenidos, se demuestre que tienen una acción beneficiosa sobre una o varias funciones del organismo y/o reduzcan el riesgo de padecer alguna enfermedad.

Por ello, la hipótesis de este trabajo es que el consumo de dietas hipersaturadas, enriquecidas o no en colesterol, en las que se incluye surimi de calamar conteniendo glucomanano o glucomanano y espirulina como ingredientes funcionales, promueve una mejora o un retraso en el desarrollo del síndrome metabólico, modificando uno o varios de sus componentes asociados (p.e. obesidad, dislipemia, hiperglucemia y tensión arterial elevada)

Para tratar de demostrar esta hipótesis, esta Tesis Doctoral tiene como **Objetivo Central** evaluar la actividad funcional potencial del surimi de calamar enriquecido con glucomanano o glucomanano y espirulina sobre diferentes marcadores del síndrome metabólico, en un modelo experimental de dicha enfermedad, la rata Zucker obesa.

De forma más concreta, se plantean a su vez los siguientes **objetivos primarios** relacionados con el consumo de dietas experimentales conteniendo surimi de calamar enriquecido con glucomanano o glucomanano y espirulina en ratas fa/fa:

- Cuantificar los efectos sobre la ingesta, ganancia de peso y tasas de crecimiento entre las cinco y las trece semanas de vida.
- Analizar su impacto sobre el tamaño y la estructura de los órganos internos de dichos animales, con especial mención del hígado y corazón.
- Determinar su influencia sobre la lipemia y la cantidad y composición de las lipoproteínas plasmáticas.
- Estudiar los efectos sobre la expresión génica, actividad y niveles de enzimas y otros biomarcadores de la actividad antioxidante.
- Evaluar su influencia sobre los marcadores de daño e inflamación celular y tisular.
- Conocer su impacto sobre la glucemia, insulinemia y marcadores de resistencia a la insulina y/o diabetes mellitus tipo 2.
- Determinar la incidencia sobre el metabolismo graso en el tejido adiposo midiendo la densidad mitocondrial.



## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

---





#### 4.1. PREPARACIÓN DE LAS DIETAS EXPERIMENTALES SURIMI DE CALAMAR

En la elaboración de las dietas experimentales de surimis enriquecidos con glucomanano y espirulina empleadas en este trabajo, se emplearon los siguientes componentes:

- Surimi de calamar gigante (*Dosidicus gigas*), proporcionado por el grupo de productos pesqueros VALSAL, perteneciente al Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTAN).
- Dieta AIN-93M modificada (Purified Rodent Diet, DYETS, Inc. Bethlehem, Pennsylvania, EEUU).
- Glucomanano (*Amorphophallus konjac*) en polvo (Guinama, S.L.U. Valencia, España).
- Espirulina (*Arthrospira maxima*) cápsulas de polvo micronizado (Arkopharma, Madrid, España).
- Celulosa microcristalina en polvo (Sigma-Aldrich Co. España).

Para obtener un concentrado proteico a base de músculo de *Dosidicus gigas* con las mejores propiedades organolépticas posibles, se empleó el proceso establecido por (Sánchez-Alonso y cols., 2007) consistente en solubilización del músculo en pH ácido, lavado, filtrado y posterior precipitación isoeléctrica de las proteínas:

A partir del cuerpo eviscerado y separado de los tentáculos, se extraen las caras interna y externa, compuestas de tejido conectivo, y se pica el músculo.

El músculo picado fue solubilizado a pH $\approx$ 3 y después filtrado y lavado para eliminar cualquier impureza. Más tarde se eleva el pH hasta 4,5-5, punto isoeléctrico en el cual las proteínas miofibrilares precipitan en un decantador. El concentrado protéico fue congelado a una temperatura de -40°C hasta que el núcleo del producto llegó a -20°C. Se almacenó a -20°C hasta su empleo.

Para su inclusión en las dietas experimentales, los bloques de surimi, previamente congelados, se sometieron a un proceso de liofilización en un liofilizador LyoAlfa 10 freeze dryer (Teltar, Terrassa, Spain). Para ello, el surimi fue sometido a vacío de 0,03 mb durante 48 horas. Posteriormente se aumentó la temperatura hasta 20 °C. A continuación los liofilizados fueron reducidos a polvo fino en un molino (ZM 200, Retsch GmbH and Co., KG, Haan, Alemania) y posteriormente tamizados varias

veces a través de una malla de 0,25 mm para una fácil homogenización. La mezcla global (surimi más otros componentes) fue mezclada durante 1 minuto hasta homogenidad.

Se prepararon seis dietas experimentales (**tabla 4.1**):

- La dieta control sin colesterol añadido (C), compuesta por una mezcla homogénea, conteniendo 70% de dieta purificada para roedores (AIN-93M; Dyets, Inc., Bethlehem, PA, USA) y 30% de surimi de calamar con celulosa microcristalina añadida.
- La dieta con glucomanano sin colesterol añadido (G), que consistió en 70% de dieta purificada para roedores y 30% de surimi de calamar con un 15% de glucomanano.
- La dieta con glucomanano y espirulina (HGS), conteniendo 70% de dieta purificada para roedores, 30% de surimi de calamar con un 15% de glucomanano y 3 g de espirulina por cada kg de dieta.
- Las dietas con colesterol añadido (HC, HG y HGS) fueron equivalentes a las C, G y GS, respectivamente, más 2% de colesterol y 0,4% de ácido cólico como agente hipercolesterolemiante

Aproximadamente, el 48,9% de la energía de las dietas provino de hidratos de carbono, el 18,6%, de proteínas; y el 32,5%, de grasa.

Tabla 4.1. Composición (g/kg) de las dietas experimentales <sup>a</sup>						
	C diet	G diet	GS diet	HC diet	HG diet	HGS diet
Almidón de maíz	213.49	254.66	254.66	189.48	230.65	230.65
Celulosa microcristalina	49.41	8.23	8.23	49.41	8.23	8.23
Colesterol	0.00	0.00	0.00	20.02	20.02	20.02
Ácido cólico	0.00	0.00	0.00	3.99	3.99	3.99
Surimi de calamari	300.00	255.00	255.00	300.00	255.00	255.00
Glucomanano	0.00	45.00	45.00	0.00	45.00	45.00
Espirulina	0.00	0.00	3.00	0.00	0.00	3.00
TOTAL	1000.00	1000.00	1003.00	1000.00	1000.00	1003.00
Energy content (kJ/kg diet)	13332.84	14175.78	14230.21	12970.95	13813.89	13868.32

C: AIN-93M (70%) + Control squid-surimi (30%); G: AIN-93M (70%) + Glucomannan enriched squid-surimi (30%); GS: AIN-93M (70%) + Glucomannan plus spirulina enriched squid-surimi (30%). HC: AIN-93M (70%) + Control squid-surimi (30%) + hypercholesterolemic agent (2% cholesterol and 0.4% cholic acid); G: AIN-93M (70%) + Glucomannan enriched squid-surimi (30%) + hypercholesterolemic agent (2% cholesterol and 0.4% cholic acid); GS: AIN-93M (70%) + Glucomannan plus spirulina enriched squid-surimi (30%) + hypercholesterolemic agent (2% cholesterol and 0.4% cholic acid).<sup>a</sup>Other ingredients (g/kg diet): casein, 105.0; palm olein, 115.29; dyetrose (carbohydrate composition: monosaccharides, 10; disaccharides, 40; trisaccharides, 50; tetrasaccharides and higher, 900), 108.5; sucrose, 70.0; AIN-93M mineral mix, 29.75; AIN-93VX vitamin mixture, 12.16; choline bitartrate, 3.06; L-cystine, 1.26; t-butylhydroquinone, 0.02. Mineral mix #210050 24.5; Vitamin mix #310025, 162.07. AIN-93M mineral mix (g/kg): calcium carbonate, 357.00; potassium phosphate monobasic, 250.00; potassium citrate.H<sub>2</sub>O, 28.00; sodium chloride, 74.00; potassium sulfate, 46.60; magnesium oxide, 24.00; ferric citrate U.S.P., 6.06; zinc carbonate, 1.65; manganous carbonate, 0.63; cupric carbonate, 0.30; potassium iodate, 0.01; sodium selenate, 0.01025; ammonium paramolybdate.4H<sub>2</sub>O, 0.00795; sodium metasilicate.9H<sub>2</sub>O, 1.45; chromium potassium sulfate.12H<sub>2</sub>O, 0.275; lithium chloride, 0.0174; boric acid, 0.0815; sodium fluoride, 0.0635; nickel carbonate, 0.0318; ammonium vanadate, 0.0066; finely powdered sucrose, 209.806. AIN-93VX vitamin mixture (g/kg): niacin, 3.00; calcium pantothenate, 1.60; pyridoxine HCl, 0.70; thiamine HCl, 0.60; riboflavin, 0.60; folic acid, 0.20; biotin, 0.02; vitamin E acetate (500 IU/g), 15.00; vitamin B12 (0.1 %), 2.50; vitamin A palmitate, (150000 µg/g), 0.80; vitamin D<sub>3</sub> (10000 µg/g), 0.25; vitamin K<sub>1</sub>-dextrose mix (10 mg/g), 7.50; sucrose, 967.23.

## **4.2. DISEÑO EXPERIMENTAL**

Para los estudios incluidos en esta memoria de Tesis Doctoral se utilizaron cuarenta y ocho ratas Zucker fa/fa (Harlan Laboratories Models, S.L., Barcelona-Spain), de cinco semanas de edad y aproximadamente 120 g de peso; se mantuvieron en jaulas metabólicas individuales a una temperatura de  $22,3 \pm 1,8^{\circ}\text{C}$ , en ciclos de 12 horas de luz/oscuridad, con registros de peso y cantidad de comida consumida de dos en dos días. Las ratas tenían acceso *ad libitum* a agua y dieta. Durante un periodo previo de adaptación de una semana a las condiciones ambientales, los animales recibieron pienso estándar (Panlab, Barcelona, España). Posteriormente se distribuyeron en los diferentes grupos experimentales, de modo que cada grupo tuviera el mismo peso corporal promedio, y se sometieron durante siete semanas a las dietas experimentales comentadas en el apartado 4.1.

Las ratas fa/fa fueron atendidas conforme a la guía para el Uso y Cuidados de Animales (directiva 86/609/EEC de 24 de noviembre, 1986) modificada por la Directiva Europea 2003/65/CE de 22 de julio de 2003. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ciencia y Tecnología de España (proyecto AGL2011-29644-C02-02 y Consolider Ingenio 2010 #CSD2007-00016) y por el Comité de Ética de la Universidad Complutense de Madrid.

## **4.3. METODOS ANALÍTICOS**

### **4.3.1. Ingesta dietética, crecimiento e índice de eficacia alimentaria**

Durante el periodo experimental, se midió diariamente el consumo de alimento cada animal y se cuantificó en días alternos el peso corporal. El índice de eficacia alimentaria se calculó relacionando la ganancia de peso corporal (g) con la ingesta total de alimento (g).

### **4.3.2. Obtención de muestras**

Al final del periodo experimental, tras un periodo de ayuno de 14-15 horas, las ratas se anestesiaron, con inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (45 mg/kg de peso vivo), seguida de eutanasia por extracción de sangre de la aorta descendente. Las muestras de sangre fueron recolectadas con jeringa heparinizada. Mediante centrifugación a 3000 rpm 4°C durante 10 minutos de la sangre extraída, se obtuvo el plasma.

A continuación, se extrajeron los órganos seleccionados para el estudio: bazo, corazón, hígado, intestino delgado, riñones y tejido adiposo de localización perirrenal y gonadal. Dichos órganos fueron lavados con solución salina al 0.9%, cuidadosamente secados, pesados y congelados en nitrógeno líquido de forma inmediata, guardándose a -80°C (Thermo electro corporation, modelo 902 rel #2, Ohio, EE. UU.) hasta su análisis. El lóbulo derecho del hígado se conservó en formaldehído al 10% para su posterior análisis histológico.

### **4.3.3. Determinación de parámetros en hígado**

#### *4.3.3.1. Estudio histológico*

Las muestras del lóbulo mayor del hígado fueron fijadas inicialmente en formol tamponado al 10%, posteriormente en xilol y luego en soluciones alcohólicas de graduación creciente. Los tejidos ya deshidratados se incluyeron en un bloque de parafina para obtener secciones de cada muestra en un micrótopo (JUNG RM 2155, Leica®, Solms, Alemania). Las secciones de 5mm de espesor se sometieron a la acción de la hematoxilina y de la eosina. El estudio histológico se realizó en 3 secciones de cada hígado amplificando 4x, 10x y 20x, con la ayuda de un fotomicroscopio digital (Olympus BX50, Tokyo, Japón) con cámara DP50 integrada (Olympus BX50, Tokyo, Japón).

Para cuantificar el número de agregados linfoides portales y parénquimatosos, las necrosis por coagulación, los focos necro-inflamatorios, la inflamación periportal,

las mitosis, apoptosis, número de focos hemorrágicos, quistes grasos y células multinucleadas, se observaron 10 campos de cada preparación a 40x. El grado de degeneración hidrópica, vacuolar y grasa se puntuó de la siguiente manera: 1=0-10%, 2=10-30%, 3=30-60%, 4=50-80%, 5=80-100%. Las necrosis de células individuales, los focos necro-inflamatorios y la infiltración con células inflamatorias, y la presencia de megalocitos se puntuó de la siguiente manera: 1=leve; 2=moderado; 3=intenso; 4=severo. Para el tipo vacuolas la puntuación fue: 1=multivacuolar; 2=multivacuolar con alguna univacuolar.

#### *4.3.3.2. Concentración de proteínas en tejido*

Para determinar la concentración total de proteína, se diluyeron las muestras, una vez homogeneizadas, 1:100 (v/v) en NaOH 1N y se cuantificaron por el método de Bradford (1976) siguiendo el protocolo de referencia del reactivo de Bradford, utilizando para ello el reactivo azul de Coomassie (Sigma-Aldrich Chemical Co.). Para construir la curva patrón se empleó albúmina de suero bovino (Sigma-Aldrich Chemical Co.). Este método se basa en la reacción por fuerza iónica, entre grupos sulfonados ácidos presentes en el azul de Coomassie y grupos amino libres presentes en los aminoácidos básicos de la muestra, principalmente arginina, lisina e histidina. Los cambios de absorbancia medidos a 595 nm son directamente proporcionales a la concentración de proteína en la muestra. Los resultados se expresan en mg proteína/mL de extracto.

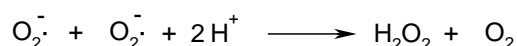
#### 4.3.3.3. Perfil antioxidante

##### 4.3.3.3.1. Actividades enzimáticas

###### A) Superóxido dismutasa hepática

- Fundamento:

La enzima SOD actúa eliminando el anión superóxido por un proceso de dismutación:



En la determinación de la actividad SOD, no está disponible en forma pura su sustrato, el radical superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), lo que implica que el  $\text{O}_2^{\cdot-}$  tiene que ser generado in situ en el sistema; lo cual complica de alguna forma su determinación. Además, este radical no es detectado fácilmente por técnicas analíticas convencionales, por lo que la mayoría de las determinaciones de la SOD están basadas en la inhibición de algunas reacciones químicas dependientes del  $\text{O}_2^{\cdot-}$ .

La cuantificación de los niveles de SOD en tejidos se realizó por la técnica de inhibición de la autooxidación del 1,2,3-bencenotriol o pirogalol (Marklund, 1985). Este fenol es muy susceptible a la autooxidación en presencia del radical superóxido. Esta propiedad se incrementa con el pH, alcanzando el óptimo a pH 8,2, por lo que el  $\text{O}_2^{\cdot-}$  está implicado inequívocamente en esta autooxidación.

La autooxidación del pirogalol por  $\text{O}_2^{\cdot-}$  está inhibida por la SOD, por lo que el grado de inhibición puede ser usado para evaluar la cantidad de SOD presente en la muestra.

- Técnica:

Se procede a homogenizar el tejido con tampón fosfato 50 mM (Panreac, Barcelona, España) pH= 7,4 (50 mg/ml). A continuación se centrifuga 20 min a 6.500 rpm (5° C). Los sobrenadantes obtenidos son mantenidos en frío hasta el momento de su utilización. En este método se emplean dos mezclas de reacción, una no catalizada, en la que se valora la autooxidación del pirogalol mediante la adición de la solución de 25 $\mu$ L de este compuesto (12mM pirogalol, Sigma-Aldrich Chemical Co., en 10 mM HCL, Panreac) sobre 775 $\mu$ L del tampón Tris-DTPA pH 8,2 (ácido dietilentriaminopentacético; Sigma-Aldrich Chemical Co, Madrid, España) pH= 8.2; y

una mezcla de reacción catalizada en la que se valora la inhibición de la autooxidación del pirogalol en presencia de la muestra. La reacción se inicia al añadir la solución de pirogalol sobre 25 $\mu$ L de la muestra biológica, en presencia de 75 $\mu$ L de tampón Tris-DTPA pH 8,2.

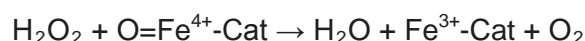
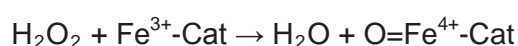
La cinética de aparición del producto de la autooxidación del compuesto se registra a 420 nm durante 2-3min. Se calcula el porcentaje de inhibición de la autooxidación y los resultados se expresan como unidades de actividad SOD. Una unidad de actividad enzimática se define como la concentración de enzima capaz de inhibir el 50% de la autooxidación de pirogalol. Los resultados fueron expresados en U/mg de proteína.

## B) Catalasa hepática

- Fundamento:

La actividad catalasa también llamada peróxido de hidrógeno oxidorreductasa se determinó utilizando el método descrito por Aebi (1984). La catalasa es una hemoenzima antioxidante que se encarga de eliminar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formado por la enzima SOD y por las oxidasas flavín dependientes (Ochoa y cols., 2003).

La actividad enzimática se mide a partir de la descomposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incorporado a las muestras biológicas. Según se degrada el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se produce la consecuente liberación de oxígeno, lo que implica un descenso continuo en la absorbancia del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



- Técnica:

El método consiste en homogenizar los tejidos con tampón fosfato 50mM (100mg tejido/mL tampón) y centrifugar durante 20min 6.500 rpm (4°C) para obtener el sobrenadante al cual se le añaden 100 $\mu$ L de Triton-X-100 (Sigma-Aldrich Chemical Co.) por cada mL de tampón fosfato utilizado anteriormente.

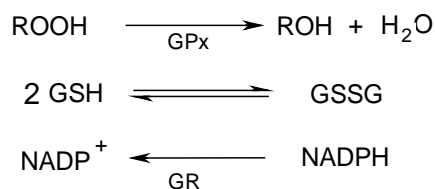
La mezcla de reacción contiene tampón fosfato 50mM (pH 7,4) o peróxido de hidrógeno 14mM y la muestra biológica (30 $\mu$ L) en un volumen final de 700 $\mu$ L. La reacción se inicia con la adición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El descenso de la absorbancia es registrado a 240nm, en una cinética de 60 segundos. Los resultados se expresan como unidades

de actividad CAT. Una unidad de actividad enzimática de la CAT se define como la cantidad de enzima que descompone un  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por minuto, bajo condiciones específicas de temperatura de  $25^\circ\text{C}$  y pH 7,4. Los resultados fueron expresados en U/mg de proteína

### C) Glutation peroxidasa hepática

- Fundamento

Existen dos formas básicas de esta enzima, la glutacion peroxidasa selenio dependiente (GPx-Se) y glutacion peroxidada no selenio dependiente (GPx-no-Se). Para determinar la actividad de estas enzimas en una misma muestra biológica se utiliza el mismo método, pero cambiando el hidroperóxido utilizado como sustrato. El ensayo con  $\text{H}_2\text{O}_2$  determina exclusivamente la GPx-Se por el método de Paglia y Valentine (1967), mientras que el ensayo con hidroperóxido de cumeno valora ambas enzimas simultáneamente (GPx total) (Lawrence, 2012). Estos ensayos se basan en métodos cinéticos, y se mide la actividad de GPx siguiendo el descenso de absorbancia a 340 nm, debido a la oxidación de NADPH y en presencia de un exceso de glutacion reductasa (GR), según la siguiente reacción acoplada:



- Técnica:

El método consiste en homogenizar los tejidos con tampón fosfato 50mM (100mg tejido/mL tampón) y centrifugar durante 20min 6.500 rpm ( $4^\circ\text{C}$ ) para obtener el sobrenadante, el cual se mantienen en frío hasta el momento de su utilización. Se prepara una solución reactiva de 7mg de azida sódica, capaz de inhibir la actividad de la catalasa, que descompone el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 10mg de EDTA (ácido etilendiaminotetracético, Sigma-Aldrich Chemical Co.), 33mg de GSH (Sigma-Aldrich Chemical Co.), 5mg de NADPH (Nicotina-adenín-dinucleótido fosfato reducido, Sigma-Aldrich Chemical Co.) y 27 UI de GR (Sigma-Aldrich Chemical Co.), en 25mL de tampón fosfato 50mM, a pH 7,4, previamente burbujeada con gas nitrógeno durante 15min. La solución se protege de la luz y se cierra herméticamente para evitar su oxidación y se mantiene a  $4^\circ\text{C}$ . La solución se debe preparar inmediatamente antes de su utilización. Durante el tiempo de medida espectrofotométrica la solución reactiva se mantiene a  $25^\circ\text{C}$ .

Se preparan las soluciones de hidroperóxido de cumeno (Sigma-Aldrich Chemical Co.) al 0,37%, y la solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,020% en de tampón fosfato 50mM pH 7,4 las cuales actuarán como sustratos de la reacción.

Esta técnica requiere de la preparación de 4 tipos de mezclas de reacción: 1) Blanco sin muestra (700µL de tampón fosfato); 2) Reacción con muestra (675µL de solución reactiva al que se le añaden 25µL de sustrato: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ó cumeno-OOH al 0,37%). Blanco con muestra (25µL de muestra diluida en 675µL de tampón fosfato); 4) Reacción con muestra (sobre 650µL de solución reactiva se añaden 25µL de sustrato y 25µL de muestra). Los resultados obtenidos se expresan como nmoles NADPH/min/mg proteína.

#### 4.3.3.3.2. Sistema del Glutation

##### A) Determinación de glutacion reducido (GSH) y oxidado (GSSG)

- Fundamento

Para la determinación de la cantidad de glutacion presente en las muestras se empleó el método de Hissin y Hilf (1976), adaptado para placa de 96 pocillos, empleando como sonda fluorescente el O-ftaldialdehido (OPT). Este método se basa en la capacidad del GSH para reaccionar con el OPT a un pH óptimo de 8, dando lugar a la formación de un compuesto fluorescente que se activa a una  $\lambda$  de 350nm y que presenta un punto máximo de emisión a una  $\lambda$  de 420nm. Por otro lado, la forma oxidada del glutacion reacciona de forma óptima con la sonda fluorescente a un pH 12. Puesto que a pH >8 el GSH se transforma en GSSG, es necesario bloquear la forma reducida del glutacion con N-etilmaleimida (NEM) para determinar únicamente el GSSG presente en la muestra biológica y no el resultante de la oxidación del glutacion en presencia de un medio básico.

- Técnica:

Se homogeneizó el tejido objeto de análisis con tampón fosfato-EDTA (pH =8) (0,1 M fosfato sódico y 0,005 M EDTA), a una concentración de a 100 mg/L, adicionando 10 µL de HClO<sub>4</sub> (60%) por cada mL de homogeneizado, para desproteinizar. A continuación se cetrifugó 10 min a 10.000 rpm (4°C) y se recogieron

los sobrenadantes. Dichos sobrenadantes se mantuvieron en frío hasta el momento de su utilización para la medida del glutatión en sus formas, reducida y oxidada.

#### B) Determinación del glutatión reducido (GSH):

En una placa de 96 pocillos, se añadió 10  $\mu\text{L}$  de muestra en cada pocillo y se completó con tampón fosfato-EDTA hasta un volumen final de 200  $\mu\text{L}$ . A continuación se añadió 20  $\mu\text{L}$  de OPT diluido en metanol (1 mg/mL), para que reaccionara con el GSH presente en la muestra. Se mezcló y se incubó en oscuridad a temperatura ambiente durante 15 min. Finalmente, se midió la fluorescencia a una  $\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$  y  $\lambda_{\text{em}} = 420 \text{ nm}$ .

#### C) Determinación del glutatión oxidado (GSSG):

A 500  $\mu\text{L}$  del sobrenadante de cada muestra se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de NEM (0,04 M), para bloquear el GSH. La muestra se incubó 30 min a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 4,3 mL de NaOH (0,1 N). Se traspasaron 100  $\mu\text{L}$  de la mezcla anterior (corresponden a 10  $\mu\text{L}$  de muestra) al pocillo y se completó con NaOH 0,1 N hasta un volumen final de 200  $\mu\text{L}$ . Se añadieron 20  $\mu\text{L}$  de OPT (1 mg/mL), para que reaccionaran con el GSSG presente en la muestra. Se mezcló y se incubó en oscuridad a temperatura ambiente durante 15 min. Finalmente, se midió la fluorescencia a una  $\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$  y  $\lambda_{\text{em}} = 420 \text{ nm}$ .

Dado que la medida de fluorescencia es proporcional a la concentración de GSH y GSSG de cada una de las muestras., se llevó a cabo una curva patrón de concentraciones conocidas de GSH y GSSG, respecto a la fluorescencia emitida ( $\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 420 \text{ nm}$ ). Los niveles de GSH y de GSSG de cada una de las muestras problema se calcularon interpolando los valores de fluorescencia obtenidos para cada una de ellas en la correspondiente ecuación de la recta. Los resultados se expresan como ng ( $\mu\text{g}$ ) de GSH o GSSG/mg tejido.

#### D) Índice redox

El índice redox (IR) es un parámetro que ha sido utilizado como índice del estado redox de la célula (Martínez-Cayuela, 2010). Este índice se expresa como el

cociente entre la cantidad de glutathion reducido respecto al total. Los valores de IR próximos a 1 indicaran una protección celular adecuada frente al estrés oxidativo.

$$IR = GSH / (GSH+GSSG)$$

#### *4.3.3.3.3. Expresión génica de enzimas antioxidantes y no antioxidantes. Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-qPCR)*

A partir de 100 mg de tejido hepático (o una mezcla homogénea de tejido adiposo perirrenal y gonadal, según el caso) se aisló RNA total utilizando Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Posteriormente el ARN obtenido fue tratado con el kit DNase I RNase-free (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EEUU) para eliminar posible contaminación con DNA genómico. La cantidad y pureza del RNA extraído se determinó mediante la medida de la absorbancia a 260, 280 y 310 nm en un espectrofotómetro (SPECTROstar nano BMG Labtech, Ortenberg, Alemania) y mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. El DNA complementario (cDNA) se ha obtenido a partir de 1 µg de RNA mediante el kit Revert Aid H Minus cDNA synthesis (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EEUU).

Se cuantificaron los niveles de RNAm de enzimas antioxidantes (CAT, Cu,Zn-SOD, Mn-SOD, GPX, GR) y no antioxidantes (CYP7A1), así como TNF-α, leptina, adiponectina y la densidad mitocondrial mediante PCR a tiempo real a partir de la determinación de fluorescencia con un termociclador LightCycler Real Time PCR Detection System, (Roche diagnostics, Indianapolis, Indiana, EEUU). Como marcador se utilizó la sonda fluorescente SYBR®Green (Biotools, Madrid, España). Los cebadores o “primers” específicos fueron sintetizados comercialmente (TIB Molbiol, Berlín, Alemania). Los niveles de expresión se normalizaron respecto a los valores del control endógeno β-actina. Los resultados se expresan en función a los valores del ciclo umbral o de threshold (Ct) relativizados al control utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak y Schmittgen, 2001).

Los parámetros de PCR fueron los siguientes: preincubación a 95°C durante 10 minutos, seguido de 45 ciclos que constaban cada uno de desnaturalización durante 10 segundos a 95°C, hibridación con una temperatura de anillamiento dependiente de

cada oligonucleótido (**Tabla 4.2**) durante 60 seg, extensión a 72°C durante 30 seg, posteriormente se crea una curva de fusión (melting curve) con temperaturas de 95°C-60°C-95°C, seguido finalmente de un ciclo de enfriamiento a 40°C durante 30 seg. Las secuencias de los oligonucleótidos también se resumen en la **Tabla 4.2.**

Tabla 4.2. Secuencias de los oligos "sentido" y "antisentido" empleados para la expresión génica de los marcadores estudiados, así como la temperatura de anillamiento empleada para cada uno de ellos.			
Oligo	Sentido	Antisentido	T. Anillamiento (°C)
CAT	5'-ATCAGGGATGCCATGTTGTT-3'	5'-GGGTCCCTCAGGTGAGTTTG-3'	60
Cu,Zn-SOD	5'-GCCGTGTGCGTGCTGAA-3'	5'-TGACGATGCCGTGCTGCATG-3'	56
Mn-SOD	5'-GACAAACCTGAGCCCTAAGGG-3'	5'-CTTCTTGCAAATATG-3'	55
GPx	5'-CCAATCAGTTCGGACACCAG-3'	5'-AAAGTTCCAGGCAATGTCGT-3'	60
GR	5'-TCACTGCTCCGCACATCC-3'	5'-CTCAACACCGCCAGCGTTCTCC-3'	60
CYP7A1	5'-CACCATTCTGCAACCTT-3'	5'-GTACCGGCAGGTCATTCA-3'	60
TNF- $\alpha$	5'-GCCAGACCCTCACACTC-3'	5'-CCACTCCAGCTGCTCCTCT-3'	67
Leptina	5'-GGTGGCTGGTTTGTCTGT-3'	5'-TATGTGGCTGCAGAGGTGAG-3'	67
Adiponectina	5'-GCCAGTCATGAAGGGATTA-3'	5'-TCTCTCCAGGAGTGCCATCT-3'	67
$\beta$ -actina	5'-CGGTCAGGTCATCACTATCGG-3'	5'-TCCATACCCAGGAAGGAAGGC-3'	60
Mitocondria	5'-GGTTCTTACTTCAGGGCCATCA-3'	5'-GATTAGACCCGTTACCATCGAGAT-3'	60

El método de  $\Delta\Delta Ct$  de Livak y Schmittgen (2001) para el análisis de la expresión de genes consiste en calcular la expresión en medidas arbitrarias teniendo en cuenta el Ct obtenido de las reacciones de PCR en tiempo real, se aplica la fórmula de cálculo de expresión génica:

$$Exp = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_m - \Delta Ct_{cb}$$

Donde el  $\Delta Ct_m$  es el valor de  $\Delta Ct$  de las muestras a ser evaluadas; y el  $\Delta Ct_{cb}$  es el valor de  $\Delta Ct$  de la muestra calibradora (gen calibrador: referencia, en éste caso  $\beta$ -actina). Una vez que los valores de Ct fueron calculados, y dada la naturaleza exponencial de la curva de PCR en tiempo real, se hizo un ajuste logarítmico para minimizar la varianza de los valores.

#### 4.3.3.3.4. Cuantificación de enzimas antioxidantes y marcadores de inflamación hepáticos. Western-Blot

La técnica de Western-Blot es un método ampliamente utilizado para la cuantificación de proteínas (Burnette, 1981). En tejido hepático se han evaluado los niveles de las enzimas antioxidantes: CAT (60 kDa), SOD (32 kDa), GPx (22 kDa), y GR (50-65 kDa) como parámetros indicadores de estrés oxidativo. Los niveles de TNF- $\alpha$  (17 kDa), eNOS (133 kDa), iNOS (131 kDa) se emplean como marcadores de inflamación. Todas las proteínas se cuantificaron a partir de extractos proteicos totales y se expresan relativizadas al valor del grupo control para cada marcador.

#### A) Obtención de extractos proteicos totales y determinación de proteínas

Se homogeneizaron en frío las fracciones de hígado correspondientes a cada animal de experimentación con tampón de lisis pH=7,4 [10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 5% glicerol, 0,1 mM PMSF (fenilmetasulfonil fluoruro), 5  $\mu$ g/mL leupeptina (Sigma-Aldrich Chemical Co.), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 M NaCl (Panreac), 5 mM  $\beta$ -mercaptoetanol (Merck) y 0,5% Nonidet P-40 (Roche)]. A continuación se agitaron las muestras durante 30 min en cámara fría y se centrifugaron 15 min a 13.000 rpm (4°C). Se recogió el sobrenadante de cada una de ellas y se midió en ellos la concentración de proteínas totales presentes por el método de Bradford (1976), utilizando el reactivo azul de Coomassie (Sigma-Aldrich Chemical Co.) y albúmina de suero bovino (Sigma-Aldrich Chemical Co.) para la curva patrón. Las muestras se ajustaron a una concentración de 100 mg/mL.

#### B) Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida

Se tomó una alícuota de 20  $\mu$ g de proteína procedente del extracto total de cada una de las muestras. Los extractos se desnaturalizaron por adición, en la cantidad adecuada, de tampón de muestra: 60 mM Tris-HCl pH 6,8, 25% glicerol, 2% SDS (lauril dodecil sulfato sódico) (Sigma-Aldrich Chemical Co.), 0,1% azul de bromofenol (BioRad), 14,4 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, y agua destilada csp 10 mL, e incubación durante 4 min en baño a 100°C (Laemmli, 1970).

A continuación las proteínas se aplicaron en el gel, junto con el marcador (Kaleidoscope Prestained Standards, BioRad) y se separaron durante un tiempo aproximado de 60 min. por electroforesis, según el método descrito por Yan y cols. (1998), con amperaje variable, pero a voltaje constante de 100 V hasta que las muestras sobrepasaron el gel concentrador o "stacking gel" seguido de voltaje constante a 200 V hasta el final del proceso. Dependiendo de los pesos moleculares de las proteínas a analizar, se prepararon geles con concentraciones variables (entre

10 y 15%) de poliacrilamida (BioRad). La composición del tampón utilizado para electroforesis corresponde a 25 mM Tris, 192 mM glicina (Sigma-Aldrich Chemical Co.) y 0,1% SDS; pH= 8,3.

Inmediatamente después de la electroforesis, las proteínas se transfieren del gel a una membrana de PVDF (difluoruro de polividileno; GE-Healthcare) utilizando un equipo de transferencia (con voltaje variable y amperaje constante, 350 amperios, durante 60 minutos) y el correspondiente tampón compuesto por: 15,6 mM Tris, 120 mM glicina y 20% metanol (Panreac); pH= 8,1-8,4.

Una vez completada la transferencia, la membrana se bloqueó durante 1 h y 30 min a temperatura ambiente y en agitación en una solución compuesta por leche en polvo (Sveltesse, Nestlé) al 10% en PBS (tampón fosfato salino; Sigma-Aldrich Chemical Co.), con el fin de inhabilitar los sitios de unión inespecíficos de la membrana. Posteriormente, y tras lavar la membrana tres veces con PBS (10 min), se procedió a la detección de las proteínas mediante el uso de anticuerpos específicos. Para ello se incubó la membrana con una solución de PBS en la que iba diluido el anticuerpo primario correspondiente, durante el tiempo necesario para que se fijara a la membrana, a la temperatura de 4°C y con agitación suave. En la **Tabla 4.3** se detallan los anticuerpos empleados para la determinación de las proteínas determinadas por Wester-blot.

Tras esta incubación se realizaron seis lavados de 5 min cada uno en solución de Tween 20 (Sigma-Aldrich Chemical Co.) al 0,1% en PBS. Posteriormente se procedió a incubar la membrana, durante 2 horas a temperatura ambiente y con agitación suave, con el anticuerpo secundario correspondiente acoplado a peroxidasa disuuelto en PBS-Tween.

Tabla 4.3. Anticuerpos empleados en la técnica Western-Blot.		
Anticuerpo	Fabricante	Referencia
anti-SOD de ratón	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	S2147
anti-CAT de ratón	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	C0979
anti-GPx de conejo	Abcam, Cambridge, UK	Ab60275
anti-GR de conejo	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA	sc-32886
anti-eNOS de conejo	Abcam, Cambridge, UK	Ab5589
anti-iNOS de ratón	Abcam, Cambridge, UK	Ab21775
anti-TNF- $\alpha$ de cabra	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA	sc-1350
anti- $\beta$ -actina de ratón	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	A2228
cabra anti-ratón	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	A9917
ratón anti-cabra	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA	sc-2490
cabra anti-conejo	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA	sc-2004

Después de volver a lavar la membrana manteniendo las mismas condiciones ya comentadas, se procedió al revelado, mediante la utilización del kit ECL-Advance (GE-Healthcare), en un analizador de imagen. Las bandas correspondientes a las proteínas analizadas se detectaron mediante la luz emitida por la oxidación del luminol en presencia de la enzima peroxidasa (reacción de quimioluminiscencia). Dicha señal fue finalmente evaluada de forma semicuantitativa mediante densitometría. Los resultados se expresan en % de los niveles de proteína con respecto al control.

#### **4.3.4. Determinación de marcadores en plasma**

##### *4.3.4.1 Glucosa*

La determinación de la glucemia se realizó de acuerdo al método de la glucosa hexoquinasa, utilizando el kit comercial Hexokinase/glucose-6-phosphate dehydrogenase #10127825001 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) en un autoanalizador Hitachi 737 Automatic Analyzer (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan), siguiendo las instrucciones del fabricante.

##### *4.3.4.2. Insulina*

Los niveles de insulina se determinaron en plasma utilizando el kit ELISA (Mercodia AB, Uppsala, Suecia). Se trata de un ensayo tipo “sándwich” (ensayo de captura de antígeno y detección mediante inmunocomplejos), en el que se recubre el área de ensayo (en este caso el pocillo de microplaca) con un primer anticuerpo anti-antígeno. Se procede a lavar el exceso de anticuerpo y, posteriormente, se aplica la muestra problema en la que se encuentra el antígeno, que será retenido en el pocillo al ser reconocido por el primer anticuerpo. Después de varios lavados, que eliminan el material no retenido, se aplica una solución que contiene un segundo anticuerpo anti-antígeno marcado. De esta forma, cada molécula de antígeno estará unida a un anticuerpo en la base que lo retiene y a un segundo anticuerpo, al menos, que lo marca. Así, la intensidad de color formada es inversamente proporcional a la cantidad de insulina (u otro de los marcadores determinados mediante esta técnica) de la muestra (Lequin, 2005). El anticuerpo marcado con enzima no unido se elimina con un simple lavado. El conjugado enzimático unido se detecta por reacción con 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB). La reacción se detiene añadiendo  $H_2SO_4$  a 0,5M. Se cuantifica por espectrofotometría a una longitud de onda de 450nm. Este ensayo tiene

una gran especificidad y sensibilidad debido a la amplificación de señal que permite el segundo anticuerpo. (**Figura 4.1**).

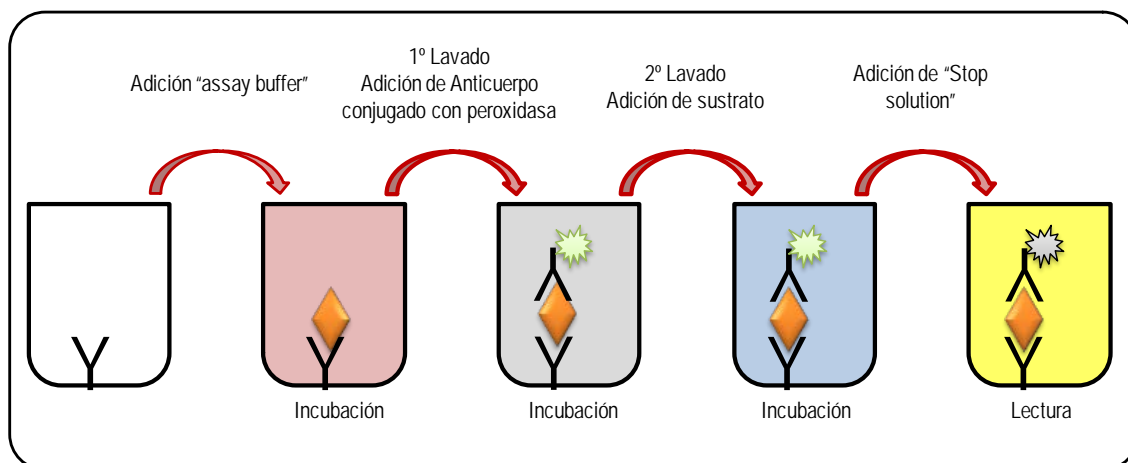


Figura 4.1. Esquema general de los pasos seguidos en los ELISA tipo "sándwich".

#### 4.3.4.3. Índices de evaluación de sensibilidad a la insulina

El HOMA (Homeostasis Model Assessment) es el modelo matemático para la estimación de la resistencia/sensibilidad a la insulina presentado por Matthews y cols. (1985). Su cálculo se establece a partir de la relación entre la glucemia basal y los niveles de insulina, evaluando el balance entre la producción hepática de glucosa y la secreción de insulina. Permite realizar estimaciones de resistencia a la insulina (HOMA-IR), función de las células  $\beta$  (HOMA-B), sensibilidad a la insulina en condiciones de no estimulación (HOMA-IS), relación entre glucosa basal e insulina basal (HOMA-D), (Livesey y cols., 2006). Y como marcador de sensibilidad a la insulina el índice QUICKI (Quantitative Insulin Sensitivity Check Index), (Katz y cols., 2000).

Para la estimación de los distintos parámetros se utilizaron las siguientes fórmulas:

- $\text{HOMA-IR} = \text{insulina en ayuno (mUI/L)} \times \text{glucosa en ayuno (mmol/L)} / 22.5$
- $\text{HOMA-\%B} = \text{insulina en ayuno (mUI/L)} \times 20 / (\text{glucosa en ayuno (mmol/L)} - 3.5)$
- $\text{HOMA-IS} = 1 / \text{HOMA-IR}$
- $\text{HOMA-D} = \text{HOMA-S} \times \text{HOMA-B}$

- $QUICKI = 1 / [\log(\text{insulina en ayuno (mUI/L)}) + \log(\text{glucosa en ayuno (mg/dL)})]$

Índice triglicéridos-glucosa (TyG). Debido a que los niveles de triglicéridos junto con los de la glucosa en ayuno, están elevados en Diabetes Mellitus tipo II (DMT2) y en resistencia a la insulina (Arner, 2002), la relación multiplicativa de la glucemia y trigliceridemia en ayunas es una estimación adecuada de resistencia a la insulina (Guerrero-Romero y cols., 2010) y que tiene buena correlación con el HOMA y el método euglicémico del “clamp” (Bonora y cols., 2000). Guerrero-Romero y cols. (2010) propusieron la siguiente fórmula:

- $TyG = \text{Ln}(\text{glucosa en ayunas (mg/dL)}) * \text{triglicéridos en ayunas (mg/dL)} / 2$

#### 4.3.4.4. Determinación de lípidos plasmáticos

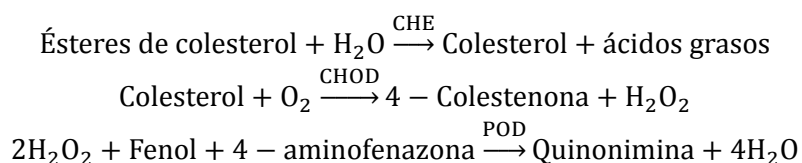
Los niveles de colesterol, triglicéridos y fosfolípidos en plasma y lipoproteínas se determinaron utilizando kits enzimáticos colorimétricos estándar (Spinreact S.A., Sant Esteve de Bas, Girona, España). Todos los coeficientes de variación intra-ensayo e inter-ensayo fueron <5,5%.

##### 4.3.4.4.1 Colesterol

En las muestras de plasma se procedió a la determinación del colesterol total siguiendo las instrucciones del kit CHOD-POD líquido SPINREACT (San Esteve de Bas, Girona, España).

En el caso de los extractos lipídicos del tejido hepático, éstos se disolvieron en isopropanol (95% v/v). La turbidez, cuando estuvo presente en algunas muestras, se eliminó mediante centrifugación a 2.200 g durante 5 minutos a 4°C, una vez desarrollada la reacción enzimática colorimétrica y antes de la lectura espectrofotométrica según indican Viejo, y cols. (2003) y Viejo (1992).

El colesterol libre o esterificado presente en la muestra produce un compuesto coloreado de acuerdo con el esquema descrito a continuación:

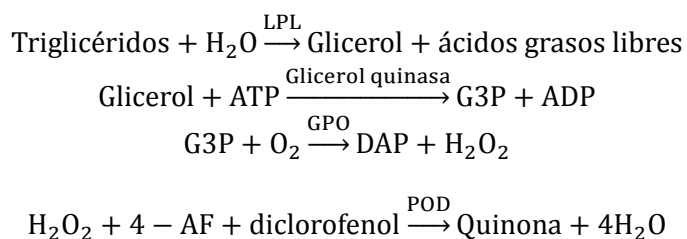


CHE: Colesterol Esterasa, CHOD: Colesterol Oxidasa, POD: Peroxidasa

La intensidad de color formado es proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra. Se cuantifica por espectrofotometría a 500 nm.

#### 4.3.4.4.2 Triglicéridos

Siguiendo instrucciones de kit (Spinreact, San Esteve de Bas, Girona, España). Los triglicéridos incubados con lipoproteinlipasa (LPL) liberan glicerol y ácidos grasos libres. El glicerol es fosforilado por glicerolfosfato deshidrogenasa (GPO) y ATP en presencia de glicerol quinasa (GK) para producir glicerol-3-fosfato (G3P) y adenosina-5-difosfato (ADP). El G3P es entonces convertido a dihidroxiacetona fosfato (DAP) y peróxido de hidrogeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) por GPO. Al final, el peróxido de hidrogeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) reacciona con 4-aminofenazona (4-AF) y p-clorofenol en una reacción catalizada por la peroxidasa (POD) originando una coloración rojiza. En el siguiente esquema se resumen las reacciones producidas:

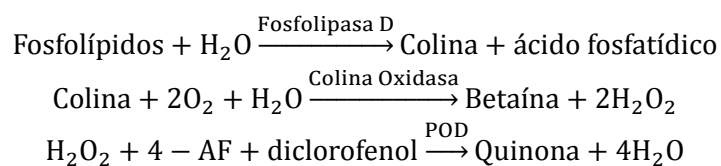


LPL: Lipoprotein lipasa, G3P: Glicerol-3-fosfato, DAP: Dihidroxiacetona fosfato, GPO: Glicerolfosfato deshidrogenasa, 4-AF: 4-Aminofenazona, POD: Peroxidasa.

La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de triglicéridos presentes en la muestra ensayada. Se cuantifica por espectrofotometría a 500 nm.

#### 4.3.4.4.3. Fosfolípidos

El fundamento del método se basa en que los fosfolípidos presentes en plasma o tejidos son hidrolizados originando colina por la acción de la fosfolipasa D. La colina liberada es secuencialmente oxidada por la colina oxidasa (CHO) a betaína, con la simultánea producción de peróxido de hidrógeno. En presencia de peroxidasa (POD) el peróxido de hidrógeno acopla oxidativamente a la 4- Aminofenazona (4-AF) y al diclorofenol formando una quinona coloreada:



La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de fosfolípidos presente en la muestra ensayada y se cuantifica por espectrofotometría a 500 nm.

#### 4.3.4.4.4 Lipoproteínas

Se utilizaron muestras de plasma que se habían mantenido en refrigeración a 4°C durante un máximo de tres días desde su obtención. En tubos de ultracentífuga transparentes (“ultraclear”, Beckman, Palo Alto, CA, USA), calibrados previamente marcando volúmenes cada 1 mL y señalando además el volumen de las diferentes soluciones a incluir y el lugar donde los tubos serían posteriormente cortados. 1 mL de plasma se mezcló con 114 mg de KBr y 25 mg de sacarosa. Posteriormente se añadieron cuidadosamente con un capilar acodado 2,4 mL de la solución salina, y 2,4

mL de agua destilada siguiendo el método de Terpstra y cols. (1982). No obstante para evitar ciertas interferencias derivadas de la utilización de negro sudan utilizado en dicho método, se evitó la adición de dicho colorante al plasma tal como señalan Sánchez-Muniz, (2003). Las fracciones lipoproteicas VLDL, IDL+LDL y HDL, se separaron mediante ultracentrifugación en gradiente salino de densidad durante 7h a 50,000 rpm (232,000 g) a 4°C en una ultracentrífuga Beckman L8 -70M, con rotor SW-50.1 (Palo Alto, CA, EE.UU). Las fracciones lipoproteicas se obtuvieron por aspiración con pipeta Pasteur, tras cortar los tubos en el intervalo de densidad referido para la rata de VLDL ( $\rho_{20} < 1,0063$  g/mL), LDL ( $1,0063 < \rho_{20} < 1,057$  g/mL) y HDL ( $1,057 < \rho_{20} < 1,21$  g/mL). Se realizó una medida precisa de los volúmenes aspirados de cada fracción lipoproteica en tubos calibrados y graduados. Posteriormente se determinó en alícuotas de las fracciones lipoproteicas colesterol, y triglicéridos adaptando el volumen de la determinación a la experiencia previa de nuestro grupo (Olivero-David y cols., 2011; Sánchez-Muniz, y cols., 2003; Bocanegra y cols., 2009) y siguiendo las instrucciones de los kits comerciales correspondientes.

#### 4.3.4.4.5. Arilesterasa

Una de las actividades más importantes de la enzima paraoxonasa-1 (PON1) es la actividad arilesterasa (AE) (Durrington y cols., 2001). Esta enzima cataliza la formación de fenol a partir de acetato de fenilo, habiéndose relacionado las modificaciones en su actividad con cambios en la capacidad antioxidante de las HDL (Aviram y cols., 1998; Nus y cols., 2008a; Nus y cols., 2008b).

La actividad AE en el plasma de rata se midió de acuerdo al método de Nus y cols. Nus y cols. (2008a), tras modificar la composición del tampón mimético del suero, como señalan estos autores, para hacerlo adecuado a mediciones en ratas. Dicho método utiliza como tampón una solución cuya composición mimetiza la del suero. Cada litro de ella contiene: NaCl, 3,050 g; NaHCO<sub>3</sub>, 2,268; KCl, 0,224; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,141; HCl, 40 mL; CaCl<sub>2</sub>, 0,278; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,071g; MgCl<sub>2</sub>, 0,305g y Tris csp pH 7,34-7,4 a 37°C. Todos los reactivos obtenidos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich Chemical Co.). Las reacciones se monitorizaron a 273 nm (Eckerson y cols., 1983) en cubetas de cuarzo termostalizadas de 1,0 mm de paso de luz, en un espectrofotómetro Shimadzu UV-2401 PC (Tokio, Japón). Se utilizaron blancos sin

plasma para corregir la hidrólisis espontánea de fenilacetato que tiene lugar en el tampón. Una unidad de AE se define como la formación de 1 mmol de fenol/min a 37 °C.

#### *4.3.4.4.6. Marcadores de daño hepático*

Con la finalidad de relacionar los efectos beneficiosos o perjudiciales de los diferentes derivados cárnicos, se determinaron en el plasma las enzimas fosfatasa alcalina (ALP); aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT) como marcadores de daño hepático. También se midió la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) como marcador de daño celular y tisular. Por último la actividad de la enzima creatinquinasa o creatín fosfoquinasa (CK) se utilizó como marcador de daño cardíaco.

La determinación de las diferentes enzimas se realizó de acuerdo al método especificado en cada kit comercial por técnica de inmunoturbidimetría en un autoanalizador Hitachi 737 Automatic Analyzer (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan). Dichas determinaciones fueron realizadas por el Centro de Análisis Sanitarios Clínicos de la UCM.

#### **4.3.5. Determinación de marcadores en tejido adiposo**

Los marcadores leptina, adiponectina, TNF- $\alpha$  y densidad mitocondrial han sido determinados por técnicas de ELISA o RT-qPCR, explicadas en apartados anteriores.

### **4.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para el análisis estadístico se empleó el programa SPSS (versión 22.0). Se determinó la normalidad de distribución de los datos mediante el test de Kormogorov-Smirnov.

Los resultados se expresaron como los valores medios y su desviación estándar. Se aceptaron diferencias significativas entre grupos para probabilidades (p) <0,05.

Cuando se realizó una comparación estadística cuantitativa, se aplicó el test de análisis de varianza (ANOVA) de dos vías para analizar los efectos y su interacción de los factores colesterol y de glucomanano o glucomanano plus spirulina sobre los resultados. El efecto de cada uno de los factores se cuantificó separadamente en las dietas sin colesterol (C, G y GS) y en aquellas con colesterol (HC, HG y HGS) mediante el test de ANOVA de una vía seguido de la corrección para múltiples comparaciones de Bonferroni o el de T2 de Tanhame cuando se asumieron varianzas diferentes. El efecto del consumo de colesterol (dietas con colesterol añadido vs. sus correspondientes dietas sin colesterol) se estudió mediante el test de la t de Student.

Para la comparación de variables cualitativas o semicuantitativas (p.e. en el estudio histológico) se empleó el método de la significación exacta bilateral de MonteCarlo. Seguidamente, los grupos se compararon dos a dos usando el test estadístico exacto de Fisher.

Por último, para conocer las posibles relaciones lineales entre parámetros, se empleó el test de correlaciones producto-momento de Pearson.



## **5. EXPOSICIÓN DE RESULTADOS**

---





## 5.1. PUBLICACIÓN N°1

**European Journal of Lipid Science and Technology** (2013) 115:1274-1283

**ISI Web JCR (2014):** Índice de impacto: 1.812

43/123 en "Food Science and Technology" (Q2)

### **Lipoproteinemia and arylesterase activity in Zucker fa/fa rats fed glucomannan/spirulina-enriched squid-surimi**

M. Vázquez-Velasco, L. González-Torres, R. Olivero-David, S. Bastida, J. Benedí, M. I. Sánchez-Reus, M J. González-Muñoz, F. J. Sánchez-Muniz

**Resumen:** Se considera al surimi como un alimento saludable. Los efectos hipocolesterolemiantes y antioxidantes de la fibra soluble y de las microalgas podrían reducir el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, convirtiéndolos en ingredientes funcionales. El objetivo de este estudio es determinar si el surimi de calamar enriquecido con glucomanano o glucomanano y espirulina mejora la lipemia, la lipoproteinemia o la actividad arilesterasa en ratas Zucker fa/fa. Seis grupos de ocho ratas en crecimiento recibieron dietas modificadas a partir de la AIN-93M durante siete semanas. Las dietas experimentales incluyeron: dieta control conteniendo 30% de surimi de calamar (C), dieta con 30% de surimi de calamar enriquecido con glucomanano (G), dieta con 30% de surimi de calamar enriquecido con glucomanano y espirulina, y las mismas dietas conteniendo un agente hipercolesterolemiantes (colesterol 2% y ácido cólico 0,4%, dietas HC, HG y HGS, respectivamente). Las dietas G y GS redujeron de forma significativa el incremento de peso y el índice de crecimiento con respecto a la C, y normalizaron parcialmente la contribución lipídica de las lipoproteínas a la lipemia. Las ratas HC presentaron hiperlipemia marcada, índice colesterol/triglicéridos elevado en todas las fracciones lipoproteicas y un alto porcentaje de colesterol transportado por las fracciones VLDL e IDL+LDL. Las dietas HG y HGS normalizaron de forma relevante la lipemia y la composición lipídica de diferentes fracciones lipoproteicas con respecto a la dieta HC. Por tanto, el glucomanano añadido a las dietas con surimi redujo el incremento de peso. Las dietas HG y HGS presentaron fuerte capacidad normalizadora sobre los lípidos con respecto a la HC. La espirulina no añadió efectos extras a los observados para el glucomanano.



## Research Article

## Lipoproteinemia and arylesterase activity in Zucker Fa/Fa rats fed glucomannan/spirulina-enriched squid-surimi

Miguel Vázquez-Velasco<sup>1</sup>, Laura González-Torres<sup>1</sup>, Raúl Olivero-David<sup>1, 2</sup>, Sara Bastida<sup>1</sup>, Juana Benedí<sup>3</sup>, M<sup>a</sup> Isabel Sánchez-Reus<sup>4</sup>, M<sup>a</sup> José González-Muñoz<sup>2</sup> and Francisco J. Sánchez-Muniz<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición) Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

<sup>2</sup> Departamento de Nutrición, Bromatología y Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, Spain

<sup>3</sup> Departamento de Farmacología Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

<sup>4</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

Surimi is considered a healthy food. Hypocholesterolemic and antioxidant properties of soluble fiber and microalgae may reduce cardiovascular disease risk, making them potential functional ingredients. This study aims to determine whether glucomannan-enriched or glucomannan *plus* spirulina-enriched squid-surimi improve plasma lipid/lipoprotein levels and arylesterase (AE) activity in Zucker Fa/Fa rats. Six groups of eight growing rats were given modified AIN-93M diets for 7 wk. Experimental diets included 30% squid-surimi control diet (C), 30% glucomannan-enriched squid-surimi diet (G), 30% glucomannan *plus* spirulina-enriched squid-surimi diet (GS), and the same diets enriched with hypercholesterolemic agent (2% cholesterol and 0.4% cholic acid; HC, HG, and HGS diets). G and GS diets induced significantly lower ( $p < 0.001$ ) body weight gain and growth rate than the C diet and partially normalized the lipoprotein lipid contribution to plasma lipids. HC rats presented marked hyperlipemia, elevated cholesterol/triglyceride ratio in all lipoprotein fractions, and a high percentage of cholesterol transported by VLDL and IDL + LDL fractions. HG and HGS diets noticeably normalized lipemia and the lipid composition of the various lipoprotein fractions versus HC. In conclusion, glucomannan added to surimi-diets decreased bodyweight gain. HG or HGS exhibited strong lipid normalizing properties versus HC. Spirulina did not add to the effects of glucomannan.

**Keywords:** Arylesterase / Cholesterol / Glucomannan / Lipids / Lipoproteins / Spirulina

Received: April 18, 2013 / Revised: July 3, 2013 / Accepted: July 8, 2013

DOI: 10.1002/ejlt.201300147

### 1 Introduction

Saturated fats are known to be hypercholesterolemic in men and laboratory animals [1, 2] but display lower oxidability of

LDL [3]. The Zucker Fa/Fa rat has been widely used as an animal model for obesity and cardiovascular disease studies [4].

Ample evidence exists of the health benefits of consumption of fish and fish derivatives [5, 6]. However, in Westernized countries the variety of fish consumed is limited and fish intake is low and displays a tendency to decrease among the younger generation [7]. Fish and squid-surimi obtained from certain species of low commercial value offer a low-cost alternative and facilitate seafood consumption by reducing or eliminating cooking time [8]. Nowadays, emerging technologies in food processing allow to add ingredients with known health benefits and/or remove potentially undesirable components to obtain functional foods.

**Correspondence:** Professor Francisco J. Sánchez-Muniz, Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición), Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid. Plaza Ramón y Cajal s/n. 28040 Madrid, Spain

**E-mail:** frasan@farm.ucm.es

**Fax:** +34 91 3941810

**Abbreviations:** AE, arylesterase; IDL, intermedium density lipoproteins; MS, metabolic syndrome; TAG, triglycerides

Glucomannan, a dietary fiber extracted from *Amorphophallus konjac* tubers, forms highly viscous solutions in water, shows satiating, laxative, and hypocholesterolemic properties but produces flatulence, abdominal pain, and esophageal or gastrointestinal obstruction in high doses [9].

*Spirulina platensis* is a microalga rich in minerals, antioxidant compounds such as carotenoids, and phycocyanin, a biliprotein pigment with hypocholesterolemic activity in rodents [10, 11]. However, evidences of its benefits in humans have been scarcely researched.

According to Borderias et al. [8] squid-surimi is a health and safe food and may substitute other conventional protein sources due to their low fat content and high protein quality. Fish protein has been found to be moderately hypocholesterolemic due, among other factors, to its lower lysine/arginine ratio [12, 13]. To the best of our knowledge, few studies investigating the effects of squid-surimi on cardiovascular disease exist [8] and none at all with regard to those of glucomannan-enriched surimi. Moreover, few studies have evaluated the effects of potential functional foods on arylesterase (AE) activity [14, 15]. AE protects LDL from oxidation [16] inducing production or maintaining high levels of other antioxidant enzymes [17, 18]. The study hypothesis is that glucomannan-enriched and glucomannan *plus* spirulina-enriched squid-surimi act as functional foods by reducing plasma lipid levels and improving antioxidant status. The present study, thus, aims to determine in rat the effects on body weight, lipemia, lipoproteinemia, and antioxidant capacity of glucomannan-enriched squid-surimi in cholesterol- and non-cholesterol-enriched hyperlipemic/hyperenergetic diets.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Diet preparation and experimental design

The present study was approved by the Spanish Science and Technology Advisory Committee (project AGL 2008-04892-C03-02 and Consolider Ingenio 2010, CSD 2007-00016) and by an ethics committee of the Universidad Complutense of Madrid (Spain). All experiments were performed in compliance with Directive 86/609/EEC of 24th November 1986 (modified by Directive 2003/65/CE) for the protection of scientific research animals. A total of 48 male growing Zucker Fa/Fa rats with an initial body weight of approximately 120 g were obtained from Harlan Laboratories Models (Harlan, SL, Barcelona, Spain). The animals were housed individually in metabolic cells in a temperature-controlled room ( $22.3 \pm 1.9^\circ\text{C}$ ) with a 12 h light–12 h dark cycle. Rats were fed commercial pellets (Panlab, Barcelona, Spain) for a 7 days adaptation period and, then, distributed into six groups of eight animals each, according to their average body weight.

Six experimental semi-synthetic diets were prepared: the control diet without added cholesterol (C) was composed of a

homogeneous mixture of 70% rodent diet (AIN-93M purified rodent diet; Dyets, Inc., Bethlehem, PA, USA) and 30% freeze-dried restructured squid-surimi (with 15% microcrystalline cellulose); the glucomannan normocholesterolemic diet (G) consisted of a mixture of modified AIN-93 (AINM no. 102635) feed (70%) and freeze-dried, restructured glucomannan-enriched squid-surimi (30%); the glucomannan *plus* spirulina normocholesterolemic diet (GS) consisted of a mixture of modified AIN-93M no. 102635 feed (70%) and freeze-dried, restructured glucomannan *plus* spirulina-enriched squid-surimi (30%); the cholesterol-enriched control diet (HC) was identical to the C diet but with 2% cholesterol (95–98% purity) and 0.4% cholic acid (98% purity) substituting an equal amount of corn starch (modified AIN-93, AIN-93M no. 102636 diet); the cholesterol-enriched glucomannan diet (HG) was the G diet enriched with cholesterol (2%) and cholic acid (0.4%); the cholesterol-enriched glucomannan *plus* spirulina diet (HGS) consisted of the GS diet enriched with cholesterol (2%) and cholic acid (0.4%). Water and food were provided ad libitum over the 7-wk experimental period. In order to avoid inter-assay variations, fasting rats were taken, one at a time from each group, anesthetized and euthanized by extracting blood from the descending aorta with a syringe.

### 2.2 Growth rate

Feed consumption was evaluated daily while body weight gain was recorded every week. Individual growth rate curves and feed conversion ratios were obtained by comparing feed consumption (g) with body weight gain (g).

### 2.3 Lipoprotein isolation and quantitation

Blood was collected in heparinized tubes. Plasma was isolated from whole blood by centrifugation at 2,500 rpm ( $1500 \times g$ ) for 20 min and kept at  $4^\circ\text{C}$  until lipoprotein isolation. A SW 50.1 rotor (Beckman, Palo Alto, CA) was used to separate the various classes of lipoproteins in 1 mL plasma samples using the salt gradient method indicated by Olivero-David et al. [19]. After preparation, the gradients were spun for 7 h at 50 000 rpm ( $232\,000 \times g$ ) and  $4^\circ\text{C}$ . Isolation of the lipoprotein fractions was performed according to normal density rat ranges (VLDL,  $\rho_{20} < 1.0063$  g/mL; intermediate-density lipoproteins *plus* low density lipoproteins (IDL + LDL),  $\rho_{20} = 1.0063$ – $1.057$  g/mL; HDL,  $\rho_{20} > 1.057$  g/mL).

Standard enzymatic colorimetric tests (Spinreact S.A., Sant Esteve de Bas, Girona, Spain) were used to determine cholesterol, triglycerides (TAG), and phospholipids in plasma and cholesterol and TAG in the various lipoprotein fractions. All intra-assay and inter-assay CV were  $< 5.5\%$ . Total lipids were calculated as the sum of cholesterol, TAG, and phospholipids. The cholesterol or TAG lipoprotein relative transports were calculated as the percentage of plasma cholesterol or TAG present in each lipoprotein fraction.

## 2.4 Arylesterase activity measurement

Rat plasma AE activity was measured using simulated body fluid as buffer, as indicated by Nus *et al.* [20]. One unit of AE was defined as the mmol phenol formed from phenyl acetate per min. Reaction rates were monitored at 273 nm in thermostated quartz cuvettes with a 10 mm light path, using a T80+ spectrophotometer from PG Instruments (PG Instruments Ltd. Wibtoft, Leics, UK). All intra-assay and inter-assay CV were <7.5%. Each measurement was performed in duplicate.

## 2.5 Statistical analyses

Statistical analyses were performed using the SPSS version 19.0 statistical analysis package (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). Results were expressed as means and SDs. A two-way ANOVA (cholesterol and diet) was used. Pairwise comparisons of diet responses between groups (C, G and GS; and HC, HG, and HGS) were made employing the Bonferroni test. The effect of cholesterol consumption (HC vs. C; HG vs. G; and HGS vs. GS) was evaluated using the unpaired Student's *t*-test. Differences in growth rate induced by diets (bodyweight gain vs. cumulative intake) were assessed by comparing their lineal regression by covariance analysis (ANCOVA test, SAS statistical packet 9.2). Significant differences were set at  $p < 0.05$ .

## 3 Results

### 3.1 Diet composition

Table 1 displays the major differences in the composition of the six experimental diets. Minor differences between the diets included their percentages of saturated, monounsaturated, and PUFA and their mineral content, due to the inclusion of spirulina in GS and HGS diets.

### 3.2 Feed intake, body weight gain, and growth rate

Body weight gain was significantly affected ( $p = 0.034$ ) by the interaction between diet and cholesterol (Table 2). Supplementary cholesterol significantly affected weight gain and the dietary efficiency ratio (both  $p < 0.001$ ), in addition to cumulative feed intake ( $p = 0.046$ ). The type of diet influenced weight gain and the dietary efficiency ratio (both  $p < 0.001$ ). Animals given cholesterol-enriched diets consumed throughout the whole experiment 300–1420 kJ less than those not fed supplementary cholesterol.

Figure 1a and b shows the relationship between cumulative feed intake and body weight gain, together with the linear adjustment parameters ( $r^2$ , slope and intercept, and their respective mean errors). All growth rate curves showed linear adjustments ( $r^2 > 0.782$ ;  $p < 0.001$ ). C diet rats significantly differ from those given the G and GS diets (at least  $p < 0.05$ ).

**Table 1.** Composition (g/kg) of the experimental diets<sup>1</sup>

	C diet	G diet	GS diet	HC diet	HG diet	HGS diet
Cornstarch	213.49	254.66	254.66	189.48	230.65	230.65
Microcrystalline cellulose	49.41	8.23	8.23	49.41	8.23	8.23
Cholesterol	0.00	0.00	0.00	20.02	20.02	20.02
Cholic acid	0.00	0.00	0.00	3.99	3.99	3.99
Squid-surimi	300.00	255.00	255.00	300.00	255.00	255.00
Glucmannan	0.00	45.00	45.00	0.00	45.00	45.00
Spirulina	0.00	0.00	3.00	0.00	0.00	3.00
Total	1000.00	1000.00	1003.00	1000.00	1000.00	1003.00
Energy content (kJ/kg diet)	13332.84	14175.78	14230.21	12970.95	13813.89	13868.32

C, AIN-93M (70%) + Control squid-surimi (30%); G, AIN-93M (70%) + Glucmannan enriched squid-surimi (30%); GS, AIN-93M (70%) + Glucmannan *plus* spirulina enriched squid-surimi (30%). HC, AIN-93M (70%) + Control squid-surimi (30%) + hypercholesterolemic agent (2% cholesterol and 0.4% cholic acid); G, AIN-93M (70%) + Glucmannan enriched squid-surimi (30%) + hypercholesterolemic agent (2% cholesterol and 0.4% cholic acid); GS, AIN-93M (70%) + Glucmannan *plus* spirulina enriched squid-surimi (30%) + hypercholesterolemic agent (2% cholesterol and 0.4% cholic acid). <sup>1</sup>Other ingredients (g/kg diet): casein, 105.0; palm olein, 115.29; dextrose (carbohydrate composition: monosaccharides, 10; disaccharides, 40; trisaccharides, 50; tetrasaccharides and higher, 900), 108.5; sucrose, 70.0; AIN-93M mineral mix, 29.75; AIN-93VX vitamin mixture, 12.16; choline bitartrate, 3.06; L-cystine, 1.26; t-butylhydroquinone, 0.02. Mineral mix#210050 24.5; Vitamin mix #310025, 162.07. AIN-93M mineral mix (g/kg): calcium carbonate, 357.00; potassium phosphate monobasic, 250.00; potassium citrate. H<sub>2</sub>O, 28.00; sodium chloride, 74.00; potassium sulfate, 46.60; magnesium oxide, 24.00; ferric citrate U.S.P., 6.06; zinc carbonate, 1.65; manganous carbonate, 0.63; cupric carbonate, 0.30; potassium iodate, 0.01; sodium selenate, 0.01025; ammonium paramolybdate.4H<sub>2</sub>O, 0.00795; sodium metasilicate.9H<sub>2</sub>O, 1.45; chromium potassium sulfate.12H<sub>2</sub>O, 0.275; lithium chloride, 0.0174; boric acid, 0.0815; sodium fluoride, 0.0635; nickel carbonate, 0.0318; ammonium vanadate, 0.0066; finely powdered sucrose, 209.806.

AIN-93VX vitamin mixture (g/kg): niacin, 3.00; calcium pantothenate, 1.60; pyridoxine HCl, 0.70; thiamine HCl, 0.60; riboflavin, 0.60; folic acid, 0.20; biotin, 0.02; vitamin E acetate (500 IU/g), 15.00; vitamin B12 (0.1%), 2.50; vitamin A palmitate, (150 000 μg/g), 0.80; vitamin D<sub>3</sub> (10 000 μg/g), 0.25; vitamin K<sub>1</sub>-dextrose mix (10 mg/g), 7.50; sucrose, 967.23.

**Table 2.** Feed intake, body weight gain and growth rate (Mean values and SDs)

	Added cholesterol	Control	Glucosaminan	Glucosaminan + spirulina	ANOVA		
					Diet	Cholesterol	Diet* cholesterol
Final weight (g)	No	326.51 ± 15.00	306.41 ± 20.02	318.44 ± 19.92	0.221	<0.001	0.871
	Yes	276.13* ± 33.76	251.06*** ± 52.60	275.89* ± 42.28			
Weight gain (g)	No	217.08 a ± 14.77	195.16b ± 26.63	193.26b ± 15.97	<0.001	<0.001	0.034
	Yes	184.34a* ± 20.58	120.46 b*** ± 16.31	140.86c*** ± 10.50			
Cumulative intake (g)	No	1196.42 ± 89.47	1174.39 ± 97.92	1197.77 ± 82.31	0.135	0.355	0.468
	Yes	1202.81ab ± 77.01	1102.51a ± 61.58	1185.95b ± 66.48			
Cumulative intake (kJ)	No	15951.68 ± 1192.92	16647.89 ± 1388.03	17044.52 ± 1171.29	0.085	0.046	0.478
	Yes	15601.59 ab ± 998.92	15229.95 a* ± 850.60	16447.13b ± 921.93			
Growth rate (g/g)	No	0.18 a ± 0.03	0.18 b ± 0.04	0.18b ± 0.03	<0.001	<0.001	0.190
	Yes	0.18a* ± 0.03	0.14b*** ± 0.03	0.15b*** ± 0.02			

a,b,c: Mean values within a row with unlike letters were significantly different ( $p < 0.05$ , Bonferroni test). Mean values within a column for the same parameter were significantly different from their no supplementary cholesterol counterparts: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$ .

The same was true between the HC rats and their HG and HGS counterparts. Comparison of slopes shows that for each kJ consumed, G and GS animals gained 0.002–0.005 g less than C rats. Supplementary dietary cholesterol significantly affected growth curves (HC vs. C; HG vs. G, and HGS vs. GS, all  $p < 0.05$ ).

### 3.3 Plasma lipid concentrations and arylesterase activities

Plasma lipids for the different groups are shown in Table 3. Significant interactions between cholesterol and diet were observed for total cholesterol, phospholipid, lipid (all  $p < 0.001$ ), and TAG ( $p = 0.003$ ) levels, and the cholesterol/phospholipid ratio ( $p < 0.001$ ). Both cholesterol-enrichment and type of diet modified (at least  $p = 0.028$ ) most of parameters tested. Although HC rats displayed significantly higher plasma cholesterol, phospholipid, and total lipid levels ( $p < 0.001$ ) than their C counterparts, HG and HGS rats did not display higher values of these parameters than their G and GS counterparts. Rats given HG and HGS presented significantly lower TAG levels than G and GS animals ( $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively). AE activity was significantly lower in HC and HG animals than in their C and G counterparts. HC, HG, and HGS rats presented higher cholesterol/phospholipid ratios than C, G, and GS animals. AE/cholesterol ratios of HC, HG, and HGS animals were lower than those of C, G, and GS rats, respectively, while the AE/HDL-cholesterol ratios of HC and HG rats were lower than those of their C and G counterparts (at least  $p < 0.01$ ). TGA and total lipids were significantly lower while AE/cholesterol higher ( $p < 0.05$ ) in G versus C rats. TGA, phospholipids, total lipids, and the cholesterol/phospholipid ratio were significantly lower ( $p < 0.05$ ), while the AE/

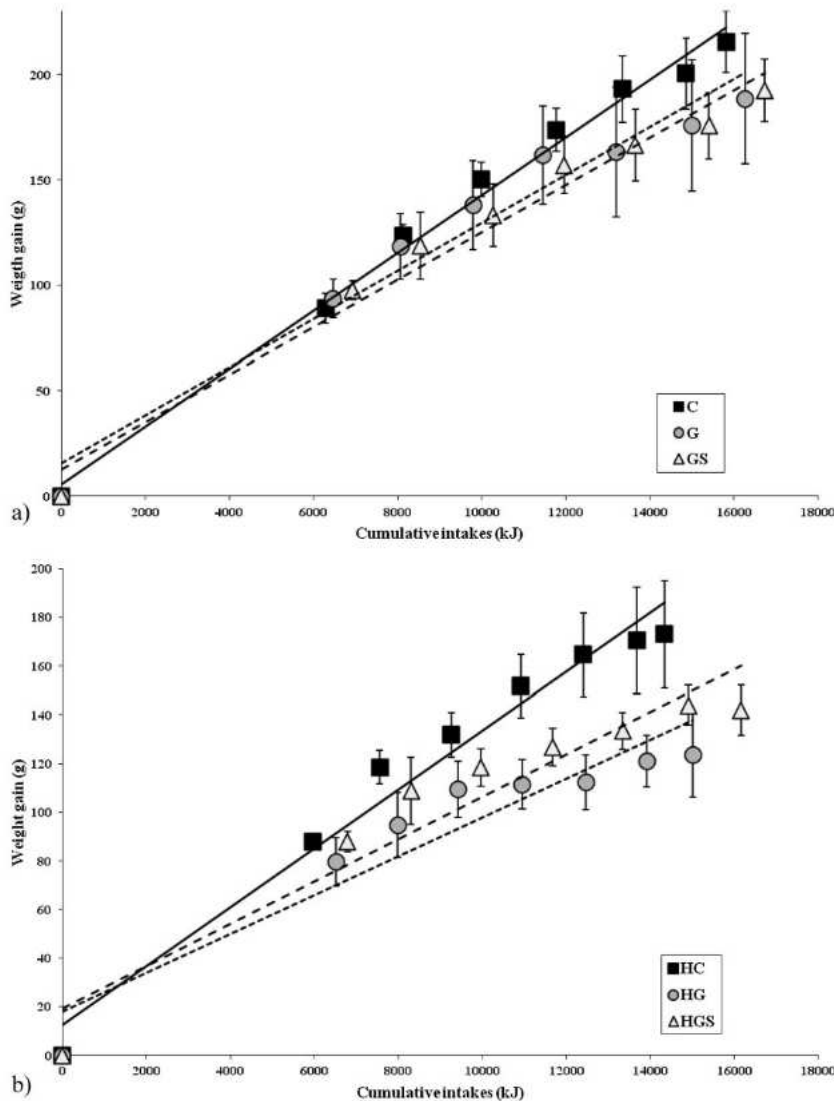
cholesterol ratio higher ( $p < 0.05$ ) in HG and HGS versus HC rats.

### 3.4 Lipoprotein profile

The cholesterol and TAG content of the different lipoprotein fractions is shown in Table 4. A significant interaction between cholesterol and diet was observed for VLDL-cholesterol, (IDL+LDL)-cholesterol and (IDL+LDL)-TAG (all  $p < 0.001$ ) and the cholesterol/TAG ratio in HDL ( $p = 0.006$ ). Supplementary dietary cholesterol and type of diet affected the cholesterol and TAG content of all lipoprotein fractions (at least  $p = 0.003$ ). When results were studied according to the cholesterol-supplement status of each group, G rats displayed lower VLDL-TGA levels than C rats ( $p < 0.05$ ), while the HG and HGS groups had lower VLDL-cholesterol, (IDL+LDL)-cholesterol, HDL-cholesterol, VLDL-TGA, (IDL+LDL)-TGA and HDL-TGA concentrations than their HC counterparts. The cholesterol/TAG ratio was significantly higher in VLDL, IDL+LDL, and HDL of HG versus HC rats ( $p < 0.05$ ) while in IDL+LDL in HGS versus HC rats ( $p < 0.05$ ).

### 3.5 Percentage contribution of lipids to lipoprotein composition

Results are presented in Fig. 2a and b. A significant interaction between cholesterol and diet was observed with regard to the percentage of cholesterol in IDL+LDL and HDL ( $p < 0.001$ ). Diet affected ( $p < 0.001$ ) the percentage contribution of cholesterol in VLDL, IDL+LDL, and HDL. Cholesterol supplementation influenced the cholesterol (at least  $p = 0.003$ ) and TGA ( $p < 0.001$ ) percentage contribution of VLDL, IDL+LDL, and HDL.



**Figure 1.** (a) Growth rates in rats fed the control, glucomannan- and glucomannan *plus* spirulina-enriched squid-surimi experimental diets.  $Y = (\text{intercept with their standard error}) + (\text{slope with their standard error}) \times X$ , where  $Y$  is the body-weight gain and  $X$  is the food consumption. Control squid-surimi (C):  $Y = (-13.57 \pm 5.07) + (0.015 \pm 0.000) \times X$ ;  $r^2 = 0.935$  ( $p < 0.001$ );  $\beta$  0.967. Glucomannan squid-surimi (G):  $Y = (17.958 \pm 6.911) + (0.011 \pm 0.001) \times X$ ;  $r^2 = 0.843$  ( $p < 0.001$ );  $\beta$  0.918. Glucomannan *plus* spirulina squid-surimi:  $Y = (-6.908 \pm 4.989) + (0.013 \pm 0.000) \times X$ ;  $r^2 = 0.919$  ( $p < 0.001$ );  $\beta$  0.918. Mean values were significantly different (ANCOVA test) for C versus G, C versus GS, and G versus GS (all  $p < 0.05$ ). (b) Growth rates in rats fed the control, glucomannan- and glucomannan *plus* spirulina-enriched squid-surimi experimental diets with supplementary cholesterol.  $Y = (\text{intercept with their standard error}) + (\text{slope with their standard error}) \times X$ , where  $Y$  is the body-weight gain and  $X$  is the food consumption. Hypercholesterolemic control squid-surimi (HC):  $Y = (-8.139 \pm 4.749) + (0.014 \pm 0.001) \times X$ ;  $r^2 = 0.925$  ( $p < 0.001$ );  $\beta$  0.962. Hypercholesterolemic glucomannan squid-surimi (HG):  $Y = (7.876 \pm 5.546) + (0.009 \pm 0.001) \times X$ ;  $r^2 = 0.782$  ( $p < 0.001$ );  $\beta$  0.884. Hypercholesterolemic glucomannan *plus* spirulina squid-surimi (HGS):  $Y = (7.502 \pm 5.357) + (0.010 \pm 0.001) \times X$ ;  $r^2 = 0.840$  ( $p < 0.001$ );  $\beta$  0.917. Mean values were significantly different (ANCOVA test) for HC versus HG and HC versus HGS (both  $p < 0.05$ ).

## 4 Discussion

The present paper describes, for the first time, how cholesterol-enriched and non-cholesterol-enriched diets including glucomannan- or glucomannan *plus* spirulina-enriched squid-surimi influence body weight gain, plasma AE activity, and the plasma lipoprotein profile in rats used as animal models of metabolic syndrome (MS).

In the present study, diets containing G or GS-enriched restructured squid-surimi were generally well accepted by growing rats, as similar intake data from other studies corroborate [21]. As in other studies, diets with a high energy and saturated fat content induced obesity and considerable body weight gain in Zucker Fa/Fa rats [22]. The conversion index in the present study was lower than that observed in casein-fed Wistar rats [19]. Interestingly, dietary glucomannan did not reduce food intake as a consequence of its

potential satiating effect as the animals, in fact, ingested more food and, thus, more energy. It must be noted that the six experimental diets were practically isocaloric as they differed little in their energy content (approximately 1.3 kJ/g). However, G and GS rats presented lower growth rates, feed conversion ratios, and body weight gains than C rats suggesting, at least in our experimental conditions, that glucomannan included in squid-surimi partially blocked absorption or utilization of dietary macronutrients. Our results coincide with evidence that fiber contributes to reduce dietary energy bioavailability [23, 24]. Despite reports of certain effects attributed to consumption of spirulina [25], the authors of the present study observed no effects of this microalga on body weight. Coinciding with the findings of Beynen *et al.* [26], supplementary dietary cholesterol decreased growth rate in the present study. This effect cannot be attributed to dietary energy content, as diets were

**Table 3.** Plasma cholesterol, TAG, phospholipids, total lipid, cholesterol/phospholipids, arylesterase (AE), AE/total cholesterol and AE/HDL-cholesterol levels in rats fed the control, glucosaminan- and glucosaminan *plus* spirulina-enriched squid-surimi diets with and without the cholesterol supplement (Mean values and SDs)

	Added cholesterol	Control	Glucosaminan	Glucosaminan + Spirulina	ANOVA		
					Diet	Cholesterol	Diet* cholesterol
Total cholesterol (mg/dL) <sup>1</sup>	No	130.2 ± 24.9	90.5 ± 12.4	93.3 ± 17.3	<0.001	<0.001	<0.001
	Yes	839.6 ± 250.3a***	166.5 ± 72.4b	141.5 ± 48.9b			
TAG (mg/dL) <sup>1</sup>	No	162.6 ± 73.4 a	107.2 ± 31.1b	134.2 ± 62.2ab	<0.001	0.028	0.003
	Yes	213.0 ± 83.2 a	34.9 ± 20.5b*	43.9 ± 43.8b**			
Phospholipids (mg/dL) <sup>1</sup>	No	233.7 ± 55.1	181.6 ± 38.8	205.0 ± 50.9	<0.001	<0.001	<0.001
	Yes	634.8 ± 159.3a***	226.5 ± 45.5b	200.3 ± 51.0b			
Total lipids (mg/dL) <sup>1,2</sup>	No	526.5 ± 145.6a	379.3 ± 70.2b	432.5 ± 110.5ab	<0.001	<0.001	<0.001
	Yes	1806.5 ± 329.2a***	427.8 ± 103.3b	385.8 ± 121.6b			
Cholesterol/phospholipids	No	0.57 ± 0.08	0.51 ± 0.10	0.47 ± 0.09	<0.001	<0.001	<0.001
	Yes	1.28 ± 0.22a***	0.73 ± 0.23b*	0.71 ± 0.20b**			
Arylesterase (U/L)	No	1072.4 ± 343.1	1127.5 ± 368.4	990.4 ± 297.7	0.809	<0.001	0.655
	Yes	691.3 ± 149.5**	731.8 ± 130.7**	753.6 ± 130.1			
AE/cholesterol (U/mg) <sup>3</sup>	No	0.87 ± 0.36a	1.28 ± 0.56b	1.09 ± 0.35ab	0.006	<0.001	0.417
	Yes	0.08 ± 0.02a***	0.50 ± 0.19b***	0.59 ± 0.22b**			
AE/HDLcholesterol (U/mg) <sup>3</sup>	No	1.35 ± 0.62	1.72 ± 0.76	1.42 ± 0.49	0.187	<0.001	0.354
	Yes	0.52 ± 0.09**	0.81 ± 0.24***	0.99 ± 0.22			

a, b: Mean values within a row with unlike superscript letters were significantly different ( $p < 0.05$ , Bonferroni test). Mean values within a column for the same parameter were significantly different from their no supplementary cholesterol counterparts: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$ . <sup>1</sup>To transform mg/dL to mmol/L of cholesterol, TAG and phospholipids, divide data by 38.86, 89, and 75, respectively. <sup>2</sup>Cholesterol + TAG + phospholipids. <sup>3</sup>To transform U/mg to U/mmol of cholesterol, multiply data by 387. One unit of AE was defined as the mmol of phenol formed from phenyl acetate per min.

considered isocaloric. Mahfouz and Kummerow [27] reported lower body weight gain in rabbits but not in rats fed cholesterol-enriched diets. Bocanegra et al. [21] reported that the availability of some dietary minerals, such as Zn, were negatively affected in cholesterol-fed rats. The central role of Zn in growth would, at least partially, explain the lower body weight increase of HC, HG, and HGS rats as compared with that of their respective non-cholesterol-enriched diet counterparts. The addition of cholesterol to the diet did not modify the effect of glucosaminan or glucosaminan with spirulina on body weight, as HG and HGS animals presented lower growth rates, and body weight gains than HC rats.

#### 4.1 Lipidemia, lipoproteinemia, and plasma arylesterase activity

Rats are the animals most often used in cholesterol metabolism studies and one of the most often used to study the cholesterolemic effect of proteins [28]. In addition, Fa/Fa Zucker rats have been widely used as animal models of obesity and MS [4]. In concurrence with the findings of other studies in Fa/Fa rats, the C diet, rich in fat and saturated fatty acids, induced obesity, moderate hypercholesterolemia, and hypertriglyceridemia [29, 30]. The C diet induced moderate hypercholesterolemia, as 87.5% of the rats displayed

cholesterol levels  $>2.58$  mmol/L (100 mg/dL), cut-off point for rat hypercholesterolemia [31]. However, our values tended to be slightly lower than those from other studies, probably because of the different sources of protein and their lysine/arginine ratio (casein, 2.0 vs. squid-surimi, 1.02) [32]. Fish protein with a lysine/arginine ratio similar or  $<1$  has been found to be moderately hypocholesterolemic with respect to other animal proteins as casein and meat [12, 13].

The present study demonstrated that the G diet in comparison to C one, tended to decrease cholesterol (12.5% of rats with  $<100$  mg/dL) and phospholipids levels, and decreased TGA. Dietary fiber, such as glucosaminan, exerts a moderate effect on plasma cholesterol levels, but results of this fiber on TAG or phospholipids have scarcely been published. The most probable mode of action of glucosaminan appears to be *via* retention of fat by adsorption and/or sequestration of bile salts; thus, contributing to decrease the hyperlipemic effect of the C diet. G and GS diets may also partially block body weight gain and thus help to decrease triglyceridemia [24, 29, 30].

Spirulina did not induce any extra significant effect on serum lipids in the present study, although it is rich in fiber and contains 7.5% fat, from that about 18% are omega-3 fatty acids. However, as only 3 g/kg diet of spirulina (36 mg omega-3 PUFA/kg diet) was included in GS and HGS diets it can be

**Table 4.** Cholesterol, TAG, and cholesterol/TAG ratios in lipoprotein fractions, in rats fed the control, glucomannan- and glucomannan *plus* spirulina-enriched squid-surimi diets with and without the cholesterol supplement (Mean values and SDs)

						ANOVA		
		Added cholesterol	Control	Glucomannan	Glucomannan + Spirulina	Diet	Cholesterol	Diet* Cholesterol
VLDL	Cholesterol (mg/dL) <sup>1</sup>	No	22.2 ± 8.2	8.4 ± 4.4	9.6 ± 6.1	<0.001	<0.001	<0.001
		Yes	203.7 ± 61.5a***	15.6 ± 5.8 b	24.3 ± 14.8b			
	Triglycerides (mg/dL) <sup>1</sup>	No	136.4 ± 76.0 a	84.7 ± 29.8b	112 ± 51.4ab	<0.001	<0.001	0.085
		Yes	118.4 ± 51.7a	19.8 ± 14.3b**	19.7 ± 19.0b***			
	Cholesterol/TAG ratio	No	0.18 ± 0.06	0.11 ± 0.07	0.08 ± 0.03	0.198	<0.001	0.223
		Yes	1.9 ± 0.54a***	1.1 ± 0.66b*	2.0 ± 1.7a***			
IDL + LDL	Cholesterol (mg/dL) <sup>1</sup>	No	18.1 ± 5.8	6.3 ± 2.9	3.3 ± 1.9	<0.001	<0.001	<0.001
		Yes	411.4 ± 178.4a***	30.2 ± 21.7b	21.3 ± 14.9b			
	Triglycerides (mg/dL) <sup>1</sup>	No	7.3 ± 5.9	3.9 ± 3.3	3.2 ± 5.2	<0.001	<0.001	<0.001
		Yes	51.7 ± 20.8a***	7.0 ± 3.3b	8.8 ± 4.9b			
	Cholesterol/TAG ratio	No	4.0 ± 3.0	4.8 ± 6.5	3.2 ± 3.8	0.077	0.253	0.152
		Yes	8.5 ± 3.5 a*	4.6 ± 2.7b	2.8 ± 2.0b			
HDL	Cholesterol (mg/dL) <sup>1</sup>	No	85.8 ± 19.6	68.9 ± 13.0	72.2 ± 13.1	0.003	0.001	0.150
		Yes	125.7 ± 29.2a**	98.7 ± 36.8b*	79.3 ± 20.9b			
	Triglycerides (mg/dL) <sup>1</sup>	No	23.2 ± 12.6	18.9 ± 6.9	19.5 ± 9.4	0.002	<0.001	0.126
		Yes	20.3 ± 3.8a	5.8 ± 3.5b***	7.4 ± 2.2b**			
	Cholesterol/TAG ratio	No	4.5 ± 2.3	4.1 ± 1.7	4.3 ± 1.6	0.009	<0.001	0.006
		Yes	6.2 ± 1.3a	26.4 ± 21.1b***	11.1 ± 2.4a			

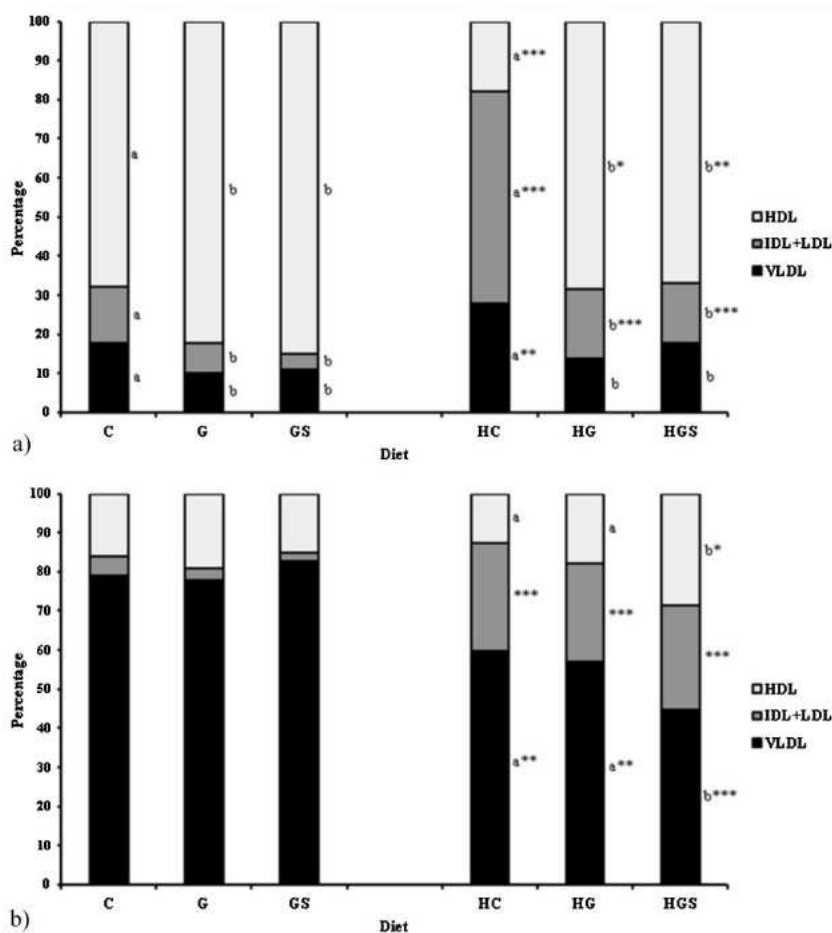
a, b: Mean values within a row with unlike letters were significantly different ( $p < 0.05$ , Bonferroni test). Mean values within a column for the same parameter were significantly different from their no supplementary cholesterol counterparts: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$ . <sup>1</sup>To transform mg/dL to mmol/L of cholesterol and TAG, divide data by 38.7 and 89.0, respectively.

accepted that the additive effect of spirulina to those fiber-glucomannan on cholesterol and TAG levels should be negligible as low amount of omega-3 fatty acids induces non significant changes in plasma lipids and lipoproteins [33].

The distribution of cholesterol and TAG among lipoprotein fractions in rats of the present study given diets without additional cholesterol (Fig. 2a and b) is similar, in general terms, to that of Wistar rats consuming semisynthetic diets [19]. HDL plays a major role in the transport of cholesterol and VLDL in that of TAG [34]. In general, rats display a very effective uptake of VLDL and a low transference of apolipoprotein B from VLDL to LDL, which explains the low levels of IDL + LDL found in the present study and in those of previous investigations given no cholesterol-enriched diets [31, 35]. However, the cholesterol transport of the non-HDL fractions was lower in rats given the G and GS diets than in their C counterparts (Fig. 2a), making the cholesterol contribution of the non-HDL fractions even more similar to that observed in non-obese rats [19].

AE, which binds to HDL and other lipoproteins [36], inhibits lipoperoxidation in LDL and HDL [16]. AE activity increases in volunteers consuming pomegranate polyphenols [37] or in seaweed fed rats [38]. G and GS did not affect AE activity, suggesting that glucomannan and spirulina did not improve lipoprotein antioxidant status.

Coinciding with findings of other studies, supplementary dietary cholesterol greatly modified serum lipid content and the lipoprotein profile in the present study [28]. All HC rats presented severe hypercholesterolemia ( $>200$  mg/dL) and a large percentage (87.5%) had cholesterol levels  $>600$  mg/dL, suggesting that Fa/Fa rats, under the present experimental conditions, were very sensitive to high-energy, high saturated fat, cholesterol-enriched diets. The VLDL and IDL + LDL fractions of HC rats transported 9- and 20-times more cholesterol, respectively, than those of C rats, while the HDL fraction of HC rats carried 1.5-times more cholesterol than that of their C-diet counterparts. The 10-fold enrichment in the cholesterol/TAG ratio of the VLDL fraction clearly suggests that the HC diet produced very large amounts of  $\beta$ -VLDL [38]. That same ratio was 3 times higher in the IDL + LDL fraction and 1.7 times higher in the HDL fraction of HC rats than the respective values of C rats. HG and HGS diets significantly reduced the induction of the hypercholesterolemia observed in the HC diet, as cholesterol levels in the VLDL, IDL + LDL, and HDL fractions of HG and HGS rats were only 2–2.5, 7, and 1.1–1.5 times higher, respectively, than the values of G and GS rats. Interestingly, the higher cholesterol/TAG ratio observed in the HDL fraction of HG and HGS rats suggests that these HDL were more anti-atherogenic than those of HC counterparts, as HDL enriched



**Figure 2.** (a) Percentage of transport (%) of cholesterol in the different lipoproteins: VLDL, IDL + LDL, and HDL, in rats fed the Control (C), Glucomannan (G)- and Glucomannan plus Spirulina (GS)-enriched squid-surimi experimental diets and the hypercholesterolemic-control (HC), (HG)- and Glucomannan plus Spirulina (HGS) squid-surimi experimental diets. Mean values were significantly different for cholesterol \* diet interaction for IDL + LDL-cholesterol and for HDL-cholesterol (both  $p < 0.001$ ). (a and b) Mean values within the same lipoprotein for C, G, and GS, and for HC, HG, and HGS, with unlike letters were significantly different ( $p < 0.05$ , Bonferroni test), represented by vertical bar areas. Mean values within the same lipoprotein for C versus HC, G versus HG, and GS versus HGS were significantly different ( $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  and  $***p < 0.001$ ), represented by vertical bar areas. (b) Percentage of transport (%) of TAG in the different lipoproteins: VLDL, IDL + LDL, and HDL, in rats fed the Control (C), Glucomannan (G)- and Glucomannan plus Spirulina (GS)-enriched squid-surimi experimental diets and the hypercholesterolemic-control (HC), (HG)-, and Glucomannan plus Spirulina (HGS) squid-surimi experimental diets. a,b Mean values within the same lipoprotein for C, G, and GS, and for HC, HG, and HGS (represented by vertical bar areas), with unlike letters were significantly different ( $p < 0.05$ , Bonferroni test). Mean values within the same lipoprotein for C versus HC, G versus HG, and GS versus HGS (represented by vertical bar areas) were significantly different ( $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ , and  $***p < 0.001$ ).

in TAG are less efficient in the inverse cholesterol transport [39]. Hepatic scavenger receptor B-I (SR-BI) plays an essential role in the hepatic uptake of plasma HDL-derived cholesterol and cholesterol esters for their subsequent secretion into the bile [40]. Also HDL particles play a central role in the elimination of free radical [18]. This may explain the lower HDL-cholesterol in HG and HGS rats compared with those of their HC counterparts. The absence of modifications in AE activity in HG and HGS groups versus HC suggest the absence of effect of glucomannan added or not with spirulina on this antioxidant enzyme. However, AE/HDL-cholesterol was increased in HG and HGS suggesting that HDL appear enriched in this AE.

The effect of the HG and HGS diets diet on cholesterol and TAG distribution in the lipoprotein fractions is impressive, compared with the HC (Fig. 2a and b). Results suggest that the cholesterol-enriched HG and HGS diets almost normalized cholesterol distribution in lipoproteins. As

the contribution of HDL to total lipoprotein TAG transport in normal rats is quite high [19], HG and HGS diets appear to have made a substantial contribution to normalizing the distribution of TAG between the different lipoprotein fractions. This effect could be due to the partial check of glucomannan on both body weight gain and dietary hypercholesterolemic effect.

## 5 Conclusions

Diets including glucomannan squid-surimi were well-accepted by Zucker Fa/Fa rats and limited body weight gain induced by diets rich in energy and saturated fat. Glucomannan, without any additional contribution of spirulina, decreased the hyperlipemic effect of these diets. This polysaccharide significantly reduced the hypercholesterolemic effects of supplementary cholesterol in the diet, and normalized plasma

lipid levels and the distribution of cholesterol and TAG in the lipoproteins fractions. The authors emphasize the importance of future studies of glucomannan-enriched squid-surimi in obese persons and those with hyperlipemia.

The present study was supported by the Spanish projects AGL 2008 04892/C03/D2, AGL 2011/29644/C02/D2, and Consolider-Ingenio 2010 project # CSD2007/00016. We gratefully acknowledge the foreign fellowship for graduate studies granted by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) of México to Laura González-Torres. The present study was approved by the Spanish Science and Technology Advisory Committee (project AGL 008 04892/C03/D2) and by an ethics committee of the Universidad Complutense de Madrid (Spain). All experiments were performed in compliance with Directive 86/609/EEC of November 24, 1986 for the protection of scientific research animals.

The authors have declared no conflict of interest.

## References

- [1] Kuipers, R., de Graaf, D., Luxwolda, M., Muskiet, M. *et al.*, Saturated fat, carbohydrates and cardiovascular disease. *Neth. J. Med.* 2011, 69, 372–378.
- [2] Tranchida, F., Tchiakpe, L., Rakotoniaina, Z., Deyris, V. *et al.*, Long-term high fructose and saturated fat diet affects plasma fatty acid profile in rats. *J. Zhejiang Univ. [Sci. B]* 2012, 13, 307–317.
- [3] Cuesta, C., Ródenas, S., Merinero, M., Rodríguez-Gil, S. *et al.*, Lipoprotein profiles and serum peroxide levels of aged women consuming palmolein or oleic acid-rich sunflower oil diets. *Eur. J. Clin. Nutr.* 1998, 52, 675–683.
- [4] Aleixandre de Artiñano, A., Miguel Castro, M., Experimental rat models to study the metabolic syndrome. *Br. J. Nutr.* 2009, 102, 1246–1253.
- [5] Sánchez-Muniz, F. J., Cava, F., Viejo, J., Higón, E. *et al.*, Olive oil- and sunflower oil-fried sardines in the prevention of rat hypercholesterolemia. *Z. Ernährungswiss.* 1995, 34, 6–21.
- [6] Kris-Etherton, P., Harris, W., Appel, L. J., Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Arterioscl. Thromb. Vas.* 2003, 23, 20–30.
- [7] Aranceta, J., Pérez-Rodrigo, C., Ribas, L., Serra-Majem, L., Sociodemographic and lifestyle determinants of food patterns in Spanish children and adolescents: The enKid study. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2003, 57, 40–44.
- [8] Borderías, A., Sánchez-Alonso, I., Pérez-Mateos, M., New applications of fibres in foods: Addition to fishery products. *Trends Food Sci. Tech.* 2005, 16, 458–465.
- [9] González-Canga, A., Fernández-Martínez, N., Sahagún, A., García-Vicitez, J. *et al.*, Glucomanano: Propiedades y aplicaciones terapéuticas. *Nutr. Hosp.* 2004, 19, 45–50.
- [10] Nagaoka, S., Shimizu, K., Kaneko, H., Shibayama, F. *et al.*, A novel protein C-phycoerythrin plays a crucial role in the hypocholesterolemic action of *Spirulina platensis* concentrate in rats. *J. Nutr.* 2005, 135, 2425–2430.
- [11] Cheong, S., Kim, M., Sok, D., Hwang, S. *et al.*, Spirulina prevents atherosclerosis by reducing hypercholesterolemia in rabbits fed a high-cholesterol diet. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 2010, 56, 34–40.
- [12] Kritchevsky, D., Tepper, S., Czarnecki, S., Klurfeld, D., Atherogenicity of animal and vegetable protein. Influence of the lysine to arginine ratio. *Atherosclerosis* 1982, 41, 429–431.
- [13] Vázquez, J., Sánchez-Muniz, F. J., Review: Fish protein and cholesterol metabolism. *Rev. Esp. Cien. Tec. Ali.* 1994, 34, 589–608.
- [14] Vázquez-Velasco, M., Díaz, L., Lucas, R., Gómez-Martínez, S. *et al.*, Effects of hydroxytyrosol-enriched sunflower oil consumption on CVD risk factors. *Br. J. Nutr.* 2011, 105, 1448–1452.
- [15] Nus, M., Frances, F., Librelotto, J., Canales, A. *et al.*, Arylesterase activity and antioxidant status depend on PON1-Q192R and PON1-L55M polymorphisms in subjects with increased risk of cardiovascular disease consuming walnut-enriched meat. *J. Nutr.* 2007, 137, 1783–1788.
- [16] Aviram, M., Rosenblat, M., Paraoxonases 1, 2, and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. *Free Radical Biol. Med.* 2004, 37, 1304–1316.
- [17] Aviram, M., Rosenblat, M., Bisgaier, C., Newton, R. *et al.*, Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J. Clin. Invest.* 1998, 101, 1581–1590.
- [18] Canales, A., Sánchez-Muniz, F. J., Bastida, S., Librelotto, J. *et al.*, Effect of walnut-enriched meat on the relationship between VCAM, ICAM, and LTB4 levels and PON-1 activity in ApoA4 360 and PON-1 allele carriers at increased cardiovascular risk. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2011, 65, 703–710.
- [19] Olivero-David, R., Schultz-Moreira, A., Vázquez-Velasco, M., González-Torres, L. *et al.*, Effects of Nori- and Wakame-enriched meats with or without supplementary cholesterol on arylesterase activity, lipaemia and lipoproteinaemia in growing Wistar rats. *Br. J. Nutr.* 2011, 106, 1476–1486.
- [20] Nus, M., Sánchez-Muniz, F. J., Sinisterra-Gago, J. V., López-Oliva, E. *et al.*, Determination of rat and mice arylesterase activity using serum mimetics. *Enzyme Microb. Tech.* 2008, 43, 252–256.
- [21] Bocanegra, A., Nieto, A., Bastida, S., Benedí, J. *et al.*, A Nori but not a Konbu, dietary supplement decreases the cholesterolaemia, liver fat infiltration and mineral bioavailability in hypercholesterolaemic growing Wistar rats. *Br. J. Nutr.* 2008, 99, 272–280.
- [22] Tovar, A., Díaz-Villaseñor, A., Cruz-Salazar, N., Ordáz, G. *et al.*, Dietary type and amount of fat modulate lipid metabolism gene expression in liver and in adipose tissue in high-fat diet-fed rats. *Arch. Med. Res.* 2011, 42, 540–553.
- [23] Lairon, D., Defoort, C., Effects of nutrients on postprandial lipemia. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 2011, 9, 309–312.
- [24] Sánchez-Muniz, F. J., Dietary fibre and cardiovascular health. *Nutr. Hosp.* 2012, 27, 31–45.
- [25] Moura, L., Puga, G., Beck, W., Teixeira, I. *et al.*, Exercise and spirulina control non-alcoholic hepatic steatosis and lipid profile in diabetic Wistar rats. *Lipids Health Dis.* 2011, 10, 77.
- [26] Beynen, A., Boogaard, A., Van Laack, H., Katan, M., Cholesterol metabolism in two strains of rats with high or low response of serum cholesterol to a cholesterol-rich diet. *J. Nutr.* 1984, 114, 1640–1651.

- [27] Mahfouz, M., Kummerow, F., Cholesterol-rich diets have different effects on lipid peroxidation, cholesterol oxides, and antioxidant enzymes in rats and rabbits. *J. Nutr. Biochem.* 2000, 11, 293–302.
- [28] Chiang, M., Chen, Y., Huang, A., Plasma lipoprotein cholesterol levels in rats fed a diet enriched in cholesterol and cholic acid. *Int. J. Vit. Nutr. Res.* 1998, 68, 328–334.
- [29] Aprikian, O., Busslerolles, J., Manach, C., Mazur, A. et al., Lyophilized apple counteracts the development of hypercholesterolemia, oxidative stress, and renal dysfunction in obese Zucker rats. *J. Nutr.* 2002, 132, 1969–1976.
- [30] Galisteo, M., Sánchez, M., Vera, R., González, M. et al., A diet supplemented with husks of *Plantago ovata* reduces the development of endothelial dysfunction, hypertension, and obesity by affecting adiponectin and TNF-alpha in obese Zucker rats. *J. Nutr.* 2005, 135, 2399–2404.
- [31] Sánchez-Muniz, F. J., Bastida, S., Do not use the Friedewald formula to calculate LDL-cholesterol in hypercholesterolaemic rats. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2008, 110, 295–301.
- [32] Vahouny, G., Adamson, I., Chalcarz, W., Satchithanandam, S. et al., Effects of casein and soy protein on hepatic and serum lipids and lipoprotein lipid distributions in the rat. *Atherosclerosis* 1985, 56, 127–137.
- [33] Harris, W. S., Miller, M., Tighe, A. P., Davidson, M. H. et al., Omega-3 fatty acids and coronary heart disease risk: Clinical and mechanistic perspectives. *Atherosclerosis* 2008, 197, 12–24.
- [34] Murata, M., Sano, Y., Ishihara, K., Uchida, M., Dietary fish oil and *Undaria pinnatifida* (wakame) synergistically decrease rat serum and liver triacylglycerol. *J. Nutr.* 2002, 132, 742–747.
- [35] Wong, K., Sam, S., Cheung, P., Ang, P., Changes in lipid profiles of rats fed with seaweed-based diets. *Nutr. Res.* 2000, 19, 1519–1527.
- [36] Fuhrman, B., Volkova, N., Aviram, M., Paraoxonase 1 (PON1) is present in postprandial chylomicrons. *Atherosclerosis* 2005, 180, 55–61.
- [37] Rock, W., Rosenblat, M., Miller-Lotan, R., Levy, A. et al., Consumption of wonderful variety pomegranate juice and extract by diabetic patients increases paraoxonase 1 association with high-density lipoprotein and stimulates its catalytic activities. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 8704–8713.
- [38] Bocanegra, A., Bastida, S., Benedí, J., Nus, M. et al., Effect of seaweed and cholesterol-enriched diets on postprandial lipoproteinaemia in rats. *Br. J. Nutr.* 2009, 102, 1728–1739.
- [39] Jover-Sanz, E., in: M. d. e. O. y. a. Fundación Jiménez Díaz, (Ed.), *Metabolismo Lipídico. Investigación en Biomedicina (Lipid Metabolism. Research in Biomedicine)*, International Marketing and Communications, S.A. (Spain) 1994.
- [40] Zhou, H., Li, Z., Silver, D., Jiang, X., Cholesteryl ester transfer protein (CETP) expression enhances HDL cholesteryl ester liver delivery, which is independent of scavenger receptor BI, LDL receptor related protein and possibly LDL receptor. *Biochim. Biophys. Acta* 2006, 1761, 1482–1488.

## 5.2. PUBLICACIÓN N°2

**Food and Chemical Toxicology** (Enviado, pendiente de aceptación)

**ISI Web JCR (2014):** Índice de impacto: **2.895**

14/123 en "Food Science and Technology" (Q1)

### **Glucomannan or glucomannan *plus* spirulina-enriched squid surimi diets reduce liver and heart histological damage on Zucker *fafa* rats fed atherogenic diet enriched or not in cholesterol**

Miguel Vázquez-Velasco, Laura González-Torres, Rosa A. García-Fernández, M. Teresa Méndez, Sara Bastida, Juana Benedí, María José González-Muñoz, and Francisco J. Sánchez-Muniz

**Resumen:** El hígado graso no alcohólico se ha asociado a la Diabetes Mellitus tipo 2. El surimi de calamar enriquecido con glucomanano es un alimento potencialmente funcional con efectos relevantes sobre la colesterolemia y el estatus antioxidante hepático. Se examinó, en el marco de una dieta rica en energía y grasas saturadas, el efecto en ratas *fafa* de grandes cantidades de surimi de calamar enriquecido con glucomanano o glucomanano y espirulina sobre el tamaño y estructura del hígado y corazón, así como de marcadores de daño celular. Los animales se alimentaron con una dieta de roedores AIN-93M (70%) más diferentes surimis (30%) durante siete semanas: surimi control (C), enriquecido con 15% glucomanano (G) o con 15% glucomanano y 3 gramos de espirulina por kilogramo de dieta (GS). Los grupos control con colesterol (HC), glucomanano con colesterol (HG) y glucomanano más espirulina con colesterol consumieron dietas similares con la inclusión de colesterol (2%) y ácido cólico (0,4%). Las dietas G y GS redujeron el incremento de peso, las transaminasa plasmáticas, la esteatosis hepática, los lipogranulomas y las puntuaciones totales y de inflamación con respecto a la dieta C. Los efectos negativos de la dieta control se potenciaron fuertemente por la adición de colesterol, ya que el peso hepático, el índice hepatosomático y todos los marcadores de daño y puntuaciones histológicas se incrementaron en la dieta HC con respecto a la C (al menos  $p < 0,05$ ). La adición de glucomanano (HG vs. HC) mejoró los marcadores sin efectos adicionales de la inclusión de espirulina excepto la mejora de la puntuación de alteración histológica total. Resumiendo, el glucomanano y el glucomanano con espirulina bloquearon los efectos

negativos inducidos por dietas ricas en energía y grasa saturada con colesterol añadido o no. Aunque se necesitan más estudios, nuestros resultados sugieren la utilidad de incluir estos ingredientes funcionales en productos derivados de la pesca para el consumo de personas en riesgo de padecer hígado graso no alcohólico.

**Glucomannan and glucomannan *plus* spirulina-enriched squid surimis affect liver and heart histological damage on Zucker *fal/fa* rats fed atherogenic diets enriched or not in cholesterol**

Miguel Vázquez-Velasco<sup>a</sup>, Laura González-Torres<sup>a</sup>, Rosa A. García-Fernández<sup>b</sup>, M. Teresa Méndez<sup>c</sup>, Sara Bastida<sup>a</sup>, Juana Benedí<sup>d</sup>, M. José González-Muñoz<sup>e</sup>, and Francisco J. Sánchez-Muniz<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición), Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain.

<sup>b</sup>Departamento Medicina y Cirugía Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain.

<sup>c</sup>Escuela de Especialización de Análisis Clínicos. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain.

<sup>d</sup>Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia; Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain.

<sup>e</sup>Departamento de Nutrición, Bromatología y Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, 28871 Madrid, Spain

**\*Corresponding author:** Francisco José Sánchez-Muniz. Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición), Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid. Plaza Ramón y Cajal s/n. 28040 Madrid, Spain.

Phone: 34-91 3941828; FAX: 34-91 3941810; e-mail: frasan@ucm.es

**Short title:** Glucomannan squid surimi effects on liver and heart

## Highlights

First study relating intake of glucomannan-enriched surimis and liver and heart changes

Distinct effects were observed for glucomannan or glucomannan/spirulina enriched-squid surimis

Total alteration scores in liver and heart were associated to damage biomarkers

Konjac-enriched surimi checked deleterious effects induced by atherogenic diets

Glucomannan or glucomannan/spirulina-surimis act as functional food in fa/fa rats

**Abstract**

1  
2 Glucomannan-enriched-squid surimi is a potential functional food with significant  
3 effects on cholesterolemia and liver antioxidant status. The effect in atherogenic diets  
4 containing squid surimi enriched with glucomannan or glucomannan-spirulina on liver  
5 and heart structures and cell damage markers was tested in fa/fa rats. Animals were  
6 fed 70% AIN-93M rodent-diet plus different 30% squid surimi diets for 7 weeks: control  
7 (C), glucomannan (G) and glucomannan plus spirulina (GS). Cholesterol-control (HC),  
8 cholesterol-glucomannan (HG) and cholesterol-glucomannan plus spirulina (HGS)  
9 groups consumed similar diets with the inclusion of hypercholesterolemic agent. G and  
10 GS diets decreased weight-gain, plasma transaminases, liver steatosis,  
11 lipogranulomas and total inflammation and alteration scores significantly vs. C diet.  
12 Deleterious effect of C diet was highly potentiated by dietary cholesterol, as liver  
13 weight, hepatosomatic index, damage markers and total histological scoring were  
14 increased in HC vs. C (at least  $p < 0.05$ ). Glucomannan addition (HG vs. HC) improved  
15 these biomarkers with non-extra effects from spirulina, except for liver total alteration  
16 score improvement. In conclusion, glucomannan and glucomannan-spirulina blocked  
17 the negative effects promoted by the atherogenic diets. Although more studies are  
18 needed, results suggest the utility of including these functional ingredients in sea-  
19 products to be consumed by people at non-alcoholic-fatty liver disease risk.  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

**Keywords:** Glucomannan; Liver/heart damage; Non-Alcoholic Fatty Liver Disease; Spirulina; Zucker fa/fa model.

**Abbreviations:** ALP, alkaline phosphatase; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; CK, creatine phosphokinase; iNOS, inducible nitric oxide synthase; LDH, lactate dehydrogenase; NAFLD, Non-alcoholic fatty liver disease; TAG, triglycerides; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor alpha; VLDL, very low density lipoproteins.

## 1. Introduction

Fatty liver due to non-alcoholic causes (NAFLD) is highly prevalent in the obese and is a predictor of both type 2 diabetes and cardiovascular disease (Yki-Jarvinen, 2014). Zucker fa/fa rats have been widely used as an animal model for obesity and metabolic syndrome (Aleixandre de Artinano and Miguel Castro, 2009) as these animals are very sensitive to hypercaloric and hyperlipemic diets, developing a chronic low-level inflammation state, closely linked to oxidative stress, which leads to cell damage (Codoner-Franch et al., 2011) and injuries in liver (Lohr et al., 2015) and heart (Baynes and Murray, 2009).

Emerging technologies in food processing allow the addition of ingredients with known health benefits and/or remove potentially undesirable components to obtain functional foods (Olmedilla-Alonso et al., 2013). Fish and specially fish derivatives represent an attractive matrix for functional food development due to their consumption health benefits (Kris-Etherton et al., 2003; Sánchez-Muniz et al., 1995), their excellent rheology for these purposes and their “healthy positioning” into consumers (Campo-Deaño et al., 2009; Moreno et al., 2014). Due to their satiating, laxative, and hypocholesterolemic properties, soluble-viscose fibres are candidate to be used as functional ingredients. However, flatulence, abdominal pain, and esophageal or lower gastrointestinal obstruction at highly consumed doses have been reported (González Canga et al., 2004). Our research team has found that the addition of glucomannan to a squid surimi matrix in the frame of a highly saturated fat diet improved plasma lipoprotein profile (Vázquez-Velasco et al., 2013) and antioxidant status, but induced mild increment of liver inflammation markers in fa/fa rats (Vázquez-Velasco et al., 2014; Vázquez-Velasco et al., 2015). *Spirulina platensis* is a microalga which is rich in minerals and antioxidant compounds such as carotenoids and phycocyanin (Nagaoka et al., 2005). When incorporated into glucomannan enriched squid surimi-diet, spirulina did not modify plasma lipoprotein profile or antioxidant status but highly reduced the

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

increase of liver inflammation markers observed (Vázquez-Velasco et al., 2013; Vázquez-Velasco et al., 2014; Vázquez-Velasco et al., 2015).

To the best of our knowledge apart from our research, no studies are available on the potential benefits of glucomannan-enriched surimi consumption on liver and/or heart damage on obese rats. As obesity, hypercholesterolemia and antioxidant status are recognized factors in playing a central role in liver and other organ damage (Bocanegra et al., 2008; Schultz Moreira et al., 2013), the hypothesis of the present work is that glucomannan-enriched and glucomannan *plus* spirulina-enriched squid-surimis act as functional foods by reducing the deleterious effects originated in *fa/fa* rats by highly saturated fat either enriched in cholesterol or not. Thus, the purpose of our study was to determine: a) the effects of large amounts of glucomannan-enriched squid-surimi in the frame of atherogenic diets on liver and heart injury biomarkers and histological parameters of inflammation or fat infiltration and b) to assess the convenience of its consumption in *fa/fa* rats affected of NAFLD.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Diet preparation and experimental design

The present study was approved by the Spanish Science and Technology Advisory Committee (project AGL 2008-04892-C03-02 and Consolider Ingenio 2010, CSD 2007-00016) and by an ethics committee of the Universidad Complutense of Madrid (Spain). All experiments were performed in compliance with Directive 86/609/EEC of 24th November 1986 (modified by Directive 2003/65/CE) for the protection of scientific research animals. A total of forty-eight male growing Zucker *fa/fa* rats with an initial body weight of approximately 120 g were obtained from Harlan Laboratories Models (Harlan, SL, Barcelona, Spain). The animals were housed individually in metabolic cells in a temperature-controlled room ( $22.3 \pm 1.9$  °C) with a 12 h light-12 h dark cycle. Rats were fed commercial pellets (Panlab, Barcelona, Spain) for a seven days adaptation

1 period and, then, distributed into six groups of eight animals each, according to their  
2 average body weight.  
3

4 Six experimental semi-synthetic diets were prepared: the control diet without  
5 added cholesterol (C) was composed of a homogeneous mixture of 70% rodent diet  
6 (AIN-93M purified rodent diet; Dyets, Inc., Bethlehem, PA, USA) and 30% freeze-dried  
7 restructured squid-surimi (with 15% microcrystalline cellulose); the glucomannan  
8 normocholesterolemic diet (G) consisted of a mixture of modified AIN-93 (AIN M no.  
9 102635) feed (70%) and freeze-dried, restructured glucomannan-enriched squid-surimi  
10 (30%); the glucomannan *plus* spirulina normocholesterolemic diet (GS) consisted of a  
11 mixture of modified AIN-93M no. 102635 feed (70%) and freeze-dried, restructured  
12 glucomannan *plus* spirulina-enriched squid-surimi (30%); the cholesterol-enriched  
13 control diet (HC) was identical to the C diet but with 2% cholesterol (95–98% purity)  
14 and 0.4% cholic acid (98% purity) substituting an equal amount of corn starch (modified  
15 AIN-93, AIN-93M no. 102636 diet); the cholesterol-enriched glucomannan diet (HG)  
16 was the G diet enriched with cholesterol (2%) and cholic acid (0.4%); the cholesterol-  
17 enriched glucomannan *plus* spirulina diet (HGS) consisted of the GS diet enriched with  
18 cholesterol (2%) and cholic acid (0.4%). Details of diet composition have been  
19 previously reported by Vázquez-Velasco et al. (2013). Water and food were provided  
20 *ad libitum* over the 7-week experimental period. In order to avoid inter-assay variations,  
21 fasting rats were taken, one at a time from each group, anesthetized and euthanized by  
22 extracting blood from the descending aorta with a syringe. Liver and heart were  
23 collected immediately after blood extraction, weighted and preserved in 10%  
24 formaldehyde aqueous solution.  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50

## 51 2.2. Liver and heart damage biomarkers

52 Plasma alkaline phosphatase (ALP), alanine aminotransferase (ALT), aspartate  
53 aminotransferase (AST), creatine phosphokinase (CK), and lactate dehydrogenase  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

(LDH) were analyzed using commercial kits according to the manufacturer's instructions in a Hitachi 737 Automatic Analyzer (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan).

### 2.3. Histological procedures

Specimens liver major lobe and heart or were fixed in 10% buffered formalin, dehydrated in alcohol gradient and xylene and embedded in paraffin. 5  $\mu$ m sections were obtained in a microtome (JUNG RM 2155, Leica, Solms, Germany) and were stained with routine hematoxylin and eosin. The histological evaluation was performed in each liver, studying three sections per liver, amplified at 4x, 10x and 20x, in a digital photomicroscope (Olympus BX50, Tokyo, Japan) with a 50DP integrated camera (Olympus BX50, Tokyo, Japan).

To assess the effect of the different diets on liver, different parameters, using a modified semi-quantitative histological scoring system (Kleiner et al., 2005), were evaluate. The scores were as follows: steatosis (0, absence; 1, mild; 2, moderate; 3-4, severe), considering steatosis grade (0, <5%; 1, 5-33%; 2, >33-66%; 3, >66%) and contiguous patches of microvesicular steatosis (0, absent, 1, present), hepatocyte ballooning (0, absence; 1, mild; 2, moderate-severe), lipogranulomas (0, 0; 1, <2 *foci* per 20x field; 2, 2-4 *foci* per 20x field; 3, >4 *foci* per 20x field), lobular inflammation, large lipogranulomas and periportal inflammation values (0, absence; 1, presence in the last three parameters).

For heart sections, we modified the semiquantitative score system of Gürses et al. (2014), where the following scores were applied: inflammation (0, absence; 1, mild; 2, moderate; 3, intense), thrombus (0, absence; 1, presence), myocyte necrosis (0, absence; 1, 1-3 necrotic cells; 2, >3 necrotic cells), necrosis spread, fibrosis and vascular fibrosis values (0, absence; 1, small area affected; 2, <5% affected; 3, 5-10% affected; 4, >10% affected).

To obtain general information on inflammation and alteration, and based on the publication of Kleiner et al. (2005), total inflammation or alteration scores were determined using the *formula*:

$$\text{Total score} = (\sum \text{score for each rat} / \text{maximum score possible}) \times 100$$

#### 2.4. Statistical analyses

Statistical analyses were performed using the SPSS version 22.0 statistical analysis package (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). Results were expressed as means and standard deviations. A two-way ANOVA (cholesterol and diet) was used. Pairwise comparisons of diet responses between groups (C, G and GS; and HC, HG and HGS) were made employing the Bonferroni test. The effect of cholesterol consumption (HC vs. C; HG vs. G; and HGS vs. GS) was evaluated using the unpaired Student's *t* test. Parameters not presenting normal distribution in the histological study (fat infiltration, ballooning, inflammation) were compared with the Montecarlo exact bilateral signification method. Subsequently, groups were pairwise compared using the Fisher exact statistical test. Significant differences were set at  $p < 0.05$ .

### 3. Results

#### 3.1. Body weight gain, and liver and heart somatic indexes

As shown in **table 1**, body weight gain, liver weight and hepatosomatic index were significantly affected by supplementary cholesterol and the type of diet (all  $p < 0.001$ ), and by the interaction between diet and cholesterol (all  $p < 0.05$ ). Non-significant effects were observed in heart and cardiosomatic index ( $p > 0.05$ ). G and GS diet decreased body weight gain significantly with respect to C diet. This effect was highly potentiated by dietary cholesterol. Liver weight and hepatosomatic index were highly increased by supplementary cholesterol ( $p < 0.001$  in all cases) but glucomannan

1 addition decreased this effect on liver size (G and GS vs. C and HG and HGS vs. HC)  
2 with no extra effects from spirulina.  
3  
4  
5

### 6 3.2. Liver and heart damage biomarkers 7

8 Results of damage markers are shown in **table 2**. All tested enzymes and the AST/ALT  
9 ratio were significantly affected by supplementary cholesterol and the type of diet (all  $p$   
10  $\leq 0.001$ ), and by the interaction between diet and cholesterol (all  $p < 0.05$ ). In  
11 comparison to C diet, HC diet led to a dramatic upraise in all enzymes (400%-1200%,  
12 all  $p < 0.05$ ). In non-cholesterol-added diet, glucomannan addition significantly lowered  
13 ALT and AST activities in comparison with the C group ( $p < 0.05$ ). No noticeable effect  
14 was observed in GS vs. G group. HG and HGS diets highly reduced (at least  $p < 0.05$ )  
15 all enzyme activities with respect to their HC counterpart.  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27

### 28 3.3. Histological procedures 29

30 **Table 3** and **Figure 1** summarize major liver histological changes due to glucomannan-  
31 surimi and cholesterol ingestion. Steatosis, hepatocyte ballooning, lipogranulomas,  
32 periportal and total inflammation and alteration scores were significantly affected by  
33 glucomannan diets and cholesterol (all  $p < 0.05$ ). C and HC diets induced the  
34 maximum steatosis level detected. G and GS diets highly reduced steatosis vs. C diet.  
35 A similar tendency was observed in HG and HGS groups vs. the HC one (both  $p >$   
36  $0.05$ ). The total inflammation and alteration scores were significantly higher in HC vs. C  
37 animals (55% vs. 42.5% and 83.75% vs. 63.75%, respectively, both  $p < 0.05$ ).  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48

49 C, G and GS display liver total alteration scores of 63.75%, 8.75% and 16.25%  
50 while these scores were 83.75%, 82.5% and 68.75% in HC, HG and HGS livers,  
51 respectively. These scores decreased ( $p < 0.05$ ) in G and GS vs. C groups, and in  
52 HGS vs. HC and HG groups.  
53  
54  
55  
56

57 **Table 4** shows major heart histological changes observed. According to the  
58 Montecarlo test, only necrosis extension was affected by diet ( $p = 0.036$ ) with the  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 cholesterol fed rats tending to present higher scores. When comparing groups, only HG  
2 vs. G were significantly different ( $p < 0.05$ ). C, G and GS display total heart alteration  
3 scores of 50%, 48.4% and 43.8% while these scores were 62.5%, 64.1% and 59.4% in  
4 case of HC, HG and HGS, respectively. Although the factor “diet” did not significantly  
5 affect these scores, the factor “cholesterol” impaired them (HC vs. C and HG vs. G;  
6 both  $p < 0.05$ ).

#### 15 **4. Discussion**

17 Present results suggest that long term ingestion of the experimental diets affect  
18 liver/heart structure in growing Zucker fa/fa rats, mainly in those fed cholesterol-  
19 enriched diets, lowering NAFLD biomarkers.

##### 26 *4.1. Body weight gain, and liver and heart somatic indexes*

28 Both glucomannan-added restructured squid-surimi diets were generally well-accepted  
29 by growing rats, as similar or even lower intake data from other studies corroborate  
30 (Bocanegra et al., 2003; Bocanegra et al., 2008). Results also suggest, as observed in  
31 other experiments with Zucker fa/fa rats (Tovar et al., 2011), that diets with a high  
32 energy and saturated fat content induced obesity and considerable body weight gain.  
33 Nonetheless, glucomannan included in squid-surimi reduced, in a certain way, dietary  
34 energy bioavailability and, thus, body weight gain, in agreement with previous studies  
35 on fibre consumption (Lairon and Defoort, 2011; Sánchez-Muniz, 2012). Despite  
36 reports of certain effects attributed to consumption of spirulina (Moura et al., 2011), this  
37 microalga did not show any significant effects on body weight under our experimental  
38 conditions.

40 Coinciding with the findings of Beynen et al. (1984), supplementary dietary  
41 cholesterol decreased growth rate in the present study. Mahfouz and Kummerow,  
42 (2000) reported lower body weight gain in rabbits but not in rats fed cholesterol-  
43 enriched diets. The effect of glucomannan or glucomannan *plus* spirulina on body  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 weight was also observed on cholesterol-fed rats, as HG and HGS animals presented  
2 lower body weight gains than HC rats.  
3

4 Assessment of the liver weight and hepatosomatic index was used to  
5 investigate potential changes in the liver size and hepatic steatosis (Chang et al.,  
6 2015). C diet values were similar to those of obese Zucker rats fed cocoa-rich diets  
7 (Cordero-Herrera et al., 2015). Glucomannan-addition reduced liver size to similar  
8 values found by Cordero-Herrera *et al.* (2015) in lean Zucker rats. According to Argiles  
9 (1989) liver in obese Zucker rats shows increased lipogenesis, potentiated by a huge  
10 glycolytic flux that leads to the formation of reduction potential in the form of NADPH,  
11 and a strongly reduced fatty acid oxidation. In addition, plasma concentrations of  
12 glycerol and non-esterified fatty acids are high, contributing to liver triglycerides (TAG)  
13 synthesis, leading to steatosis.  
14  
15

16 Gomez-Zorita et al. (2012) state that resveratrol protects from fatty liver  
17 development by reducing oxidative stress and hepatic lipids content. As glucomannan  
18 or glucomannan *plus* spirulina have shown antioxidant properties in normo- and  
19 hypercholesterolemia (Vázquez-Velasco et al., 2013; Vázquez-Velasco et al., 2014),  
20 normalized lipemia (Vázquez-Velasco et al., 2015) and reduce liver weight (present  
21 results), we can hypothesize that our diets reduce liver lipogenesis and steatosis.  
22  
23

24 Although the consumption of cholesterol-enriched diets (HC vs. C) duplicated  
25 liver size, suggesting induction of liver steatosis and/or glycogen content enlargement  
26 (Leonard et al., 2005), glucomannan in cholesterol-enriched diets (HG and HGS diets)  
27 drastically reduced hepatomegalia, pointing to potential benefits of this fibre on fatty  
28 liver prevention. Spirulina in diet did not to exert any effect on this parameter.  
29  
30

31 Heart weight and cardiosomatic index were similar to those observed in fa/fa  
32 rats by Noratto et al. (2015). Heart values did not significantly differ between groups,  
33 suggesting no effect of glucomannan-diets on heart size. However, the consumption of  
34 cholesterol-added diets tended to increase the cardiosomatic index. At present, no  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 clear explanation is available, although some morphological modifications would be  
2 implicated.

#### 3 4 5 6 4.2. Liver and heart damage biomarkers

7  
8 ALT, AST and ALP values of the C group were in concordance with those observed by  
9 Gomez-Zorita et al. (2012) but higher than those found in Sprague-Dawley rats  
10 affected by NAFLD disease (Thong-Ngam et al., 2007). Zucker fa/fa rat is a known  
11 model of obesity that develops NAFLD (Kucera and Cervinkova, 2014). Low AST/ALT  
12 ratios have been defined as a NAFLD-independent predictor (Kotronen et al., 2009)  
13 where ALT values are higher than AST. Present AST/ALT ratios in the C groups were  
14 approximately one third those found in Wistar rats fed fried sardines (Sánchez-Muniz et  
15 al., 1995) or restructured meat containing *algae* (Schultz Moreira et al., 2013), clearly  
16 suggesting that fa/fa rats are prone to develop NAFLD. Negative and highly significant  
17 correlations were found when liver weights and hepatosomatic index were related to  
18 this ratio in the non-cholesterol-fed animals ( $r = -0.650$ ;  $p < 0.001$ ;  $r = -0.571$ ;  $p = 0.004$ ,  
19 respectively). In the present study AST/ALT ratio was 1.09 in the C group and about  
20 1.6 in the G and GS groups suggesting that hepatosteatosis was ameliorated by  
21 glucomannan consumption. In the case of cholesterol-fed animals, this ratio was  
22 positively associated to liver weight; however, it has to be pointed out that the liver  
23 enlargement in cholesterol-fed animals is linked to cholesterol-ester deposits  
24 (Sánchez-Muniz et al., 2003), although in the hypercholesterolemic fa/fa rats both the  
25 cholesterol-ester pool and the TAG liver enlargement could be engaged in the  
26 hepatosteatosis found.

27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51 The ALT/ALP ratio, defined as a cholestasis indicator, shows significant and  
52 positive correlation with the liver weight ( $r = 0.465$ ;  $p = 0.022$ ) and the hepatosomatic  
53 index ( $r = 0.420$ ,  $p = 0.041$ ) in the non-cholesterol fed groups. The ALT/ALP ratio in C  
54 rats was 3.6 times higher than that found in Wistar rats (Schultz Moreira et al., 2013)  
55 suggesting the presence of cholestasis on this fa/fa rat group. The glucomannan  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 inclusion highly decreased that ratio, suggesting the positive effect of glucomannan on  
2 cholestasis. The hypercholesterolemic agent drastically increased those levels, thus,  
3 severe cholestasis and hepatocellular damage could be hypothesized, as was reported  
4 by Shultz Moreira et al. (2013) in cholesterol-fed Wistar rats.  
5  
6

7  
8 CK and LDH are enzymes present in high amounts in the heart that can be  
9 released into blood in cases of heart injury or inflammation. However, LDH is also a  
10 known marker of cell necrosis (Garcimartín et al., 2015) and hepatocellular damage  
11 (Sánchez-Muniz et al., 1992; Sánchez-Muniz et al. 1995). Both enzyme levels were  
12 relatively high in C rats in comparison to adult Wistar rats (Shah et al., 2014) but lower  
13 than those found on Sprague-Dawley rats (Carvajal-Zarrabal et al., 2014), suggesting  
14 no very high deleterious cardiac and hepatic effects of C diets. As both enzyme  
15 activities were increased on HC rats, it can be inferred that cholesterol feeding clearly  
16 damaged both organs. G and GS diets tended to decrease (although non-significantly)  
17 LDH activities. Glucomannan addition to hypercholesterolemic diets blocked, at least  
18 partially, the negative effects of hypercholesterolemia on both damage markers.  
19 Spirulina addition did not show any extra effect on those enzymes. Sánchez-Muniz et  
20 al. (1992; 1995) found marked increase on LDH activities in cholesterol fed rats that  
21 were highly decreased by the action of omega-3 fatty acids.  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41

#### 42 *4.3. Histological procedures*

43  
44 As observed in Fig. 1, livers from C rats presented altered characteristics with a  
45 relatively high hepatosteatosis according to their lobulillar space structures. Total  
46 alteration score rises to 63.75%. As suggested by the AST/ALT ratio, hepatosteatosis  
47 was reduced by glucomannan and glucomannan *plus* spirulina diets. In fact the total  
48 alteration scores were 8.75% and 16.25%, respectively. According to Yki-Jarvinen  
49 (2014), once fatty, the liver is resistant to the action of insulin to inhibit both production  
50 of glucose and very low density lipoproteins (VLDL) which results in both compensatory  
51 hyperinsulinemia and hypertriglyceridemia. Thus, present results on liver total  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 alterations suggest that glucomannan may improve insulin effects. In a previous study  
2 it was reported that G and GS diets reduced triglyceridemia and VLDL-TAG levels  
3 (Vázquez-Velasco et al., 2013). However, periportal inflammation tended to increase  
4 slightly on G rats. As commented (Vázquez-Velasco et al., 2014) found in G rats that  
5 some inflammation markers (TNF- $\alpha$ , iNOS) were increased in G rats, which is probably  
6 related to the high fermentation of this fibre.  
7  
8  
9  
10  
11  
12

13 Cholesterol-feeding impaired the liver histological facts in HC vs. C rats by  
14 enlarging total inflammation and total alteration scores although the steatosis score did  
15 not change. The consumption of HG and HGS diets induced higher steatosis than the  
16 observed in their G and S counterparts but lower than that of HC rats, suggesting  
17 improvement of the hepatosteatosis, in line with the reduction of the AST/ALT ratio  
18 already commented on. However, the total inflammation score was not reduced in HG  
19 rats while the total alteration score improved in HGS rats, suggesting that spirulina,  
20 probably related to minor compounds and omega-3 fatty acids, even at low doses  
21 induced positive results on liver structure. Omega-3 fatty acids have been found to  
22 partially block the negative effects of cholesterol feeding (Sánchez-Muniz et al., 1992;  
23 Sánchez-Muniz et al. 1995). However, it has to be pointed out that extra changes  
24 induced by spirulina were modest in the frame of obese animals fed a high saturated,  
25 hyperenergetic diet.  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41

42 A relatively high amount of CK and LDH in C rats agree with the myocyte  
43 necrosis and necrosis extension observed (scored 15 over 16, and 15 over 32,  
44 respectively). However, other histological facts were not evident. G or GS diets did not  
45 exert any effect on the heart parameters tested nor on the total alteration score. Total  
46 alteration in the heart appeared to be significantly increased ( $p < 0.05$ ) in HC rats with  
47 respect to their C counterparts. Fibrosis tended to be increased in HGS vs. HG ( $p =$   
48 0.078) suggesting a potential negative effect of the spirulina *plus* glucomannan  
49 conjunction.  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 The usefulness of total alteration scores in the liver and heart can be  
2 suggested, as significant correlations were found between those scores and the  
3 damage markers tested (at least  $p = 0.026$ ).  
4  
5  
6  
7

## 8 **5. Conclusions**

9  
10 Konjac glucomannan alone or together with spirulina arrested the negative effects on  
11 liver size, histological structure and plasma damage biomarkers induced by highly  
12 saturated-high-energetic diets either added with cholesterol or not. Total alteration  
13 score in the liver and also heart are highly associated to alteration in enzyme damage  
14 biomarkers (ALT, AST, ALP, CK, and LDH). Present results suggest that glucomannan  
15 and/or glucomannan *plus* spirulina added to squid surimi act as functional food in an  
16 obese and NAFLD animal model. However, authors encourage future studies to assess  
17 the utility of these products in people affected by non-alcoholic-fatty liver disease.  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30

## 31 **Acknowledgements**

32  
33 The present study was supported by the Spanish projects AGL-2008-04892-C03-02,  
34 AGL-2011-29644-C02-02 and AGL2014-53207-C2-2-R. We gratefully acknowledge the  
35 foreign fellowship for graduate studies granted by the Consejo Nacional de Ciencia y  
36 Tecnología (CONACYT) of México to Laura González-Torres. All authors have  
37 significantly contributed to the paper and agree with the present version of the  
38 manuscript. FJ S-M is the corresponding author and Guarantor of the paper, M V-V has  
39 contributed to the study design, data discussion, and writing of the paper, L G-T, MT M  
40 and RA G-F have contributed to the data acquisition and analysis and writing of the  
41 paper. S B, J B and MJ G-M have contributed to data discussion and have made a  
42 critical review of the paper. The present study was approved by the Spanish Science  
43 and Technology Advisory Committee (project AGL-2008-04892-C03-02) and by an  
44 ethics committee of the Universidad Complutense de Madrid (Spain). All experiments  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 were performed in compliance with Directive 86/609/EEC of November 24, 1986 for the  
2 protection of scientific research animals.  
3  
4  
5

6 **Disclosure statement**  
7

8 The authors declare that there are no conflicts of interest.  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## References

- 1  
2  
3 Aleixandre de Artinano, A., Miguel Castro, M., 2009. Experimental rat models to study  
4 the metabolic syndrome. *Br. J. Nutr.* 102, 1246-1253.  
5  
6 Baynes, J.W., Murray, D.B., 2009. The metal chelators, trientine and citrate, inhibit the  
7 development of cardiac pathology in the Zucker diabetic rat. *Exp. Diabetes Res.*  
8 2009, 696378.  
9  
10 Beynen, A.C., Boogaard, A., Van Laack, H.L., Katan, M.B., 1984. Cholesterol  
11 metabolism in two strains of rats with high or low response of serum cholesterol to  
12 a cholesterol-rich diet. *J. Nutr.* 114, 1640-1651.  
13  
14 Bocanegra, A., Nieto, A., Bastida, S., Benedi, J., Sanchez-Muniz, F.J., 2008. A Nori but  
15 not a Konbu, dietary supplement decreases the cholesterolaemia, liver fat  
16 infiltration and mineral bioavailability in hypercholesterolaemic growing Wistar rats.  
17 *Br. J. Nutr.* 99, 272-280.  
18  
19 Bocanegra, A., Nieto, A., Blas, B., Sanchez-Muniz, F.J., 2003. Diets containing a high  
20 percentage of Nori or Konbu algae are well-accepted and efficiently utilised by  
21 growing rats but induce different degrees of histological changes in the liver and  
22 bowel. *Food Chem. Toxicol.* 41, 1473-1480.  
23  
24 Campo-Deaño, L., Tovar, C.A., Pombo, M.J., Solas, M.T., Borderías, A.J., 2009.  
25 Rheological study of giant squid surimi (*Dosidicus gigas*) made by two methods  
26 with different cryoprotectants added. *J. Food Eng.* 94, 26-33.  
27  
28 Carvajal-Zarrabal, O., Nolasco-Hipolito, C., Aguilar-Uscanga, M.G., Melo-Santiesteban,  
29 G., Hayward-Jones, P.M., Barradas-Dermitz, D.M., 2014. Avocado oil  
30 supplementation modifies cardiovascular risk profile markers in a rat model of  
31 sucrose-induced metabolic changes. *Dis. Markers* 2014, 386425.  
32  
33 Codoner-Franch, P., Valls-Belles, V., Arilla-Codoner, A., Alonso-Iglesias, E., 2011.  
34 Oxidant mechanisms in childhood obesity: the link between inflammation and  
35 oxidative stress. *Trans. Res.* 158, 369-384.  
36  
37 Cordero-Herrera, I., Martin, M.A., Escriva, F., Alvarez, C., Goya, L., Ramos, S., 2015.  
38 Cocoa-rich diet ameliorates hepatic insulin resistance by modulating insulin  
39 signaling and glucose homeostasis in Zucker diabetic fatty rats. *J. Nutr. Biochem.*  
40 26, 704-712.  
41  
42 Chang, E., Kim, L., Park, S.E., Rhee, E.J., Lee, W.Y., Oh, K.W., Park, S.W., Park,  
43 C.Y., 2015. Ezetimibe improves hepatic steatosis in relation to autophagy in obese  
44 and diabetic rats. *World J. Gastroenterol.* 21, 7754-7763.  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65
- Garcimartin, A., Merino, J.J., Santos-Lopez, J.A., Lopez-Oliva, M.E., Gonzalez, M.P., Sanchez-Muniz, F.J., Benedi, J., 2015. Silicon as neuroprotector or neurotoxic in the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line. *Chemosphere* 135, 217-224.
- Gomez-Zorita, S., Fernandez-Quintela, A., Macarulla, M.T., Aguirre, L., Hijona, E., Bujanda, L., Milagro, F., Martinez, J.A., Portillo, M.P., 2012. Resveratrol attenuates steatosis in obese Zucker rats by decreasing fatty acid availability and reducing oxidative stress. *Br. J. Nutr.* 107, 202-210.
- Gonzalez Canga, A., Fernandez Martinez, N., Sahagun, A.M., Garcia Vieitez, J.J., Diez Liebana, M.J., Calle Pardo, A.P., Castro Robles, L.J., Sierra Vega, M., 2004. Glucomanano: propiedades y aplicaciones terapéuticas. *Nutr Hosp.* 19, 45-50.
- Gürses, I., Özeren, M., Serin, M., Yücel, N., Erkal HŞ., 2014. Histopathological evaluation of melatonin as a protective agent in heart injury induced by radiation in a rat model. *Pathol. Res. Pract.* 210, 863-871.
- Kleiner, D.E., Brunt, E.M., Van Natta, M., Behling, C., Contos, M.J., Cummings, O.W., Ferrell, L.D., Liu, Y.C., Torbenson, M.S., Unalp-Arida, A., Yeh, M., McCullough, A.J., Sanyal, A.J., 2005. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 41, 1313-1321.
- Kotronen, A., Peltonen, M., Hakkarainen, A., Sevastianova, K., Bergholm, R., Johansson, L.M., Lundbom, N., Rissanen, A., Ridderstrale, M., Groop, L., Orho-Melander, M., Yki-Jarvinen, H., 2009. Prediction of non-alcoholic fatty liver disease and liver fat using metabolic and genetic factors. *Gastroenterology* 137, 865-872.
- Kris-Etherton, P.M., Harris, W.S., Appel, L.J., 2003. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, e20-30.
- Kucera, O., Cervinkova, Z., 2014. Experimental models of non-alcoholic fatty liver disease in rats. *World J. Gastroenterol.* 20, 8364-8376.
- Lairon, D., Defoort, C., 2011. Effects of nutrients on postprandial lipemia. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 9, 309-312.
- Leonard, B.L., Watson, R.N., Loomes, K.M., Phillips, A.R., Cooper, G.J., 2005. Insulin resistance in the Zucker diabetic fatty rat: a metabolic characterisation of obese and lean phenotypes. *Acta Diabetol.* 42, 162-170.
- Lohr, M., Folkmann, J.K., Sheykhzade, M., Jensen, L.J., Kermanizadeh, A., Loft, S., Moller, P., 2015. Hepatic oxidative stress, genotoxicity and vascular dysfunction in lean or obese Zucker rats. *PLoS one* 10, e0118773.
- Mahfouz, M.M., Kummerow, F.A., 2000. Cholesterol-rich diets have different effects on lipid peroxidation, cholesterol oxides, and antioxidant enzymes in rats and rabbits. *J. Nutr. Biochem.* 11, 293-302.

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65
- Moreno, H., Herranz, B., Pérez-Mateos, M., Sánchez-Alonso, I., Borderías, A.J., 2014. New alternatives in seafood restructured products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* DOI: 10.1080/10408398.2012.719942.
- Moura, L.P., Puga, G.M., Beck, W.R., Teixeira, I.P., Ghezzi, A.C., Silva, G.A., Mello, M.A., 2011. Exercise and spirulina control non-alcoholic hepatic steatosis and lipid profile in diabetic Wistar rats. *Lipids Health Dis.* 10, 77.
- Nagaoka, S., Shimizu, K., Kaneko, H., Shibayama, F., Morikawa, K., Kanamaru, Y., Otsuka, A., Hirahashi, T., Kato, T., 2005. A novel protein C-phycocyanin plays a crucial role in the hypocholesterolemic action of *Spirulina platensis* concentrate in rats. *J. Nutr.* 135, 2425-2430.
- Noratto, G., Martino, H.S., Simbo, S., Byrne, D., Mertens-Talcott, S.U., 2015. Consumption of polyphenol-rich peach and plum juice prevents risk factors for obesity-related metabolic disorders and cardiovascular disease in Zucker rats. *J. Nutr Biochem.* 26, 633-641.
- Olmedilla-Alonso, B., Jiménez-Colmenero, F., Sánchez-Muniz, F.J., 2013. Development and assessment of healthy properties of meat and meat products designed as functional foods. *Meat Sci.* 95:919-930.
- Sanchez-Muniz, F.J., 2012. Dietary fibre and cardiovascular health. *Nutr. Hosp.* 27, 31-45.
- Sanchez-Muniz, F.J., Garcia-Linares, M.C., Garcia-Arias, M.T., Bastida, S., Viejo, J., 2003. Fat and protein from olive oil-fried sardines interact to normalize serum lipoproteins and reduce liver lipids in hypercholesterolemic rats. *J. Nutr.* 133, 2302-2308.
- Sánchez-Muniz, F.J., Higón, E., Cava, F., Viejo, J.M., 1992. Prevention of dietary hypercholesterolemia in rats using sunflower oil-fried sardines. Effects on cholesterol and serum enzymes. *J. Agric. Food Chem.* 40, 2226-2231.
- Sanchez-Muniz, F.J., Cava, F., Viejo, J.M., Higon, E., Cuesta, C., 1995. Olive oil- and sunflower oil-fried sardines in the prevention of rat hypercholesterolemia. *Z. Ernährungswiss.* 34, 16-21.
- Schultz Moreira, A.R., Garcia-Fernandez, R.A., Bocanegra, A., Mendez, M.T., Bastida, S., Benedi, J., Sanchez-Reus, M.I., Sanchez-Muniz, F.J., 2013. Effects of seaweed-restructured pork diets enriched or not with cholesterol on rat cholesterolaemia and liver damage. *Food Chem. Toxicol.* 56, 223-230.
- Shah, N.C., Shah, G.J., Li, Z., Jiang, X.C., Altura, B.T., Altura, B.M., 2014. Short-term magnesium deficiency downregulates telomerase, upregulates neutral sphingomyelinase and induces oxidative DNA damage in cardiovascular tissues:

relevance to atherogenesis, cardiovascular diseases and aging. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 7, 497-514.

- Thong-Ngam, D., Samuhasaneeto, S., Kulaputana, O., Klaikeaw, N., 2007. N-acetylcysteine attenuates oxidative stress and liver pathology in rats with non-alcoholic steatohepatitis. *World J. Gastroenterol.* 13, 5127-5132.
- Tovar, A.R., Diaz-Villasenor, A., Cruz-Salazar, N., Ordaz, G., Granados, O., Palacios-Gonzalez, B., Tovar-Palacio, C., Lopez, P., Torres, N., 2011. Dietary type and amount of fat modulate lipid metabolism gene expression in liver and in adipose tissue in high-fat diet-fed rats. *Arch. Med. Res.* 42, 540-553.
- Vázquez-Velasco, M., González-Torres, L., López-Gasco, P., Bastida, S., Benedí, J., González-Muñoz, M.J., Sánchez-Muniz, F.J., 2015. Effects of glucomannan/spirulina-surimi on liver oxidation and inflammation in Zucker rats fed atherogenic diets. *J. Phys. Biochem.*, 1-12. DOI: 10.1007/s13105-015-0425-9.
- Vázquez-Velasco, M., González-Torres, L., López-Gasco, P., Bastida, S., Benedí, J., Sánchez-Reus, M.I., González-Muñoz, M.J., Sánchez-Muniz, F.J., 2014. Liver oxidation and inflammation in fa/fa rats fed glucomannan/spirulina-surimi. *Food Chem.* 159, 215-221.
- Vázquez-Velasco, M., González-Torres, L., Olivero-David, R., Bastida, S., Benedí, J., Sánchez-Reus, M., González-Muñoz, M., Sánchez-Muniz, F.J., 2013. Lipoproteinemia and arylesterase activity in Zucker fa/fa rats fed glucomannan/spirulina-enriched squid-surimi. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 115, 1274-1283.
- Yki-Jarvinen, H., 2014. Non-alcoholic fatty liver disease as a cause and a consequence of metabolic syndrome. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2, 901-910.

**Table 1.** Body weight gain and liver and heart weights (Mean values and standard deviations).

	Added cholesterol	Control	Glucomanan	Glucomanan + Spirulina	ANOVA		
					Diet	Cholesterol	Diet*Cholesterol
Weight gain (g)	No	217.08 ± 14.77 a	195.16 ± 26.63 b	193.26 ± 15.97 b	<0.001	<0.001	0.034
	Yes	184.34 ± 20.58 a*	120.46 ± 16.31 b***	140.86 ± 10.50 c***			
Liver weight (g)	No	12.31 ± 0.84 a	9.10 ± 0.80 b	9.74 ± 0.44 b	<0.001	<0.001	<0.001
	Yes	23.36 ± 2.60 a***	13.64 ± 2.18 b***	14.47 ± 1.46 b***			
Hepatosomatic index (g/g)	No	0.04 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 b	0.03 ± 0.00 b	<0.001	<0.001	<0.001
	Yes	0.09 ± 0.00 a***	0.06 ± 0.01 b***	0.05 ± 0.01 b***			
Heart weight (g)	No	1.02 ± 0.29	1.16 ± 0.22	1.13 ± 0.19	0.357	0.981	0.668
	Yes	1.04 ± 0.29	1.07 ± 0.22	1.19 ± 0.26			
Cardiosomatic index (g/g)	No	0.003 ± 0.001	0.004 ± 0.000	0.004 ± 0.001	0.118	0.013	0.905
	Yes	0.004 ± 0.001	0.004 ± 0.001	0.004 ± 0.001			

a,b,c: Mean values within a row with unlike letters were significantly different ( $p < 0.05$ , Bonferroni test). Mean values within a column for the same parameter were significantly different from their no supplementary cholesterol counterparts: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$ .

**Table 2.** Liver and heart damage biomarkers (Mean values and standard deviations).

	Added cholesterol	Control	Glucomanan	Glucomanan <i>plus</i> Spirulina	ANOVA		
					Diet	Cholesterol	Diet*Cholesterol
ALT (U/L)	No	176.38 ± 200.76 a	40.25 ± 7.36 b	39.63 ± 5.04 b	0.001	<0.001	0.045
	Yes	870.86 ± 724.90 a*	241.13 ± 114.25 b**	254.38 ± 151.74 b**			
AST (U/L)	No	171.38 ± 166.66 a	63.63 ± 5.45 b	64.75 ± 15.65 b	<0.001	<0.001	<0.001
	Yes	2095.71 ± 1536.06 a*	310.00 ± 135.49 b***	325.63 ± 174.82 b**			
ALP (U/L)	No	95.50 ± 17.05	96.50 ± 20.86	94.63 ± 16.02	<0.001	<0.001	<0.001
	Yes	407.14 ± 135.55 a***	174.13 ± 57.66 b**	198.25 ± 119.93 b*			
CK (U/L)	No	127.25 ± 26.55	142.83 ± 33.27	122.13 ± 18.40	0.004	<0.001	0.004
	Yes	564.29 ± 348.52 a*	242.00 ± 154.61 b	175.38 ± 107.28 b			
LDH (U/L)	No	458.63 ± 382.10	325.63 ± 239.31	232.25 ± 72.96	<0.001	<0.001	<0.001
	Yes	3468.71 ± 2249.23 a*	491.63 ± 211.81 b	442.88 ± 221.48 b*			
AST/ALT	No	1.09 ± 0.19 a	1.61 ± 0.22 b	1.64 ± 0.38 b	0.017	0.014	<0.001
	Yes	2.47 ± 0.61 a***	1.30 ± 0.18 b**	1.31 ± 0.26 b			

a,b: Mean values within a row with unlike letters were significantly different ( $p < 0.05$ , Bonferroni test). Mean values within a column for the same parameter were significantly different from their no supplementary cholesterol counterparts: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$ .

**Table 3.** Histological scoring report in liver of fa/fa rats fed the six experimental diets.

Alteration Score	Added cholesterol	Control				Glucosaminan				Glucosaminan plus spirulina				C vs. G	C vs. GS	G vs. GS	$P^1$	$P^2$			
		0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4			HC vs. HG	HC vs. HGS	HG vs. HGS
Steatosis (Score 0-4)	No	0	0	0	0	8	7	1	0	0	0	6	1	1	0	0	<0.001	<0.001	0.731	<0.001	<0.001
	Yes	0	0	0	0	8	0	0	0	5	3**	0	0	0	6	2***	0.124	0.108	1.000	0.193	
Hepatocyte ballooning (Score 0-2)	No	6	2	0			8	0	0			8	0	0			0.465	0.465	NA	0.301	<0.001
	Yes	0	6	2**			0	4	4***			6	2	0			0.266	0.008	0.002	<0.001	
Lobular inflammation (Score 0-1)	No	0	8				4	4				2	6				0.073	0.463	0.609	0.107	0.315
	Yes	1	7				2	6				2	6				1.000	1.000	1.000	1.000	
Lipogranulomas (Score 0-3)	No	1	7	0	0		8	0	0	0		8	0	0	0		0.001	0.001	NA	<0.001	<0.001
	Yes	0	8	0	0		0	6	1	1***		0	3	4	1***		0.462	0.032	0.394	0.078	
Large lipogranulomas (Score 0-1)	No	8	0				8	0				8	0				NA	NA	NA	NA	0.105
	Yes	8	0				6	2				6	2				0.462	0.474	1.000	0.495	
Periportal inflammation (Score 0-1)	No	6	2				2	6				4	4				0.135	0.610	0.609	0.190	0.013
	Yes	0	8**				0	8				3	5				NA	0.213	0.199	0.085	
Total inflammation (% over a top score of 40)	No			42.50					15.00					25.00			0.001	0.051	0.243	0.001	<0.001
	Yes			55.00*					65.00***					67.50***			0.321	0.264	0.870	0.324	
Total alteration (% over a top score of 80)	No			63.75					8.75					16.25			<0.001	<0.001	0.103	<0.001	<0.001
	Yes			83.75**					82.5***					68.75***			0.168	0.030	0.041	0.023	

Steatosis values: 0, absence; 1, mild; 2, moderate; 3-4, severe. Hepatocyte ballooning values: 0, absence; 1, mild; 2, moderate-severe. Lipogranulomas values: 0, absence; 1, mild; 2, moderate; 3, severe. Lobular inflammation, large lipogranulomas and periportal inflammation values: 0, absence; 1, presence.  $P^1$ : Montecarlo significance between normo- or hypercholesterolemic groups.  $P^2$ : Montecarlo significance between the 6 experimental groups. \* Mean values within a column for the same parameter were significantly different from their no supplementary cholesterol counterparts (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$ ). NA: Non-applicable due to equivalent data distribution.

**Table 4.** Histological scoring report in heart of fa/fa rats fed the six experimental diets.

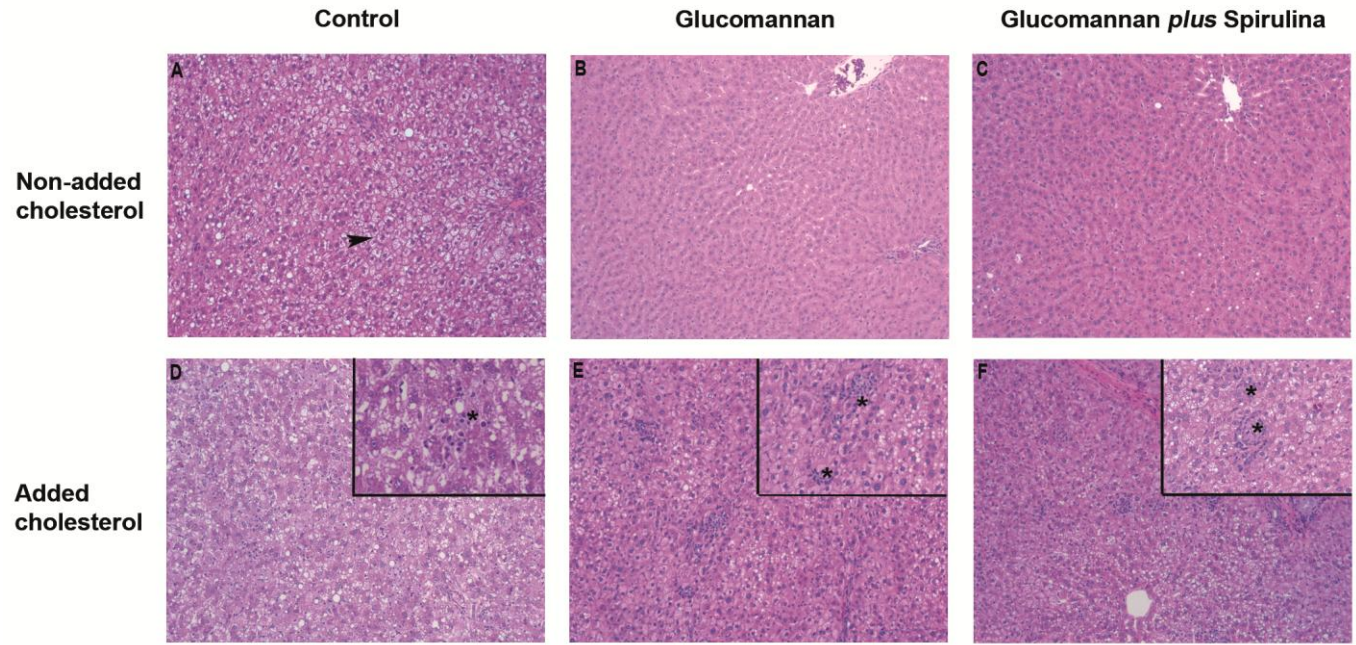
Alteration Score	Added Cholesterol	Control					Glucomannan					Glucomannan <i>plus</i> spirulina					C vs. G HC vs. HG	C vs. GS HC vs. HGS	G vs. GS HG vs. HGS	<i>P</i> <sup>1</sup>	<i>P</i> <sup>2</sup>
		0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4					
Inflammation (Score 0-3)	No	7	1	0	0	7	1	0	0	8	0	0	0	0	NA	1.000	1.000	1.000	0.182		
	Yes	6	2	0	0	4	4	0	0*	7	1	0	0	0.282	1.000	0.284	0.246				
Thrombus (Score 0-1)	No	8	0			8	0			8	0			NA	NA	NA	NA	NA			
	Yes	8	0			8	0			8	0			NA	NA	NA	NA				
Myocyte necrosis (Score 0-2)	No	0	1	7		0	0	8		0	2	6		0.317	1.000	0.470	0.751	0.687			
	Yes	0	0	8		0	0	8		0	1	7		NA	1.000	1.000	1.000				
Necrosis spread (Score 0-4)	No	0	4	2	1	1	0	2	6	0	0	0	0	0.817	0.730	0.607	0.699	0.036			
	Yes	0	1	1	4	2	0	0	4	3	1*	0	2	3	2	1	0.750		0.359		
Fibrosis (Score 0-4)	No	7	1	0	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0.317	1.000	0.462	0.751	0.077			
	Yes	6	2	0	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0.463	0.275	0.078	0.048				
Vascular fibrosis (Score 0-4)	No	8	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	0	NA	NA	NA	NA	NA			
	Yes	8	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	0	NA	NA	NA	NA				
Total alteration (% over a top score of 64)	No	50.0					48.4					43.8					0.434	0.236	0.331	0.595	0.016
	Yes	62.5*					64.1*					59.4					0.444	0.393	0.362	0.874	

Inflammation values: 0, absence; 1, mild; 2, moderate; 3, intense. Thrombus values: 0, absence; 1, presence. Myocyte necrosis values: 0, absence; 1, 1-3 necrotic cells; 2, >3 necrotic cells. Necrosis spread, fibrosis and vascular fibrosis values: 0, absence; 1, small area affected; 2, <5% affected; 3, 5-10% affected; 4, >10% affected. *P*<sup>1</sup>: Montecarlo significance between normo- or hypercholesterolemic groups. *P*<sup>2</sup>: Montecarlo significance between the 6 experimental groups. \* Mean values within a column for the same parameter were significantly different from their no supplementary cholesterol counterparts (\**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01 and \*\*\**p* < 0.001). NA: Non-applicable due to equivalent data distribution.

**Figure footnote:**

1  
2  
3 **Fig. 1.** Comparative among different livers from non-added cholesterol (A,B,C) and  
4 added cholesterol (D,E,F) to control diet (A,D) glucomannan enriched diet (B,E) and  
5 glucomannan plus spirulin enriched diet (C,F). In non-cholesterol fed rats,  
6 glucomannan and glucomannan plus spirulina considerable reduced the steatosis  
7 (arrowhead) when compared to the control animals. This effect was less evident in  
8 cholesterol-fed animals. The insets in D, E and F show typical microgranulomas (\*)  
9 arose mainly in cholesterol-fed rats. Obj 10x. Insets: Obj 20x. Shown figure is a  
10 representative sample of three sections per liver of eight animals per group. For details  
11 of diets and procedures, see Material and Methods.  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

Fig. 1.



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49

### 5.3. PUBLICACIÓN N°3

**Food Chemistry** (2014) 159:215-221

**ISI Web JCR (2014):** Índice de impacto: 3.391

8/123 en “Food Science and Technology” (Q1)

#### **Liver oxidation and inflammation in Fa/Fa rats fed glucomannan/spirulina-surimi**

Miguel Vázquez-Velasco, Laura González-Torres, Patricia López-Gasco, Sara Bastida, Juana Benedí, María Isabel Sánchez-Reus, María José González-Muñoz, Francisco J. Sánchez-Muniz.

**Resumen:** Se determinó el efecto en ratas Zucker fa/fa de dietas enriquecidas en glucomanano o glucomanano y espirulina sobre la lipemia, el estatus del glutatión hepático, enzimas antioxidantes y marcadores de inflamación. Grupos de ocho ratas cada uno consumieron durante siete semanas surimi de calamar control (C), enriquecido en glucomanano (G) o enriquecido en glucomanano y espirulina (GS). El peso hepático, la expresión de CYP7A1 y la colesterolemia se redujeron en G y GS vs. C, mejorando el índice redox del glutatión ( $p < 0.05$ ). La dieta G incrementó los niveles de glutatión reductasa (GR) con respecto a la C, pero redujo los de óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y aumentó los de la inducible (iNOS) y del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) ( $p < 0.05$ ). La dieta GS mejoró las actividades de superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y GR, y los niveles de eNOS, iNOS y TNF- $\alpha$  ( $p < 0.05$ ). La dieta con glucomanano indujo efectos hipocolesterolemiantes, antioxidantes y proinflamatorios, mientras que la adición de 3 gramos de espirulina por kilogramo de dieta mantuvo los efectos hipocolesterolemiantes y antioxidantes pero redujo la inflamación observada.





## Liver oxidation and inflammation in Fa/Fa rats fed glucomannan/spirulina-surimi



Miguel Vázquez-Velasco<sup>a</sup>, Laura González-Torres<sup>a</sup>, Patricia López-Gasco<sup>b</sup>, Sara Bastida<sup>a</sup>, Juana Benedí<sup>b</sup>, María Isabel Sánchez-Reus<sup>c</sup>, María José González-Muñoz<sup>d</sup>, Francisco J. Sánchez-Muniz<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición), Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

<sup>b</sup> Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

<sup>c</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

<sup>d</sup> Departamento de Nutrición, Bromatología y Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, 28871 Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 31 October 2013

Received in revised form 31 January 2014

Accepted 4 March 2014

Available online 12 March 2014

#### Keywords:

Squid-surimi  
Glucomannan  
Spirulina  
Glutathione system  
Antioxidants  
Inflammation

### ABSTRACT

The effect of high-fat squid-surimi diets enriched in glucomannan or glucomannan–spirulina on lipemia, liver glutathione status, antioxidant enzymes and inflammation biomarkers was determined in Zucker Fa/Fa rats. Groups of eight rats each received for 7 weeks the squid-surimi control (C), glucomannan-enriched squid-surimi (G) and glucomannan–spirulina enriched squid-surimi (GS). Liver weight, cytochrome P450 7A1 expression and cholesterolemia were decreased in G and GS vs. C, improving glutathione red-ox index ( $p < 0.05$ ). G also showed increased glutathione reductase (GR) levels vs. C, but reduced the endothelial (eNOS) and increased the inducible nitric oxide synthase (iNOS) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) levels ( $p < 0.05$ ). The GS diet improved superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and GR activities and eNOS, iNOS and TNF- $\alpha$  levels ( $p < 0.05$ ). The glucomannan enriched surimidiets induced hypocholesterolemic, antioxidant and proinflammatory effects, while the addition of 3 g/kg spirulina kept those hypocholesterolemic and antioxidant effects but reduced the inflammation observed.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Epidemiologic studies reinforce the hypothesis that vegetable and vegetable derivatives consumption promotes a reduction in the incidence of chronic pathologies such as diabetes, obesity and cardiovascular diseases (Bocanegra, Bastida, Benedí, Ródenas, & Sánchez-Muniz, 2009; Sánchez-Muniz, 2012). Thus, the antioxidant activities of these bioactive plant compounds is now an area of active research.

Glucomannan is a dietary fiber extracted from *Amorphophallus konjac* tubers and is commonly consumed in Japan and Taiwan.

**Abbreviations:** CAT, catalase; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; GPx, glutathione peroxidase; GR, glutathione reductase; GSH, reduced glutathione; GSSG, oxidized glutathione; iNOS, inducible nitric oxide synthase; MS, metabolic syndrome; RNS, reactive nitrogen species; ROS, reactive oxygen species; SOD, superoxide dismutase; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor alpha.

\* Corresponding author. Address: Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición), Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain. Tel.: +34 91 3941828; fax: +34 91 3941810.

E-mail address: [frasan@ucm.es](mailto:frasan@ucm.es) (F.J. Sánchez-Muniz).

This polysaccharide forms highly viscous solutions when dissolved in water, due to its high water-holding capacity. This fiber is known to have satiating, laxative and hypocholesterolemic properties but also to produce flatulence, abdominal pain and esophageal or lower gastrointestinal obstruction at high doses (González-Canga et al., 2004). In addition, our research team has found that its consumption improved plasma lipoprotein profile in Fa/Fa rats (Vázquez-Velasco et al., 2013), and Wu and Chen (2011) reported that rats fed a high fat diet containing glucomannan improved their antioxidant status in comparison to high fat controls.

*Spirulina platensis* is a microalga rich in minerals and antioxidant compounds such as carotenoids and phycocyanin (Nagaoka et al., 2005). Although there is no clear scientific evidence in humans, data in rodents related to its antioxidant activity has pointed the media to promote spirulina consumption (Deng & Chow, 2010).

Ample evidence exists of the health benefits of fish and fish derivative consumption (Kris-Etherton, Harris, & Appel, 2003; Sánchez-Muniz, Cava, Viejo, Higón, & Cuesta, 1995). Fish and squid-surimi obtained from certain species of low commercial value, employing emerging technologies in food processing, allow the addition of

ingredients with known health benefits and/or remove potentially undesirable components to obtain functional foods (Borderías, Sánchez-Alonso, & Pérez-Mateos, 2005).

The Zucker Fa/Fa rat has been widely used as an animal model for obesity and metabolic syndrome (MS) (Aleixandre de Artiñano & Miguel-Castro, 2009) because it is very sensitive to hypercaloric and hyperlipemic diets, developing a chronic low-level inflammation state, closely linked to oxidative stress, which leads to cell and tissue damages (Codoñer-Franch, Valls-Bellés, Arilla-Codoñer, & Alonso-Iglesias, 2011).

Oxidative stress is defined as an overbalance of the net levels of reactive oxygen or nitrogen species (ROS or RNS) in comparison to the antioxidant capacity. The endogenous antioxidant defense consists of enzymes that catalyze oxidant-modifying reactions and interacting with molecules with antioxidant activity. Major enzymatic antioxidants are superoxide dismutase (SOD), which catalyzes the dismutation reaction of  $O_2^-$  to  $H_2O_2$ , subsequently catalyzed to  $H_2O$  and  $O_2$  by catalase (CAT) or glutathione peroxidase (GPx). GPx oxidizes glutathione in this process and glutathione reductase (GR) completes the glutathione cycle (Fig. 1) by reduction of oxidized glutathione (Codoñer-Franch et al., 2011). Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) is habitually expressed in cells, synthesizing nitric oxide, which is involved in the regulation of the cardiovascular system and homeostatic mechanisms (Stuehr, 1999). Inducible nitric oxide synthase (iNOS) activation is only promoted under pathophysiological situations in response to cytokines, and leads to higher and maintained nitric oxide levels, with antioxidant and anti-inflammatory results (Berdeaux, 1993; Tousoulis, Kampoli, Tentolouris, Papageorgiou, & Stefanadis, 2012).

Currently, and to the best of our knowledge, very few studies have been reported investigating the effects of squid-surimi on antioxidant status, and no reports could be found regarding glucomannan-enriched surimi. The hypothesis of the present work is that glucomannan-enriched and glucomannan with spirulina-enriched squid-surimi act as functional foods by reducing the oxidative and inflammatory status in Fa/Fa rats. Thus, our study aims to determine the effects of large amounts of glucomannan-enriched squid-surimi in hyperlipemic and hypercaloric rat diets on antioxidant capacity (SOD, GPx, GR, CAT, oxidized and reduced glutathione) and inflammation biomarkers (eNOS, iNOS and TNF- $\alpha$ ).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Diet preparation and experimental design

All experiments were performed in compliance with Directive 86/609/EEC of 24th November 1986 (modified by Directive 2003/65/CE of 22th July 2003) for the protection of scientific research animals. The present study was approved by the Spanish Science and Technology Advisory Committee (project AGL 2008-04892-C03-02 and Consolider Ingenio 2010, CSD 2007-00016) and by an ethics committee of the Universidad Complutense of Madrid (Spain). A total of twenty-four male growing Zucker Fa/Fa rats with an initial body weight of approximately 120 g were obtained from Harlan Laboratories Models (Harlan, SL, Barcelona, Spain). The animals were housed individually in metabolic cells in a temperature-controlled room ( $22.3 \pm 1.9$  °C) with a 12 h light, 12 h dark cycle. The rats were fed commercial rat pellets (Panlab, Barcelona, Spain) during a one-week adaptation period to environmental conditions and then distributed into three groups of eight animals, according to their average body weight.

Three experimental semi-synthetic diets were prepared in a room under appropriate environmental conditions (4 °C and low light) to reduce changes in their antioxidant properties blending AIM-93M diets and surimi. Vitamin and mineral contents of AIN-93M diets were designed to cover requirements for rats once the whole diet was prepared (Table 1). Details of the Control diet (C), glucomannan diet (G) and glucomannan *plus* spirulina diet (GS) preparation, fasting conditions, and sampling have been previously described (Vázquez-Velasco et al., 2013).

### 2.2. Glutathione determination

Total, reduced (GSH) and oxidized Glutathione (GSSG) levels were determined in liver following the Hissin and Hill (1976) method. Liver tissue was homogenized with phosphate-EDTA (0.1 M sodium phosphate and 0.005 M EDTA) buffer (pH = 8) at 100 mg/ml, adding 10  $\mu$ l/ml tissue of  $HClO_4$  (60%). Then, tissue

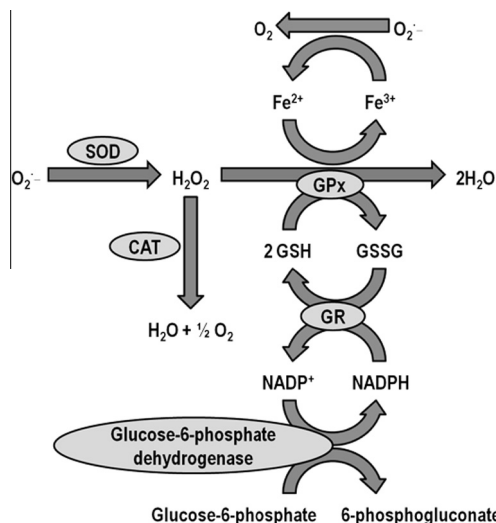


Fig. 1. General endogenous antioxidant defense system diagram.

Table 1  
Composition (g/kg) of the experimental diets.<sup>a</sup>

	C diet	G diet	GS diet
Cornstarch	213.49	254.66	254.66
Microcrystalline cellulose	49.41	8.23	8.23
Squid-surimi	300.00	255.00	255.00
Glucomannan	0.00	45.00	45.00
Spirulina	0.00	0.00	3.00
Energy content (kJ/kg diet)	13332.84	14175.78	14230.21

C: AIN-93M (70%) + control squid-surimi (30%); G: AIN-93M (70%) + glucomannan enriched squid-surimi (30%); GS: AIN-93M (70%) + glucomannan *plus* spirulina enriched squid-surimi (30%).

<sup>a</sup> Other ingredients (g/kg diet): casein, 105.0; palm olein, 115.29; dyetose (carbohydrate composition: monosaccharides, 10; disaccharides, 40; trisaccharides, 50; tetrasaccharides and higher, 900), 108.5; sucrose, 70.0; AIN-93M mineral mix, 29.75; AIN-93VX vitamin mixture, 12.16; choline bitartrate, 3.06; L-cystine, 1.26; t-butylhydroquinone, 0.02. Mineral mix #210050 24.5; Vitamin mix #310025, 162.07. AIN-93M mineral mix (g/kg): calcium carbonate, 357.00; potassium phosphate monobasic, 250.00; potassium citrate- $H_2O$ , 28.00; sodium chloride, 74.00; potassium sulfate, 46.60; magnesium oxide, 24.00; ferric citrate U.S.P., 6.06; zinc carbonate, 1.65; manganese carbonate, 0.63; cupric carbonate, 0.30; potassium iodate, 0.01; sodium selenate, 0.01025; ammonium paramolybdate- $4H_2O$ , 0.00795; sodium metasilicate- $9H_2O$ , 1.45; chromium potassium sulfate- $12H_2O$ , 0.275; lithium chloride, 0.0174; boric acid, 0.0815; sodium fluoride, 0.0635; nickel carbonate, 0.0318; ammonium vanadate, 0.0066; finely powdered sucrose, 209.806. AIN-93VX vitamin mixture (g/kg): niacin, 3.00; calcium pantothenate, 1.60; pyridoxine HCl, 0.70; thiamine HCl, 0.60; riboflavin, 0.60; folic acid, 0.20; biotin, 0.02; vitamin E acetate (500 IU/g), 15.00; vitamin B12 (0.1%), 2.50; vitamin A palmitate, (150,000  $\mu$ g/g), 0.80; vitamin D<sub>3</sub> (10,000  $\mu$ g/g), 0.25; vitamin K<sub>1</sub>-dextrose mix (10 mg/g), 7.50; sucrose, 967.23.

homogenates were centrifuged at 10,000 RPM (6000g) for 10 min at 4 °C and the supernatants were stored at 4 °C until GSH and GSSG determination. Fluorescence was measured in a FLX 800 fluorimeter (Bio-Tek Instruments, Winooski, Vermont, USA) at  $\lambda_{exc} = 350$  nm and  $\lambda_{em} = 420$  nm.

The redox index (RI), a parameter that indicates the antioxidant status of the tissue, was expressed as follows:  $RI = GSH / (GSH + GSSG)$ .

### 2.3. Western blotting and antioxidant enzyme levels

Equal amounts of protein lysates obtained from rat liver homogenates were separated in 10% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide (SDS–PAGE) gel electrophoresis. The gels were blotted onto a PVDF Amersham Hybond-P membrane (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) and incubated with the appropriate antibodies (S2147, C0979, A2228 and A9917 from Sigma–Aldrich, St. Louis, Missouri, USA; Ab60275, Ab5589 and Ab21775 from Abcam, Cambridge, UK; sc-32886, sc-1350, sc-2490 and sc-2004 from Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA). Blots were developed by enhanced chemo luminescence using an Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) according to the manufacturer's instructions.  $\beta$ -Actin was used as a loading control.

### 2.4. Extraction and analysis of RNA and quantification by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) – Enzymes' Gene expression

Total RNA was isolated from 100 mg of liver using trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

RNA samples were then treated with DNase I RNase-free, DNase treatment and removal reagents, (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) to remove any contamination with genomic DNA. The yield and quality of the RNA were assessed by measuring absorbance at 260, 270, 280 and 310 nm and by electrophoresis on agarose gels (1.3%). Total RNA of each sample (1.5 mg) was reverse-transcribed to first-strand complementary DNA (cDNA) using a revert aid H minus first strand cDNA synthesis kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

Relative CAT, Cu,Zn-SOD, Mn-SOD, GPx, GR and CYP7A1 mRNA levels were quantified using real-time PCR with a LightCycler™ Real Time PCR Detection System (Roche diagnostics, Indianapolis, Indiana, USA), using SYBR® Green (Biotools, Madrid, Spain) for normalization of the results.

The PCR parameters were as follows: preincubation at 95 °C for 5 s followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 5 s, with an

annealing temperature dependent on each couple primer (55 °C for Mn-SOD; 56 °C for Cu,Zn-SOD and 60 °C for CAT, GPx, GR and CYP7A1), extension 72 °C for 30 s. Melting curve 95 °C–65 °C–95 °C. Cooling 40 °C.

Primers sequences:

Enzyme	Sense	Antisense
Cu,Zn-SOD	5'-GCCGTGTGCGTGCTGAA-3'	5'-TGACGATGCCGTGCTGCATG-3'
Mn-SOD	5'-GACAAACCTGAGCCCTAAGGG-3'	5'-CTTCTTGCAAACCTATG-3'
CAT	5'-ATCAGGGATGCCATGTTGTT-3'	5'-GGGTCCTTCAGGTGAGTTTG-3'
GPx	5'-CCAATCAGTTCGGACACCAG-3'	5'-AAAGTTCAGGCAATGTCGT-3'
GR	5'-TCACTGCTCCGCACATCC-3'	5'-CTCAACACCGCCAGCGTTCTCC-3'
CYP7A1	5'-CACCATTCTGCAACCTT-3'	5'-GTACCGGACAGTCATTCA-3'

All sample mRNA levels were normalized to their values of  $\beta$ -actin and the results expressed as fold changes of threshold cycle (Ct) value relative to controls using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method (Livak & Schmittgen, 2001).

### 2.5. Enzyme assays

GPx activity was determined as Se-dependent GPx and total GPx activities. Se-dependent GPx activity was assessed following the Paglia and Valentine (1967) method, while total GPx activity was determined by the Lawrence and Burk (1976) method. CAT activity was determined according to the method of Aebi (1984). Total SOD activity was determined as indicated by Marklund (1985). Enzyme activities were standardized to liver protein concentrations that were determined according to Bradford (1976).

### 2.6. Plasma lipids

The cholesterol and triglycerides in plasma were determined by the enzymatic colorimetric method (kit references #1001090 and #1001312, respectively) of Spinreact (Sant Esteve de Bas, Girona, Spain).

### 2.7. Statistical analyses

Statistical analyses were performed using the SPSS version 19.0 statistical analysis package (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). Results

**Table 2**

Liver weight, hepatosomatic index, CYP7A1 expression, plasma lipids, glutathione levels and red-ox and inflammation indexes in Fa/Fa rats fed modified AIM-93 diets containing control-surimi, glucomannan-surimi, and glucomannan-surimi plus spirulina.

	Control		Glucomannan		Glucomannan plus spirulina		ANOVA
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	
Final weight (g)	326.51	15.01	306.41	20.02	318.44	19.92	0.221
Liver weight (g)	12.31 <sup>a</sup>	0.84	9.10 <sup>b</sup>	0.80	9.74 <sup>b</sup>	0.44	<0.001
Hepatosomatic index (g/g)	0.04 <sup>a</sup>	0.00	0.03 <sup>b</sup>	0.00	0.03 <sup>b</sup>	0.00	<0.001
CYP7A1 expression (% vs. C)	100.00 <sup>a</sup>		64.61 <sup>b</sup>	25.50	39.20 <sup>b</sup>	19.17	<0.001
Plasma cholesterol (mmol/l)	3.36 <sup>a</sup>	0.64	2.34 <sup>b</sup>	0.32	2.41 <sup>b</sup>	0.45	<0.001
Plasma triglycerides (mmol/l)	1.83 <sup>a</sup>	0.82	1.20 <sup>b</sup>	0.35	1.51 <sup>a,b</sup>	0.70	<0.001
GSH ( $\mu$ g/mg tissue)	0.51 <sup>a</sup>	0.09	0.71 <sup>b</sup>	0.10	0.66 <sup>b</sup>	0.13	0.002
GSSG ( $\mu$ g/mg tissue)	0.79	0.18	0.81	0.23	0.81	0.21	0.960
Red-ox index, GSH/(GSH + GSSG)	0.39 <sup>a</sup>	0.03	0.47 <sup>b</sup>	0.08	0.45 <sup>a,b</sup>	0.07	0.009
Inflammation index, eNOS/(eNOS + iNOS)	0.50 <sup>a</sup>	0.01	0.26 <sup>b</sup>	0.03	0.42 <sup>a</sup>	0.08	<0.001

<sup>a,b</sup> Values, mean with standard deviation of eight rats per group, within a row with unlike superscript letters were significantly different ( $p < 0.05$ ). CYP7A1 was calculated as percentage related to control values. Thus, control group has no standard deviations.

**Table 3**  
Liver antioxidant enzymes expressions and activities of Fa/Fa rats fed modified AIM-93 diets containing control-surimi, glucomannan-surimi, and glucomannan-surimi plus spirulina.

	Control		Glucomannan		Glucomannan + spirulina		ANOVA
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	
<i>SOD</i>							
Cu,Zn-SOD expression (% vs. C)	100.00 <sup>a</sup>		91.52 <sup>a</sup>	23.87	8.12 <sup>b</sup>	7.34	<0.001
Mn-SOD expression (% vs. C)	100.00 <sup>a</sup>		66.68 <sup>b</sup>	38.07	34.42 <sup>c</sup>	15.92	0.029
Activity (U/mg protein)	0.11	0.04	0.14	0.07	0.16	0.09	0.963
<i>CAT</i>							
Expression (% vs. C)	100.00 <sup>a</sup>		103.76 <sup>ab</sup>	7.48	107.23 <sup>a</sup>	10.25	0.001
Activity (U/mg protein)	58.45 <sup>a</sup>	17.60	103.76 <sup>ab</sup>	7.48	35.54 <sup>a</sup>	16.24	0.326
<i>GPx</i>							
Expression (% vs. C)	100.00 <sup>a</sup>		150.18 <sup>a</sup>	90.53	43.13 <sup>a</sup>	24.01	<0.001
Se-GPx activity (U/mg protein)	8788.31	4671.85	10791.80	3834.04	6539.29	4532.90	0.572
Non Se-GPx activity (U/mg protein)	6474.91	4696.42	7853.60	3993.86	7315.71	6324.27	0.952
<i>GR</i>							
Expression (% vs. C)	100.00 <sup>a</sup>		94.55 <sup>a</sup>	74.84	199.56 <sup>a</sup>	81.23	0.012

<sup>a,b,c</sup> Values, mean with standard deviation of eight rats per group, within a row with unlike superscript letters were significantly different ( $p < 0.05$ ). SOD, superoxide dismutase; CAT, catalase; GPx, glutathione peroxidase, and GR, glutathione reductase expressions were calculated as percentage related to control values. Thus, control groups have no standard deviations.

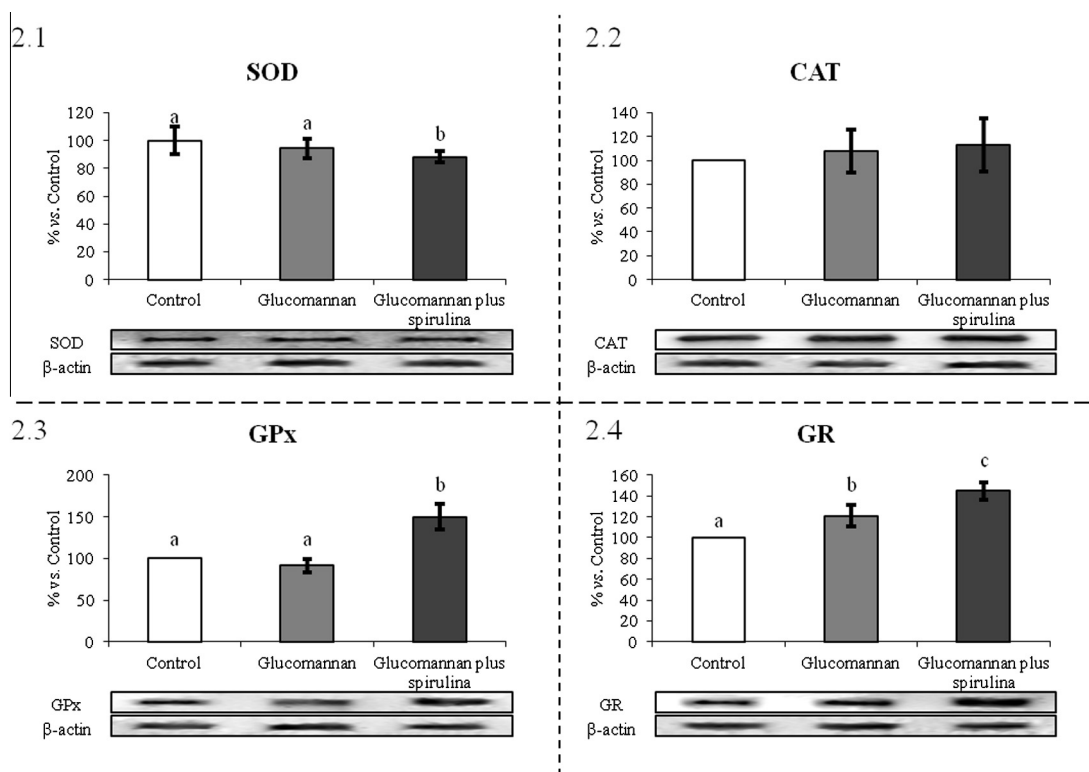
were expressed as means and standard deviations. One way ANOVA followed by Bonferroni test was used to assess the effect of the diet. Results were accepted as significant when  $p < 0.05$ .

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Body and liver weights and hepatosomatic index

As shown in Table 2, all Fa/Fa rats became obese (Alexandre de Artiñano et al., 2009); although diets did not modify the final

weight of the rats, but changed the liver weight and the hepatosomatic index. The C group showed significant ( $p < 0.05$ ) higher liver weight and hepatosomatic index than the G and GS counterparts, suggesting that the hypercaloric and saturated control diet produced liver enlargement. Liver fat infiltration and hepatomegalia has been observed in Fa/Fa rats and MS (Brockman, Chen, & Gallaher, 2012). Livers of Wistar rats fed control or Sea Spaghetti enriched restructured-pork diets were 40% smaller than those of the control in the present study, but similar to the G and GS diets (Schultz-Moreira et al., 2011). This suggests a hepatomegalia



**Fig. 2.** Effects of glucomannan-squid surimi with or without spirulina on major enzymatic antioxidants, determined by Western blotting. Fig. 2.1: effects on superoxide dismutase (SOD) level. Fig. 2.2: Effects on catalase (CAT) level. Fig. 2.3: effects on glutathione peroxidase (GPx) level. Fig. 2.4: effects on glutathione reductase (GR) level. (a–c) Values, mean  $\pm$  standard deviation, with unlike superscript letters were significantly different ( $p < 0.05$ ). Results were calculated as percentage related to control values. Thus, control groups have no standard deviations. A representative band of each enzyme result is set together to a  $\beta$ -actin band, used as a loading control.

reduction in Fa/Fa rats fed glucomannan or glucomannan *plus* spirulina diet.

### 3.2. Plasma lipids and cytochrome P450 7A1 (CYP7A1) expression

Table 2 shows that G diets significantly decreased plasma cholesterol and triglycerides while GS only significantly decreased cholesterol. Both G and GS diets reduced CYP7A1 expression (all  $p < 0.05$ ). In fact, according to Sánchez-Muniz and Bastida (2008) most rats on C diets, while only 50% of rats from groups G and GS, were hypercholesterolemic. This effect could be ascribed to the ability of glucomannan to create a matrix which partially blocks fat, cholesterol and bile acid absorptions (González-Canga et al., 2004). CYP7A1 is a haemo enzyme which helps remove cholesterol from the liver via bile acid, generating free radicals (Shin-kyo & Guengerich, 2011). A previous study indicates that CYP7A1 expression was related to plasma and liver cholesterol levels (Sánchez-Muniz et al., 2008). The present results suggest that because glucomannan reduced plasma cholesterol, cholesterol removal from the liver is decreased, leading in turn to a reduction in CYP7A1 expression in G and GS vs. C groups ( $p < 0.05$ ). Addition of Spirulina did not produce any additional observations.

### 3.3. Total, reduced and oxidized glutathione levels

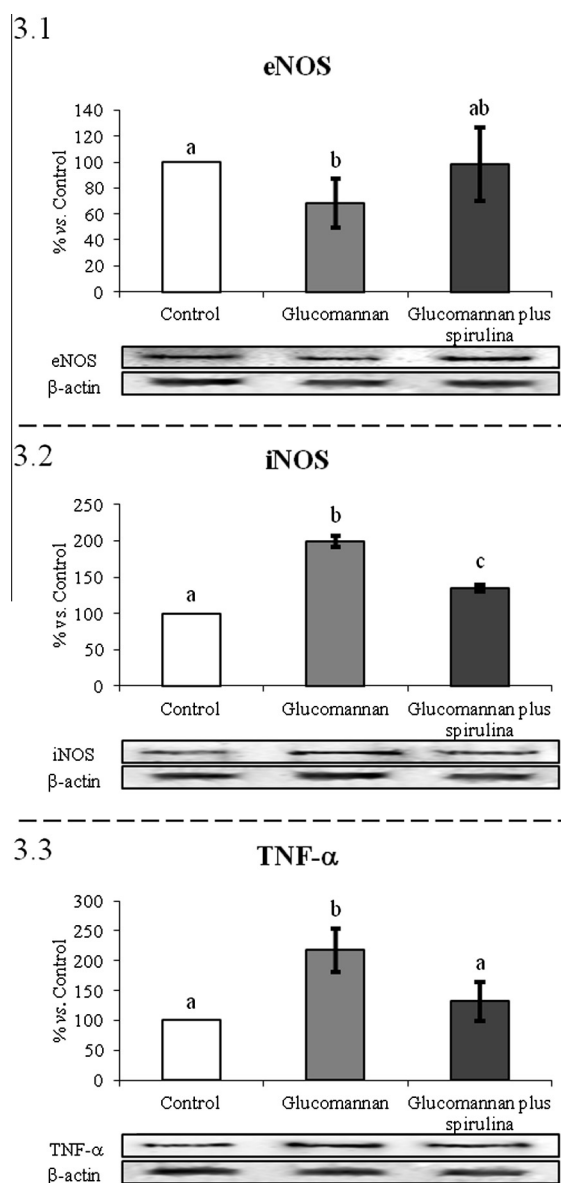
GSH levels were affected by diet, increasing in G and GS groups in comparison to the control counterpart (Table 2). GSSG levels were not significantly affected by any treatment. The RI was higher in G vs. C ( $p < 0.05$ ) and tended to increase, although not significantly. The present results clearly suggest that the control diet reduced GSH and increased GSSG in Fa/Fa rats in comparison to previous GSH and GSSG values in Wistar rats (Schultz-Moreira et al., 2011). Fiber has been found to act as an antioxidant (Bocanegra et al., 2009) but our results reinforce the hypothesis that less free radical generation via CYP7A1 occurred by the addition of glucomannan to the squid-surimi.

### 3.4. Antioxidant enzyme activities, levels and expressions

Table 3 and Fig. 2 show information on antioxidant enzyme activities, levels and expressions. SOD levels tended to decrease in GS vs. C ( $p < 0.05$ ). When comparing SOD expressions, GS group reduced Cu,Zn-SOD and Mn-SOD expressions vs. G and C groups ( $p < 0.05$ ). SOD activity was not affected by any treatment.

CAT levels were not affected by diet but the GS diet increased CAT expression and reduced its activity with respect to the other groups ( $p < 0.05$ ). The GS group showed higher GPx levels but lower GPx expression compared to the C or G groups ( $p < 0.05$ ). No differences in activity were observed in Se- or Non-Se-GPx between the groups. GR levels were higher in glucomannan-enriched diets vs. C ( $p < 0.05$ ), especially in the GS diet, which also increased GR expression with respect to the G group ( $p < 0.05$ ).

When the antioxidant enzymes results were integrated and discussed according to Fig. 1, we can suggest that the GSH increase in G group, already discussed, was the direct result of higher GR levels. The GS diet results on SOD point to an extra reduction of  $O_2^-$  radical concentrations by antioxidants from spirulina, as described by Zheng et al. (2013). In addition, the GSH recovery from GSSG appears increased due to GR and GPx values in the GS group. It can be also pointed out that the present control Fa/Fa rats were diabetics (Vázquez-Velasco et al., 2011), with probably less availability for NADPH production (Stanton, 2012). G and GS diets partially improved glucose levels (Vázquez-Velasco et al., 2011), probably activating the glucose-6-phosphate dehydrogenase pathway (Fig. 1), that in turn, would permit a GR increase. Riss et al. (2007) reported



**Fig. 3.** Effects of glucomannan-squid surimi with or without spirulina on inflammation biomarkers, determined by Western blotting. Fig. 3.1: effects on endothelial nitric oxide synthase (eNOS) level. Fig. 3.2: effects on inducible nitric oxide synthase (iNOS) level. Fig. 3.3: effects on tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) level. (a–c) Values, mean  $\pm$  standard deviation, with unlike superscript letters were significantly different ( $p < 0.05$ ). Results were calculated as percentage related to control values. Thus, control groups have no standard deviations. A representative band of each enzyme result is set together to a  $\beta$ -actin band, used as a loading control.

a NADPH oxidase reduced expression induced by C-phycoerythrin from *S. platensis*.

### 3.5. Inflammation biomarkers

The G diet reduced eNOS and increased iNOS and TNF $\alpha$  levels ( $p < 0.05$ ) with respect to the C diet (Fig. 3). These results suggest that glucomannan added to squid-surimi induced some liver inflammation, while previous studies on this flour pointed to anti-inflammatory effects (Lin, Pang, Fan, & Chen, 2010; Onishi et al., 2007). Differences in animal species, physiopathological status, dietary fat amount and composition, and study length could explain divergences within studies. We are far from knowing the mechanisms engaged; however, the link between the excess

production of potential irritating compounds (e.g. hydrogen ions or methane from fiber fermentation) (Ichikawa & Sakata, 1997) and the liver inflammation should not be discarded. High glucomannan levels were included in an obesogenic experimental animal model. According to Hullar and Lampe (2012), the “obesogenic” microbiota influences the interaction of signal molecules of the host, producing changes in gut permeability and hormone releasing, and a low intestinal level of inflammation.

In addition, contrary to popular belief, the use of herbal remedies can pose serious health risks, particularly hepatotoxicity. Thereby, acute hepatitis of cholestatic type (jaundice and transaminase increase) has been suggested with the use of glucomannan after the exclusion of other causes of liver injury, such as alcohol consumption (Fernández-Villaverde et al., 2004). Thus, future studies should be conducted to evaluate histological changes in liver in animal models fed with squid surimi containing high amounts of glucomannan.

The present data shows that the GS group improved eNOS and iNOs levels with respect to the G group, suggesting less inflammation in the GS diet. Spirulina contains C-phycoyanin, which has a structure very similar to biliverdin, that has free radical scavenging and NADPH oxidase inhibition capacity (Zheng et al., 2013), explaining, at least partially, the present results. Nonetheless, possible anti-inflammatory effects of spirulina omega-3 polyunsaturated fatty acids should be not discarded (Villalobos et al., 2010).

#### 4. Conclusion

The present results clearly demonstrate the hypolipemic and antioxidant effects of glucomannan addition to squid-surimi in Fa/Fa rats. However, negative results were found with respect to its effects on inflammation. The addition of spirulina potentiated the antioxidant effects and partially blocked the negative proinflammatory effect induced by glucomannan. More studies are needed to understand the effects observed in the glutathione and NOS systems induced by G and GS diets, and thus to ascertain the convenience of including different doses of these ingredients in the diet to find out the optimal dosage for functional food design and to avoid potential liver damage.

#### 5. Disclosure statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

#### Acknowledgements

The present study was supported by the Spanish projects AGL-2011-29644-C02-02, AGL-2008-04892-C03-02 and Consolider-Ingenio 2010 project # CSD2007-00016. We gratefully acknowledge the foreign fellowship for graduate studies granted by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) of México to Laura González-Torres. All authors have significantly contributed to the paper and agree with the present version of the manuscript. F.J.S.-M. is the corresponding author and Guarantor of the paper and has contributed to the study design, data discussion and writing of this paper. M.V.-V., L.G.-T. and P. L.-G. have contributed to the data acquisition and analysis and writing of the paper. S.B., J.B., M.J.G.-M., and M.I.R. have contributed to data discussion and have made a critical review of the paper. The present study was approved by the Spanish Science and Technology Advisory Committee (project AGL-2008-04892-C03-02) and by an ethics committee of the Universidad Complutense de Madrid (Spain). All experiments were performed in compliance with Directive 86/609/EEC of November 24, 1986 for the protection of scientific research animals.

#### References

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121–126.
- Aleixandre de Artiñano, A., & Miguel Castro, M. (2009). Experimental rat models to study the metabolic syndrome. *British Journal of Nutrition*, 102, 1246–1253.
- Berdeaux, A. (1993). Nitric oxide: An ubiquitous messenger. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 7, 401–411.
- Bocanegra, A., Bastida, S., Benedí, J., Ródenas, S., & Sánchez-Muniz, F. J. (2009). Characteristics and nutritional and cardiovascular-health properties of seaweeds. *Journal of Medicinal Food*, 12, 236–258.
- Borderías, A., Sánchez-Alonso, I., & Pérez-Mateos, M. (2005). New applications of fibres in foods: Addition to fishery products. *Trends in Food Science Technology*, 16, 458–465.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Brockman, D., Chen, X., & Gallaher, D. (2012). Hydroxypropyl methylcellulose, a viscous soluble fiber, reduces insulin resistance and decreases fatty liver in Zucker Diabetic Fatty rats. *Nutrition & Metabolism*, 9, 100.
- Codoñer-Franch, P., Valls-Bellés, V., Arilla-Codoñer, Á., & Alonso-Iglesias, E. (2011). Oxidant mechanisms in childhood obesity: The link between inflammation and oxidative stress. *Translational Research*, 158, 369–384.
- Deng, R., & Chow, T. (2010). Hypolipidemic, antioxidant, and antiinflammatory activities of microalgae *Spirulina*. *Cardiovascular Therapy*, 28, 33–45.
- Fernández-Villaverde, A., Benlloch, S., Berenguer, M., Miguel-Rayón, J., Pina, R., & Berenguer, J. (2004). Acute hepatitis of cholestatic type possibly associated with the use of glucomannan (*Amorphophalus konjac*). *Journal of Hepatology*, 41, 1061–1067.
- González-Canga, A., Fernández-Martínez, N., Sahagún, A. M., García-Vieitez, J. J., Díez-Liéban, M. J., Calle-Pardo, A. P., et al. (2004). Glucomannano: Propiedades y aplicaciones terapéuticas. *Nutrición Hospitalaria*, 19, 45–50.
- Hissin, P., & Hill, R. (1976). Fluorimetric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical Biochemistry*, 74, 214–226.
- Hullar, M. A., & Lampe, J. W. (2012). The gut microbiome and obesity. *Nestle Nutrition Institute Workshop Series*, 73, 67–79.
- Ichikawa, H., & Sakata, T. (1997). Effect of L-lactic acid, short-chain fatty acids, and pH in cecal infusate on morphometric and cell kinetic parameters of rat cecum. *Digestive Diseases and Sciences*, 42, 1598–1610.
- Kris-Etherton, P., Harris, W., & Appel, L. J. (2003). Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 23, 20–30.
- Lawrence, R., & Burk, R. (1976). Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 71, 952–958.
- Lin, H. M., Pang, J., Fan, L. L., & Chen, J. (2010). Advances in immunological activities of Konjac glucomannan. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 26(11), 1404–1406.
- Livak, K., & Schmittgen, T. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods*, 25, 402–408.
- Marklund, S. L. (1985). Pyrogallol oxidation. In R. Greenwald (Ed.), *Handbook of methods for oxygen radical research* (pp. 243–247). Boca Raton: CRC Press.
- Nagaoka, S., Shimizu, K., Kaneko, H., Shibayama, F., Morikawa, K., Kanamaru, Y., et al. (2005). A novel protein C-phycoyanin plays a crucial role in the hypocholesterolemic action of *Spirulina platensis* concentrate in rats. *Journal of Nutrition*, 135, 2425–2430.
- Onishi, N., Kawamoto, S., Suzuki, H., Santo, H., Aki, T., Shigeta, S., et al. (2007). Dietary pulverized konjac glucomannan suppresses scratching behavior and skin inflammatory immune responses in NC/Nga mice. *International Archives of Allergy and Immunology*, 144(2), 95–104.
- Paglia, D., & Valentine, W. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 70, 158–169.
- Riss, J., Décorde, K., Sutra, T., Delage, M., Baccou, J. C., Jouy, N., et al. (2007). Phycobiliprotein C-phycoyanin from *Spirulina platensis* is powerfully responsible for reducing oxidative stress and NADPH oxidase expression induced by an atherogenic diet in hamsters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 7962–7967.
- Sánchez-Muniz, F. J., & Bastida, S. (2008). Do not use the Friedewald formula to calculate LDL-cholesterol in hypercholesterolaemic rats. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110, 295–301.
- Sánchez-Muniz, F. J., Cava, F., Viejo, J., Hígon, E., & Cuesta, C. (1995). Olive oil- and sunflower oil-fried sardines in the prevention of rat hypercholesterolemia. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft*, 34, 6–21.
- Sánchez-Muniz, F. J. (2012). Dietary fibre and cardiovascular health. *Nutrición Hospitalaria*, 27, 40–54.
- Schultz-Moreira, A., Benedí, J., González-Torres, L., Olivero-David, R., Bastida, S., Sánchez-Reus, M. I., et al. (2011). Effects of diet enriched with restructured meats, containing *Himantalia elongata*, on hypercholesterolaemic induction, CYP7A1 expression and antioxidant enzyme activity and expression in growing rats. *Food Chemistry*, 129, 1623–1630.
- Shinkyu, R., & Guengerich, F. (2011). Cytochrome P450 7A1 cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylation: individual reaction steps in the catalytic cycle and rate-limiting ferric iron reduction. *Journal of Biological Chemistry*, 286, 4632–4643.
- Stanton, R. (2012). Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and cell survival. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, 64, 362–369.

- Stuehr, D. (1999). Mammalian nitric oxide synthases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1411, 217–230.
- Tousoulis, D., Kampoli, A., Tentolouris, C., Papageorgiou, N., & Stefanadis, C. (2012). The role of nitric oxide on endothelial function. *Current Vascular Pharmacology*, 10, 4–18.
- Vázquez-Velasco, M., González-Torres, L., Olivero-David, R., Bastida, S., Benedí, J., Sánchez-Reus, M. I., et al. (2013). Lipoproteinaemia and arylesterase activity in Zucker Fa/Fa rats fed glucomannan/spirulina-enriched squid surimi. *European Journal of Food Science and Technology*, 115, 1274–1283.
- Vázquez-Velasco, M., González-Torres, L., Schultz-Moreira, A., Bastida, S., Sánchez-Muniz, F. J., Sánchez-Reus, M. I., et al. (2011). Insulin resistance/sensibility biomarkers changes in Zucker Fa/Fa rats fed diabetogenic diet enriched in squid surimi containing glucomannan and a microalga. *Atherosclerosis Supplements*, 1, 145.
- Villalobos, M. E., Sánchez-Muniz, F. J., Acín, M. T., Vaquero, M. P., Higuera, F. J., & Bastida, S. (2010). Similarities, differences and agonisms of pleiotropic effects of statins and omega-3 fatty acids. *Nutrición Hospitalaria*, 25, 889–909.
- Wu, W., & Chen, H. (2011). Konjac glucomannan and inulin systematically modulate antioxidant defense in rats fed a high-fat fiber-free diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 9194–9200.
- Zheng, J., Inoguchi, T., Sasaki, S., Maeda, Y., McCarty, M. F., Fujii, M., et al. (2013). Phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis* protect against diabetic nephropathy by inhibiting oxidative stress. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 304, 110–120.



#### 5.4. PUBLICACIÓN N°4

**Journal of Physiology and Biochemistry** (2015) DOI 10.1007/s13105-015-0425-9

**ISI Web JCR (2014):** Índice de impacto: 1.969

51/83 en "Physiology" (Q3)

#### **Effects of glucomannan/spirulina-surimi on liver oxidation and inflammation in Zucker rats fed atherogenic diets**

Miguel Vázquez-Velasco, Laura González-Torres, Patricia López-Gasco, Sara Bastida, Juana Benedí, María José González-Muñoz, Francisco J. Sánchez-Muniz

**Resumen:** La colesterolemia se asocia con efectos prooxidativos y proinflamatorios. Se incluyó glucomanano o glucomanano y espirulina en surimis de calamar en el marco de dietas ricas en grasa saturada y enriquecidas en colesterol para evaluar sus efectos sobre la lipemia, el estatus antioxidante (estatus del glutatión, y niveles, expresión y actividad de enzimas antioxidantes) y marcadores de inflamación (óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), inducible (iNOS) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )) en ratas Zucker fa/fa. Grupos de ocho ratas cada uno consumieron dietas conteniendo surimi control (C), surimi control con colesterol (HC), surimi con glucomanano y colesterol (HG) o surimi con glucomanano, espirulina y colesterol (HGS) durante siete semanas. La dieta HC indujo hiperlipemia severa, hepatomegalia, marcadores de inflamación incrementados y estatus antioxidante empeorado de forma significativa (al menos  $p < 0,05$ ) con respecto a la dieta C. La dieta HG redujo la lipemia, el tamaño del hígado y normalizó el estatus antioxidante hasta los niveles del grupo C, pero incrementó el TNF- $\alpha$  con respecto a la dieta HC ( $p < 0.05$ ). En términos generales, la adición de 3 gramos de espirulina por cada gramo de dieta mantuvo los resultados positivos de la dieta HG y además mejoró el índice de inflamación [eNOS/(eNOS + iNOS)] y redujo el TNF- $\alpha$  plasmático (ambos  $p < 0.05$ ). Por tanto, el glucomanano más una pequeña cantidad de espirulina bloqueó los efectos negativos inducidos por dietas hipercolesterolémicas. Aunque se necesitan más estudios al respecto, los presentes resultados sugieren la utilidad de incorporar glucomanano y/o espirulina como ingredientes funcionales a derivados de la pesca para el consumo de individuos con riesgo de desarrollar síndrome metabólico.



# Effects of glucomannan/spirulina-surimi on liver oxidation and inflammation in Zucker rats fed atherogenic diets

Miguel Vázquez-Velasco · Laura González-Torres · Patricia López-Gasco · Sara Bastida · Juana Benedí · María José González-Muñoz · Francisco J. Sánchez-Muniz

Received: 31 May 2015 / Accepted: 22 July 2015  
© University of Navarra 2015

**Abstract** Cholesterolemia is associated with pro-oxidative and proinflammatory effects. Glucomannan- or glucomannan *plus* spirulina-enriched surimis were included in cholesterol-enriched high-saturated diets to test the effects on lipemia; antioxidant status (glutathione status, and antioxidant enzymatic levels, expressions and activities); and inflammation biomarkers (endothelial nitric oxide synthase (eNOS), inducible nitric oxide synthase (iNOS), tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ )) in Zucker fa/fa rats. Groups of eight rats each received diet containing squid-surimi (C), squid-surimi cholesterol-enriched diet (HC), glucomannan-squid-surimi cholesterol-enriched diet (HG), or glucomannan-spirulina-squid-surimi cholesterol-enriched diet (HGS) over a period of 7 weeks. HC diet induced severe

hyperlipemia, hepatomegalia, increased inflammation markers, and impaired antioxidant status significantly (at least  $p < 0.05$ ) vs. C diet. HG diet decreased lipemia and liver size and normalized antioxidant status to C group levels, but increased TNF- $\alpha$  with respect to HC diet ( $p < 0.05$ ). In general terms, 3 g/kg of spirulina in diet maintained the positive results observed in the HG diet but, in addition, increased inflammation index [eNOS/(eNOS + iNOS)] and decreased plasma TNF- $\alpha$  (both  $p < 0.05$ ). In conclusion, glucomannan plus a small amount of spirulina blocks negative effects promoted by hypercholesterolemic diets. Although more studies are needed, present results suggest the utility of including glucomannan and/or spirulina as functional ingredients into fish derivatives to be consumed by people on metabolic syndrome risk.

Miguel Vázquez-Velasco and Laura González-Torres are the first authors of this study.

M. Vázquez-Velasco · L. González-Torres · S. Bastida · F. J. Sánchez-Muniz (✉)

Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición), Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain  
e-mail: frasan@ucm.es

P. López-Gasco · J. Benedí  
Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain

M. J. González-Muñoz  
Departamento de Nutrición, Bromatología y Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Alcalá, Carretera Madrid-Barcelona, Km. 33,600, 28871 Alcalá de Henares, Spain

**Keywords** Squid-surimi · Glucomannan · Spirulina · Hypercholesterolemia · Antioxidants · Inflammation

## Abbreviations

CAT	Catalase
eNOS	Endothelial nitric oxide synthase
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Reduced glutathione
GSSG	Oxidized glutathione
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
RNS	Reactive nitrogen species
ROS	Reactive oxygen species
SOD	Superoxide dismutase
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor alpha

## Introduction

A plethora of potential functional foods have been developed during the last few decades [3]. As ample evidence exists of the health benefits of fish and fish derivate consumption [15], our research team is engaged in assessing the health impact of potential new functional foods containing seaweeds [12] and fish derivatives/ingredients [33]. Squid-surimi admits the addition of ingredients with known health benefits and/or removes potentially undesirable components for the development of functional foods [6, 33].

Westernized countries, where there is a high prevalence of degenerative chronic diseases, are also characterized by consumption of hyperenergetic, hypersaturated, cholesterol-rich diets believed to cause imbalances in reactive oxygen species (ROS) production [5]. Free radicals and ROS are considered to be crucial in the development of degenerative diseases such as obesity, cardiovascular diseases and type 2 diabetes [21]. In addition, hypercholesterolemia, increases free radical production and related inflammation mechanisms [30]. Oxidative stress is defined as an overbalance of the net levels of ROS and reactive nitrogen species (RNS) in comparison to the antioxidant capacity. Endogenous antioxidant defense capacity consists of enzymes that catalyze oxidant-modifying reactions and interacting molecules with antioxidant activity (Fig. 1). Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) is habitually expressed in cells, synthesizing nitric oxide, which is involved in the regulation of the cardiovascular system and homeostatic mechanisms [31]. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) activation is strongly promoted by pathophysiological situations in response to cytokines and leads to sustained higher nitric oxide levels, which have antioxidant and anti-inflammatory effects [32].

The role of plant bioactive components and dietary fiber as free radical scavengers is now an area of active research. Glucomannan, a dietary fiber extracted from *Amorphophallus konjac*, is known to possess satiating, laxative, and hypocholesterolemic properties [11], while *Spirulina platensis*, has been considered a microalga rich in minerals and antioxidant compounds such as carotenoids and phycocyanin [23].

Zucker fa/fa rats are very sensitive to hypercaloric and hyperlipemic diets, developing a chronic low-level inflammation state, closely linked to oxidative stress, which leads to cell damage [9].

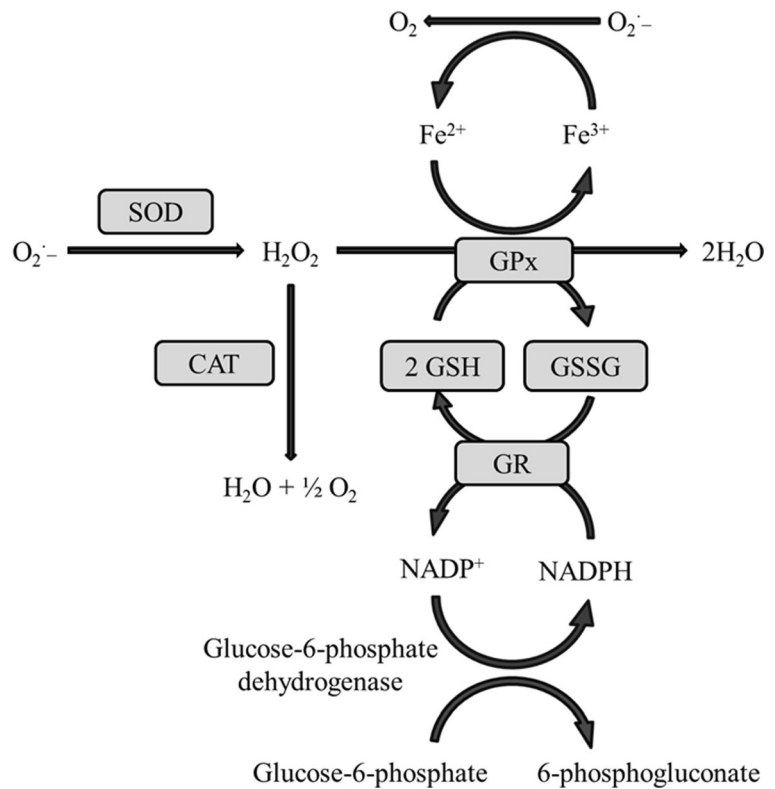
To the best of our knowledge, there have been few studies to date on the effects of squid-surimi on antioxidant status and hypercholesterolemia, and much less on the effects of glucomannan-enriched surimi in the frame of hypercholesterolemic diets. A previous study demonstrated that glucomannan-enriched surimi induced antioxidant and proinflammatory effects, while glucomannan plus spirulina-enriched surimi kept the antioxidant effects but ameliorated the inflammatory ones [33]. The hypothesis of the present work is that glucomannan-enriched and glucomannan plus spirulina-enriched squid-surimis act as functional foods by reducing the oxidative and inflammatory status originated by hypercholesterolemia induction in fa/fa rats. The purpose of our study, then, is to determine the effects of large amounts of glucomannan-enriched squid-surimi consumption in a hyperenergetic, hypersaturated-fat diet, enriched with cholesterolemic agents, on liver fat and cholesterol; liver antioxidant (superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), catalase (CAT), oxidized and reduced glutathione); and inflammation (eNOS, iNOS, and tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) biomarkers.

## Material and methods

### Diet preparation and experimental design

All experiments were performed in compliance with Directive 86/609/EEC of 24 November 1986 (modified by Directive 2003/65/CE of 22 July 2003) for the protection of scientific research animals. The present study was approved by the Spanish Science and Technology Advisory Committee (project AGL 2008-04892-C03-02 and Consolider Ingenio 2010, CSD 2007-00016) and by an ethics committee of the Universidad Complutense of Madrid (Spain). A total of 24 male growing Zucker fa/fa rats with an initial body weight of approximately 120 g were obtained from Harlan Laboratories Models (Harlan, SL, Barcelona, Spain). The animals were housed individually in metabolic cells in a temperature-controlled room ( $22.3 \pm 1.9$  °C) with a 12-h light/12-h dark cycle. The rats were fed commercial rat pellets (Panlab, Barcelona, Spain) during a 1-week adaptation period to environmental conditions and then distributed into three groups of eight animals each, according to their average body weight.

**Fig. 1** General endogenous antioxidant defense system diagram. Figure modified from Vázquez-Velasco et al. [33]



Four experimental semi-synthetic diets were prepared in a room under appropriate environmental conditions (4 °C and low enlightenment) to reduce changes in their antioxidant properties blending AIM-93 M diets and surimi. Vitamin and mineral contents of AIM-93 M diets were designed to cover requirements for rats once the whole diet was prepared (Table 1). Control diet (C) was composed of a homogeneous mixture of 70 % rodent diet (AIN-93 M #102634 purified rodent diet; Dyets, Inc., Bethlehem, PA, USA) and 30 % freeze-dried restructured squid-surimi (with 15 % microcrystalline cellulose). Hypercholesterolemic control diet (HC) was composed of a homogeneous mixture of 70 % rodent diet (AIN-93 M #102636 purified rodent diet; Dyets, Inc., Bethlehem, PA, USA) and 30 % freeze-dried restructured squid-surimi (with 15 % microcrystalline cellulose); Hypercholesterolemic glucomannan diet (HG) consisted of a mixture of AIN-93 M #102637 feed (70 %) and freeze-dried, restructured glucomannan-enriched squid-surimi (30 %, 15 % of glucomannan into surimi) and hypercholesterolemic glucomannan plus spirulina diet (HGS) consisted in a mixture of AIN-93 M #102637 feed (70 %) and freeze-dried, restructured glucomannan plus

spirulina-enriched squid-surimi (30, 15 % glucomannan into surimi and 3 g/kg diet of spirulina). All hypercholesterolemic diets contained 2 % cholesterol (95–98 % purity) and 0.4 % cholic acid (98 % purity). Water and food were provided ad libitum over the 7-week experimental period. At the end of the experiment, in order to avoid inter-assay variations that could affect the comparison of data from the different groups, fasting rats were taken, one at a time from each of the six groups, anesthetized and euthanized by extracting blood from the descending aorta.

#### Liver fat and cholesterol determinations

Lipids from homogeneous samples of hepatic tissue from the major lobe of liver were extracted with chloroform/methanol (2:1, v/v). Extract was dissolved in isopropanol and tested for total cholesterol, using the enzymatic colorimetric method (kit references #1001090) of Spinreact (Sant Esteve de Bas, Girona, Spain). Turbidity in samples, when present, was eliminated by centrifuging at 2200 g at 4 °C for 5 min after the enzymatic-colorimetric reaction and before spectrophotometric reading.

**Table 1** Composition (g/kg) of the experimental diets

	C	HC	HG	HGS
Comstarch	213.49	189.48	230.65	230.65
Microcrystalline cellulose	49.41	49.41	8.23	8.23
Cholesterol	0	20.02	20.02	20.02
Cholic acid	0	3.99	3.99	3.99
Squid surimi	300	300	255	255
Glucomannan	0	0	45	45
Spirulina	0	0	0	3
Energy content (MJ/kg diet)	13.33	12.97	13.81	13.87

Other ingredients (g/kg diet): casein, 105.0; palm olein, 115.29; dyetrose (carbohydrate composition: monosaccharides, 10; disaccharides, 40; trisaccharides, 50; tetrasaccharides and higher, 900), 108.5; sucrose, 70.0; AIN-93 M mineral mix, 29.75; AIN-93VX vitamin mixture, 12.16; choline bitartrate, 3.06; L-cystine, 1.26; t-butylhydroquinone, 0.02. Mineral mix #210050 24.5; vitamin mix #310025, 162.07. AIN-93 M mineral mix (g/kg): calcium carbonate, 357.00; potassium phosphate monobasic, 250.00; potassium citrate.H<sub>2</sub>O, 28.00; sodium chloride, 74.00; potassium sulfate, 46.60; magnesium oxide, 24.00; ferric citrate U.S.P., 6.06; zinc carbonate, 1.65; manganous carbonate, 0.63; cupric carbonate, 0.30; potassium iodate, 0.01; sodium selenate, 0.01025; ammonium paramolybdate 4H<sub>2</sub>O, 0.00795; sodium metasilicate 9H<sub>2</sub>O, 1.45; chromium potassium sulfate 12H<sub>2</sub>O, 0.275; lithium chloride, 0.0174; boric acid, 0.0815; sodium fluoride, 0.0635; nickel carbonate, 0.0318; ammonium vanadate, 0.0066; finely powdered sucrose, 209.806. AIN-93VX vitamin mixture (g/kg): niacin, 3.00; calcium pantothenate, 1.60; pyridoxine HCl, 0.70; thiamine HCl, 0.60; riboflavin, 0.60; folic acid, 0.20; biotin, 0.02; vitamin E acetate (500 IU/g), 15.00; vitamin B12 (0.1 %), 2.50; vitamin A palmitate, (150000 µg/g), 0.80; vitamin D<sub>3</sub> (10000 µg/g), 0.25; vitamin K<sub>1</sub>-dextrose mix (10 mg/g), 7.50; sucrose, 967.23

C AIN-93 M (70 %) plus control squid-surimi (30 %), HC AIN-93 M (70 %) plus control squid-surimi (30 %) plus hypercholesterolemic agents, HG AIN-93 M (70 %) plus glucomannan-enriched squid-surimi (30 %) plus hypercholesterolemic agents, HGS AIN-93 M (70 %) plus glucomannan plus spirulina-enriched squid-surimi (30 %) plus hypercholesterolemic agents

### Glutathione determination

Total, reduced (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) levels were determined in liver following the Hissin and Hill [13] method. Liver tissue was homogenized with phosphate-EDTA (0.1 M sodium phosphate and 0.005 M EDTA) buffer (pH=8) at 100 mg/mL concentration, adding 10 µL/mL tissue of HClO<sub>4</sub> (60 %). Then, tissue homogenates were spun at 10,000 RPM (6000g) for 10 min at 4 °C and supernatant were at 4 °C until GSH and GSSG determination. Fluorescence was measured in a FLX 800 fluorimeter (Bio-Tek Instruments,

Winooski, Vermont, USA) at  $\lambda_{exc}$ =350 nm and  $\lambda_{em}$ =420 nm.

The redox index (RI), a parameter that indicates the antioxidant status of the tissue, was expressed as follows:  $RI = GSH / (GSH + GSSG)$ .

### Western blotting. Antioxidant enzyme and inflammation biomarker levels

Equal amounts of protein lysates obtained from rat liver homogenates were separated in 10 % sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The gels were blotted onto a PVDF Amersham Hybond-P membrane (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) and incubated with the appropriate antibodies (S2147, C0979, A2228 and A9917 from Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA; Ab60275, Ab5589 and Ab21775 from Abcam, Cambridge, UK; sc-32886, sc-1350, sc-2490 and sc-2004 from Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). Blots were developed by enhanced chemo luminescence using an Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) according to the manufacturer's instructions.  $\beta$ -actin was used as a loading control.

### Extraction and analysis of RNA and quantification by reverse transcription-polymerase chain reaction. Enzymes' gene expression

Total RNA was isolated from 100 mg of liver using TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. RNA samples were then treated with DNase I RNase-free, DNase treatment and removal reagents (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) to remove any contamination with genomic DNA. The yield and quality of the RNA were assessed by measuring absorbance at 260, 270, 280, and 310 nm and by electrophoresis on agarose gels (1.3 %). Total RNA of each sample (1.5 mg) was reverse-transcribed to first-strand complementary DNA (cDNA) using a revert aid H minus first-strand cDNA synthesis kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Relative CAT, Cu, Zn-SOD, Mn-SOD, GPx, GR, and cytochrome P450 7A1 (CYP7A1) messenger RNA (mRNA) levels were quantified using real-time PCR with a LightCycler<sup>TM</sup> Real-Time PCR Detection System (Roche diagnostics, Indianapolis, IN, USA), using a

SYBR® Green (Biotools, Madrid, Spain) for the normalization of the results.

The PCR parameters were as follows: preincubation at 95 °C for 5 s followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 5 s, with an annealing temperature dependent of each couple primer (55 °C for Mn-SOD; 56 °C for Cu, Zn-SOD and 60 °C for CAT, GPx, GR and CYP7A1), extension 72 °C for 30 s. Melting curve 95–65–95 °C. Cooling 40 °C.

Primers sequences:

Cu, Zn-SOD: sense 5'-GCCGTGTGCGTGCTGAA-3'  
antisense -TGACGATGCCGTGCTGCATG-3'  
Mn-SOD: sense 5'-GACAAACCTGAGCCCTAA  
GGG-3'  
antisense 5'-CTTCTTGCAAACCTATG-3'  
CAT: sense 5'-ATCAGGGATGCCATGTTGTT-3'  
antisense 5'-GGGTCCTTCAGGTGAGTTTG-3'  
GPx: sense 5'-GCAATCAGTTCGGACACCAG-3'  
antisense 5'-AAAGTTCCAGGCAATGTCGT-3'  
GR: sense 5'-TCACTGCTCCGCACATCC-3'  
antisense 5'-CTCAACACCGCCAGCGTTCTCC-3'  
CYP7A1: sense 5'-CACCAATCTGCAACCTT-3'  
antisense 5'-GTACCGGCAGGTCATTCA-3'

All sample mRNA levels were normalized to their values of  $\beta$ -actin and the results expressed as fold changes of threshold cycle (Ct) value relative to controls using the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method [18].

#### Enzyme assays

GPx activity was determined as Se-dependent GPx and total GPx activities. Se-dependent GPx activity was assessed following the Paglia and Valentine method [24], while total GPx activity was assessed by the Lawrence and Burk method [16]. CAT activity was determined according to Aebi [1]. Total SOD activity was determined as indicated by Marklund [20]. Enzyme activities were standardized to liver protein concentrations that were determined according to Bradford [7].

#### Plasma assays

Cholesterol and triglycerides were determined by the enzymatic colorimetric method (kit references #1001090 and #1001312, respectively) of Spinreact (Sant Esteve de Bas, Girona, Spain). TNF- $\alpha$  was

measured using the #DE4774 rat ELISA kit from Diagenics (Milton Keynes, Buckinghamshire, UK).

#### Statistical analyses

Statistical analyses were performed using the SPSS version 22.0 statistical analysis package (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). Results were expressed as means and standard deviations. One-way ANOVA followed by Bonferroni test was used to assess the effect of the diets. When variances were assumed not to be equal, the T2 of Tamhane post hoc test was applied. Contingence tables to assess differences in prevalence of severe hypercholesterolemia between groups were performed by chi-square test. Results were accepted as significant when  $p < 0.05$ .

## Results

#### Body and liver weight, hepatosomatic index

As shown in Table 2, all fa/fa rats became obese. HC diet intake reduced body weight ( $p < 0.05$ ), but increased liver weight and hepatosomatic index in comparison with C rats (both  $p < 0.001$ ).

#### Liver fat and cholesterol

HG diet significantly reduced liver weight and hepatosomatic index vs. HC diet (both  $p < 0.001$ ), but no extra effect of spirulina addition was observed (HGS vs. HG,  $p > 0.05$ ).

Liver fat and liver cholesterol significantly increased in HC vs. C rats ( $p < 0.001$ ). Both HG and HGS diets significantly reduced liver fat but only HGS diet was able to decrease significantly liver cholesterol with respect to HC diet (at least  $p < 0.05$ ).

#### Plasma lipids and CYP7A1 expression

HC diet considerably modified the cholesterolemia and hypertriglyceridemia with respect to C diet (Table 2). Glucomannan-supplemented diets significantly reduced ( $p < 0.001$ ) plasma cholesterol and triglycerides in comparison to HC diet (Table 2). In fact, the prevalence of severe hypercholesterolemia (plasma cholesterol  $\geq 200$  mg/dL [27]) differed significantly ( $p = 0.002$ ) between rat groups: all HC rats were severely

**Table 2** Liver weight, fat, and cholesterol, hepatosomatic index, CYP7A1 expression, plasma lipids, glutathione levels, and red-ox and inflammation indexes in fa/fa rats fed modified AIM-93 diet containing control-surimi (C) and fa/fa rats fed cholesterol-enriched modified AIM-93 diet containing control-surimi (HC), glucomannan-surimi (HG), and glucomannan-surimi plus spirulina (HGS)

	C	HC	HG	HGS	ANOVA ( <i>p</i> )
Final weight (g)	326.51±15.01a	276.13±33.76b	251.06±52.6b	275.89±42.28b	0.002
Cumulative intake (g)	1196.4±89.5	1202.8±77.0	1102.5±61.6	1185.9±66.5	0.086
Liver weight (g)	12.31±0.84b	23.36±2.60a	13.64±2.18b	14.46±1.46b	<0.001
Hepatosomatic index (g/100 g)	3.82±0.26c	8.62±0.48a	5.55±0.74b	5.39±0.76b	<0.001
Liver fat (g/100 g)	11.10±2.51b	19.35±2.83a	13.23±2.22b	13.85±3.16b	<0.001
Liver cholesterol (μmol/g)	10.83±1.24c	25.20±2.20a	22.12±1.30ab	20.13±2.23b	0.002
Liver CYP7A1 expression (% vs. C)	100.00±12.65b	33.75±6.06c	136.93±21.23a	134.08±13.08a	0.006
Plasma insulin (μ UI/mL)	10.81±2.04b	18.57±6.29a	14.60±5.23ab	5.75±1.40c	0.038
Plasma cholesterol (mg/dL)	130.24±24.85b	794.78±257.35a	166.49±72.39b	141.53±48.86b	<0.001
Plasma HDL-cholesterol (mg/dL)	85.83±19.60ab	125.72±29.15a	98.70±36.75ab	79.29±20.96b	0.016
Plasma triglycerides (mg/dL)	162.59±73.40a	195.60±88.83a	34.85±20.49b	43.94±43.88b	<0.001
GSH (mg/mg tissue)	0.51±0.09a	0.43±0.05b	0.51±0.02a	0.49±0.06ab	0.21
GSSG (mg/mg tissue)	0.79±0.18	0.87±0.08	0.80±0.11	0.82±0.09	0.89
Redox index [GSH/(GSH+GSSG)]	0.39±0.03a	0.33±0.02b	0.39±0.03a	0.38±0.01a	0.018
Inflammation index [eNOS/(eNOS + iNOS)]	0.50±0.02b	0.49±0.03b	0.51±0.01b	0.65±0.01a	<0.001
Plasma TNF-α (pg/mL)	71.05±12.64b	88.82±15.53b	119.23±13.68a	41.60±10.69c	0.40

Values (mean±standard deviation of eight rats per group) within a row with unlike letters were significantly different (*a*>*b*>*c*, post hoc Bonferroni test or T2 of Tamhane, *p*<0.05)

hypercholesterolemic, but the same applied to only 37.5 % and 12.5 % from groups HG and HGS, respectively. Furthermore, some of the animals in the HG and HGS groups became normocholesterolemic (<100 mg/dL [27]). Glucomannan consumption reduced triglycerides by more than 80 %; all triglycerides values in HG and HGS groups were below 150 mg/dL. Liver weight appears to correlate significantly with both plasma cholesterol and triglycerides (*p*<0.01).

Low cytochrome P450 expression has been reported in fa/fa rats [14]. The HC diet reduced this theoretically low CYP7A1 expression even more. Both HG and HGS diets significantly increased CYP7A1 expression (*p*<0.05). However, the addition of spirulina (HGS vs. HG) has no extra effects (*p*>0.05) on CYP7A1 expression.

#### Total, reduced, and oxidized glutathione levels

Dietary cholesterol significantly reduced GSH levels (*p*<0.05) and the redox index (*p*<0.001) in HC vs. C rats (Table 2). GSH levels were greater in HG rats than in their HC counterparts, but GSSG levels were

unaffected (Table 2). The addition of Spirulina (HGS vs. HG) has no extra effects (*p*>0.05) on GSH or GSSG levels. The redox index was higher in HG and HGS vs. HC liver extracts (*p*<0.05).

#### Antioxidant enzyme activities, levels, and expressions

Table 3 and Fig. 2 show information on liver antioxidant enzyme activities, levels, and expressions. SOD activity increased significantly (*p*<0.05) while total GPx, Se-GPx, and non-Se-GPx activities tended to increase, and CAT activity to decrease in HC vs. C rats.

HC diet significantly increased GPx levels (14 %) and MnSOD expression (38-fold), and reduced CAT (65 %) and GPx (58 %) expressions. As noted, HC rats displayed cholesterol levels six times higher than C rats.

HG vs. HC diet reduced SOD and total GPx activities (Table 3). In fact, the MnSOD expression was reduced considerably. The addition of spirulina to HG diet induced important changes. GPx and MnSOD expression decreased. Levels of GR and GPx also diminished.

**Table 3** Liver antioxidant enzymes expressions and activities of fa/fa rats fed modified AIM-93 diet containing control-surimi (C) and fa/fa rats fed cholesterol-enriched modified AIM-93 diet containing control-surimi (HC), glucomannan-surimi (HG), and glucomannan-surimi plus spirulina (HGS)

	C	HC	HG	HGS	ANOVA ( <i>p</i> )
<b>SOD</b>					
CuZnSOD expression (% vs. C)	100.00±30.86ab	130.47±19.66a	119.69±35.92ab	53.17±17.04b	<0.001
MnSOD expression (% vs.C)	100.00±17.62c	3781.8±1076.30a	288.07±49.67b	110.69±13.49c	<0.001
SOD activity (U/mg protein)	0.11±0.04b	0.20±0.01a	0.15±0.02b	0.15±0.02b	<0.001
<b>CAT</b>					
CAT expression (% vs. C)	100.00±23.45a	45.98±3.86c	54.21±8.08bc	59.24±3.17b	0.001
CAT activity (U/mg protein)	58.45±17.60	49.58±18.75	48.32±13.92	52.62±8.64	0.87
<b>GPx</b>					
GPx expression (% vs. C)	100.00±14.86a	51.90±10.94b	90.45±28.09a	55.97±22.33b	0.013
Se-GPx activity (U/mg protein)	8.79±4.67	9.82±1.54	8.13±1.19	7.96±1.53	0.074
Non-Se-GPx activity (U/mg protein)	6.47±4.70	9.32±1.18	7.13±0.88	8.12±1.42	0.019
Total GPx activity (U/mg protein)	15.26±8.81ab	19.14±2.61a	15.26±1.67b	16.08±2.93b	0.037
<b>GR</b>					
GR expression (% vs. C)	100.00±16.57b	149.72±37.29ab	124.73±23.41b	182.28±19.84a	0.001

Values (mean±standard deviation of eight rats per group) within a row with unlike letters were significantly different ( $a>b>c$ , post hoc Bonferroni test or T2 of Tamhane,  $p<0.05$ )

### Inflammation biomarkers

Table 2 and Fig. 3 show data on inflammation biomarkers. C rats presented very high plasma TNF- $\alpha$  values. HC diet increased liver eNOS and iNOS levels ( $p<0.05$ ) but not the eNOS/(eNOS + iNOS) index in comparison to C diet. eNOS and iNOS expressions were not significantly different ( $p>0.05$ ) in HG animals with respect to their HC counterparts. HGS diet reduced significantly iNOS expression and the inflammation ratio with respect to the other three experimental diets (at least  $p<0.05$ ).

HG reduced liver TNF- $\alpha$  ( $p<0.05$ ) while HGS reduced liver iNOS and TNF- $\alpha$  levels (all  $p<0.05$ ) with respect to the HC diet. In comparison with HG diet, HGS diet improved iNOS and the inflammation index but increased liver TNF- $\alpha$  levels ( $p<0.05$ ). Plasma TNF- $\alpha$  values were higher in HG than in HC rats ( $p<0.05$ ). However, HGS diet significantly reduced plasma TNF- $\alpha$  vs. all other tested diets (at least  $p<0.05$ ).

### Discussion

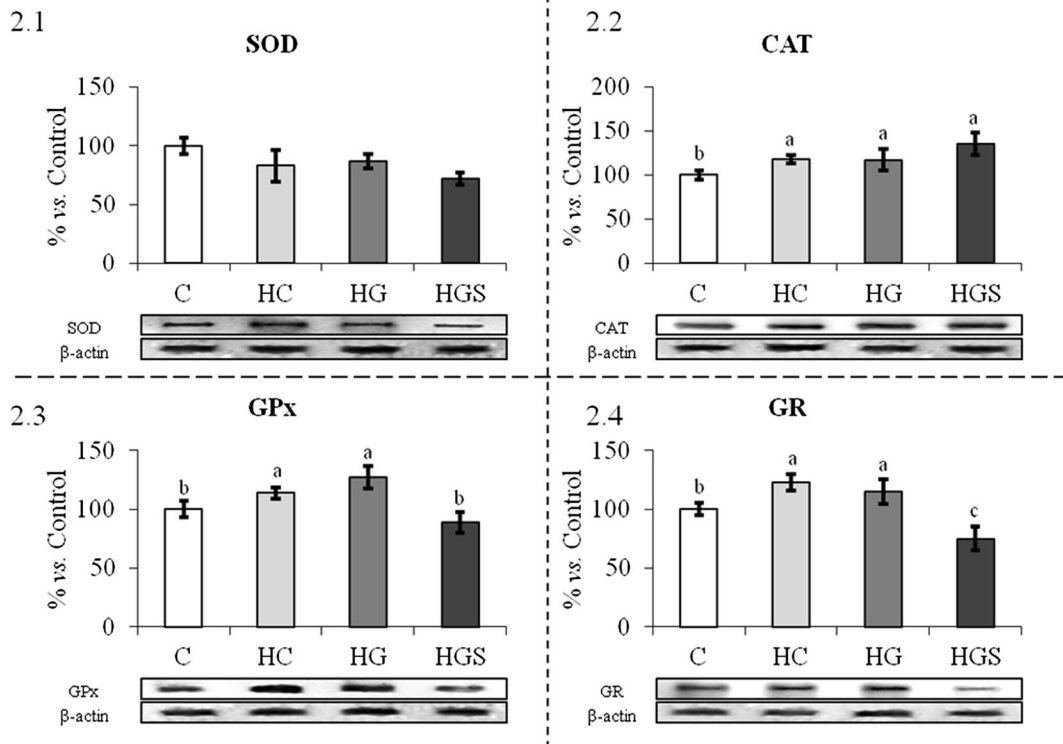
Present results show for the first time that the consumption of squid surimi added with glucomannan highly

arrested the negative effect of cholesterol feeding on cholesterolemia and antioxidant status in fa/fa rats, although induced negative proinflammatory effects. The inclusion of small amounts of spirulina in the glucomannan-squid surimi blocked those negative effects but enhanced the hypolipemic and antioxidant effects of glucomannan-squid surimi.

In order to control the results of the present study in the fa/fa rats fed cholesterol-enriched diets, the inclusion of a fa/fa group fed control diet in the study was obliged. Nonetheless, it has to be pointed out that these results were also included in other parallel study testing the effect of glucomannan and and/or glucomannan plus spirulina in the frame of non-added cholesterol diets where squid surimis were tested [33].

### Body and liver weight, fat, and cholesterol

According to a previous study from Aguirre et al. [2], all fa/fa rats became obese. Hepatomegalia and steatosis have been previously observed in fa/fa rats suffering from metabolic syndrome [8]. Results reveal that dietary cholesterol reduced body weight but increased liver weight and hepatosomatic index and this organ fat and cholesterol contents, suggesting that a high cholesterol dietary enrichment aggravates liver enlargement in this



**Fig. 2** Effects of cholesterol enriched diets containing glucomannan-squid surimi added or not with spirulina on major enzymatic antioxidants, determined by western blotting. **2.1.** Effects on superoxide dismutase (SOD) level. **2.2.** Effects on catalase (CAT) level. **2.3.** Effects on glutathione peroxidase (GPx) level. **2.4.** Effects on glutathione reductase (GR) level. Bars (mean±standard deviation of eight rats per group) bearing unlike superscript letters were significantly different ( $a>b>c$ , post hoc Bonferroni test or T2 of Tamhane,

$p<0.05$ ). A representative band of each enzyme result is set together to a  $\beta$ -actin band, used as a loading control. C, fa/fa rats fed modified AIM-93 diet containing control-surimi; HC, fa/fa rats fed cholesterol-enriched modified AIM-93 diet containing control-surimi; HG, fa/fa rats fed cholesterol-enriched modified AIM-93 diet containing glucomannan-surimi; HGS, fa/fa rats fed cholesterol-enriched modified AIM-93 diet containing glucomannan-surimi plus spirulina

animal model already fed with a high saturated fat diet. Results agree with previous reports in Wistar rats fed semisynthetic cholesterol-enriched diets [4, 28].

Glucomannan addition to restructured squid surimi diet added with hypercholesterolemic agent reduced liver weight and fat and the hepatosomatic index in comparison to the HC diet. Thus, these results can be attributed to the dietary inclusion of konjac fiber. However, spirulina addition decreased liver cholesterol, suggesting that some ingredients of spirulina (e.g., omega-3 fatty acids, polyphenols) exert this extra effect. We are far from knowing the precise mechanism involved.

#### Plasma lipids and CYP7A1 expression

The dyslipemic profile of the control group was similar to the one reported by Aguirre et al. [2]. This effect could be ascribed, at least partially, to the ability of

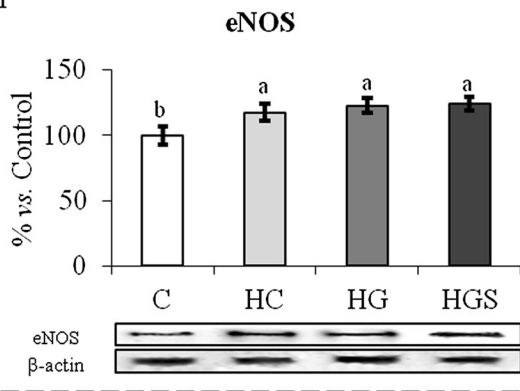
glucomannan to create a matrix which partially blocks fat, cholesterol and bile acid absorption [11].

CYP7A1 is a hemo enzyme of the cytochrome P450 protein family which helps to remove cholesterol from the liver via bile acid, generating free radicals [29]. Glucomannan addition increased CYP7A1 expression, helping to improve cholesterol excretion from the liver. Spirulina inclusion did not display extra effects on CYP7A1 expression, although in previous studies on hypercholesterolemic rats fed algae, this expression were found to increase [28].

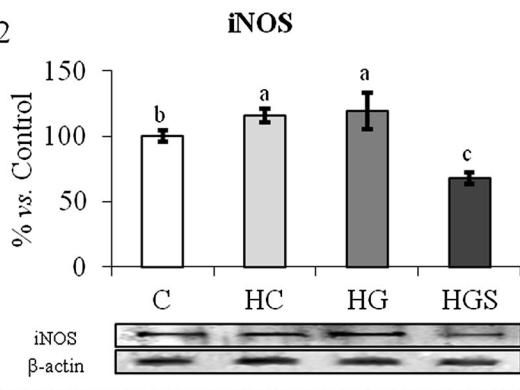
#### Total, reduced, and oxidized glutathione levels

The present results clearly suggest a decline of the glutathione status, given by the redox index, in comparison to that found in Wistar rats fed cholesterol enriched diets [28]. However, the redox index was higher when

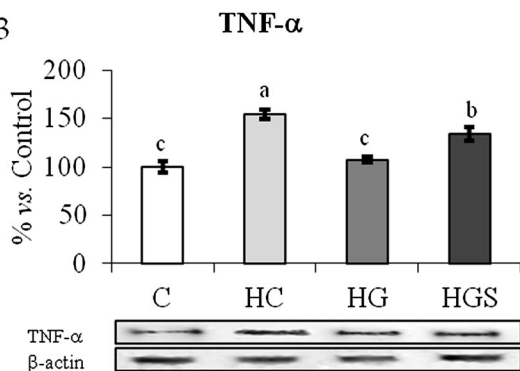
3.1



3.2



3.3



**Fig. 3** Effects of cholesterol enriched diets containing glucomannan-squid surimi added or not with spirulina on inflammation biomarkers, determined by western blotting. **3.1.** Effects on endothelial nitric oxide synthase (eNOS) level. **3.2.** Effects on inducible nitric oxide synthase (iNOS) level. **3.3.** Effects on tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) level. Bars (mean $\pm$ standard deviation of eight rats per group) bearing unlike superscript letters were significantly different (a>b>c, post hoc Bonferroni test or T2 of Tamhane,  $p < 0.05$ ). A representative band of each enzyme result is set together to a  $\beta$ -actin band, used as a loading control. C, fa/fa rats fed modified AIM-93 diet containing control-surimi; HC, fa/fa rats fed cholesterol-enriched modified AIM-93 diet containing control-surimi; HG, fa/fa rats fed cholesterol-enriched modified AIM-93 diet containing glucomannan-surimi; HGS, fa/fa rats fed cholesterol-enriched modified AIM-93 diet containing glucomannan-surimi plus spirulina

glucomannan was added to cholesterol enriched diet. Similar tendencies were observed in fa/fa rats fed non-added cholesterol diets containing squid surimis [33]. Fiber is known to act as an antioxidant [17]; thus suggesting the ability of glucomannan to scavenge free radicals.

Antioxidant enzyme activities, levels, and expressions

A comparison of these activities with previous results in Wistar rats shows that C and HC rats in the present study displayed similar values of SOD but four times higher Se-GPx values and six to eight times lower CAT values in rats fed with and without added cholesterol than in Wistar rats [4, 28], suggesting antioxidant status impairment in fa/fa rats, as previously discussed for GSH and GSSG.

The tremendous increase in MnSOD expression together with the 73 % increase in SOD activity, was not observed in a parallel study performed in non-cholesterol fed-fa/fa rats [33], suggesting that cholesterol feeding and/or cholesterolemia regulation fueled a process linked to  $O_2^-$  production and elimination in HC rats. The CYP7A1 enzyme implies  $O_2^-$  production [29], which would explain the observed increase in SOD. However, the SOD increase was coupled with an increase of total GPx (40 %, 15.26 vs. 19.14 mmol NADPH/min/mg protein) but not of CAT. In fact, the CAT/GPx activity ratio was reduced almost to the half in HC rats vs. C rats. We are far from understanding the mechanism involved. A decrease in CAT, together with the decrease in NADPH needed for a normal GSSG/GSH pathway, has been reported in diabetes [34]. Preliminary data suggest that HC rats presented higher insulinemia than C rats (18.57 vs. 10.81  $\mu$  UI/mL;  $p = 0.017$ ); that would explain, at least in part, data on the redox index, that in turn appears as a consequence of the tendency of GPx activity to increase (Tables 2 and 3, Fig. 1). Nonetheless, there would have to be some modulations in the expressions and levels of GPx and GR to avoid excess conversion of GSH to GSSG. In fact, the ratio of GPx/GR expressions was lower in HC vs. C animals (0.31 vs. 1, respectively).

HG vs. HC diet reduced SOD activity (Table 3) suggesting that less ROS ( $O_2^-$ ) is produced. In fact, the MnSOD expression was reduced considerably (Table 3). The increase in GPx expression appears to be linked to  $H_2O_2$  elimination. Here, again, no clear explanation is available, but the increase in CYP7A1

expression and the lower cholesterol levels of HG with respect to HC animals, could at least partially explain those results. The redox index improvement in HG vs. HC rats appears to be related to the decrease in GPx activity (Table 3). Preliminary data on these fa/fa rats suggest that insulinemia was lower (21 %) in HG than in HC positively affecting GSSG/GSH pathway as reported by Winiarska et al. [34].

The addition of spirulina to HG diet induced important changes. GPx and MnSOD expression decreased. Levels of GR and GPx also diminished, suggesting that the GSH ↔ GSSG pathway was less active. Spirulina contains bioactive compounds of recognized antioxidant activity [23], explaining the need for less antioxidant enzymes. It also seems possible that spirulina or its ingredients modulate the gene expression of these antioxidant enzymes. It can be speculated again that the relationship of the GSH/GSSG pathway and insulinemia, as HGS rats presented much lower insulinemia than HC rats (5.75 vs. 18.57  $\mu\text{U}/\text{mL}$ ;  $p < 0.001$ ).

#### Inflammation biomarkers

HC diet ingestion increased both eNOS and iNOS expressions keeping stable the inflammation index with respect to the C diet. The consumption of glucomannan in squid surimi did not modify thus parameters suggesting that this fermentable fiber did not affect NOS system in our experimental conditions. However, glucomannan plus spirulina largely decreased the iNOS expression. Spirulina contains C-phycoyanin that present anti-inflammatory effects [19]. The anti-inflammatory effects of glucomannan plus spirulina were also observed in fa/fa rats fed squid surimis in the frame of non-added cholesterol diets [33].

C rats presented very high plasma TNF- $\alpha$  values, approximately 3.4-times higher than reported by Plaza-Díaz et al. [25] in obese fa/fa rats, suggesting considerable inflammation caused by the high dietary consumption of saturated fat in this sensitive model. These data suggest that cholesterol feeding further increased the liver inflammation present in fa/fa rats, although there seems to have been a compensatory effect from activation of nitric oxide production. Mells et al. [22] reported increased TNF- $\alpha$  on a high-fat, high-cholesterol fed metabolic syndrome murine model, suggesting a clear relationship between cholesterol feeding and liver inflammation.

Plasma TNF- $\alpha$  values were augmented by cholesterol feeding in the glucomannan group. However, HGS diet significantly reduced plasma TNF- $\alpha$ , suggesting anti-inflammatory effects of spirulina. We are far from having an understanding of the mechanisms involved in differences between liver and plasma levels. Raju and Bird [26] proposed that increased levels of plasma TNF- $\alpha$  are in part due to its rapid release from other tissues to the vascular bed, including that released from the fatty liver. Thus, the increase in plasma could be due to higher liver TNF- $\alpha$  release induced by an inflammatory reaction. Glucomannan has been posited as a cause of jaundice and increased transaminase counts after the exclusion of other causes of liver injury such as alcohol consumption [10]. Spirulina contains omega-3 polyunsaturated fatty acids and C-phycoyanin. The former have anti-inflammatory effects [19], and the structure of the latter is very similar to biliverdin, a free radical scavenger and NADPH oxidase inhibitor [35], which would at least partially explain the present results.

Some potential limitations of the present paper are as follows: (a) only male growth fa/fa rats were used, (b) the study was performed with only one level of glucomannan or glucomannan plus spirulina added to squid surimi, and (c) only one dose of hypercholesterolemic agent was tested. Future studies should assess potential benefits of different levels of glucomannan/ and glucomannan plus spirulina-squid surimis and in an ampler age range of fa/fa rats and their possible extrapolation to obese and dyslipidemic humans.

#### Conclusions

Adding cholesterol to a high-energy, high-saturated-fat, squid-surimi diet increased cholesterolemia in fa/fa rats, leading to antioxidant status impairment. Glucomannan addition to a cholesterol-enriched squid-surimi diet produced strongly hypolipemic effects, improving antioxidant status but inducing proinflammatory effects. The inclusion of spirulina maintained the hypolipemic effects, enhanced the antioxidant benefits, and partially blocked the negative proinflammatory effects induced by glucomannan. More studies are needed to understand the effects induced by HG and HGS diets in the glutathione and NOS systems, and hence to ascertain the utility of including different doses of these ingredients in the diet to determine the optimal dosage for functional food design and to avoid potential liver damage.

**Acknowledgments** The present study was supported by the Spanish projects AGL-2011-29644-C02-02, AGL-2008-04892-C03-02 and Consolider-Ingenio 2010 project # CSD2007-00016. We gratefully acknowledge the foreign fellowship for graduate studies granted by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) of México to Laura González-Torres.

**Author's contributions** All authors have significantly contributed to the paper and agree with the present version of the manuscript. FJ S-M is the corresponding author and guarantor of the paper, M V-V has contributed to the study design, data discussion, and writing of the paper, L G-T and P L-G have contributed to the data acquisition and analysis and writing of the paper. S B, J B, and MJ G-M have contributed to data discussion and have made a critical review of the paper.

**Compliance with ethical standards** The present study was approved by the Spanish Science and Technology Advisory Committee (project AGL-2008-04892-C03-02) and by an ethics committee of the Universidad Complutense de Madrid (Spain). All experiments were performed in compliance with Directive 86/609/EEC of November 24, 1986 for the protection of scientific research animals.

**Conflict of interest** The authors declare that they have no competing interests.

## References

- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Method Enzymol* 105:121–126
- Aguirre L, Hijona E, Macarulla MT, Gracia A, Larrechi I, Bujanda L, Hijona L, Portillo MP (2013) Several statins increase body and liver fat accumulation in a model of metabolic syndrome. *J Physiol Pharmacol* 64:281–288
- Arai S, Osawa T, Ohigashi H, Yoshikawa M, Kaminogawa S, Watanabe M, Ogawa T, Okubo K, Watanabe S, Nishino H, Shinohara K, Esashi T, Hirahara T (2001) A mainstay of functional food science in Japan: history, present status, and future outlook. *Biosci Biotech Biochem* 65:1–13
- Bocanegra A, Benedí J, Sánchez-Muniz FJ (2006) Differential effects of kombu and nori seaweed dietary supplementation on liver glutathione status in normo- and hypercholesterolaemic growing rats. *Br J Nutr* 95:696–702
- Bondia-Pons I, Ryan L, Martínez JA (2012) Oxidative stress and inflammation interactions in human obesity. *J Physiol Biochem* 68:701–711
- Borderías A, Sánchez-Alonso I, Pérez-Mateos M (2005) New applications of fibres in foods: addition to fishery products. *Trends Food Sci Tech* 16:458–465
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Brockman D, Chen X, Gallaher D (2012) Hydroxypropyl methylcellulose, a viscous soluble fiber, reduces insulin resistance and decreases fatty liver in Zucker diabetic fatty rats. *Nutr Metab* 9:100
- Codoñer-Franch P, Valls-Bellés V, Arilla-Codoñer Á, Alonso-Iglesias E (2011) Oxidant mechanisms in childhood obesity: the link between inflammation and oxidative stress. *Transl Res* 158:369–384
- Fernández-Villaverde A, Benlloch S, Berenguer M, Miguel-Rayón J, Pina R, Berenguer J (2004) Acute hepatitis of cholestatic type possibly associated with the use of glucmannan (*Amorphophalus konjac*). *J Hepatol* 41:1061–1067
- González-Canga A, Fernández-Martínez N, Sahagún AM, García-Vieitez JJ, Díez-Liébana MJ, Calle-Pardo AP, Castro-Robles LJ, Sierra-Vega M (2004) Glucomanano: propiedades y aplicaciones terapéuticas. *Nutr Hosp* 19:45–50
- González-Torres L, Churrua I, Schultz Moreira AR, Bastida S, Benedí J, Portillo MP, Sánchez-Muniz FJ (2012) Effects of restructured pork containing Himanthalia elongata on adipose tissue lipogenic and lipolytic enzyme expression of normo- and hypercholesterolemic rats. *J Nutrigenet Nutrigenomics* 5: 158–167
- Hissin P, Hill R (1976) Fluorimetric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* 74:214–226
- Irizar A, Barnett CR, Flatt PR, Ioannides C (1995) Defective expression of cytochrome P450 proteins in the liver of the genetically obese Zucker rat. *Eur J Pharmacol* 293:385–393
- Kris-Etherton P, Harris W, Appel LJ (2003) Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:20–30
- Lawrence R, Burk R (1976) Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 71:952–958
- Lecumberri E, Mateos R, Ramos S, Alía M, Rupérez P, Goya L, Izquierdo-Pulido M, Bravo L (2006) Characterization of cocoa fiber and its effect on the antioxidant capacity of serum in rats. *Nutr Hosp* 21:622–628
- Livak K, Schmittgen T (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> method. *Methods* 25:402–408
- Lorente-Cebrián S, Costa AG, Navas-Carretero S, Zabala M, Laiglesia LM, Martínez JA, Moreno-Aliaga MJ (2015) An update on the role of omega-3 fatty acids on inflammatory and degenerative diseases. *J Physiol Biochem* 71:341–349
- Marklund SL (1985) Pyrogallol oxidation. In: Greenwald R (ed) *Handbook of methods for oxygen radical research*. CRC Press, Boca Raton, pp 243–247
- Martínez JA (2006) Mitochondrial oxidative stress and inflammation: an slalom to obesity and insulin resistance. *J Physiol Biochem* 62:303–306
- Mells JE, Fu PP, Kumar P, Smith T, Karpen SJ, Anania FA (2015) Saturated fat and cholesterol are critical to inducing murine metabolic syndrome with robust nonalcoholic steatohepatitis. *J Nutr Biochem* 26:285–292
- Nagaoka S, Shimizu K, Kaneko H, Shibayama F, Morikawa K, Kanamaru Y, Otsuka A, Hirahashi T, Kato T (2005) A novel protein C-phycocyanin plays a crucial role in the hypocholesterolemic action of *Spirulina platensis* concentrate in rats. *J Nutr* 135:2425–2430

24. Paglia D, Valentine W (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70:158–169
25. Plaza-Diaz J, Gomez-Llorente C, Abadia-Molina F, Saez-Lara MJ, Campaña-Martin L, Muñoz-Quezada S, Romero F, Gil A, Fontana L (2014) Effects of *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 and *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 on hepatic steatosis in Zucker rats. *PLoS One* 9:e98401
26. Raju J, Bird RP (2006) Alleviation of hepatic steatosis accompanied by modulation of plasma and liver TNF- $\alpha$  levels by *Trigonella foenum graecum* (fenugreek) seeds in Zucker obese (fa/fa) rats. *Int J Obes* 30:1298–1307
27. Sánchez-Muniz FJ, Bastida S (2008) Do not use the Friedewald formula to calculate LDL-cholesterol in hypercholesterolaemic rats. *Eur J Lipid Sci Technol* 110: 295–301
28. Schultz-Moreira A, Benedí J, González-Torres L, Olivero-David R, Bastida S, Sánchez-Reus MI, González-Muñoz MJ, Sánchez-Muniz FJ (2011) Effects of diet enriched with restructured meats, containing *Himantalia elongata*, on hypercholesterolaemic induction, CYP7A1 expression and antioxidant enzyme activity and expression in growing rats. *Food Chem* 129:1623–1630
29. Shinkyo R, Guengerich F (2011) Cytochrome P450 7A1 cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylation: individual reaction steps in the catalytic cycle and rate-limiting ferric iron reduction. *J Biol Chem* 286:4632–4643
30. Stokes KY, Cooper D, Taylor A, Granger DN (2002) Hypercholesterolemia promotes inflammation and microvascular dysfunction: role of nitric oxide and superoxide. *Free Rad Biol Med* 33:1026–1036
31. Stuehr D (1999) Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta* 1411:217–230
32. Tousoulis D, Kampoli A, Tentolouris C, Papageorgiou N, Stefanadis C (2012) The role of nitric oxide on endothelial function. *Curr Vasc Pharmacol* 10:4–18
33. Vázquez-Velasco M, González-Torres L, López-Gasco P, Bastida S, Benedí J, Sánchez-Reus MI, González-Muñoz MJ, Sánchez-Muniz FJ (2014) Liver oxidation and inflammation in fa/fa rats fed glucomannan/spirulina-surimi. *Food Chem* 159:215–221
34. Winiarska K, Focht D, Sierakowski B, Lewandowski K, Orłowska M, Usarek M (2014) NADPH oxidase inhibitor, apocynin, improves renal glutathione status in Zucker diabetic fatty rats: a comparison with melatonin. *Chem Biol Interact* 218:12–19
35. Zheng J, Inoguchi T, Sasaki S, Maeda Y, McCarty MF, Fujii M, Ikeda N, Kobayashi K, Sonoda N, Takayanagi R (2013) Phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis* protect against diabetic nephropathy by inhibiting oxidative stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 304:110–120

## 5.5. PUBLICACIÓN N°5

**Nutrición Hospitalaria** (2015) Fecha prevista publicación Dic 2015 (n06, vol. 32)

**ISI Web JCR (2014):** Índice de impacto: 1.040

64/77 en "Nutrition and Dietetics" (Q4)

### **Glucomannan and glucomannan *plus* spirulina-enriched squid-surimi added to high saturated diet affect glycemia, plasma and adipose leptin and adiponectin levels in 2 growing fa/fa rats**

Miguel Vázquez-Velasco, Laura González-Torres, María Teresa Méndez, Sara Bastida, Juana Benedí, M. José González-Muñoz and Francisco J. Sánchez-Muniz

**Resumen:** La diabetes tipo 2 es una enfermedad crónica de gran prevalencia. Entre otros factores dietéticos para su prevención y tratamiento, la fibra saciante (p. e. glucomanano de konjac) y la espirulina han experimentado un interés creciente. Estudios previos sugieren que el glucomanano en solitario o en conjunción con la espirulina, incorporados a surimi de calamar, como ingredientes funcionales, induce efectos hipolipemiantes y antioxidantes. En el presente estudio tratamos de determinar si dichos surimis de calamar mejoran la glucemia y la insulinemia en ratas Zucker fa/fa alimentadas con una dieta hipersaturada. Veinticuatro ratas en crecimiento, divididas en tres grupos, fueron alimentadas durante siete semanas con las siguientes dietas AIN-93M modificadas: dieta control con 30% de surimi de calamar (C), dieta glucomanano con 30% surimi de calamar enriquecido con 15% glucomanano (G) y dieta glucomanano/espirulina con 30% de surimi de calamar enriquecido con 15% glucomanano y espirulina 3 g/kg dieta (GS). Todos los grupos presentaron hiperglicemia e hiperinsulinemia, pero las dietas G y GS redujeron significativamente los niveles de glucosa (20%;  $p < 0.05$ ) con respecto a la dieta C, aunque no lograron modificar la insulinemia. Los animales alimentados con GS tuvieron valores de HOMA-D ( $p < 0.05$ ) más elevados respecto al grupo C, sugiriendo una disponibilidad de insulina aumentada. La leptina y la adiponectina plasmáticas disminuyeron por la dieta G y GS respecto a la C ( $p < 0.05$ ). La adiponectina en tejido adiposo aumentó significativamente en G y GS vs. C 69 (16-20 veces,  $p < 0.01$ ). La leptina en tejido adiposo fue mayor en GS vs. G ( $p < 0.05$ ). En resumen, ambas dietas con glucomanano fueron capaces de reducir la hiperglucemia e incrementar la

adiponectina en tejido adiposo, sugiriendo para este tejido efectos anti-hipertróficos y sensibilizantes a la insulina. La inclusión de espirulina incrementó la disponibilidad de insulina. Aunque los resultados son prometedores, la conveniencia del consumo de surimis con glucomanano como parte de una dieta normal requiere futuros estudios.

1 **Glucomannan and glucomannan *plus* spirulina-enriched squid-surimi added to high**  
2 **saturated diet affect glycemia, plasma and adipose leptin and adiponectin levels in**  
3 **growing *fafa* rats**

4

5 Miguel Vázquez-Velasco<sup>1+</sup>, Laura González-Torres<sup>1+</sup>, María Teresa Méndez<sup>2</sup>, Sara Bastida<sup>1</sup>,  
6 Juana Benedí<sup>3</sup>, M. José González-Muñoz<sup>4</sup> and Francisco J. Sánchez-Muniz<sup>1\*</sup>

7

8 <sup>1</sup>Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición) Facultad de Farmacia, Universidad  
9 Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain.

10 <sup>2</sup>Escuela de especialización de Análisis Clínicos. Facultad de Farmacia, Universidad  
11 Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain.

12 <sup>3</sup>Departamento de Farmacología Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid,  
13 28040 Madrid, Spain.

14 <sup>4</sup>Departamento de Nutrición, Bromatología y Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de  
15 Alcalá, Alcalá de Henares, 28871 Madrid, Spain.

16 <sup>+</sup>Both authors should be considered as first authors.

17

18 \*Corresponding author: Profesor Dr. Francisco J. Sánchez-Muniz. Departamento de Nutrición y  
19 Bromatología I (Nutrición), Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid. Plaza  
20 Ramón y Cajal s/n. 28040 Madrid, Spain. Phone: 34-91 3941828; FAX: 34-91 3941810; e-mail:

21 [frasan@ucm.es](mailto:frasan@ucm.es)

22

23 **Abbreviations:** HOMA, homeostatic model assessment; QUICKI, quantitative insulin sensitivity  
24 check index; T2DM, type 2 diabetes mellitus

25 **Abstract**

26 Type 2 diabetes is a very prevalent chronic disease. Among dietary factors for its prevention and  
27 treatment, interest has grown in satiating fibre (konjac glucomannan) and spirulina. Our previous  
28 studies suggest that glucomannan itself and/or in conjunction to spirulina displayed hypolipemic  
29 and antioxidant effects when incorporated to squid surimi as functional ingredients. The present  
30 study aims to determine whether glucomannan-enriched or glucomannan *plus* spirulina-enriched  
31 squid-surimi improve plasma glucose and insulin levels in Zucker *fa/fa* rats fed a high saturated  
32 fat diet. Twenty four growing rats, divided into three groups, were given modified AIN-93M diets  
33 for seven weeks: 30% squid-surimi control diet (C), 30% glucomannan-enriched squid-surimi diet  
34 (G) and 30% glucomannan *plus* spirulina-enriched squid-surimi diet (GS). All rats became  
35 hyperglycemics and hyperinsulinemics, but G and GS diets induced significantly lower glucose  
36 levels (20%;  $p < 0.05$ ) than the C diet but did not modify insulinemia with respect to C. GS  
37 animals showed higher HOMA-D ( $p < 0.05$ ) than C ones suggesting increased insulin availability.  
38 Plasma leptin and adiponectin decreased in G and GS vs. C group ( $p < 0.05$ ). Adipose  
39 adiponectin increased significantly in G and GS vs. C rats (16-20 times,  $p < 0.01$ ). Leptin in  
40 adipose tissue was higher in GS vs. G group ( $p < 0.05$ ). In conclusion, both glucomannan-diets  
41 were able to reduce hyperglycemia and increase adipose tissue adiponectin levels in *fa/fa* rats,  
42 suggesting an anti-hypertrophic and insulin-sensitizing adipokine effect in this tissue. Spirulina  
43 inclusion increased insulin availability. Although results are promising, the utility of consuming  
44 glucomannan surimis as part of usual diets demands future studies.

45

46 **Keywords:** Functional foods. Glucomannan. Obesity. Spirulina. Type 2 Diabetes Mellitus.

47

48 **Dietas hipersaturadas conteniendo surimi de calamar enriquecido con glucomanano y**  
49 **glucomanano/espirulina afectan a la glucemia y los niveles plasmáticos y adiposos de**  
50 **leptina y adiponectina en ratas fa/fa en crecimiento**

51

52 **Resumen**

53 La diabetes tipo 2 es una enfermedad crónica de gran prevalencia. Entre otros factores dietéticos  
54 para su prevención y tratamiento, la fibra saciante (p. e. glucomanano de konjac) y la espirulina  
55 han experimentado un interés creciente. Estudios previos sugieren que el glucomanano en  
56 solitario o en conjunción con la espirulina, incorporados a surimi de calamar, como ingredientes  
57 funcionales, induce efectos hipolipemiantes y antioxidantes. En el presente estudio tratamos de  
58 determinar si dichos surimis de calamar mejoran la glucemia y la insulinemia en ratas Zucker  
59 fa/fa alimentadas con una dieta hipersaturada. Veinticuatro ratas en crecimiento, divididas en tres  
60 grupos, fueron alimentadas durante siete semanas con las siguientes dietas AIN-93M  
61 modificadas: dieta control con 30% de surimi de calamar (C), dieta glucomanano con 30% surimi  
62 de calamar enriquecido con 15% glucomanano (G) y dieta glucomanano/espirulina con 30% de  
63 surimi de calamar enriquecido con 15% glucomanano y espirulina 3 g/kg dieta (GS). Todas los  
64 grupos presentaron hiperglicemia e hiperinsulinemia, pero las dietas G y GS redujeron  
65 significativamente los niveles de glucosa (20%;  $p < 0.05$ ) con respecto a la dieta C, aunque no  
66 lograron modificar la insulinemia. Los animales alimentados con GS tuvieron valores de HOMA-D  
67 ( $p < 0.05$ ) más elevados respecto al grupo C, sugiriendo una disponibilidad de insulina  
68 aumentada. La leptina y la adiponectina plasmáticas disminuyeron por la dieta G y GS respecto a  
69 la C ( $p < 0.05$ ). La adiponectina en tejido adiposo aumentó significativamente en G y GS vs. C  
70 (16-20 veces,  $p < 0.01$ ). La leptina en tejido adiposo fue mayor en GS vs. G ( $p < 0.05$ ). En  
71 resumen, ambas dietas con glucomanano fueron capaces de reducir la hiperglucemia e  
72 incrementar la adiponectina en tejido adiposo, sugiriendo para este tejido efectos anti-  
73 hipertróficos y sensibilizantes a la insulina. La inclusión de espirulina incrementó la disponibilidad  
74 de insulina. Aunque los resultados son prometedores, la conveniencia del consumo de surimis  
75 con glucomanano como parte de una dieta normal requiere futuros estudios.

76

77 **Keywords:** Alimentos funcionales. Diabetes Mellitus Tipo 2. Espirulina. Glucomanano. Obesidad.

78

## 79 Introduction

80

81 Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a chronic disease with an increasing prevalence all  
82 around the world.<sup>1</sup> Its treatment is mainly focused on hypoglycemic drugs, which cause high  
83 costs in health systems,<sup>2</sup> so new strategies in prevention such as healthy diets and exercise are  
84 strongly recommended.<sup>3</sup> Different foods such as dairy products or cereal fibre have been shown  
85 to be effective in regulating plasma glucose levels.<sup>4,5</sup> In addition, emerging technologies in food  
86 processing have made it possible to add ingredients with known health benefits and/or remove  
87 potentially undesirable components to obtain functional foods, and to modify any properties to  
88 improve consumer satisfaction.<sup>6,7</sup>

89 Glucomannan, a dietary fibre extracted from *Amorphophallus konjac* tubers, commonly  
90 consumed in Japan and Taiwan, forms highly viscous solutions when dissolved in water, due to  
91 its high water-holding capacity. This fibre is known to have satiating, laxative, and  
92 hypocholesterolemic properties but also to produce flatulence, abdominal pain, and esophageal  
93 or lower gastrointestinal obstruction at high doses.<sup>8</sup> In addition, our research team has found that  
94 its consumption improved plasma lipoprotein profile and antioxidant status in fa/fa rats.<sup>9-11</sup> Vuksan  
95 *et al.*<sup>12</sup> reported that diabetic patients consuming glucomannan improved their glycemic control  
96 and peripheral insulin sensitivity in T2DM glycemia/insulinemia status.

97 *Spirulina platensis* is a microalga rich in minerals and antioxidant compounds such as  
98 carotenoids and phycocyanin.<sup>13</sup> Data in rodents point to its antidiabetic activity,<sup>14,15</sup> and metabolic  
99 syndrome ameliorating<sup>16</sup> but as yet there is no clear scientific evidence in humans.<sup>17</sup>

100 According to Campo-Deaño *et al.*<sup>18</sup> squid-surimi is a healthy and safe food and may  
101 substitute for other conventional protein sources due to its low fat content and high protein  
102 quality. It has also been recommended as a suitable matrix to add different compounds in order  
103 to create potential functional foods. To the best of our knowledge, few studies have been  
104 performed to date investigating the effects of squid-surimi on T2DM<sup>6,19</sup> and none at all with regard  
105 to those of glucomannan- or glucomannan *plus* spirulina-enriched surimi.

106 Zucker fa/fa rat results from a spontaneous mutation on chromosome 5, which encodes  
107 leptin receptors, decreasing its functionality. In this animal, hyperphagia and obesity appear from  
108 the first week of age along with increased growth of subcutaneous fat depot, as happens at the  
109 early stage of human T2DM. Those rats show moderated hyperglycemia, insulin resistance, mild  
110 glucose intolerance, hyperlipidemia, hyperinsulinemia, and moderate hypertension,<sup>20</sup> making  
111 them a widely used model for diabetes, obesity and cardiovascular disease studies.<sup>21</sup>

112 Adiponectin is an anti-inflammatory and insulin-sensitizing adipokine. In sharp contrast to  
113 most adipokines, adiponectin expression and serum concentrations are not increased but  
114 reduced in a variety of obese and insulin-resistant states.<sup>22,23</sup> Leptin is a pro-inflammatory  
115 adipokine and both leptin-deficient and leptin-resistant obese rodents exhibit severe insulin  
116 resistance.<sup>21</sup> This condition is rapidly ameliorated by leptin administration.<sup>24</sup> To the best of our  
117 knowledge no information relating glucomannan consumption and adiponectin is available.

118 The hypothesis of the present study is that glucomannan-enriched and glucomannan *plus*  
119 spirulina-enriched squid-surimi act as functional foods by improving glycemia/insulinemia status  
120 and the leptin and adiponectin rate in plasma and adipose tissue. The present study, thus, aims  
121 to determine the effects of large amounts of glucomannan- or glucomannan *plus* spirulina-  
122 enriched squid-surimi in high saturated fat and hyperenergetic rat diets on a) fasting glucose,  
123 insulin levels, and on most commonly used indexes for insulin resistance (HOMA, QUICKI); and  
124 b) plasma and adipose tissue leptin and adiponectin levels and their respective ratio.

125

## 126 **Material and methods**

127

### 128 *Diet preparation and experimental design*

129 All experiments were performed in compliance with Directive 86/609/EEC of 24th  
130 November 1986 (modified by Directive 2003/65/CE of 22th July 2003) for the protection of  
131 scientific research animals. The present study was approved by the Spanish Science and  
132 Technology Advisory Committee (project AGL 2008-04892-C03-02 and Consolider Ingenio 2010,  
133 CSD 2007-00016) and by an ethics committee of the Universidad Complutense of Madrid  
134 (Spain). A total of twenty-four male growing Zucker *fa/fa* rats with an initial body weight of  
135 approximately 120 g were obtained from Harlan Laboratories Models (Harlan, SL, Barcelona,  
136 Spain). The animals were housed individually in metabolic cells in a temperature-controlled room  
137 ( $22.3 \pm 1.9$  °C) with a 12 h light-12 h dark cycle. The rats were fed commercial rat pellets  
138 (Panlab, Barcelona, Spain) during a one-week adaptation period to environmental conditions and  
139 then distributed into three groups of eight animals each, according to their average body weight.

140 Three experimental semi-synthetic diets were prepared in a room under appropriate  
141 environmental conditions (4 °C and low enlightenment) to reduce changes in their antioxidant  
142 properties blending AIM-93M diets and surimi. Vitamin and mineral contents of AIN-93M diets  
143 were designed to cover requirements for rats once the whole diet was prepared (**Table I**). Control  
144 diet (C) was composed of a homogeneous mixture of 70% rodent diet (AIN-93M #102634 purified  
145 rodent diet; Dyets, Inc., Bethlehem, PA, USA) and 30% freeze-dried restructured squid-surimi

146 (with 15% microcrystalline cellulose); glucomannan diet (G) consisted of a mixture of AIN-93M  
 147 #102635 feed (70 %) and freeze-dried, restructured glucomannan-enriched squid-surimi (30%,  
 148 15% of glucomannan into surimi) and glucomannan *plus* spirulina diet (GS) consisted of a mixture  
 149 of AIN-93M #102635 feed (70%) and freeze-dried, restructured glucomannan *plus* spirulina-  
 150 enriched squid-surimi (30%, 15% glucomannan into surimi and 3 g/kg diet of spirulina). Water  
 151 and food were provided ad libitum over the 7-week experimental period. At the end of the  
 152 experiment, in order to avoid inter-assay variations that could affect the comparison of data from  
 153 the different groups, fasting rats were taken, one at a time from each of the six groups,  
 154 anesthetized and euthanized by extracting blood from the descending aorta.

155

156 *Fasting glucose and insulin levels, insulin resistance indexes.*

157 Fasting plasma glucose levels were determined by the hexokinase/glucose-6-  
 158 phosphate dehydrogenase method, using a commercial kit according to the manufacturer's  
 159 instructions (kit HK/G6P-DH #10127825001, Roche diagnostics, Mannheim, Germany) in a Hitachi  
 160 737 Automatic Analyzer (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan). Insulin levels were determined in plasma  
 161 using a rat insulin ELISA kit #10-1250-01 from Mercodia AB (Uppsala, Sweden). Then, following  
 162 indexes were calculated using the *formulae*:

163

164  $HOMA-IR = \text{fasting insulin (mUI/L)} \times \text{fasting glucose (mmol/L)} / 22.5$

165  $HOMA-IS = 1 / HOMA-IR$

166  $HOMA-\%B = \text{fasting insulin (mUI/L)} \times 20 / (\text{fasting glucose (mmol/L)} - 3.5)$

167  $HOMA-D = HOMA-IS \times HOMA-\%B$

168  $QUICKI = 1 / [\log (\text{fasting insulin (mUI/L)}) + \log (\text{fasting glucose (mg/dL)})]$

169

170 *Leptin and adiponectin levels*

171 Leptin and adiponectin in plasma or white adipose tissue homogenates were determined  
 172 by the ELISA method using the mouse/rat leptin kit #K1006-1 and mouse/rat adiponectin kit  
 173 #K1002-1 of B-Bridge International, Inc. (Cupertino, California, USA).

174

175 *Statistical analyses*

176 Statistical analyses were performed using the SPSS version 19.0 statistical analysis  
 177 package (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). Results were expressed as means and standard  
 178 deviations. One way ANOVA followed by the Bonferroni test was used to assess the effect of the  
 179 diet. Results were accepted as significant when  $p < 0.05$ .

180

181 **Results and discussion**182 *Fasting glucose and insulin levels, insulin resistance indexes.*

183 **Table II** shows detailed information about weight gain, daily food intake, glucose, insulin  
184 and homeostatic assessment models (HOMA and QUICKI) for the study of insulin resistance or  
185 sensitivity.

186 As a characteristic of the Zucker fa/fa model, rats develop hyperphagia, obesity, glucose  
187 intolerance, hyperinsulinemia and insulin resistance at 11-12 weeks.<sup>21</sup> All these facts were found  
188 in C fa/fa rats. According to the standard cut-off points for diabetes, all G and GS rats presented  
189 severe hyperglycemia, although treatments reduced glycemia by 20% in comparison to the C rats  
190 ( $p < 0.05$ ). Vuksan *et al.*<sup>12</sup> described glycemia reduction in diabetic patients consuming konjak  
191 flour. The most probable mode of action of glucomannan appears to be *via* retention of  
192 carbohydrates absorption through its sequestration into the high viscous gel generated or  
193 slowing gastric emptying, and thus, its bioavailability in gut.<sup>25</sup>

194 As 6 mUI/L has been proposed as the cut-off point for hyperinsulinemia,<sup>26, 27</sup> we can  
195 assume that all C rats were insulin-resistant. In contrast to other studies, glucomannan or  
196 spirulina did not significantly decrease insulinemia.<sup>12,28,29</sup> Nonetheless, G and GS groups showed  
197 a non-significant tendency (17% and 13%, respectively; both  $p > 0.1$ ) to decrease insulin levels  
198 with respect to the C one. In fact, 25% of G rats and 12.5% of GS showed insulinemia  $\leq 6$  mUI/L;  
199 suggesting that some rats ameliorated their insulin by the consumption of G and GS diets.  
200 Several factors can be implicated in those differences: length of experiments, age and animals  
201 models, type of diet. It should be emphasized that, in our case, growing fa/fa rats were used and  
202 these animals consumed hyperenergetic and high-saturated fat diets for relatively long time.

203 HOMA-IR is an index related to insulin resistance.<sup>30</sup> As a consequence of the glucose  
204 and insulin levels observed, insulin resistance in Zucker fa/fa rats tended to ameliorate after  
205 feeding with G and GS diets with respect to the C one (29% and 24%, respectively; both ( $p >$   
206 0.1).

207 Insulin sensitivity or  $\beta$ -cell function, according to HOMA-IS, QUICKI and HOMA-%B  
208 indexes did not change by experimental treatment; however, HOMA-D, increased significantly ( $p$   
209  $< 0.05$ ) in GS vs. C rats. No data on rat HOMA-D was available on references, making the  
210 discussion of the result difficult; however, taking into account the meaning of the HOMA-D, an  
211 increased bioavailability of insulin in the added spirulina diet can be suggested.

212

213 *Total fat, leptin and adiponectin levels.*

214 **Table III** shows adipose tissue weight, and plasma and adipose tissue leptin and  
215 adiponectin levels. The total amount of fat found in our experimental animals is consistent with  
216 other studies in Zucker diabetic rats.<sup>31, 32</sup> Although there were non-significant changes among  
217 groups for the total fat amount and the fat index (gonadal + perirenal fat/body weight), major  
218 changes with regard to leptin and adiponectin levels were observed.

219 Data on both plasma adipocytokines suggest that C rats were obese, as low plasma  
220 levels of adiponectin and high on leptin has been found in obesity.<sup>33</sup> A crosstalk between fat cells  
221 and adipose tissue macrophages seems to be a key driving force for the initiation and progress of  
222 inflammation in obesity. Some of the macrophages are “normal” residents of the adipose tissue  
223 but others are recruited presumably to serve originally as scavengers of dead macrophages and  
224 other “toxic lipid remnants”.<sup>34</sup> Adipose hypertrophy leads to macrophage recruitment and elevated  
225 release of free fatty acids, worsening insulin resistance in mature adipocyte.<sup>35</sup>

226 The increment of adiponectin in adipose tissue by G and GS diets (16 and 20-fold,  
227 respectively, both  $p < 0.01$ ) is not easy to explain. However, as adiponectin has been found to  
228 exert anti-inflammatory properties,<sup>36</sup> it can be speculated that its increase could be linked to a  
229 decrease of adipocyte hypertrophy and, in turn, to inflammation of this tissue, even conditioning  
230 an adiponectin retention in adipose tissue, reducing plasmatic levels. Future studies should be  
231 addressed to understand the adiponectin balance between plasma and adipose tissue.

232 In lean Zucker rats, leptin circulated at approximately 4ng/ml plasma whereas levels were  
233 elevated more than 6-fold in fa/fa rats.<sup>37</sup> Plasma leptin, which is known to be directly related to  
234 adipose tissue mass,<sup>38</sup> was lower (both  $p < 0.05$ ) in G and GS (both around 40%) rats vs. C ones.  
235 As leptin has been found to exert negative effects on health,<sup>39,40</sup> the decrease found in plasma  
236 following glucomannan-surimi diets should be interpreted as relevant. Leptin inside of adipose  
237 tissue was higher ( $p < 0.05$ ) in GS vs. G. These differences seem related to the total fat content  
238 or fat index found in G vs. GS rats; however, other interpretations can be suggested.<sup>41</sup>

239 While the plasma adiponectin/leptin ratio did not change by the G and GS diets, in  
240 adipose tissue this ratio was increased at least 16-fold in G and GS rats vs. their C counterparts,  
241 reinforcing again the role of these functional ingredients on the adipose tissue hormone levels  
242 and its hypertrophy.

243

## 244 **Conclusions**

245 In summary, the inclusion of glucomannan and/or glucomannan *plus* spirulina surimis in a  
246 high saturated hyperenergetic diet did not affect weight increase but improved glycemia. Results  
247 in adiponectin and the adiponectin/leptin ratio in adipose tissue are promising and suggest an

248 anti-hypertrophic and insulin-sensitizing effect in this tissue. However, more studies are needed  
249 to understand the results obtained and to ascertain the utility of consuming glucomannan-surimis  
250 as part of regular diets in individuals with obesity and/or metabolic syndrome.

251

## 252 **Aknowledgements**

253 The present study was supported by the Spanish projects AGL-2008-04892-C03-02,  
254 AGL-2011-29644-C02-02 and AGL2014-53207-C2-2-R. We gratefully acknowledge the foreign  
255 fellowship for graduate studies granted by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología  
256 (CONACYT) of México to Laura González-Torres. All authors have significantly contributed to the  
257 paper and agree with the present version of the manuscript. FJ S-M is the corresponding author  
258 and Guarantor of the paper and has contributed to the study design, data discussion, and writing  
259 of the paper. M V-V and L G-T have contributed to the data acquisition and analysis and writing of  
260 the paper. S B, J B and MJ G-M have contributed to data discussion and have made a critical  
261 review of the paper. The present study was approved by the Spanish Science and Technology  
262 Advisory Committee (project AGL-2008-04892-C03-02) and by an ethics committee of the  
263 Universidad Complutense de Madrid (Spain). All experiments were performed in compliance with  
264 Directive 86/609/EEC of November 24, 1986 for the protection of scientific research animals.

265

266 The authors declare that there are no conflicts of interest.

## References

1. Llopiz PQ, García-Galbis MR. Control glicémico a través del ejercicio en pacientes con diabetes mellitus tipo 2: Revisión sistemática. *Nutr Hosp* 2015; 31: 1465-1472.
2. Zhang P, Zhang X, Brown J, Vistisen D, Sicree R, Shaw J, Nichols G. Global healthcare expenditure on diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract* 2010; 87: 293-301.
3. Winett RA, Davy BM, Marinik E, Savla J, Winett SG, Phillips SM, Lutes LD. Developing a new treatment paradigm for disease prevention and healthy aging. *Transl Behav Med* 2014; 4: 117-123.
4. Hirahatake KM, Slavin JL, Maki KC, Adams SH. Associations between dairy foods, diabetes, and metabolic health: potential mechanisms and future directions. *Metabolism* 2014; 63: 618-627.
5. Cho SS, Qi L, Fahey GC, Klurfeld DM. Consumption of cereal fiber, mixtures of whole grains and bran, and whole grains and risk reduction in type 2 diabetes, obesity, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 2013; 98: 594-619.
6. Borderías AJ, Sánchez-Alonso I, Pérez-Mateos M. New applications of fibres in foods: addition to fishery products. *Trends Food Sci Tech* 2005; 16: 458-465.
7. Moreno H, Herranz B, Pérez-Mateos M, Isabel Sánchez-Alonso, Borderías AJ. New Alternatives in Seafood Restructured Products. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2014. DOI: 10.1080/10408398.2012.719942.
8. Gonzalez-Canga A, Fernandez-Martinez N, Sahagun AM, Garcia-Vieitez JJ, Diez-Liebana MJ, Calle-Pardo AP, Castro-Robles LJ, Sierra-Vega M. Glucomanano: propiedades y aplicaciones terapéuticas. *Nutr Hosp* 2004; 19: 45-50.
9. Vázquez-Velasco M, González-Torres L, Olivero-David R, Bastida S, Benedí J, Sánchez-Reus M, González-Muñoz M, Sánchez-Muniz FJ. Lipoproteinemia and arylesterase activity in Zucker Fa/Fa rats fed glucomannan/spirulina-enriched squid-surimi. *Eur J Lipid Sci Tech* 2013; 115: 1274-1283.
10. Vazquez-Velasco M, Gonzalez-Torres L, Lopez-Gasco P, Bastida S, Benedi J, Sanchez-Reus MI, Gonzalez-Munoz MJ, Sanchez-Muniz FJ. Liver oxidation and inflammation in Fa/Fa rats fed glucomannan/spirulina-surimi. *Food Chem* 2014; 159: 215-221.
11. Vázquez-Velasco M, González-Torres L, López-Gasco P, Bastida S, Benedí J, González-Muñoz MJ, Sánchez-Muniz FJ. Effects of glucomannan/spirulina-surimi on liver oxidation and inflammation in Zucker rats fed atherogenic diets. *J Phys Biochem* 2015. DOI 10.1007/s13105-015-0425-9
12. Vuksan V, Jenkins DJ, Spadafora P, Sievenpiper JL, Owen R, Vidgen E, Brighenti F, Josse R, Leiter LA, Bruce-Thompson C. Konjac-mannan (glucomannan) improves glycemia and other associated risk factors for coronary heart disease in type 2 diabetes. A randomized controlled metabolic trial. *Diabetes Care* 1999; 22: 913-919.
13. Nagaoka S, Shimizu K, Kaneko H, Shibayama F, Morikawa K, Kanamaru Y, Otsuka A, Hirahashi T, Kato T. A novel protein C-phycoerythrin plays a crucial role in the hypocholesterolemic action of Spirulina platensis concentrate in rats. *J Nutr* 2005; 135: 2425-2430.
14. Joventino IP, Alves HG, Neves LC, Pinheiro-Joventino F, Leal LK, Neves SA, Ferreira FV, Brito GA, Viana GB. The microalga Spirulina platensis presents anti-inflammatory action as well as hypoglycemic and hypolipidemic properties in diabetic rats. *J Complement Integr Med* 2012; 9: 1553-3840.
15. Ou Y, Lin L, Yang X, Pan Q, Cheng X. Antidiabetic potential of phycoerythrin: effects on KKAy mice. *Pharm Biol* 2013; 51: 539-544.
16. Fujimoto M, Tsuneyama K, Fujimoto T, Selmi C, Gershwin ME, Shimada Y. Spirulina improves non-alcoholic steatohepatitis, visceral fat macrophage aggregation, and serum leptin in a mouse model of metabolic syndrome. *Dig Liver Dis* 2012; 44: 767-774.

17. Lee EH, Park JE, Choi YJ, Huh KB, Kim WY. A randomized study to establish the effects of spirulina in type 2 diabetes mellitus patients. *Nutr Res Pract* 2008; 2: 295-300.
18. Campo-Deaño L, Tovar CA, Pombo MJ, Solas MT, Borderías AJ. Rheological study of giant squid surimi (*Dosidicus gigas*) made by two methods with different cryoprotectants added. *J Food Eng* 2009; 94: 26-33.
19. Borderías A, Perez Mateos M. Restructured fish products. *Alimentaria (España)* 1996. 269: 53-62.
20. Durham HA, Truett GE. Development of insulin resistance and hyperphagia in Zucker fatty rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006; 290: R652-658.
21. Aleixandre de Artinano A, Miguel Castro M. Experimental rat models to study the metabolic syndrome. *Br J Nutr* 2009; 102: 1246-1253.
22. Guenther M, James R, Marks J, Zhao S, Szabo A, Kidambi S. Adiposity distribution influences circulating adiponectin levels. *Transl Res* 2014; 164: 270-277.
23. Lim S, Quon MJ, Koh KK. Modulation of adiponectin as a potential therapeutic strategy. *Atherosclerosis* 2014; 233: 721-728.
24. Paz-Filho G, Mastronardi CA, Licinio J. Leptin treatment: facts and expectations. *Metabolism* 2015; 64:146-156.
25. Sanchez-Muniz FJ. Dietary fibre and cardiovascular health. *Nutr Hosp* 2012; 27: 31-45.
26. Gesteiro E, Bastida S, Sanchez-Muniz FJ. Effects of maternal glucose tolerance, pregnancy diet quality and neonatal insulinemia upon insulin resistance/sensitivity biomarkers in normoweight neonates. *Nutr Hosp* 2011; 26: 1447-1455.
27. Gesteiro E, Bastida S, Sanchez-Muniz FJ. Insulin resistance markers in term, normoweight neonates. The Merida cohort. *Eur J Pediatr* 2009; 168: 281-288.
28. Parikh P, Mani U, Iyer U. Role of Spirulina in the Control of Glycemia and Lipidemia in Type 2 Diabetes Mellitus. *J Med Food* 2001; 4: 193-199.
29. Muthuraman P, Senthilkumar R, Srikumar K. Alterations in beta-islets of Langerhans in alloxan-induced diabetic rats by marine *Spirulina platensis*. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2009; 24: 1253-1256.
30. Wallace TM, Levy JC, Matthews DR. Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care* 2004; 27: 1487-1495.
31. Beaudoin MS, Snook LA, Arkell AM, Simpson JA, Holloway GP, Wright DC. Resveratrol supplementation improves white adipose tissue function in a depot-specific manner in Zucker diabetic fatty rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2013; 305: R542-551.
32. Candiracci M, Justo ML, Castano A, Rodriguez-Rodriguez R, Herrera MD. Rice bran enzymatic extract-supplemented diets modulate adipose tissue inflammation markers in Zucker rats. *Nutrition* 2014; 30: 466-472.
33. Martínez-Sesmero M. Riesgo cardiovascular en el estudio Área de Toledo. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. 2012.
34. Kim F, Pham M, Luttrell I, Bannerman DD, Tupper J, Thaler J, Hawn TR, Raines EW, Schwartz MW. Toll-like receptor-4 mediates vascular inflammation and insulin resistance in diet-induced obesity. *Circ Res* 2007; 100: 1589-1596.
35. Serrano-Ríos M, Gutiérrez-Fuentes JA. In Serrano-Ríos M, Ordovás JM, Gutiérrez-Fuentes JA, eds. Obesity. Chapter 13. Obesity and Type 2 Diabetes Mellitus. The reciprocal impact. Elsevier España; pp 215-232, Barcelona, 2011.
36. Panis C, Herrera AC, Aranome AM, Victorino VJ, Michelletti PL, Morimoto HK, Cecchini AL, Simao AN, Cecchini R. Clinical insights from adiponectin analysis in breast cancer patients reveal its anti-inflammatory properties in non-obese women. *Mol Cell Endocrinol* 2014; 382: 190-196.

37. Hardie LJ, Rayner DV, Holmes S, Trayhurn P. Circulating leptin levels are modulated by fasting, cold exposure and insulin administration in lean but not Zucker (fa/fa) rats as measured by ELISA. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 223: 660-665.
38. Considine RV, Caro JF. Leptin in humans: current progress and future directions. *Clin Chem* 1996; 42: 843-844.
39. Türkoğlu A, Büyük A, Tanrıverdi MH, Gündüz E, Dusak A, Kaplan İ, Gümüş M. The potential role of BMI, plasma leptin, nesfatin-1 and ghrelin levels in the early detection of pancreatic necrosis and severe acute pancreatitis: a prospective cohort study. *Int J Surg* 2014; 12:1310-1313.
40. Wędrychowicz A, Zając A, Pilecki M, Kościelniak B, Tomasiak PJ. Peptides from adipose tissue in mental disorders. *World J Psychiatry* 2014; 4:103-111.
41. Fried SK, Ricci MR, Russell CD, Laferrere B. Regulation of leptin production in humans. *J Nutr* 2000; 130: 3127s-3131s.

**Table I**  
*Composition (g/kg) of the experimental diets\*.*

	C diet	G diet	GS diet
Cornstarch	213.49	254.66	254.66
Microcrystalline cellulose	49.41	8.23	8.23
Squid-surimi	300.00	255.00	255.00
Glucomannan	0.00	45.00	45.00
Spirulina	0.00	0.00	3.00
Energy content (kJ/kg diet)	13332.84	14175.78	14230.21

C: AIN-93M (70%) + Control squid-surimi (30%); G: AIN-93M (70%) + Glucomannan enriched squid-surimi (30%); GS: AIN-93M (70%) + Glucomannan *plus* spirulina enriched squid-surimi (30%). \*Other ingredients (g/kg diet): casein, 105.0; palm olein, 115.29; dyetrose (carbohydrate composition: monosaccharides, 10; disaccharides, 40; trisaccharides, 50; tetrasaccharides and higher, 900), 108.5; sucrose, 70.0; AIN-93M mineral mix, 29.75; AIN-93VX vitamin mixture, 12.16; choline bitartrate, 3.06; L-cystine, 1.26; t-butylhydroquinone, 0.02. Mineral mix #210050 24.5; Vitamin mix #310025, 162.07. AIN-93M mineral mix (g/kg): calcium carbonate, 357.00; potassium phosphate monobasic, 250.00; potassium citrate.H<sub>2</sub>O, 28.00; sodium chloride, 74.00; potassium sulfate, 46.60; magnesium oxide, 24.00; ferric citrate U.S.P., 6.06; zinc carbonate, 1.65; manganous carbonate, 0.63; cupric carbonate, 0.30; potassium iodate, 0.01; sodium selenate, 0.01025; ammonium paramolybdate.4H<sub>2</sub>O, 0.00795; sodium metasilicate.9H<sub>2</sub>O, 1.45; chromium potassium sulfate.12H<sub>2</sub>O, 0.275; lithium chloride, 0.0174; boric acid, 0.0815; sodium fluoride, 0.0635; nickel carbonate, 0.0318; ammonium vanadate, 0.0066; finely powdered sucrose, 209.806. AIN-93VX vitamin mixture (g/kg): niacin, 3.00; calcium pantothenate, 1.60; pyridoxine HCl, 0.70; thiamine HCl, 0.60; riboflavin, 0.60; folic acid, 0.20; biotin, 0.02; vitamin E acetate (500 IU/g), 15.00; vitamin B12 (0.1 %), 2.50; vitamin A palmitate, (150000 µg/g), 0.80; vitamin D<sub>3</sub> (10000 µg/g), 0.25; vitamin K<sub>1</sub>-dextrose mix (10 mg/g), 7.50; sucrose, 967.23.

**Table II***Fasting glucose and insulin levels, and HOMA and QUICKI indexes- (n=8 per group).*

	Control		Glucomannan		Glucomannan + Spirulina		ANOVA
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	
Intake (g/day)	34.18	2.55	33.55	2.80	34.22	2.35	0.135
Weight gain (g)	217.08 a	14.77	195.16 b	26.63	193.26 b	15.97	< 0.001
Fasting glucose (mg/dL)	331.50 a	29.20	284.38 b	32.44	278.25 b	47.52	0.018
Insulin mUI/L	10.82	2.04	8.96	2.99	9.33	2.12	0.23
HOMA-IR	8.73	1.64	6.23	2.36	6.61	1.95	0.13
HOMA-IS	0.12	0.03	0.16	0.06	0.15	0.04	0.25
HOMA-%B	14.93	3.63	15.04	5.20	15.59	10.07	0.63
HOMA-D	1.73 a	0.42	2.25 ab	0.75	2.43 b	0.68	0.034
QUICKI	0.28	0.01	0.29	0.01	0.29	0.01	0.41

a, b: Mean values within a row with unlike superscript letters were significantly different ( $p < 0.05$ ).

**Table III***Total fat, leptin and adiponectin levels. (n=8 per group).*

	Control		Glucosamin		Glucosamin + Spirulina		ANOVA
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	
Total fat* (g)	21.00	2.12	18.41	3.17	20.61	3.29	0.184
Fat index (Total fat* / Final weight *100)	6.50	0.51	6.18	0.61	6.56	0.84	0.484
Plasma leptin (ng/mL)	10.88 a	0.69	7.76 b	1.58	7.84 b	1.72	0.002
Adipose tissue leptin (ng/mg protein)	7.05 ab	0.84	6.11 a	1.25	8.66 b	1.71	0.063
Plasma adiponectin (mg/mL)	8.63 a	0,29	5.63 b	0.57	6.81 b	0.98	0.003
Adipose tissue adiponectin (ng/mg protein)	18.6 a	14.5	312.8 b	142.5	386.3 b	145.9	0.009
Plasma adiponectin/leptin ratio	796.3	59.2	725.4	85.5	812.9	174.6	0.546
Adipose tissue adiponectin/leptin ratio	2.76 a	2.25	54.00 b	40.70	44.89 b	17.43	0.043

a, b: Mean values within a row with unlike superscript letters were significantly different ( $p < 0.05$ ). \*Gonadal *plus* perirenal fats.



## 6. DISCUSIÓN

---





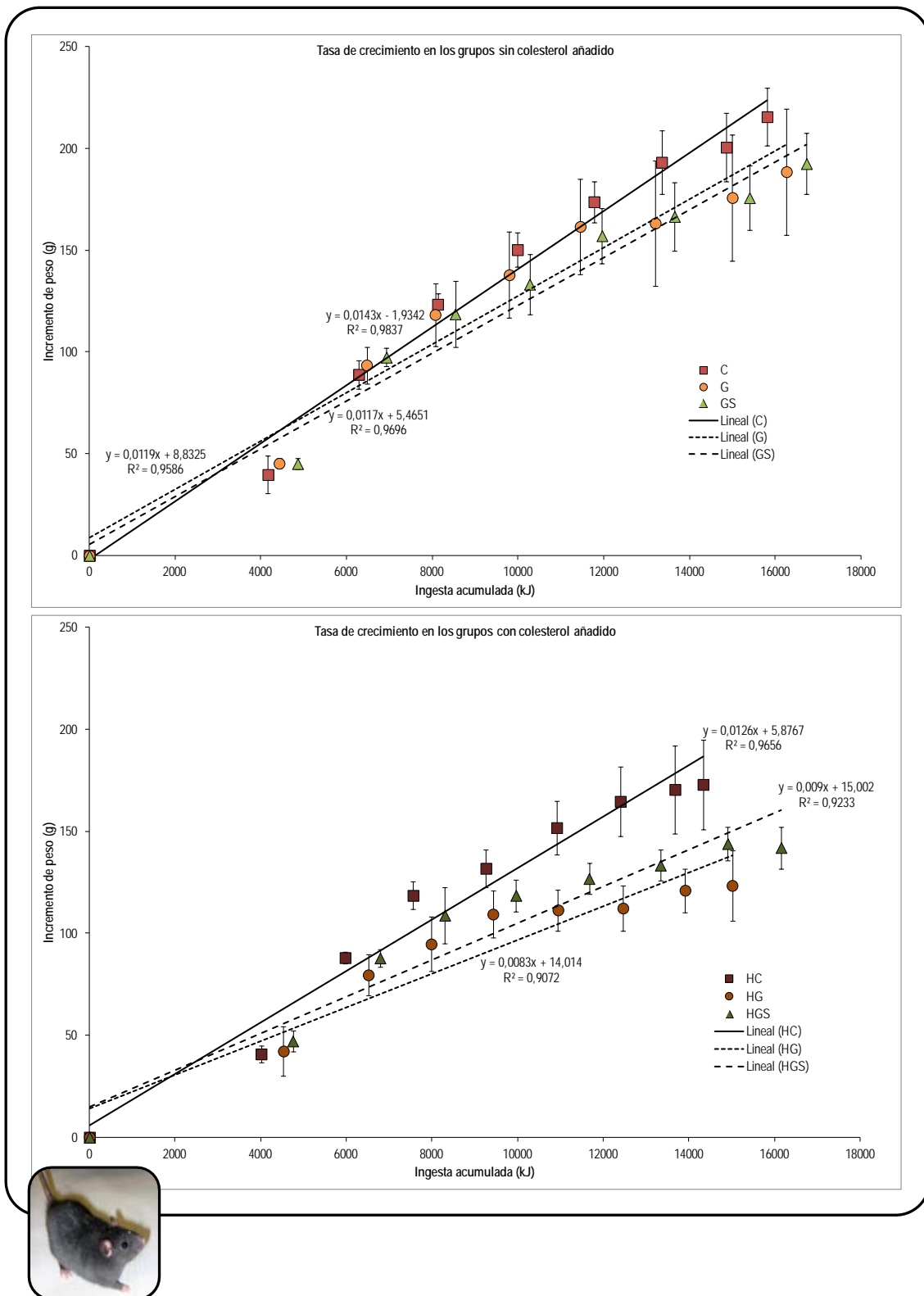
## **6.1. OBJETIVO 1: CUANTIFICAR LOS EFECTOS SOBRE LA INGESTA, GANANCIA DE PESO Y TASAS DE CRECIMIENTO ENTRE LAS CINCO Y LAS TRECE SEMANAS DE VIDA.**

Las ratas Zucker fa/fa control utilizadas desarrollaron hiperfagia como consecuencia de la mutación que poseen en el receptor de leptina. Ese cambio condiciona un desequilibrio peptidérgico con predominio de los péptidos orexígenos respecto a los anorexígenos (Aleixandre De Artiñano y Miguel Castro, 2009). De hecho, el consumo medio de dieta control fue de 24 g/día, un 30% más elevado que el observado por Olivero-David y cols. (2011) en ratas Wistar de 15 semanas de edad y también más elevado que el señalado por Bocanegra y cols. (2008) en ratas Wistar consumiendo dietas con un contenido energético mucho menor. Las dietas con glucomanano o glucomanano y espirulina fueron ingeridas de forma equivalente a las de la dieta control, sin ningún efecto saciante debido a la presencia de esta fibra viscosa. Debe recordarse que aunque era esperable que se produjera incremento del volumen y ralentizamiento del vaciamiento gástrico en estas ratas (Gonzalez Canga y cols., 2004), la mutación en los receptores de leptina (Aleixandre De Artiñano y Miguel Castro, 2009) evitaría que el teórico incremento de leptina gástrica inducido por el glucomanano fuera inoperante en la regulación de la ingesta. También podría especularse que la alteración de los péptidos orexígenos, incluyendo incremento de ghrelina (Aleixandre De Artiñano y Miguel Castro, 2009), compensaría el flujo de señales de saciedad promovido por el aumento de volumen gástrico. Al igual que en otros estudios, las dietas hipersaturadas indujeron obesidad y ganancia considerable de peso en las ratas Zucker fa/fa (Tovar y cols., 2011). El índice de conversión de las dietas ensayadas fue menor que en otros estudios en ratas Wistar alimentadas con caseína (Olivero-David y cols., 2011). De forma interesante, el glucomanano de la dieta no redujo la ingesta, como cabría esperar dadas sus propiedades saciantes, ya que los animales consumieron más cantidad de dieta y, por lo tanto, de energía. Es necesario señalar que las dietas eran prácticamente isocalóricas, siendo la máxima diferencia entre ellas de 1,3 kJ/g. Sin embargo, las dietas que contienen glucomanano presentaron índices de crecimiento y de conversión de la dieta; y ganancias de peso menores que los controles, sugiriendo, al menos en nuestras condiciones experimentales, que la fibra de konjac incluida en el surimi de calamar bloqueó parcialmente la absorción o la utilización de los macronutrientes de la dieta. Nuestros resultados coinciden con la evidencia de que la fibra contribuye a reducir la disponibilidad de energía de la dieta (Lairon y Defoort, 2011; Sanchez-Muniz, 2012). A

pesar de que a la espirulina se le han atribuido algunos efectos reductores sobre el peso corporal (Moura y cols., 2011), en este estudio no se observó efecto alguno en ese sentido.

Coincidiendo con los hallazgos de Beynen y cols. (1984), la adición de un agente hipercolesterolemizante a la dieta redujo el índice de crecimiento en las ratas. Este efecto no puede atribuirse al contenido energético de las diferentes dietas, ya que eran esencialmente isocalóricas. Mahfouz y Kummerow (2000) describieron reducciones de peso en conejos, pero no en ratas alimentadas con altas dosis de colesterol. Bocanegra y cols. (2008) encontraron que la disponibilidad de algunos minerales como el Cinc fue menor en ratas con dietas hipercolesterolémicas. El papel central del Cinc en el crecimiento podría explicar, al menos parcialmente, el menor crecimiento de las ratas que ingirieron el agente hipercolesterolemizante (HC, HG y HGS) en comparación con las dietas normocolesterolémicas con los mismos componentes (C, G y GS, respectivamente). La adición de colesterol no modificó los efectos de las dietas con fibra de konjac, ya que las dietas HG y HGS presentaron índices de crecimiento y ganancias de peso menores que sus controles HC.

Las curvas de crecimiento de las diferentes dietas se encuentran representadas gráficamente en la **figura 6.1**.



**Figura 6.1.** Tasas de crecimiento en los diferentes grupos experimentales. C, surimi control; G, surimi con 15% glucomanano; GS, surimi con 15% glucomanano y 3 g/kg dieta de espirulina; HC, surimi control con agente hipercolesterolemiantes; HG, surimi con 15% glucomanano y con agente hipercolesterolemiantes; HGS, surimi con 15% glucomanano, 3 g/kg dieta de espirulina y con agente hipercolesterolemiantes;  $Y =$  (ordenada en el origen) + (pendiente de la recta)  $\times X$ , donde  $Y$  es el incremento de peso y  $X$  es la ingesta.

## **6.2. OBJETIVO 2: ANALIZAR SU IMPACTO SOBRE EL TAMAÑO Y LA ESTRUCTURA DE LOS ÓRGANOS INTERNOS DE DICHS ANIMALES, CON ESPECIAL MENCIÓN DEL HÍGADO Y CORAZÓN.**

La determinación de los cambios en el peso del hígado y el índice hepatosomático han sido usados frecuentemente para evaluar cambios potenciales en el tamaño del hígado y la presencia de esteatosis en este órgano (Chang y cols., 2015). La dieta control presentó valores similares a los de ratas Zucker obesas alimentadas con dietas que contenían cacao (Cordero-Herrera y cols., 2015). La adición de glucomanano redujo el peso hepático hasta los niveles de las ratas Zucker delgadas referidas en ese mismo estudio. De acuerdo con Argiles (1989), el hígado de las ratas Zucker fa/fa tiene incrementada la lipogénesis, hecho potenciado por un gran flujo glucolítico que lleva a la formación de un potencial reductor en forma de NADPH, y por una reducción importante de la oxidación de ácidos grasos. Además las concentraciones plasmáticas de glicerol y ácidos grasos no esterificados son altas, lo que representa un flujo incrementado de estos sustratos metabólicos al hígado para la síntesis de TG, promoviendo la esteatosis hepática.

Gomez-Zorita y cols. (2012) proponen que el resveratrol protege contra el desarrollo del hígado graso reduciendo el estrés oxidativo y el contenido de grasa en el hígado. Como las dietas con glucomanano o glucomanano y espirulina han demostrado propiedades antioxidantes y reguladoras de la lipidemia (Vázquez-Velasco y cols., 2015a; Vázquez-Velasco y cols., 2014; Vázquez-Velasco y cols., 2013), nuestros resultados sugieren que estas dietas podrían reducir la lipogénesis hepática.

Aunque el consumo de dietas con agente hipercolesterolemizante (HC vs. C) duplicó el tamaño del hígado, sugiriendo la inducción de hepatoesteatosis y/o un contenido de glucógeno incrementado (Leonard y cols., 2005), la adición de glucomanano a estas dietas (HG y HGS) redujo drásticamente la hepatomegalia, lo que apunta a efectos potencialmente beneficiosos de esta fibra en la prevención del hígado graso. La espirulina no produjo ningún efecto extra sobre este parámetro.

El peso del corazón y el índice cardiosomático inducido por las dietas experimentales fueron similares a los observados por Noratto y cols. (2015). Estos valores no variaron entre los diferentes grupos, lo que lleva a pensar que el glucomanano no presenta ningún efecto a nivel cardíaco. Sin embargo, el agente hipercolesterolemizante tiende de manera no significativa a incrementar el índice cardiosomático. A día de hoy no existe una explicación clara para este fenómeno,

aunque podrían estar implicadas algunas alteraciones morfológicas del corazón, aspecto al que nos referiremos más adelante en este apartado.

Los datos sobre el peso y peso relativo somático de los diferentes órganos estudiados se detallan en la **tabla 6.1**.

En la **figura 6.2** se detallan los valores de los diferentes marcadores de daño hepático estudiados

Los resultados de ALT, AST y ALP concordaron con los observados por Gomez-Zorita y cols. (2012) en ratas fa/fa, pero resultaron mayores que los encontrados en ratas Sprague-Dawley que padecían esteatohepatitis no alcohólica. La rata Zucker obesa es según Kucera y Cervinkova (2014) un modelo de síndrome metabólico que desarrolla esteatohepatitis no alcohólica. Kotronen y cols. (2009) sugieren que los valores bajos de AST/ALT son predictores de esta enfermedad, en la que los valores de ALT son más elevados que los de AST. El valor de este cociente en el grupo C fue aproximadamente un tercio del que presentaron ratas Wistar alimentadas con sardinas fritas (Sanchez-Muniz y cols., 1995) o con reestructurados cárnicos enriquecidos con algas (Schultz Moreira y cols., 2013), sugiriendo claramente la propensión de las ratas fa/fa a desarrollar esteatohepatitis no alcohólica. Se encontraron correlaciones negativas y altamente significativas entre este cociente y los pesos del hígado o el índice hepatosomático ( $r=-0,650$ ;  $p<0,001$  y  $r=-0,571$ ;  $p=0,004$ , respectivamente). El cociente AST/ALT aumentó en los grupos G y GS respecto al grupo C, sugiriendo una mejora en la esteatohepatitis por el consumo de glucomanano. En el caso de los animales que consumieron dietas hipercolesterolemiantes, el citado cociente se correlacionó positivamente con el tamaño del hígado. Sin embargo, hay que señalar que la hepatomegalia en animales hipercolesterolémicos está muy condicionada por el depósito de ésteres de colesterol (Sanchez-Muniz y cols., 2003), aunque en nuestro estudio, en las ratas fa/fa hipercolesterolémicas, la esteatosis observada podría deberse tanto a acúmulos de triglicéridos como de ésteres de colesterol.

Tabla 6.1. Pesos de los diferentes órganos estudiados y su índice corporal													
Peso (g) o Índice (g/g)	Colesterol Añadido	Control			Glucomanano			Glucomanano y espirulina			ANOVA		
		Media	DS	P	Media	DS	P	Media	DS	P	Dieta	Colesterol	Intersección
Hígado	No	12,31	0,84	a	9,10	0,80	b	9,74	0,44	b	<0,001	<0,001	<0,001
	Sí	23,36	2,60	a***	13,64	2,18	b***	14,46	1,46	b***			
Índice hepatosomático	No	0,04	0,00	a	0,03	0,00	b	0,03	0,00	b	<0,001	<0,001	<0,001
	Sí	0,09	0,00	a***	0,06	0,01	b***	0,05	0,01	b***			
Riñones	No	1,99	0,79		2,22	0,33		2,38	0,28		0,040	0,047	<0,001
	Sí	3,16	0,48	a**	2,11	0,33	b	2,15	0,25	b			
Índice nefrosomático	No	0,01	0,00		0,01	0,00		0,01	0,00		0,107	<0,001	<0,001
	Sí	0,01	0,00	a***	0,01	0,00	b	0,01	0,00	b			
Bazo	No	0,65	0,27		0,77	0,21		0,84	0,25		0,264	0,001	0,032
	Sí	1,18	0,23	a**	0,83	0,17	b	1,02	0,31	ab			
Índice esplenosomático	No	0,00	0,00		0,00	0,00		0,00	0,00		0,615	<0,001	0,012
	Sí	0,00	0,00	a***	0,00	0,00	b*	0,00	0,00	ab*			
Corazón	No	1,01	0,29		1,16	0,22		1,12	0,19		0,357	0,981	0,668
	Sí	1,04	0,29		1,07	0,22		1,19	0,26				
Índice cardiosomático	No	0,00	0,00		0,00	0,00		0,00	0,00		0,118	0,013	0,905
	Sí	0,00	0,00		0,00	0,00		0,00	0,00				
Intestino	No	5,56	0,54	b	7,76	1,15	a	7,29	0,46	a	<0,001	0,340	0,027
	Sí	6,03	0,62	b	6,72	0,80	ab	7,21	0,76	a			
Índice intestino/corporal	No	0,02	0,00	b	0,03	0,00	a	0,02	0,00	a	<0,001	0,001	0,198
	Sí	0,02	0,00	b***	0,03	0,00	a	0,03	0,00	a			

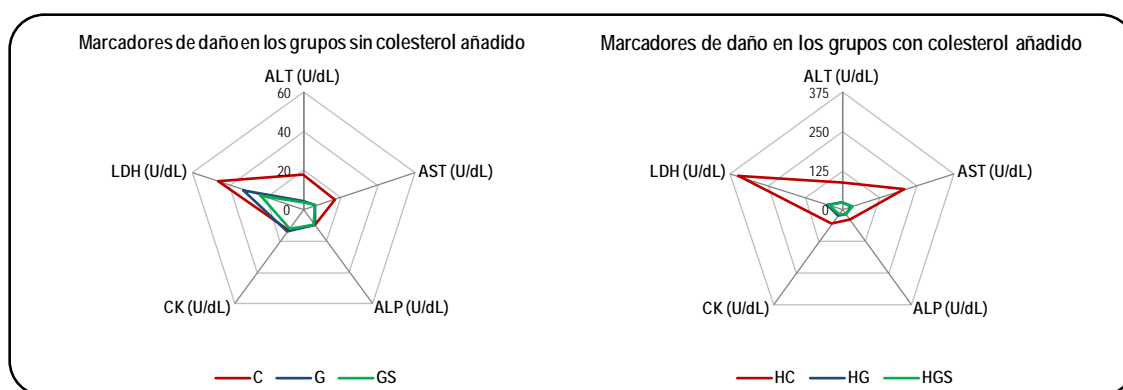
P, significación estadística.

\* Significación estadística entre los valores con y sin colesterol añadido de un mismo parámetro (\*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001).

a, b, Significación estadística entre valores de una misma fila (P<0,05)

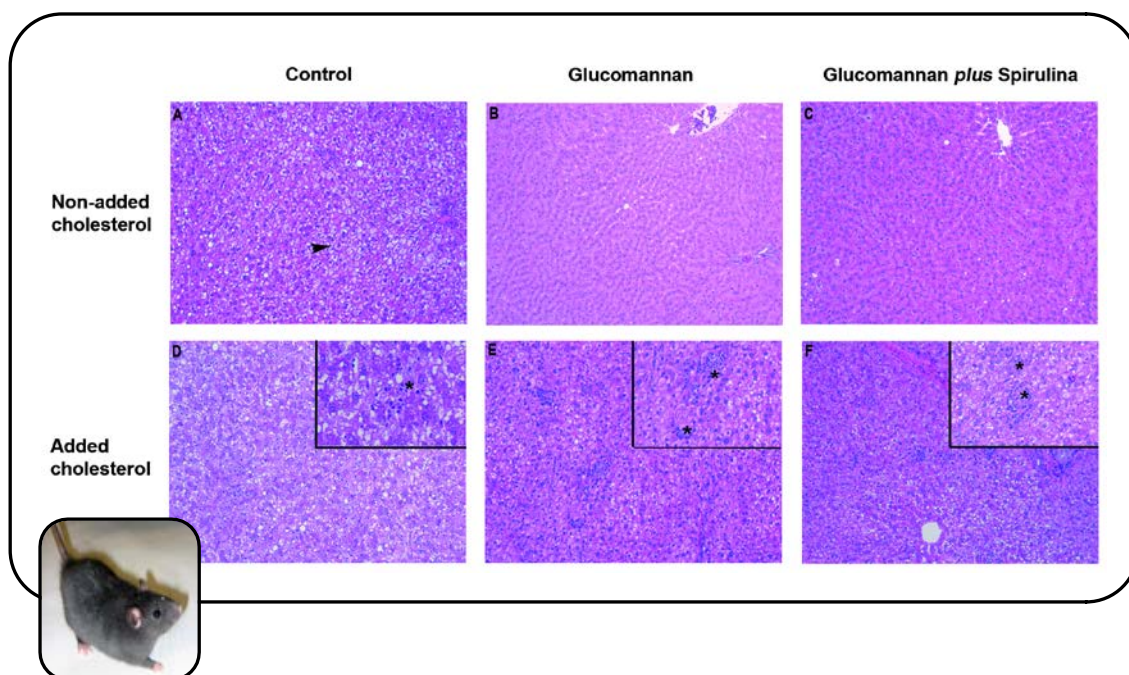
El cociente ALT/ALP, definido como un indicador de colestasis, presenta en los grupos sin colesterol añadido correlaciones positivas y significativas con el peso hepático ( $r=0,465$ ;  $p=0,022$ ) y el índice hepatosomático ( $r=0,420$ ;  $p=0,041$ ). Este cociente fue en el grupo C 3,6 veces más elevado que en ratas Wistar (Schultz Moreira y cols., 2013) sugiriendo colestasis. El consumo de glucomanano redujo drásticamente este cociente, apuntando a efectos positivos del glucomanano sobre la colestasis. El agente hipercolesterolemizante incrementó mucho el valor ALT/ALP, de modo que se puede sugerir la existencia de colestasis grave y daño hepatocelular, en consonancia con lo señalado por Schultz Moreira y cols. (2013) en ratas Wistar con hipercolesterolemia.

Respecto a los marcadores de daño celular o tisular las enzimas CK y LDH, se puede señalar que se encuentran en altas cantidades en el corazón y pueden verse al torrente sanguíneo en casos de inflamación o daño cardíaco. Por su parte la LDH es, según Garcimartin y cols. (2015), también un marcador de necrosis celular; y según Sanchez-Muniz y cols. (1995) un marcador de daño hepático. En nuestro estudio, ambas enzimas se encontraron en cantidades relativamente elevadas en las ratas C en comparación con ratas Wistar adultas (Shah y cols., 2014) pero más bajas que las señaladas por Carvajal-Zarrabal y cols. (2014) en ratas Sprague-Dawley, sugiriendo que la dieta C no indujo efectos demasiado deletéreos a nivel cardíaco o hepático.



**Figura 6.2.** Marcadores de daño hepático y celular en plasma de las dietas experimentales. C, dieta hipergrasa con 30% de surimi control con celulosa microcristalina; G, surimi con un 15% de glucomanano añadido; GS, surimi con un 15% de glucomanano y 3 gramos de espirulina/kg dieta. HC, HG y HGS son equivalentes a C, G y GS con la adición de un agente hipercolesterolemizante.

Tanto la CK como la LDH se incrementaron de forma marcada en las ratas HC, sugiriendo que la inducción hipercolesterolemia causó daños en hígado y corazón. Mientras que la presencia de glucomanano y glucomanano más espirulina en las dietas G y GS sólo indujo una reducción no significativa de la actividad LDH, en las dietas con colesterol añadido (HG y HGS), redujo de forma significativa ambas enzimas, sin diferencias significativas debidas a la inclusión de espirulina. Sanchez-Muniz y cols. (1995) encontraron que la actividad LDH, muy elevada en las ratas alimentadas con colesterol, se redujo de forma significativa por la acción de los ácidos grasos  $\omega$ -3.



**Figura 6.3.** Comparativa (Obj. 10x) entre diferentes hígados de dietas sin colesterol añadido (A, B, C) o con adición de colesterol (D, E, F) a la dieta control (A, D), la dieta con glucomanano (B, E) o la dieta con glucomanano y espirulina (C, F). En los animales sin colesterol añadido, las dietas con glucomanano o glucomanano y espirulina redujeron la esteatosis en comparación con el control (Punta de flecha). Este efecto no se observó de forma tan evidente en las dietas con colesterol añadido. Los asteriscos en los paneles insertados en D, E y F señalan típicos microgranulomas, que aparecen principalmente en las dietas con colesterol añadido (Obj. 20x).

La **figura 6.3A-F** se corresponde con secciones histológicas representativas de los hígados de los diferentes grupos experimentales. En la **figura 6.3A** observamos según las estructuras de los espacios lobulillares una esteatosis relativamente elevada, con un índice de alteración total fue del 63,75%. Esta esteatosis se redujo en los grupos G y GS (**figuras 6.3B** y **6.3C**, respectivamente), los cuales presentaron una alteración total cuyos scores fueron, respectivamente 8,75% y 16,25%, que se

corresponden a su vez con lo indicado previamente para el cociente AST/ALT, que también se redujo de forma muy marcada por el consumo de estas dietas. Según Yki-Jarvinen (2014), la esteatosis hepática debe a la resistencia a la insulina, con lo que se pierden los efectos inhibitorios de esta hormona sobre la glucemia y la producción de VLDL. El consumo de glucomanano debe inducir una mejora en la sensibilidad a la insulina, ya que se reduce la esteatosis y los niveles de TG y VLDL. Sin embargo, la inflamación periportal tendió a incrementar ligeramente en las ratas G. Como se discutirá más adelante en el **objetivo 5**, algunos marcadores de inflamación (TNF- $\alpha$  e iNOS) se incrementan en las ratas G.

Tanto los scores de alteración total como de inflamación se elevaron por el consumo de dietas enriquecidas en colesterol (HC vs. C), aunque la esteatosis no cambió (**figura 6.3D**), con lo que se demuestra que el consumo del agente hipercolesterolemizante produjo cambios tóxicos en el hígado. La ingesta de las dietas HG y HGS indujeron un mayor grado de esteatosis (**figuras 6.3E y 6.3F**) que los observados en los grupos G y GS, pero menor que el del grupo HC. Nuevamente pueden sugerirse beneficios del consumo de las dietas enriquecidas en glucomanano sobre la hepatoesteatosis, en línea con la reducción del cociente AST/ALT ya discutido. Sin embargo, el score de inflamación no se redujo en las ratas HC, mientras que el score de alteración total sí mejoró en el grupo HGS. Estos datos sugieren que probablemente componentes minoritarios de la espirulina (p. ej. sus ácidos grasos  $\omega$ -3), incluso a bajas dosis, indujeron efectos protectores positivos sobre la estructura del hígado. No obstante, debe puntualizarse que los cambios extras inducidos por la espirulina fueron modestos en estas ratas obesas alimentadas con dietas altamente saturadas y altamente energéticas.

Los niveles relativamente altos de CK y LDH del grupo C concuerdan con la necrosis de los miocitos y su extensión observada (15 sobre 16 y 15 sobre 32, respectivamente). Sin embargo, este hecho no fue tan evidente en otros marcadores histológicos: las dietas G y GS no promovieron cambios en los parámetros cardíacos testados ni en la alteración total. Esta alteración total se incrementó en las ratas HC con respecto a las C. La fibrosis tendió a incrementarse en la dieta HGS con respecto a la HG, sugiriendo efectos potencialmente negativos de la conjunción de glucomanano y espirulina en un clima marcadamente hipercolesterolemico.

Se puede destacar la utilidad de los scores de alteración total tanto para corazón como para hígado, ya que se encontraron correlaciones significativas entre dichos scores y los marcadores de daño celular estudiados (el valor mínimo de p fue 0,026 en todos los casos).

### **6.3. OBJETIVO 3. DETERMINAR SU INFLUENCIA SOBRE LA LIPEMIA Y LA CANTIDAD Y COMPOSICIÓN DE LAS LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS.**

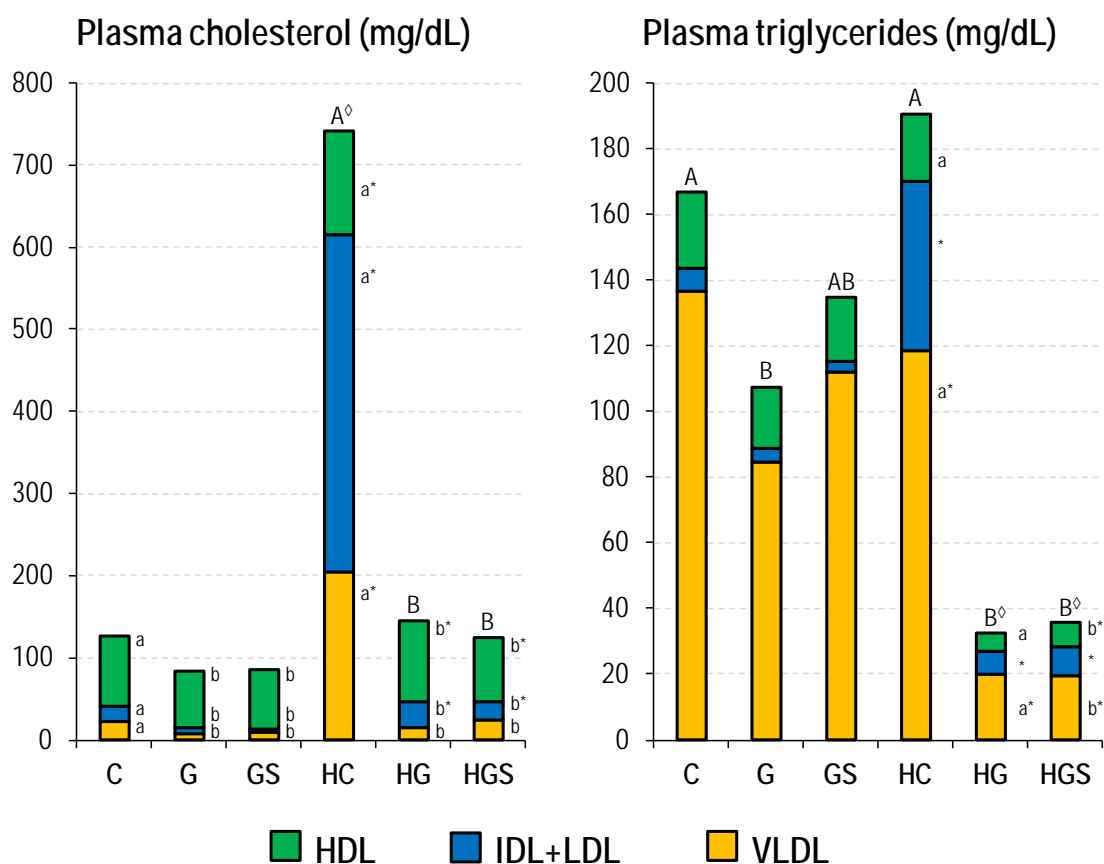
Las ratas son los animales más frecuentemente empleados para desarrollar estudios sobre el metabolismo del colesterol, como también para evaluar el efecto de las proteínas sobre la colesterolemia (Chiang y cols., 1998). De acuerdo con otros estudios en ratas fa/fa, la dieta C, rica en grasas y ácidos grasos saturados, produjeron hipercolesterolemia moderada e hipertrigliceridemia (Aprikian y cols., 2002;Galisteo y cols., 2005). La hipercolesterolemia fue moderada, ya que el 87.5% de las ratas tuvieron niveles de colesterol en plasma > 100 mg/dL, punto de corte propuesto para diagnosticar hipercolesterolemia en la rata (Sanchez-Muniz y Bastida, 2008) y pocas ratas, más de 200 mg/dL. Sin embargo, nuestros valores tienden a ser algo menores que los de otros estudios, probablemente debido a la fuente de proteínas y su cociente lisina/arginina [2.9 para caseína y 1.02 para calamar (Vahouny y cols., 1985)]. Vázquez y Sánchez-Muniz (1994) y Kritchevsky y cols. (1982) señalaron que la proteína de pescado, tiene propiedades hipocolesterolemiantes con respecto a otras proteínas animales como la caseína y la carne, entre otros aspectos por su menor cociente lisina/arginina.

La dieta G, en comparación con la C, tiende a reducir la colesterolemia (12.5% de los animales con valores <100 mg/dL), la trigliceridemia y la fosfolipemia. Es conocido el efecto moderado sobre la colesterolemia de la fibra dietética y en particular del glucomano, aunque no existen muchos datos publicados con respecto a los TG y fosfolípidos plasmáticos. El mecanismo más probable por el que actúa el glucomano es a través de la retención de la absorción de la grasa por la absorción y/o secuestro de las sales biliares, contribuyendo de esa manera a contrarrestar el efecto hiperlipemiente de la dieta C. La reducción de peso inducida por las dietas G y GS también contribuiría a la reducción de la trigliceridemia (Sanchez-Muniz, 2012;Aprikian y cols., 2002;Galisteo y cols., 2005).

La espirulina, aunque es rica en fibra y contiene un 7,5% de grasas, de las cuales el 18% son ácidos grasos  $\omega$ -3, no produjo ningún efecto significativo sobre los lípidos plasmáticos. Dado que sólo se añadieron 3 g de espirulina por cada kg de dieta a las dietas HG y HGS, lo que representaría unos 36 mg de ácidos grasos poliinsaturados  $\omega$ -3/kg de dieta, se podría aceptar que el efecto aditivo de la espirulina sobre los del glucomano o la colesterolemia en los niveles de colesterol o TG plasmáticos sería despreciable. De hecho se requieren dosis relativamente elevadas

de ácidos grasos  $\omega$ -3 para inducir cambios significativos en los lípidos y lipoproteínas plasmáticas (Harris y cols., 2008).

La distribución de colesterol y TG entre las fracciones lipoproteicas entre los animales del estudio que no consumieron el agente hipercolesterolemizante (**figura 6.4**) recuerda, en términos generales, a la encontrada por nuestro grupo en ratas Wistar alimentadas con dietas semisintéticas (Olivero-David y cols., 2011). La rata normocolesterolémica se considera un buen modelo para el estudio de las HDL. Estas lipoproteínas juegan un papel muy importante en el transporte de colesterol pero también junto con las VLDL en el de TG (Murata y cols., 2002). En general, en las ratas existe una recaptación hepática muy efectiva de VLDL y una transferencia reducida de apo-B desde las VLDL hacia las LDL, lo que explica los niveles bajos de IDL+LDL encontradas en las ratas del grupo C de esta memoria de Tesis Doctoral no difieran sensiblemente de los definidos en investigaciones anteriores con ratas que ingerían dietas no suplementadas con agente hipercolesterolemizante (Sanchez-Muniz y Bastida, 2008; Wong y cols., 1999). No obstante, dados los niveles de triglicéridos, el reparto de ellos en las lipoproteínas y ciertas características de la HDL, enriquecidas en TG respecto a las HDL de ratas Wistar normocolesterolémicas (Garcimartin y cols., 2015) puede asumirse que las ratas del grupo C tienen el perfil lipoproteico de la rata diabética (Janiak y cols., 2006). En las ratas alimentadas con las dietas G y GS, el transporte de colesterol de las fracciones lipoproteicas de menor densidad (las no-HDL) fue aún menor que en las C (**figura 6.4**), de manera que la contribución de estas fracciones no-HDL fue similar al observado en ratas no obesas (Olivero-David y cols., 2011).



**Figura 6.4.** Valores medios del colesterol o triglicéridos totales transportados por las fracciones lipoproteicas VLDL, IDL+LDL y HDL de las ratas Zucker alimentadas con las diferentes dietas experimentales: C, dieta hipergrasa con 30% de surimi control con celulosa microcristalina; G, surimi con un 15% de glucomanano añadido; GS, surimi con un 15% de glucomanano y 3 gramos de espirulina/kg dieta. HC, HG y HGS son equivalentes a C, G y GS con la adición de un agente hipercolesterolemiantes. Los valores que presentaron diferencias significativas para el total del lípido plasmático (A, B,  $\diamond$ ) o fracción lipoproteica (a, b, \*) se marcaron para C vs. G vs. GS, y para HC vs. HG vs. HGS con letras diferentes ( $P \leq 0.05$ , test de Bonferroni). Para C vs. HC, G vs. HG y GS vs. HGS, con símbolos ( $P \leq 0.05$ ).

Coincidiendo con otros estudios, la adición a la dieta de colesterol y ácido cólico como agente hipercolesterolemiantes modificó enormemente la lipemia y el perfil lipoproteico (Chiang y cols., 1998). Todas las ratas del grupo HC tenían hipercolesterolemia severa ( $> 200$  mg/dL) y un gran porcentaje de ellas (87,5%) valores de colesterol superiores a los 600 mg/dL, lo que sugiere que las ratas fa/fa, bajo nuestras condiciones de experimentación, fueron muy sensibles a estas dietas ricas en energía, grasa saturada y colesterol. Las fracciones VLDL y IDL+LDL de las ratas HC transportaron aproximadamente 9 y 20 veces, respectivamente, más colesterol que las del grupo C, mientras que la fracción HDL transportó 1,5 veces más colesterol en el grupo HC que en el C. El cociente colesterol/TG se multiplicó por 10 en

el caso de la fracción VLDL, lo que indica claramente que la dieta HC promovió formación de grandes cantidades de  $\beta$ -VLDL (Bocanegra y cols., 2009). Este mismo cociente fue 3 y 1,7 veces mayor en la dieta HC con respecto a la C para las fracciones IDL+LDL y HDL, respectivamente. Las dietas ricas en colesterol con glucomanano añadido (HG y HGS) redujeron de forma significativa la inducción de hipercolesterolemia promovida por la dieta HC, ya que los niveles de colesterol en las fracciones VLDL, IDL+LDL, y HDL de dichas ratas fueron sólo 2-2,5 y 7; y 1,1-1,5 veces mayores, respectivamente, que los valores encontrados en los grupos G y GS. De forma interesante, los valores del cociente colesterol/TG fueron más altos en la fracción HDL de los grupos HG y HGS, sugiriendo que las HDL de estas ratas fueron más antiaterogénicas que las del grupo HC, ya que según Jover-Sanz (1994) las HDL ricas en TG son menos eficientes en el transporte reverso de colesterol. El receptor de tipo "scavenger" B-I (SR-BI) juega un papel esencial en la recaptación de colesterol y ésteres de colesterol asociados a HDL para su posterior secreción a través de la bilis (Zhou y cols., 2006). Las HDL también se asocian a la eliminación de radicales libres (Canales y cols., 2011), lo que podría explicar los valores más bajos encontrados de HDL-colesterol en las dietas HG y HGS en comparación con la dieta HC.

El efecto de las dietas HG y HGS sobre la distribución de colesterol y TG en las lipoproteínas es impresionante cuando se compara con el de la dieta HC (**figura 6.4**). Puede afirmarse que las dietas enriquecidas en colesterol conteniendo glucomanano fueron capaces de llevar la distribución de colesterol en las lipoproteínas a valores cercanos a la normalidad. Como la contribución de la fracción HDL al total de transporte de TG en ratas es muy elevado (Olivero-David y cols., 2011), también puede afirmarse que los grupos HG y HGS contribuyeron sustancialmente a la normalización la distribución de TG entre las diferentes fracciones lipoproteicas. Este efecto podría deberse al bloqueo parcial del glucomanano a la hipercolesterolemia inducida por la dieta en la rata Zucker fa/fa.

#### **6.4. OBJETIVO 4. ESTUDIAR LOS EFECTOS SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA, ACTIVIDAD Y NIVELES DE ENZIMAS Y OTROS BIOMARCADORES DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.**

La enzima colesterol-7- $\alpha$ -hidroxilasa (CYP7A1) es una enzima de la familia del citocromo P450, que ayuda a eliminar el colesterol hepático en forma de ácidos biliares, generando radicales libres en este proceso (Shinkyo y Guengerich, 2011). Deficiencias en esta enzima resultan en reducciones de la liberación hepática del colesterol, elevando la colesterolemia en plasma e hígado (Sanchez-Muniz y Bastida, 2008; Wang y cols., 2015). Sin embargo, Wang y cols. (2015) han encontrado expresiones muy reducidas de esta enzima en ratas a las que se indujo hígado graso no alcohólico mediante el consumo de dietas hipergrasas.

Las dietas G y GS, a las que no se añadió agente hipercolesterolemizante fueron capaces de reducir moderadamente la colesterolemia en los animales de experimentación, por lo que es posible que las necesidades de eliminación hepática de colesterol fueran menores, llevando a una menor expresión de la CYP7A1, lo que contribuiría a su vez a una menor generación de radicales libres por esta vía. La adición del agente hipercolesterolemizante indujo esteatohepatitis en el grupo HC, a juzgar por lo observado en cuanto a peso hepático y al examen histológico de este órgano. La expresión de CYP7A1 se encuentra drásticamente reducida en la dieta HC si la comparamos con la de la dieta C, como también observaron en animales hipercolesterolémicos Wang y cols. (2015). Sin embargo, las dietas hipercolesterolémicas conteniendo glucomanano (HG y HGS) incrementaron la expresión de CYP7A1 con respecto a la HC, lo que sugiere una mejora en la excreción hepática de colesterol, con implicaciones potenciales beneficiosas para la esteatohepatitis y el daño orgánico que tal patología implica. La inclusión de espirulina no fue capaz de alterar los niveles de expresión de CYP7A1 más allá de los efectos observados para el glucomanano.

En cuanto al sistema antioxidante no enzimático, vemos que en comparación con otros estudios en ratas Wistar no obesas (Schultz-Moreira y cols., 2011), las ratas control alimentadas con dietas sin colesterol tuvieron una protección antioxidante deficitaria a juzgar por los bajos valores de GSH y elevados de GSSG. Las dietas G y GS mejoraron significativamente los niveles de glutatión reducido, aunque sólo la dieta G mejoró significativamente la relación GSH/(GSH+GSSG). La dieta HC indujo un empeoramiento del sistema del glutatión con respecto a la C con índices redox

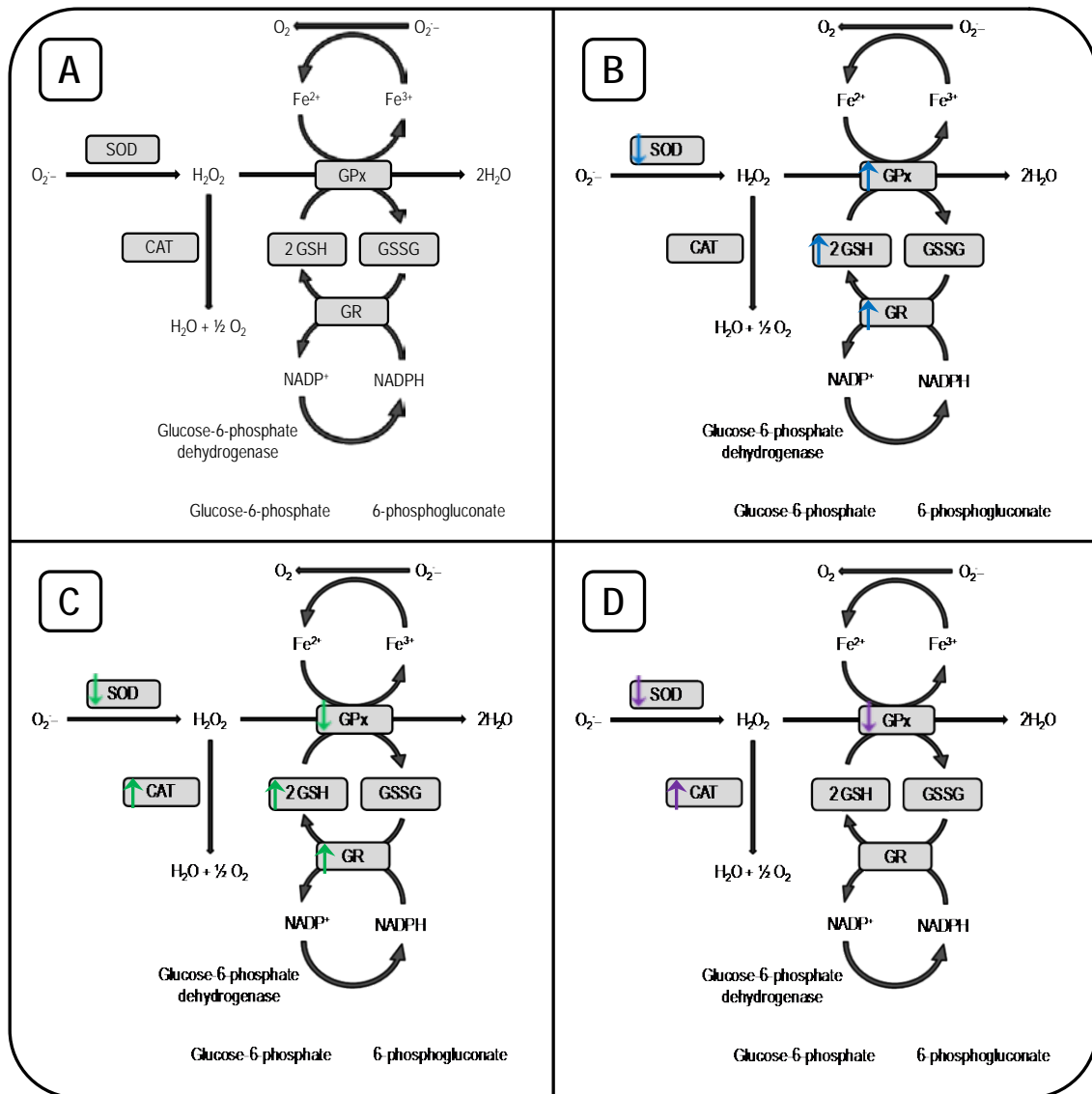
menores que otros estudios con animales hipercolesterolémicos (Schultz-Moreira y cols., 2011). Sin embargo, al añadir glucomanano a la dieta (grupos HG y HGS) se elevó significativamente el índice redox, alcanzándose valores similares a los de la dieta C. Este resultado sugiere que la fibra de konjac fue capaz de contrarrestar los efectos negativos sobre el sistema antioxidante no enzimático inducidos por la hipercolesterolemia. Bocanegra y cols. (2009) definieron la capacidad de la fibra soluble para captar radicales libres y actuar como antioxidante. La inclusión de espirulina no fue capaz de alterar en ningún caso los efectos observados para el glucomanano.

Los resultados obtenidos sobre el sistema antioxidante enzimático indican un claro empeoramiento, al igual que en el caso del sistema del glutatión, en las ratas fa/fa respecto a estudios previos realizados en ratas Wistar (Schultz-Moreira y cols., 2011).

En las **figuras 6.5A-D** se integran los resultados del sistema antioxidante enzimático de los animales que ingirieron dietas sin adición de colesterol. Puede sugerirse que el incremento de GSH en los grupos que consumieron glucomanano es consecuencia directa de valores más elevados de GR. Tras el consumo de la dieta GS se producen cambios en la SOD, que implican, en concordancia con Zheng y cols. (2013), que la espirulina reduce la concentración de radicales  $O_2^{\cdot-}$ . Además, en el grupo GS se observa una recuperación de GSH a partir de GSSG debida a los valores de GR y GPx. Es necesario señalar que las ratas del grupo C son diabéticas (Vázquez-Velasco y cols., 2015b), lo que supone una menor disponibilidad de sustrato para la producción de NADPH (Stanton, 2012). Las dietas G y GS mejoraron parcialmente la glucemia (Vázquez-Velasco y cols., 2015b), hecho que probablemente activó la vía metabólica de la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (**6.5A**) permitiendo un incremento de la GR. Riss y cols. (2007) documentaron una expresión reducida de la NADPH oxidasa, inducida por la C-ficocianina de la espirulina.

Cabe señalar que el gran aumento de la expresión de Mn-SOD y de la actividad SOD producido por las dietas hipercolesterolémicas sugiere que el consumo de colesterol y/o la regulación de la colesterolemia alimentan un proceso relacionado con la producción y eliminación de radicales  $O_2^{\cdot-}$  en las ratas HC. Al compararlas con las del grupo C encontramos que el incremento de SOD fue paralelo al de la GPx total, pero no al de CAT. De hecho, el cociente de actividades CAT/GPx se redujo casi a la mitad en las ratas HC. Desconocemos los mecanismos que podrían estar implicados en estas variaciones. En DMT2 se han encontrado reducciones de CAT y del NADPH necesario para mantener un balance redox normal de glutatión (Dhaunsi y cols.,

2010;Agarkov y cols., 2014). Los resultados indican que las ratas HC presentan una insulinemia mayor que las C, lo que explicaría, al menos en parte, la variación del índice redox, que, sin embargo, parece una consecuencia del incremento de la actividad GPx y no por la CAT (**figura 6.5E**). No obstante, existirían modificaciones en las expresiones y niveles de GPx y GR para evitar el exceso de oxidación de glutation. Así, el cociente de las expresiones GPx/GR fue menor en el grupo HC que en el C.



**Figura 6.5.** Esquema de los principales resultados ejercidos sobre el sistema antioxidante por las diferentes dietas experimentales sin colesterol añadido. A, esquema general del sistema antioxidante; B, resultados de la dieta con glucomanano (G) respecto a la control (C); C, resultados de la dieta con glucomanano y espirulina (GS) respecto a la control (C); y D, resultados de la dieta con glucomanano y espirulina (GS) respecto a la dieta con glucomanano (G).

La dieta HG redujo la actividad GPx total y tendió a reducir las actividades CAT y SOD con respecto a la dieta HC, sugiriendo una menor producción de especies reactivas de oxígeno. De hecho la expresión de Mn-SOD disminuyó de forma considerable. El incremento de las expresiones de CAT y GPx parece relacionado con la eliminación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. No existe una explicación evidente, pero dada la relación observada entre hipercolesterolemia y status antioxidante (Tie y cols., 2014), los menores niveles de colesterol plasmático con respecto a los inducidos por la dieta HC podrían explicar parcialmente estos resultados. La mejora del índice redox en el lote HG con respecto al HC parece relacionada a la disminución de la actividad GPx. En línea con lo señalado por Winiarska y cols. (2014), la reducción de la insulinemia en las ratas HG respecto a las HC, podría estar implicada, afectando positivamente al sistema del glutatión.

La adición de espirulina a las dietas hipercolesterolémicas (lote HGS) indujo cambios importantes, integrados en la **figura 6.6A-D**. Las expresiones de GPx y Mn-SOD, al igual que los niveles de GR y GPx, disminuyeron sugiriendo una menor activación del sistema del glutatión. La espirulina contiene compuestos bioactivos de reconocida actividad antioxidante (Nagaoka y cols., 2005), demandando menos enzimas antioxidantes. También existe la posibilidad de que la espirulina o uno de sus componentes modulen la expresión genética de las enzimas antioxidantes. Se puede argumentar otra vez la relación entre el sistema del glutatión y la insulinemia, ya que las ratas HGS presentan una insulinemia muy inferior a la observada en las HC.

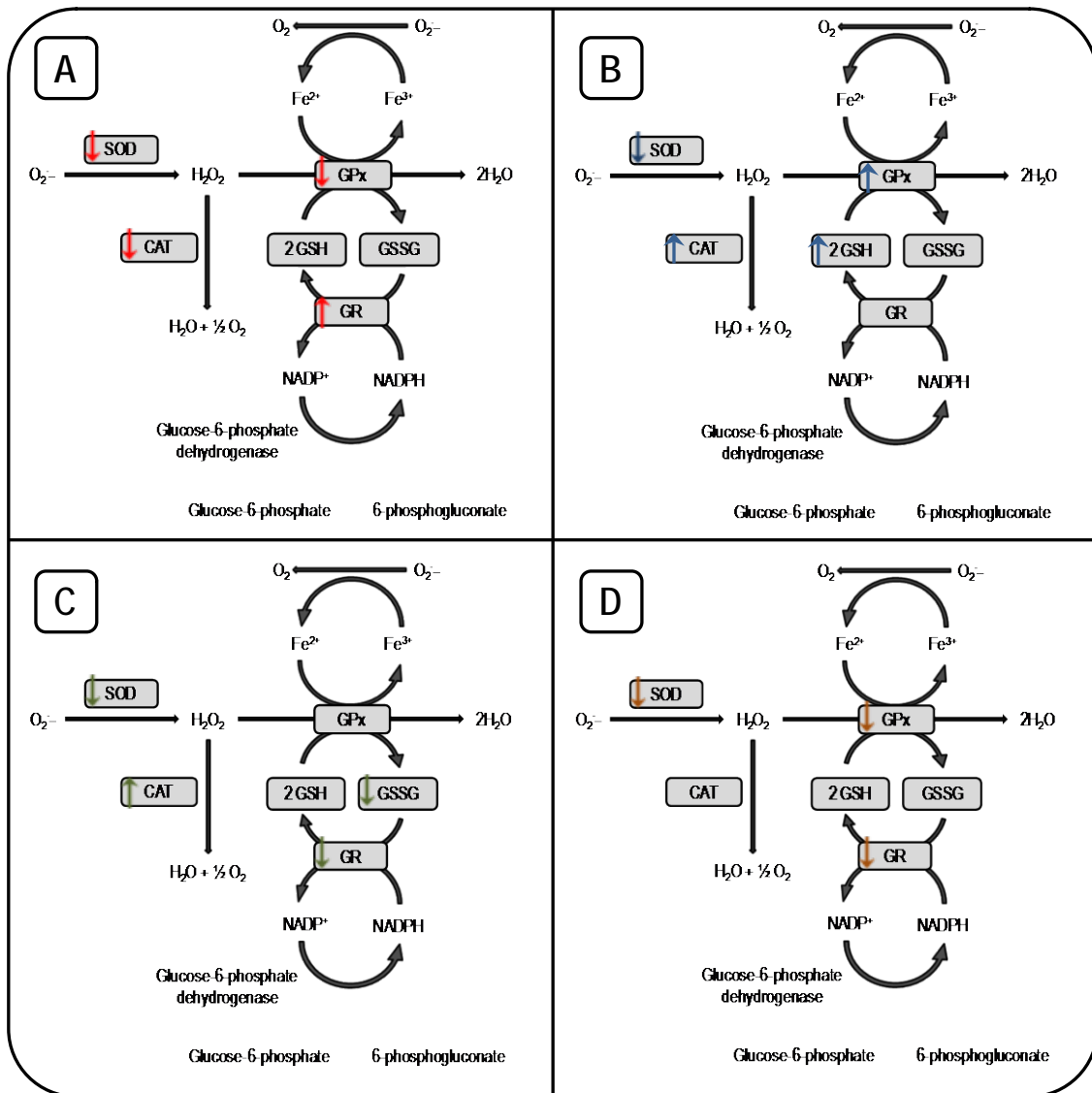


Figura 6.6. Esquema de los principales resultados ejercidos sobre el sistema antioxidante por las diferentes dietas experimentales con colesterol añadido. A, resultados de la dieta control con colesterol añadido (HC) respecto a la control (C); B, resultados de la dieta con glucomanano y con colesterol añadido (HG) respecto a la control con colesterol añadido (HC); C, resultados de la dieta con glucomanano y espirulina y con colesterol añadido (HGS) respecto a la control con colesterol añadido (HC); y D, resultados de la dieta con glucomanano y espirulina y con colesterol añadido (HGS) respecto a la dieta con glucomanano y con colesterol añadido (HG).

## **6.5. OBJETIVO 5. EVALUAR SU INFLUENCIA SOBRE LOS MARCADORES DE DAÑO E INFLAMACIÓN CELULAR Y TISULAR.**

Las ratas del grupo C presentaron valores elevados de TNF- $\alpha$  en plasma, aproximadamente 3.4 veces mayores que los observados por Plaza-Diaz y cols. (2014) en ratas fa/fa obesas. Este hecho sugiere que la ingesta elevada de grasas saturadas por este modelo tan sensible a las mismas causa una considerable inflamación. La dieta G con respecto a la dieta C redujo los valores de eNOS e incrementó los de iNOS y TNF- $\alpha$ , lo que señala que el surimi enriquecido con glucomanano indujo algún grado de inflamación, en contra de estudios previos en los que se apuntaban propiedades antiinflamatorias de esta harina (Onishi y cols., 2007; Lin y cols., 2010). Diferencias entre especies, estados fisiopatológicos, cantidad en grasa de la dieta y duración del estudio son factores que podrían explicar las diferencias observadas entre los estudios. No conocemos los mecanismos implicados, pero debe indicarse que se incluyó en la dieta una gran cantidad de glucomanano, altamente fermentable, por lo que la producción de compuestos potencialmente irritantes como los hidrogeniones o metano provenientes de la fermentación de la fibra (Ichikawa y Sakata, 1997) y la inflamación hepática no debe ser descartada. Según Hullar y Lampe (2012), la microbiota obesógena tiene influencia sobre la interacción de moléculas señaladoras del huésped, produciendo cambios en la permeabilidad intestinal y liberación de hormonas, y niveles bajos de inflamación a nivel intestinal. Fernández-Villaverde y cols. (2004) han sugerido, tras la exclusión de otras causas de daño hepático, que el consumo de glucomanano puede originar hepatitis aguda de tipo colestático con aumento de transaminasas e ictericia.

El grupo GS mejoró los valores de eNOS e iNOS con respecto al G, sugiriendo una mejora en el proceso inflamatorio. La espirulina contiene C-ficocianina, una molécula con estructura muy similar a la biliverdina, que posee capacidad de captación de radicales libres y de inhibición de la NADPH oxidasa (Zheng y cols., 2013), lo que podría explicar parcialmente estos resultados. Tampoco serían descartables los efectos antiinflamatorios de los ácidos grasos poliinsaturados  $\omega$ -3 (Villalobos y cols., 2010) presentes en la espirulina.

La inflamación hepática presente en las ratas fa/fa, se agrava por el consumo de dietas añadidas con el agente hipercolesterolemizante, aunque parece existir un mecanismo compensatorio a través de la activación de la óxido nítrico sintasa. Mells y cols. (2015) describieron un aumento del TNF- $\alpha$  en un modelo murino de síndrome

metabólico alimentado con una dieta alta en grasa y colesterol, lo que sugiere que el consumo elevado de colesterol y la inflamación hepática están íntimamente relacionados.

Los niveles de TNF- $\alpha$  se elevaron aún más en el grupo HG con respecto al HC. Sin embargo, la dieta HGS los redujo, en consonancia con las propiedades antiinflamatorias de la espirulina indicadas en otros estudios. No conocemos con exactitud el mecanismo que explique las diferencias de niveles de TNF- $\alpha$  entre plasma e hígado. Raju y Bird (2006) propusieron que los niveles altos de TNF- $\alpha$  en plasma se deben en parte a su rápida liberación al lecho vascular desde otros tejidos, incluyendo los liberados desde el hígado graso. Por ello creemos que los niveles incrementados en plasma pueden responder a un aumento de su liberación desde el hígado inducido por la reacción inflamatoria. Una vez más, es necesario destacar el posible rol del glucomanano en la inflamación y la capacidad antioxidante que la espirulina ha demostrado.

## **6.6. OBJETIVO 6. CONOCER SU IMPACTO SOBRE LA GLUCEMIA, INSULINEMIA Y MARCADORES DE RESISTENCIA A LA INSULINA Y/O DIABETES MELLITUS TIPO 2.**

La **tabla 6.2** aporta información detallada sobre los niveles de glucosa, insulina y los modelos homeostáticos HOMA y QUICKI para la determinación de la resistencia o sensibilidad a la insulina.

Como se comentó en la introducción, las ratas fa/fa desarrollan intolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia y resistencia a la insulina a partir de las once o doce semanas de vida (Banday y cols., 2005). Todas estas alteraciones metabólicas fueron encontradas en las ratas alimentadas con la dieta C. Si utilizamos los niveles de corte aceptados para el diagnóstico de diabetes, todas las ratas alimentadas con las dietas G y GS presentarían hiperglucemia severa, aunque estos tratamientos redujeron la glucemia un 20% en comparación con la de las ratas control. Vuksan y cols. (1999) describieron un efecto hipoglucemiante en pacientes diabéticos por el consumo de harina de konjac. El mecanismo más probable parece ser a través del bloqueo parcial de la absorción de hidratos de carbono, secuestrándolos en el interior del gel viscoso que origina, o tal vez ralentizando el vaciado gástrico, con lo que la disponibilidad de los hidratos de carbono a nivel intestinal se reduciría (Sanchez-Muniz, 2012).

Dado que valores superiores a 6mUI/L son indicadores de hiperinsulinemia (Gesteiro y cols., 2011a), podemos asumir que todas las ratas del grupo C fueron resistentes a la insulina. En contraste con otros estudios (Vuksan y cols., 1999), el glucomanano con la adición o no de espirulina, no redujo la insulinemia de forma significativa. No obstante, en las ratas de los grupos G y GS con respecto a las del grupo C, la insulinemia tendió a reducirse (17% y 13%, respectivamente). De hecho, el 25% de los animales del grupo G y el 12.5% del GS tuvieron niveles  $\leq 6$  mUI/L, sugiriendo que el consumo de las dietas G y GS la mejora el control de la glucemia.

El HOMA-IR es un marcador de resistencia a la insulina. Como una consecuencia directa de la glucemia e insulinemia observadas, la resistencia a la insulina en las ratas Zucker fa/fa presentó una tendencia a mejorar después del consumo de las dietas G y GS con respecto a la dieta C (29% y 24%, respectivamente). La sensibilidad a la insulina o la funcionalidad de las células  $\beta$ , de acuerdo con los índices HOMA-IS, QUICKI y HOMA-%B no cambió con ninguno de los tratamientos. Sin embargo, el HOMA-D se incrementó de forma significativa en el grupo GS en relación con el grupo C. No hemos encontrado referencias bibliográficas

sobre el HOMA-D en ratas, lo que complica enormemente la discusión de estos resultados. De cualquier forma, teniendo en cuenta la definición de HOMA-D, se puede sugerir una biodisponibilidad de insulina aumentada en el caso de la dieta GS.

El índice TyG ha sido propuesto como un aceptable marcador de síndrome metabólico por Guerrero-Romero y cols. (2010) ya que está bien correlacionado con el HOMA-IR. Los niveles de TyG encontrados en las ratas alimentadas con dietas sin colesterol añadido definen claramente la existencia de síndrome metabólico y, por tanto, de resistencia a la insulina, ya que un porcentaje muy elevado de las ratas de los tres lotes tuvieron TyG superiores al valor 9,1, considerado como indicativo de síndrome metabólico (Unger y cols., 2014).

**Tabla 6.2.** Principales marcadores del metabolismo hidrocarbonado, expresados como media  $\pm$  desviación estándar

	Colesterol añadido	Control	Glucomanan	Glucomanano con espirulina	ANOVA
Glucemia (mg/dL)	No	331,50 $\pm$ 29,20 a	284,38 $\pm$ 32,44 b	278,25 $\pm$ 47,52 b	0,018
	Sí	189,29 $\pm$ 43,55 c*	254,13 $\pm$ 16,68 b	241,25 $\pm$ 24,52 b	<0,001
Insulinemia mUI/L	No	10,82 $\pm$ 2,04	8,96 $\pm$ 2,99	9,33 $\pm$ 2,12	0,23
	Sí	18,57 $\pm$ 6,29 a*	14,60 $\pm$ 5,23 ab	5,75 $\pm$ 1,40 c	<0,001
HOMA-IR	No	8,73 $\pm$ 1,64	6,23 $\pm$ 2,36	6,61 $\pm$ 1,95	0,13
	Sí	8,79 $\pm$ 4,13 a	9,07 $\pm$ 3,29 a	3,37 $\pm$ 0,83 b*	0,001
HOMA-IS	No	0,12 $\pm$ 0,03	0,16 $\pm$ 0,06	0,15 $\pm$ 0,04	0,25
	Sí	0,14 $\pm$ 0,07 b	0,12 $\pm$ 0,05 b	0,31 $\pm$ 0,08 a*	<0,001
HOMA-%B	No	14,93 $\pm$ 3,63	15,04 $\pm$ 5,20	15,59 $\pm$ 10,07	0,63
	Sí	61,61 $\pm$ 33,09 a*	28,03 $\pm$ 10,05 b	12,11 $\pm$ 3,75 b	<0,001
HOMA-D	No	1,73 $\pm$ 0,42 a	2,25 $\pm$ 0,75 ab	2,43 $\pm$ 0,68 b	0,034
	Sí	9,37 $\pm$ 3,83 a*	3,12 $\pm$ 0,51 b	3,63 $\pm$ 1,04 b	0,022
QUICKI	No	0,28 $\pm$ 0,01	0,29 $\pm$ 0,01	0,29 $\pm$ 0,01	0,41
	Sí	0,29 $\pm$ 0,02 b	0,28 $\pm$ 0,01 b	0,32 $\pm$ 0,01 a*	<0,001

a, b, c, implican variaciones significativas entre las tres dietas de una misma fila ( $p < 0,05$ , test de Bonferroni).

\* Señala diferencias significativas entre una misma dieta con o sin colesterol añadido ( $p < 0,05$ ).

Los niveles de adiponectina y leptina de las ratas control son indicativos de obesidad (Martínez Sesmero, 2013). Se ha sugerido que la comunicación entre los adipocitos y los macrófagos del tejido adiposo son la clave para el inicio y progreso de la inflamación en la obesidad. Algunos de los macrófagos son residentes habituales, pero otros son reclutados presumiblemente para eliminar restos de macrófagos y

lípidos oxidados, potencialmente tóxicos (Kim y cols., 2007). La hipertrofia del tejido adiposo conlleva reclutamiento de macrófagos e incremento de ácidos grasos, empeorando la resistencia a la insulina en el adipocito maduro (Serrano-Ríos M, 2011). El incremento de la adiponectina en el tejido adiposo debido al consumo de las dietas G y GS (16 y 20 veces, respectivamente; ambos  $p < 0,01$ ) no es fácil de explicar; sin embargo, ya que la adiponectina tiene propiedades antiinflamatorias (Panis y cols., 2014) puede especularse que su incremento estaría ligado a la reducción de la hipertrofia adipocitaria y de la inflamación en este tejido, posiblemente condicionando la retención de adiponectina en el tejido adiposo, lo que contribuiría a reducir sus niveles plasmáticos de esta citoquina.

En ratas Zucker delgadas, la leptina presenta niveles plasmáticos medios de 4 ng/mL, mientras que dichos niveles son 6 veces más elevados en ratas Zucker obesas (Hardie y cols., 1996). La cantidad de masa grasa condiciona la leptinemia (Considine y Caro, 1996). Esta citoquina fue más baja en las ratas del lote G y GS vs. C. Como la leptina tiene efectos negativos para la salud (Turkoglu y cols., 2014), la reducción encontrada en plasma en estos dos lotes puede considerarse positiva. La leptina adipocitaria fue mayor en el grupo GS que en el G, lo que se relaciona con la tendencia de las ratas GS a tener mayor índice adiposomático y grasa visceral.

Finucane y cols. (2009) propusieron que el cociente leptina/adiponectina en plasma sería un índice apropiado de la existencia de resistencia a la insulina. Niveles elevados de este cociente reflejarían una función alterada del tejido adiposo. Esta función no parece modificarse en las ratas fa/fa que consumen dietas sin colesterol añadido; en línea con la ausencia de cambios significativos en la cantidad de grasa del tejido adiposo.

Respecto a las ratas de los grupos que ingirieron dietas a las que se adicionó colesterol, todas las ratas del grupo HC presentaron hiperglucemia (glucemia  $> 7$  mmol/L), aunque su glucemia fue un 42% menor que la de las ratas fa/fa del grupo C, y sólo un 75% de ellas presentaron hiperglucemia severa ( $> 11,1$  mmol/L). Estos resultados debe interpretarse con cautela y deben relacionarse con la menor ganancia de peso experimentada por las ratas del grupo HC, pero no con la ingesta que no varió. Las diferencias en la glucemia permanecieron incluso después de ajustar los datos para el incremento de peso. Las dietas HG y HGS incrementaron, de forma inesperada, la glucemia con respecto a las HC. Vuksan y cols. (1999) describieron una reducción de la glucemia en pacientes diabéticos que consumieron harina de Konjac. Puede sugerirse que un exceso de colesterol a nivel intestinal interferiría con la retención de glucosa por la matriz del glucomanano, permitiendo una mayor absorción

de glucosa intestinal, lo que a su vez produciría una elevación de la glucemia en estas ratas. De hecho la hiperglucemia severa fue más prevalente en las ratas HG y HGS que en las ratas HC.

La insulinemia observada se agravó en el lote HC respecto al C, ya que un 75% de las ratas presentaron insulinemia  $>15$  mUI/L, nivel indicativo de hiperinsulinemia severa (Gesteiro y cols., 2009;Gesteiro y cols., 2011b). González-Torres en su Tesis Doctoral (prevista para 2016) encontró que la hipercolesterolemia, a pesar de la reducir el peso, empeoró la insulinemia en ratas Zucker fa/fa control alimentadas con restructurados cárnicos. La dieta HG no fue capaz de modificar la insulinemia observada en sus controles HC; sin embargo, la dieta HGS sí la redujo marcadamente respecto a la dieta HG, HC e incluso con respecto a las C. Un 62 % de las ratas HGS fueron normoinsulinémicas, lo que sugiere que incluso en circunstancias drásticas, la dieta con surimi enriquecido en glucomanano más espirulina fue capaz de mejorar sensiblemente la insulinemia. Ou y cols. (2013) han descrito que la espirulina reduce los niveles de insulina.

La resistencia a la insulina evaluada por el HOMA-IR no cambió en las ratas HC y HG respecto a sus controles respectivos C y G. Sin embargo, las ratas HGS tuvieron HOMA-IR significativamente menores respecto a las GS, ya que se necesitó mucha menos insulina para mantener la glucemia. Un 88% de las ratas HC tenían niveles de índices TyG compatibles con síndrome metabólico (Unger y cols., 2014). Las dietas HG y HGS redujeron significativamente dichos índices a valores inferiores incluso a las de ratas C, sugiriendo una notable mejoría de la resistencia a la insulina. Aunque como hemos discutido, HOMA-IR y TyG guardan una aceptable correlación, las modificaciones de ambos no son superponibles, por lo que se sugiere cautela a la hora de su extrapolación. Los índices HOMA-IS y QUICKI, indicativos de sensibilidad a la insulina (Livesey y cols., 2006;Katz y cols., 2000), mejoraron con la dieta HGS, aspecto que corrobora los beneficios de la inclusión de espirulina a los surimis con glucomanano para la insulina y el HOMA-IR ya comentados anteriormente.

La leptinemia se redujo en las ratas alimentadas con dietas conteniendo colesterol respecto a sus basales sin la adición del mismo. Estos datos son consecuencia de la reducción de la masa grasa observada (Sainz y cols., 2015); sin embargo, la adiponectinemia no se modificó de forma significativa entre los grupos HC, HG y HGS. Siguiendo el criterio expuesto anteriormente, las ratas HC vs. C presentarían una función mejorada del tejido adiposo, ya que el cociente adiponectina/leptina se incrementa enormemente. No obstante, dicho cociente disminuye en plasma por el consumo de la dieta HG, sugiriendo un efecto negativo del

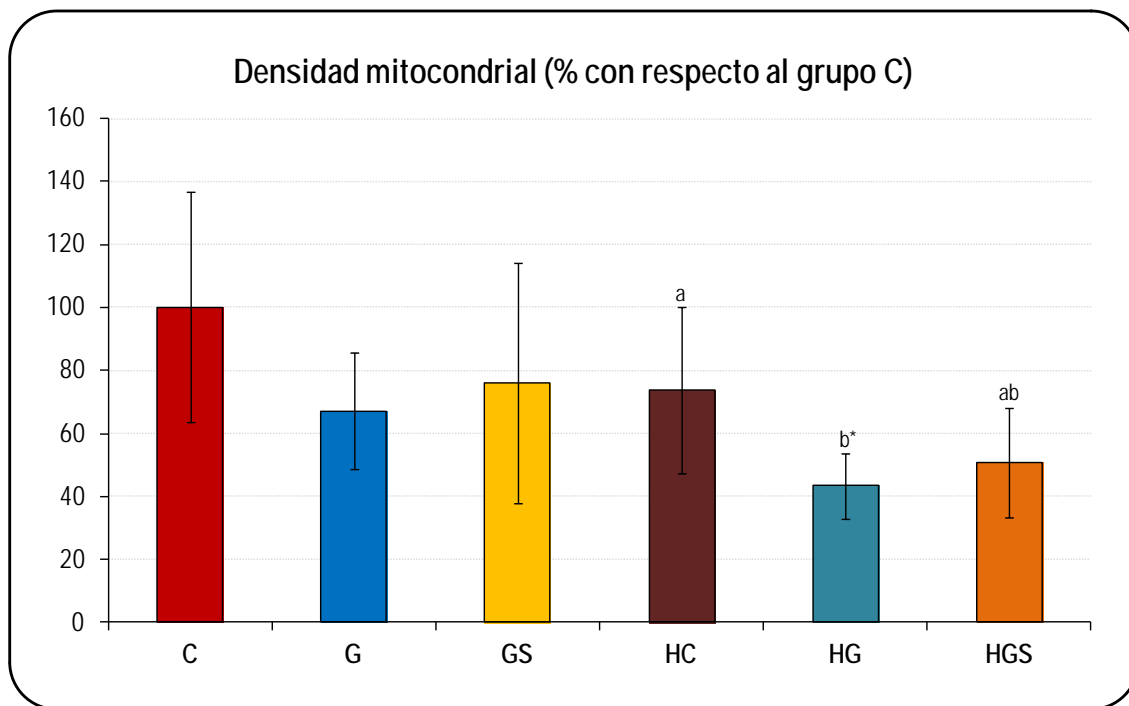
consumo de glucomanano en el marco de dietas hipercolesterolemiantes, que se ve parcialmente bloqueado con la inclusión de espirulina junto al glucomanano.

## 6.7. OBJETIVO 7: DETERMINAR LA INCIDENCIA SOBRE EL METABOLISMO GRASO EN EL TEJIDO ADIPOSO MIDIENDO LA DENSIDAD MITOCONDRIAL.

Wei y Florez (2010) observaron en pacientes con DMT2 y obesidad un envejecimiento de las mitocondrias del tejido adiposo que reduce su capacidad para oxidar las grasas, disminuyendo la síntesis de ATP y se observándose una disminución del número total de mitocondrias o de la cantidad de mitocondrias útiles. Hoevenaars (2014) estableció una clara relación entre obesidad, estrés oxidativo, inflamación y resistencia a la insulina, que inducen una menor densidad mitocondrial en el tejido adiposo de ratones sometidos a condiciones de hipoxia similares a las generadas por la obesidad.

Los resultados obtenidos en las ratas fa/fa alimentadas con surimis de calamar enriquecidos con glucomanano y/o espirulina se presentan en la **figura 6.6**. En comparación con la dieta C, las dietas no enriquecidas en colesterol conteniendo glucomanano no presentan cambios significativos, aunque se percibe una ligera tendencia a la reducción de la densidad mitocondrial. Como los resultados expuestos con anterioridad apuntan a reducciones de los parámetros de síndrome metabólico, interpretamos que tiene lugar una mejora del fisiologismo de las mitocondrias que, al ser más funcionales, demandan una menor expresión de las mismas para el mantenimiento de un correcto balance energético. La inducción de hipercolesterolemia exacerbó los resultados observados para las ratas sin colesterol añadido: la densidad mitocondrial se vió reducida en todos los casos, aunque sólo de forma significativa en el grupo HG vs. G, en línea con lo comentado por Hoevenaars (2014), ya que las condiciones de estrés oxidativo de las ratas que consumieron dietas hipercolesterolemiantes fueron francamente más drásticas. De nuevo, las dietas con glucomanano añadido en el marco de la hipercolesterolemia tendieron a reducir la densidad mitocondrial, lo que interpretamos como una mejora de la funcionalidad mitocondrial.

Aunque de manera no significativa, probablemente debido a las pequeñas dosis empleadas de espirulina, las dietas GS y HGS tienden a presentar una densidad mitocondrial mayor que las G y HG, respectivamente. La espirulina contiene polifenoles, que han demostrado elevar la termogénesis interactuando con los receptores  $\beta$ -3 adrenérgicos, así como inhibiendo la degradación de noradrenalina (Most y cols., 2014), explicando una mayor demanda energética y, así aumentando la densidad mitocondrial.



**Figura 6.6.** Densidad mitocondrial de las diferentes dietas experimentales: C, dieta hipergrasa con 30% de surimi control con celulosa microcristalina; G, surimi con un 15% de glucomanano añadido; GS, surimi con un 15% de glucomanano y 3 gramos de espirulina/kg dieta. HC, HG y HGS son equivalentes a C, G y GS con la adición de un agente hipercolesterolemiante. Los valores que presentaron diferencias significativas entre los grupos con o sin colesterol añadido se marcaron con letras diferentes ( $P \leq 0.05$ , test de Bonferroni). Cada tipo de dieta, comparado con su equivalente con colesterol añadido se marcó con \* ( $P \leq 0.05$ ).

## 6.8. DISCUSIÓN INTEGRADORA

En los apartados de la discusión 6.1 a 6.7 se han expuesto de forma detallada diferentes aspectos con la finalidad de responder a los objetivos planteados.

En esta sección pretendemos integrar los efectos ya discutidos individualmente considerando las posibles acciones de la ingesta de surimis de calamar, enriquecidos o no con glucomanano o con glucomanano más espirulina, en un modelo de obesidad/DMT2. También se pretende analizar por qué la situación fisiológica y metabólica se complica por la adición de agentes hipercolesterolemiantes que modifican de manera terminante la respuesta a la dieta en la rata fa/fa.

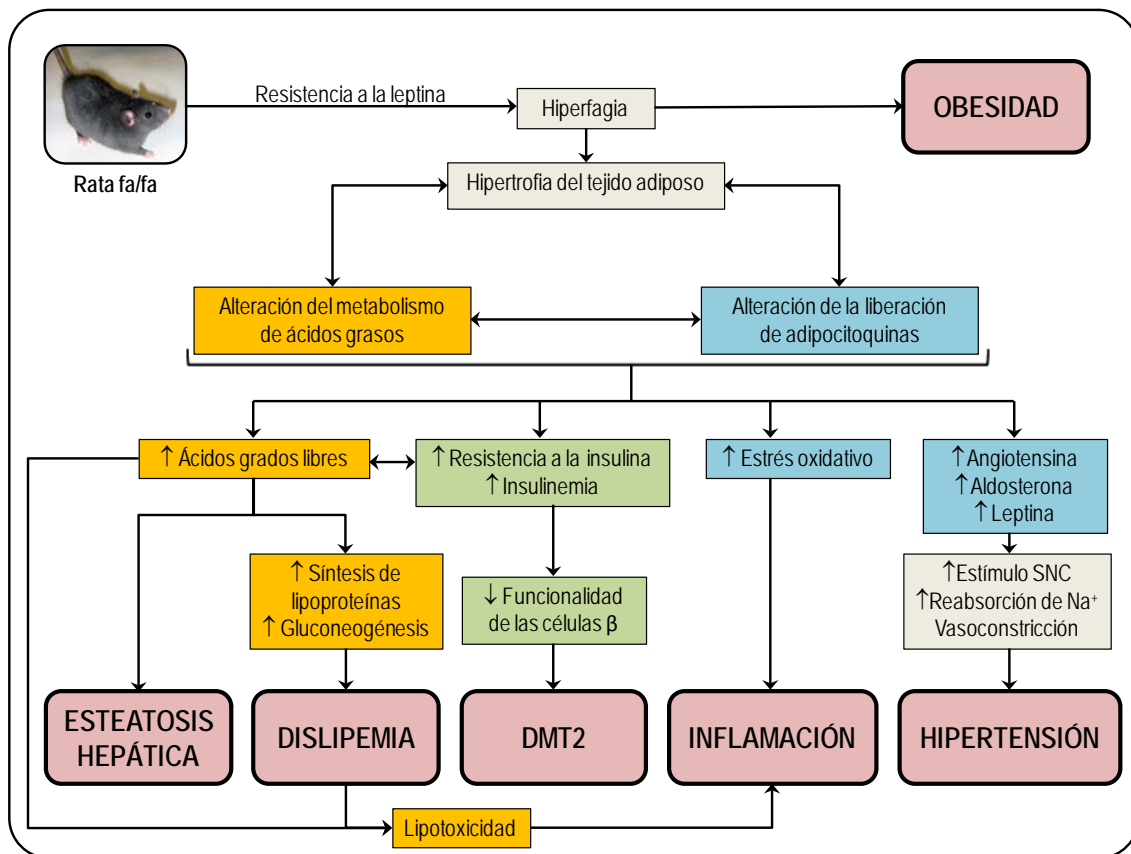
En concreto se revisarán los aspectos definidos en la bibliografía en este modelo experimental, tanto bajo el punto de vista de obesidad como de diabetes o de hiperlipemia, particularmente relacionada con la presencia incrementada de partículas VLDL y reducida de HDL, de gran impacto cardio-metabólico en la diabetes y en el síndrome metabólico (Carmena, 2010). Con la finalidad de acercarnos a los mecanismos moleculares modulados por la ingestión de los surimis de calamar estudiados, se revisarán algunas propiedades del glucomanano y de la espirulina que pudieran afectar tanto a la ingesta como a los efectos estudiados, siempre en el marco de ratas fa/fa sometidas a dietas ricas en grasa saturada y energía.

La rata Zucker fa/fa es un animal que posee una mutación en el gen codificante del receptor de leptina (Friedman, 2011) y desarrolla espontáneamente obesidad, hiperglicemia, hiperlipidemia y resistencia a la insulina (Leonard y cols., 2005). Nuestras ratas eran jóvenes, de unas 13 semanas de vida, que desarrollaron las características ya comentadas. Es llamativa la hiperfagia observada, a pesar de que las ratas consumían dietas hiperenergéticas muy saturadas, donde cabría esperar unas ingestas menores para conseguir adecuar la energía necesaria para un crecimiento adecuado.

A pesar de que el glucomanano no modificó la ingesta, su aporte sí redujo el índice de conversión dieta/peso animal respecto al control. Así, podría afirmarse que por cada kJ consumido de dieta G o GS, las ratas ganaron entre 0,002–0,005 g menos que las ratas control, lo que supone un beneficio indudable, dada la implicación fisiopatológica negativa del incremento de peso (Fruhbeck, 2010).

La hiperfagia observada en las ratas del grupo C produjo hipertrofia del tejido adiposo a nivel perirrenal más gonadal, hecho indicativo de obesidad central o visceral en la rata fa/fa (Chentouf y cols., 2011). El incremento exagerado del tejido adiposo

conduce a alteraciones importantes en el metabolismo de los ácidos grasos (O'Neill y O'Driscoll, 2015) y a alteraciones en la liberación y control de la adipocitoquinas (Adams-Huet y cols., 2014). Estas alteraciones impulsan diferentes mecanismos que implican alteraciones en la lipemia, resistencia a la insulina, estrés oxidativo e inflamatorio (**figura 6.7**). Si bien la hipertrofia también se encontró en los grupos G y GS, la cantidad de grasa perirrenal más gonadal tendió a ser menor en estos lotes que en el control, particularmente en el grupo G.



**Figura 6.7.** Resumen esquemático de las diferentes alteraciones relacionadas con el síndrome metabólico. Adaptado de XXXX.

La expansión del tejido adiposo es un factor importante en el desarrollo del síndrome metabólico como nexo entre obesidad y resistencia insulínica. El tejido adiposo visceral se encuentra directamente conectado con el hígado a través de la vena porta, lo que representa una amenaza para este órgano, cuya integridad y funcionalidad están comprometidas (p.ej. por el exceso de aporte de AGL) en el síndrome metabólico (Arner, 2002). La resistencia a la insulina inducida en la ratas fa/fa promueve una liberación incrementada de ácidos grasos y glicerol desde los

adipocitos repletos de grasa. El exceso de ácidos grasos que llegan al hígado contribuye a la formación incrementada de VLDL enriquecidas en triglicéridos, aspecto clave de la lipemia observada en diabetes tipo 2 (Carmena, 2010) y en la rata Zucker fa/fa (Aleixandre De Artiñano y Miguel Castro, 2009). En nuestro estudio un porcentaje elevado de ratas control presentaban severa hipertrigliceridemia ( $> 150$  mg/dL), incluso superior a lo observado por Bocanegra y cols. (2009) en ratas en situación postprandial. Aproximadamente un 80% de los triglicéridos es transportado por las VLDL, las cuales aparecen en gran medida enriquecidas en este lípido (**figura 6.4**). Aunque el transporte de colesterol se realiza fundamentalmente por la fracción HDL, es llamativa la presencia incrementada de IDL+LDL en estas ratas control. Debe recordarse que la rata no obesa/no diabética presenta niveles muy reducidos de LDL-colesterol y de lipoproteínas remanentes por existir una transferencia muy limitada de componentes de VLDL a las LDL y por la captación muy rápida de las VLDL por el hígado (Bilheimer y cols., 1972). Observamos también que las HDL aparecen enriquecidas en TG. Por tanto el perfil dislipémico de las ratas control es típico de una rata diabética. El aporte de G y GS modificó la lipemia y redujo la trigliceridemia y los niveles de VLDL-TG (**figura 6.4**). Estos resultados pueden relacionarse con la tendencia a la disminución ponderal del tejido adiposo visceral en estos animales. A su vez se observa una reducción en el transporte de colesterol y en menor cuantía de TG por la fracción IDL+LDL. En definitiva las ratas G y GS presentan un perfil lipoproteico mucho más normalizado que las ratas C, lo que de nuevo supone un beneficio potencial del consumo de estas dietas en animales diabéticos.

La hiperglucemia de la rata Zucker fa/fa aparece entre la semana 7 y 12 de vida. Si bien algunos autores han comentado que la situación a las 13 semanas es de prediabetes, en nuestro caso la hiperglucemia de las ratas control fue muy severa (18,4 mmol/L), indicativa de DMT2, lo que supone un agravamiento neto del metabolismo hidrocarbonado. A su vez estas ratas desarrollaron RI, tal como señala el HOMA-IR, promovida en este modelo de obesidad por la elevada ingesta de dieta hipersaturada (Yang y cols., 2014). Se ha descrito que los AGS en exceso inducen RI (Sanchez-Muniz y cols., 2013). Además, atendiendo a los valores del índice TyG, las ratas control tendrían síndrome metabólico (Unger y cols., 2014), ya que superan el valor medio propuesto en humanos con síndrome metabólico de 9,1. No obstante, diferencias de especies, podrían limitar la validez de este índice y la extrapolación de los datos. Debe recordarse que las ratas fa/fa desarrollan hiperleptinemia a causa de la expansión del tejido adiposo, lo que explica que los niveles en nuestras ratas control superen con creces los de ratas delgadas.

El aporte de los surimis con glucomanano y glucomanano más espirulina redujo los niveles de glucosa, posiblemente por el efecto de retención la misma por la matriz del glucomanano y por los menores efectos expansivos que se producen en el tejido adiposo de estos animales. Aunque las ratas G y GS siguen siendo obesas, se observa en ellas una tendencia a la reducción de la resistencia a la insulina, estimada tanto por los índices HOMA-IR como por el TyG, y una mayor disponibilidad celular de insulina, según informa el HOMA-D. La menor expansión del tejido adiposo se corrobora también por la reducción de los niveles de leptina en plasma. Esta reducción también es beneficiosa, ya que tanto en obesidad como en diabetes se ha observado activación por esta hormona de macrófagos residentes (Luan y cols., 2014). También parece evidente que se plantea una mejoría en la concentración de adipocitoquinas, siendo notable el marcadísimo incremento encontrado de adiponectina en tejido adiposo y del cociente adiponectina/leptina en este órgano.

En la **figura 6.8** se resume de forma evidente los beneficios del consumo de G y GS respecto al lote control. En ella están relativizados los resultados de los 3 lotes a las cantidades que se consideran límites o “cut-off points” para Diabetes tipo 2. No obstante para la leptinemia se ha utilizado el valor 4 ng/mL que Hardie y cols. (1996) señalan como valor normal para ratas delgadas.

Tanto en los casos de obesidad como de DMT2 existe un defecto intrínseco en la capacidad mitocondrial para oxidar la grasa (Wei y Florez, 2010). Los defectos en la mitocondria pueden estar originados por una disminución en el número de mitocondrias útiles en el músculo esquelético o bien por una reducción en el número global de mitocondrias o por una combinación de ambos fallos. Los tres escenarios originan una rebaja en la tasa de síntesis de ATP. No obstante, las anomalías morfológicas en la mitocondria observadas en individuos con resistencia a la insulina son reversibles con la pérdida de peso y la práctica de ejercicio (Petersen y cols., 2003).

En las ratas alimentadas con dietas con glucomanano pero sin colesterol, la densidad mitocondrial tiende a reducirse, aspecto, que lejos de significar daño mitocondrial, podría ser interpretado de otra forma. Así, puede especularse que en el lote control, debido a la RI, obesidad y estrés oxidativo, las mitocondrias aparecen envejecidas, demandándose una mayor expresión mitocondrial para contrarrestar tal situación. La reducción de la expansión del tejido adiposo en los lotes G y GS implicaría menor demanda a nivel del tejido adiposo de número y actividad mitocondrial.

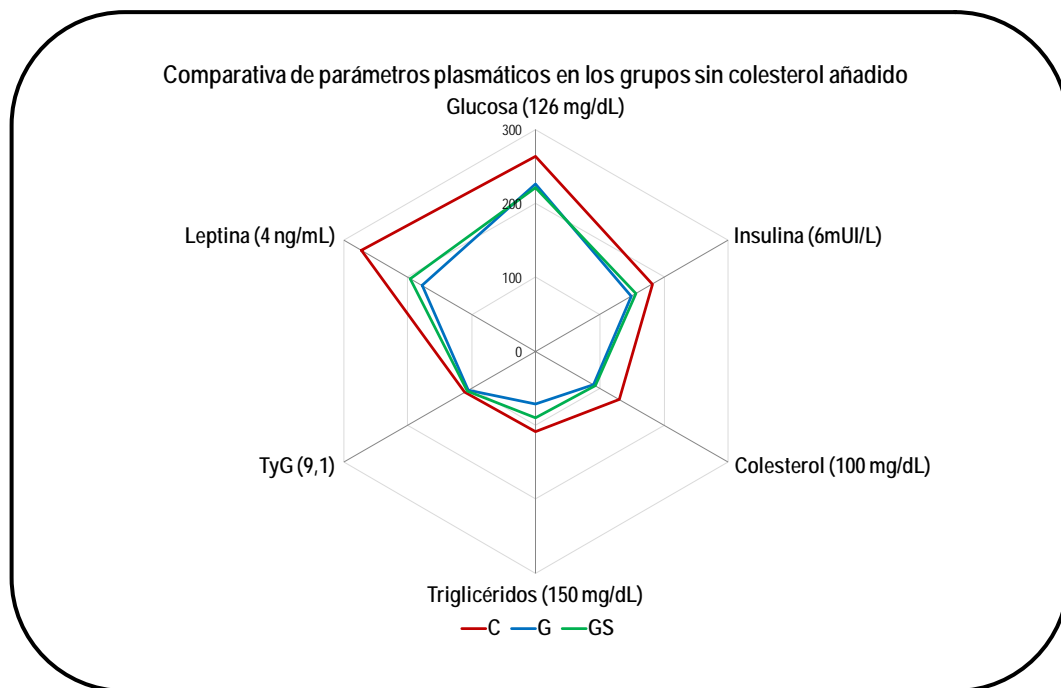


Figura 6.8. Comparación de diferentes biomarcadores en C, G y GS fal/fa ratas alimentadas con dietas hiperenergéticas ricas en grasa saturada conteniendo surimi de calamar control, enriquecido en glucomanano y en glucomanano más espirulina, respectivamente. Los valores utilizados como valores de referencia se relativizaron al valor 100.

El análisis histológico de las ratas control señaló, como era de esperar, la presencia de hígado graso, con un score de daño de 51 sobre un máximo de 80, como consecuencia de la obesidad y la diabetes, así como cierto grado de inflamación como consecuencia de la RI. También el cociente AST/ALT es cercano a 1 e indica la existencia de hígado graso.

La esteatosis se redujo de forma marcada con el consumo de dietas G y GS. Los scores de alteración total fueron mucho menores, aunque se observó inflamación en ciertas áreas periportales en las ratas G.

En consonancia con el estudio histológico y con la reducción de algunos aspectos negativos ligados a la RI, el consumo de G y GS mejoró el estatus del glutatión. Aunque la dieta G incrementó los niveles GR, redujo los de eNOS e incrementó los de iNOS y TNF- $\alpha$ , sugiriendo cierto grado de inflamación. La inclusión de dieta GS mantuvo los mecanismos antioxidantes del G y redujo la inflamación observada.

El estatus antioxidante de las ratas control fue, a juzgar por todos los marcadores medidos, deficitario. La inclusión de glucomanano o glucomanano y

espirulina en las dietas, dentro de una matriz de surimi de calamar, provocó una disminución de la expresión CYP7A1, debida a la menor demanda de excreción de colesterol generada por estas dietas hipolipemiantes; y una interesante mejora de los niveles de glutatión reducido. Esta mejora se debe probablemente a un aumento de los niveles de GR, lo que a su vez está relacionado con la reducción de la glucemia inducida por estas dietas, activando la vía de la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa. La dieta que contiene espirulina sólo se diferenció de la que únicamente incluía glucomanano en una pequeña disminución de SOD y aumento de la GPx, sugiriendo una modesta actividad antioxidante extra de la espirulina al eliminar radicales superóxidos.

Dado que las dietas consumidas en la actualidad no sólo inducen obesidad, sino que además implican elevación en las lipoproteínas aterogénicas, se estudió en ratas fa/fa alimentadas con dietas aterogénicas los posibles mecanismos que ocurrían durante la inducción hipercolesterolemia y los posibles efectos protectores derivados de la inclusión en las dietas de surimis enriquecidos en glucomanano y glucomanano más espirulina.

La hiperfagia fue patente en los animales HC (25 g/día) y similar a lo observado en los animales control (C) alimentados con las mismas dietas sin colesterol. Sin embargo, el incremento de peso y las curvas de crecimiento fueron mucho menores, al igual que lo encontrado por otros autores en animales que ingerían dietas adicionadas con colesterol (Beynen y cols., 1984), que sugiere la existencia de ajustes ponderales para bloquear ciertos procesos modulados por la inducción hipercolesterolemia. De hecho tanto la cantidad de grasa visceral como el índice relativo graso se redujeron de forma importante.

Puede especularse que cantidades elevadas de AGL llegan al hígado, desde el tejido adiposo contribuyendo a reducir la expansión del tejido adiposo, posiblemente para esterificar el colesterol hepático y permitir su inclusión en las VLDL. No obstante este proceso no sería totalmente beneficioso pues agravaría la IR, debido a la presencia tóxica de los AGL que llegan al hígado en exceso.

En efecto en las ratas del grupo HC respecto a las del grupo C se observa un incremento marcadísimo de colesterol plasmático y de VLDL enriquecidas en colesterol ( $\beta$ -VLDL) y una elevación de los niveles de insulina del 80%. El perfil lipoproteico de las ratas HC evidencia un marcado empeoramiento respecto a las C con reducción de las HDL y presencia marcada de lipoproteínas remanentes IDL+LDL enriquecidas en TG.

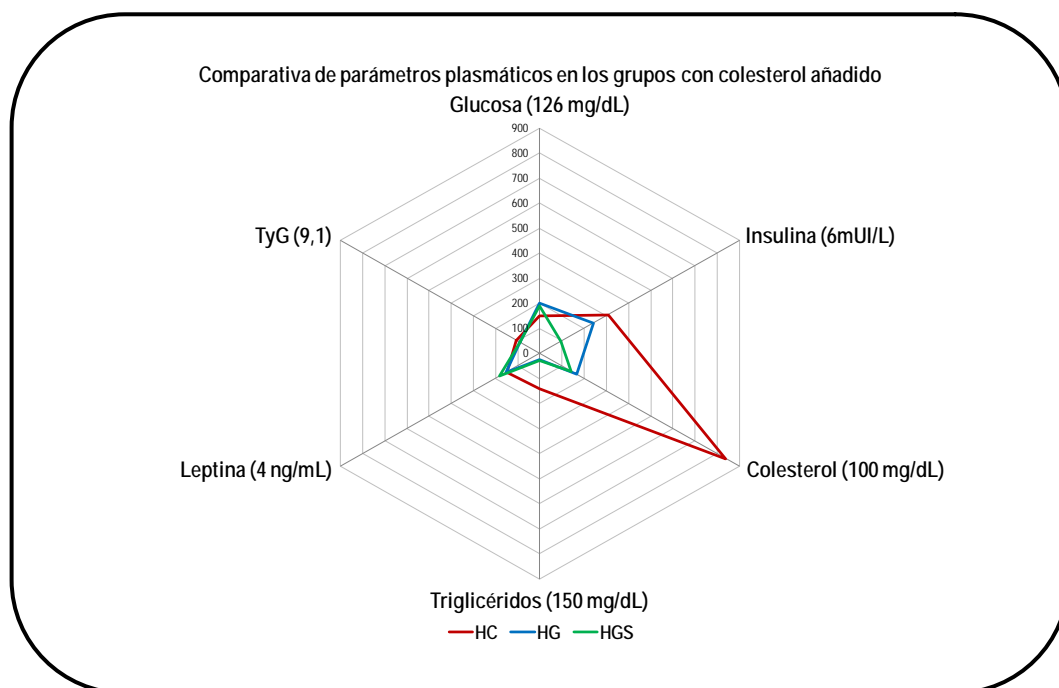
La inclusión de surimis con glucomanano o glucomanano más espirulina en las dietas hipercolesterolemiantes no afectó a la ingesta, recordando lo comentado líneas arriba de que el posible incremento de leptina en el estómago por la formación de geles de glucomanano fue ineficaz en la regulación de la ingesta debido a la leptino-resistencia de las ratas fa/fa. Sin embargo, las curvas de crecimiento se ralentizan mucho más en los lotes HG y HGS que en las ratas HC, sugiriendo cierto bloqueo de componentes de la dieta (p.ej. grasa y colesterol) por el glucomanano sólo o en conjunción con la espirulina. De hecho la inducción hipercolesterolemia observada en el lote HG se redujo 9 veces en el lote HG y 14 veces en el HGS. El contenido total de lípidos de las VLDL y de las IDL+LDL también disminuyó de forma neta, normalizando prácticamente el perfil lipoproteico.

Todas las ratas que recibieron dietas enriquecidas en colesterol tuvieron hiperglucemia, aunque ésta fue algo más marcada en los grupos HG y HGS. La insulinemia de las ratas HGS se redujo de forma significativa, pero su glucemia fue equivalente a la de las ratas HG, lo que sugiere beneficios extras inducidos por la espirulina, a nivel de la resistencia/sensibilidad a la insulina. El índice TyG mejoró de forma significativa en las ratas HG y HGS vs. HC. Así, las ratas HC, según el índice TyG, padecen síndrome metabólico, mientras que las de los grupos HG y HGS tuvieron niveles medios similares a los de individuos sin síndrome metabólico (Unger y cols., 2014).

En los lotes con agente hipercolesterolemia añadido se puede observar también una reducción de la densidad mitocondrial del tejido adiposo blanco, de nuevo relacionada con una menor hipertrofia de este tejido. Al comparar los grupos entre sí, nuevamente se observa que el grupo control hipercolesterolémico presentó concentraciones más elevadas de mitocondrias que los grupos hipercolesterolémicos con glucomanano o glucomanano más espirulina, sugiriendo un mayor daño por estrés oxidativo en las mitocondrias que elevaría su expresión para compensar cierta deficiencia en su actividad.

En cuanto al análisis histológico en las ratas con hipercolesterolemia inducida, se puede observar en el grupo HC una alteración total elevada con respecto al grupo C, debido principalmente a una mayor balonización de los hepatocitos junto a una grave inflamación periportal, consecuencia directa de la esteatosis e inflamación inducidas por la hipercolesterolemia severa en el marco de la obesidad y la DMT2. El consumo de las dietas HG y HGS tendió a reducir de manera no significativa la esteatosis. En el caso de la dieta HGS, se observa además una menor balonización de las células hepáticas e inflamación periportal, indicando un efecto positivo extra de la

espirulina sobre estos marcadores de daño hepático, llegando incluso a los niveles de alteración observados tras el consumo de la dieta C.



**Figura 6.9.** Niveles de diferentes biomarcadores en ratas *fa/fa* alimentadas con dietas hiperenergéticas ricas en grasas saturadas, a las que se adicionó colesterol y ácido cólico como agentes hipercolesterolemiantes, conteniendo surimi de calamar control, enriquecido en glucomanano y en glucomanano más espirulina (HC, HG y HGS, respectivamente). Los valores utilizados como valores de referencia se relativizaron al valor 100.

La dieta HC redujo de forma importante el sistema del glutatión con respecto a la C, indicativo de un aumento del ciclo de generación y eliminación de radicales superóxido, y de una disminución de la CAT como la observada en casos de diabetes (Dhaunsi y cols., 2010). También se observan ciertos efectos compensadores en las enzimas antioxidantes para tratar de mejorar el balance entre el glutatión reducido y el oxidado. Los grupos HG y HGS incrementaron significativamente el índice redox, resultando en valores similares a los de la dieta C. A juzgar por los resultados sobre las enzimas antioxidantes, éstos parecen indicar una menor generación de radicales superóxido por las dietas que contienen glucomanano en hipercolesterolemia. La dieta HG aumenta los valores de CAT y GPx, y por tanto la capacidad de eliminación de peróxidos, relacionado con la disminución de la insulinemia observada (Dhaunsi y cols., 2010), sin olvidar los efectos antioxidantes atribuidos al glucomanano. La dieta HGS, mantuvo los resultados antioxidantes de la dieta HG, presentando una modesta

mejora por la reducción de expresiones de enzimas antioxidantes, y también relacionados con una disminución aún mayor de la insulinemia.

Como ocurría en las dietas sin colesterol añadido, el glucomanano en la dieta HG indujo cierto nivel de inflamación, a juzgar por el balance eNOS/iNOS y los valores de TNF- $\alpha$ . Sin embargo, la dieta HGS bloqueó la inflamación de la dieta HG, sin menoscabo sus efectos antioxidantes.

### 6.8.1. *Integrated Discussion*

Different aspects of our research have been exposed in detail from section 6.1 to section 6.8, aiming to answer the different objectives set on this PhD memory.

In the present section it is our intention to integrate the effects already individually discussed considering the potential properties of squid surimi, either enricher or not with glucomannan or glucomannan plus spirulina, in an obesity/DMT2 model. It is also our goal to understand why the physiological and metabolic status is impaired by the consumption of hypercholesterolemic agents, which modify greatly the response to diet of fa/fa rats.

Particularly, the aspects defined on references for this experimental model, from the obesity/DMT2 or the dyslipemia point of view, are going to be revised (Carmena, 2010). Trying to analyze the molecular mechanisms modulated by the ingestion of the studied squid surimis, some compounds of glucomannan and spirulina that may affect the intake or the studied effects in the frame of fa/fa rats fed high saturated and high energy diets will be revised too.

The Zucker fa/fa rat has a mutation in the leptin receptor (Friedman, 2011) and develops obesity, hyperglycemia, hyperlipidemia and insulin resistance (Leonard y cols., 2005). Our rats were young, around 13 weeks old, and developed the already commented characteristics. It is impressive the high daily intake observed, taking into account that the rats consumed hyper-energetic high fat diets, that theoretically would lead to lower intakes to get to the adequate energy for their maintenance and growing.

Glucomannan did not modify the intake, but lowered the conversion intake/weight gain ratio with respect to that of the control. Thus, it can be assumed that each kJ consumed of G or GS diet led to a 0.002-0.005 g less weight gain than the C diet consumption did, which is an undoubtedly beneficial, given the negative physiological implication of weight gain in obesity (Fruhbeck, 2010).

The high intake observed in C rats led to an adipose tissue hypertrophy, particularly at perirrenal plus gonadal levels, suggesting central obesity (Chentouf y cols., 2011). The exaggerated increase of the adipose tissue led to important alterations of both the fatty acids metabolism (O'Neill y O'Driscoll, 2015) and adipokines control and release (Adams-Huet y cols., 2014). These alterations impulsed different mechanisms inducing lipidemia alterations, insulin resistance, oxidative stress, and inflammation (**figure 6.7bis**). Although adipose tissue hypertrophy was also observed

in G and GS groups, the amount of perirrenal plus gonadal fat observed was lower than in the control, particularly in G group.

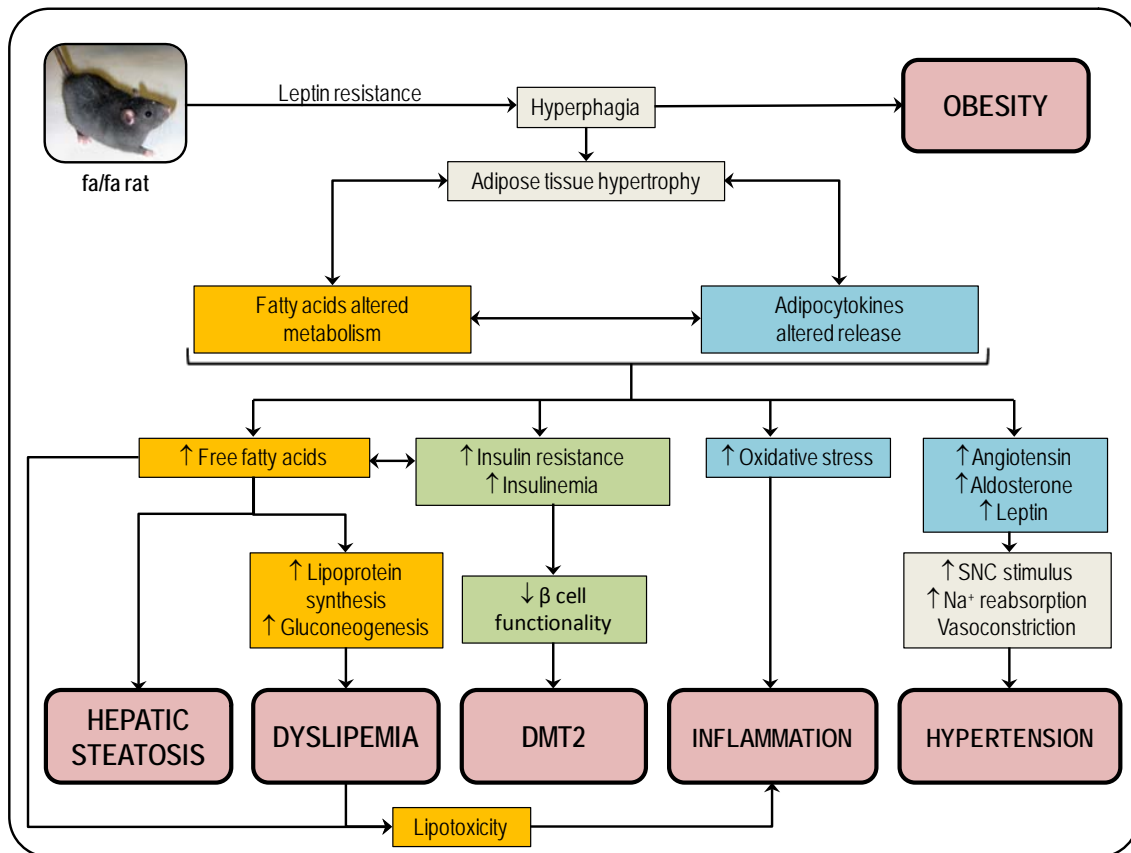


Figure 6.7bis. Schematic overview of the different alterations related to metabolic syndrome. Adapted from XXXX.

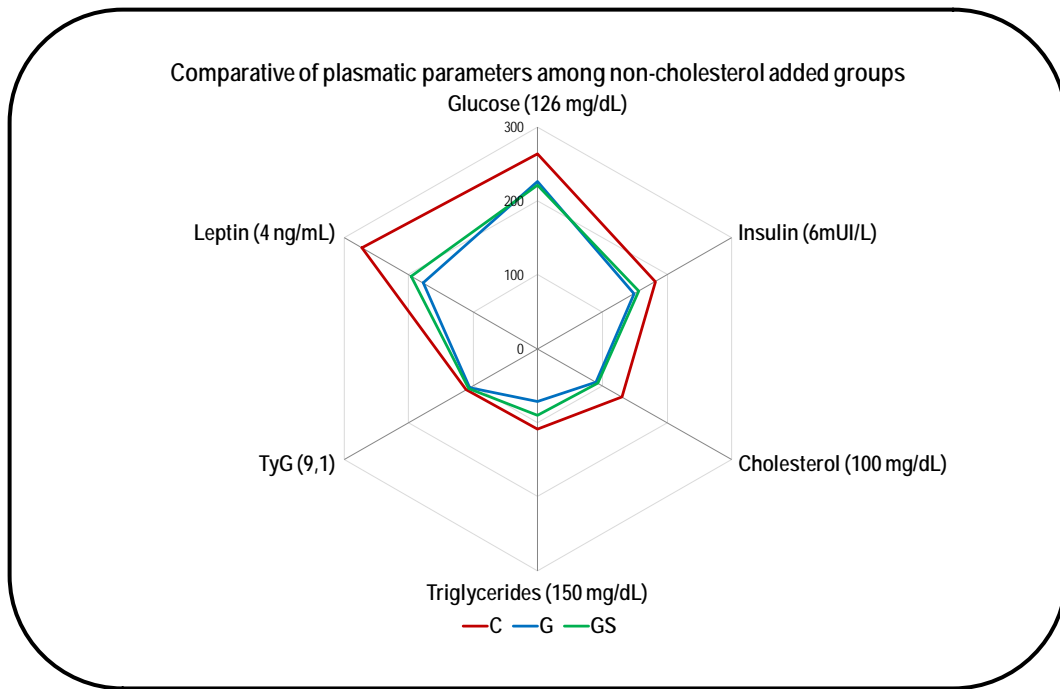
Adipose tissue expansion, as a link between obesity and insulin resistance, is an important factor for the metabolic syndrome development. Visceral adipose tissue is directly connected to liver through the porta vein, which represents a threat for this organ, whose integrity and functionality, for excessive free fatty acids uptake, could be compromised in the metabolic syndrome (Arner, 2002). Insulin resistance induced in fa/fa rats promotes a release of free fatty acids and glycerol from the fat-repleted adipocytes. The excessive amount of free fatty acids entering into the liver contributes to raise the formation of cholesterol-enriched VLDL particles, key aspect of the DMT2 (Carmena, 2010) and in the Zucker fa/fa rat lipemia (Aleixandre De Artiñano y Miguel Castro, 2009). In our study, a high percentage of control rats showed severe hypertriglyceridemia (> 150 mg/dL), even superior to the observed by Bocanegra y cols. (2009) in postprandial rats. Nearly 80% of TG were transported by VLDL, which were highly enriched in this lipid (figure 6.4).

Although HDL fraction appears as the major cholesterol carrier, it has to be pointed out the increased presence of IDL+LDL in control rats. Usually, the non-diabetic / non-obese rat shows very low levels of LDL-cholesterol and of remnant lipoproteins due to very limited component transference from VLDL to LDL and the quick uptake of VLDL by the liver (Bilheimer y cols., 1972). We also observed that HDL appeared TG-enriched. Thus, the dyslipidemic profile of control rats concurs with diabetes. G or GS diets modified lipidemia and decreased triglyceridemia and TG-VLDL levels (**figure 6.4**). These results can be related to the adipose tissue weight-lowering tendency observed in those animals. Parallely, it was observed a reduction of cholesterol and, in less quantity TG, transported by the IDL+LDL fraction. In conclusion, G and GS rats show a normalized lipoprotein profile in comparison to C rats, which means a potential benefit of the consumption of these diets by diabetics.

Hyperglycemia in Zucker fa/fa rat appears at the 7-12<sup>th</sup> week of life. Some authors have reported a prediabetes state at 13<sup>th</sup> week, but in our case rats showed severe hyperglycemia (18.4 mmol/L), which is a clear DMT2 indicator and suggest aggravation of the carbohydrates metabolism. Consequently, these rats developed insulin resistance, as pointed by HOMA-IR data, potentiated by the high intake of a high saturated fat diet (Yang y cols., 2014). It has been described that free fatty acid excess promotes insulin resistance (Sanchez-Muniz y cols., 2013). Moreover, attending to the TyG index values observed, control rats would have both DMT2 and metabolic syndrome (Unger y cols., 2014), as their values were over the human-proposed cut-off point. However, differences on species could reduce the utility and validity of extrapolation of this index. It is important to remind that fa/fa rats develop hyperleptinemia due to adipose tissue expansion, which would explain why in our rats the levels observed overwhelmed those observed in lean rats.

Glucosaminan and glucosaminan plus spirulina enriched surimis reduced glycemia, probably due to glucose retention into glucosaminan matrix and for the lower adipose tissue expansion produced in those animals. Although G and GS rats are also obese, it can be observed in them a tendency to decrease insulin resistance and to elvate insulin availability, according to HOMA-IR, TyG and HOMA-D values. The lower adipose tissue expression is corroborated by the leptinemia reduction. This decrease also represents a benefit, as resident macrophages activation due to high leptin values is observed in obesity and DMT2 (Luan y cols., 2014). It also seems evident that an improvement of adipokines concentrations did happen, being remarkable the raise of adipose tissue adiponectin and the adiponectin/leptin ratio in this tissue.

The benefits of G and GS consumption with respect to C are clearly summarized in the **figure 6.8bis**, where the results of the three groups were related to the cut-off points for DMT2. We have used the cut-off point of 4 ng/mL for leptinemia, stated as “normal” value for lean rats by (Hardie y cols., 1996).



**Figure 6.8bis.** Comparison of different biomarkers in C, G and GS fa/fa rats fed with hyperenergetic, high saturated fat diets containing control squid surimi, or glucomannan- or glucomannan plus spirulina-squid surimi, respectively. Cut-off points used were set at the 100 level.

In obesity or DMT2 there is a flaw on mitochondrial density capacity to oxidize fats (Wei y Florez, 2010). It can be originated by a reduction of useful mitochondria on skeletal muscle or the total mitochondrion number, or maybe a combination of both factors. Any of the possible scenarios result on ATP synthesis rate reduction. However, morphological abnormalities of mitochondria observed on insulin resistant patients can be reverted with weight loss and exercise (Petersen y cols., 2003).

Mitochondrial density tended to be lower in glucomannan but non-cholesterol fed rats that can suggest not mitochondrial damage but a mitochondrial protection due to glucomannan. Thus, C rats, due to their insulin resistance, obesity and oxidative stress, would have damaged mitochondria, demanding higher expression of them to guarantee a proper metabolism. Adipose tissue lower expansion in G and GS groups

would imply fewer mitochondrial number and activity demands on white adipose tissue. Nonetheless, other mechanisms could be engaged.

Histological analysis of the C group revealed, as expected, the presence of non-alcoholic fatty liver disease, showing a damage score of 51 over a maximum of 80, suggesting fatty liver due to obesity and DMT2, and a certain inflammation grade due to insulin resistance. AST/ALT ratio was also close to 1, suggesting fatty liver development.

Steatosis was markedly reduced following G and GS consumption; in fact, although some inflammation was observed in certain periportal areas of G rats, total alteration scores were much lower,

The histological report and the reduction of some negative aspects linked to insulin resistance suggest that G and GS consumption improved glutation status. Although G diet promoted GR levels increase, certain grade of inflammation occurs, as eNOS was reduced while iNOS and TNF- $\alpha$  increased. GS diet maintained the antioxidant mechanisms of G diet but reduced the inflammation observed.

Taking into account all the markers determined, antioxidant status of control rats was deficient. Glucomannan or glucomannan plus spirulina inclusion into diets, in a squid surimi diet, led to CYP7A1 expression decrease, due to lower demand of cholesterol excretion induced by these hipolipemic diets; and an interesting improvement of reduced glutathione levels. This improvement was caused by a GR levels increase, which in turn is related to the glycemic improvement induced by glucomannan added diets, activating the glucose-6-phosphate dehydrogenase pathway. The diet containing spirulina, in comparison to that of glucomannan induced a slight SOD decrease and GPx increase, suggesting an antioxidant extra activity of spirulina in eliminating superoxide radicals.

As diets consumed nowadays not only induce obesity but also imply atherogenic lipoproteins increase, we also studied possible mechanisms induced during hypercholesterolemic induction in fa/fa rats fed the atherogenic diets, and the possible benefits related to the inclusion of squid surimis enriched with glucomannan or glucomannan plus spirulina into diets.

High intake, similar to that observed in the C group was patent in HC animals (25 g/day). However, weight gains and growth curves slopes smothered, as reported by other authors (Beynen y cols., 1984), suggesting the existence of weight adjustments to block some processes modulated by hypercholesterolemic induction. In fact, total visceral fat and the adiposomatic index were highly reduced.

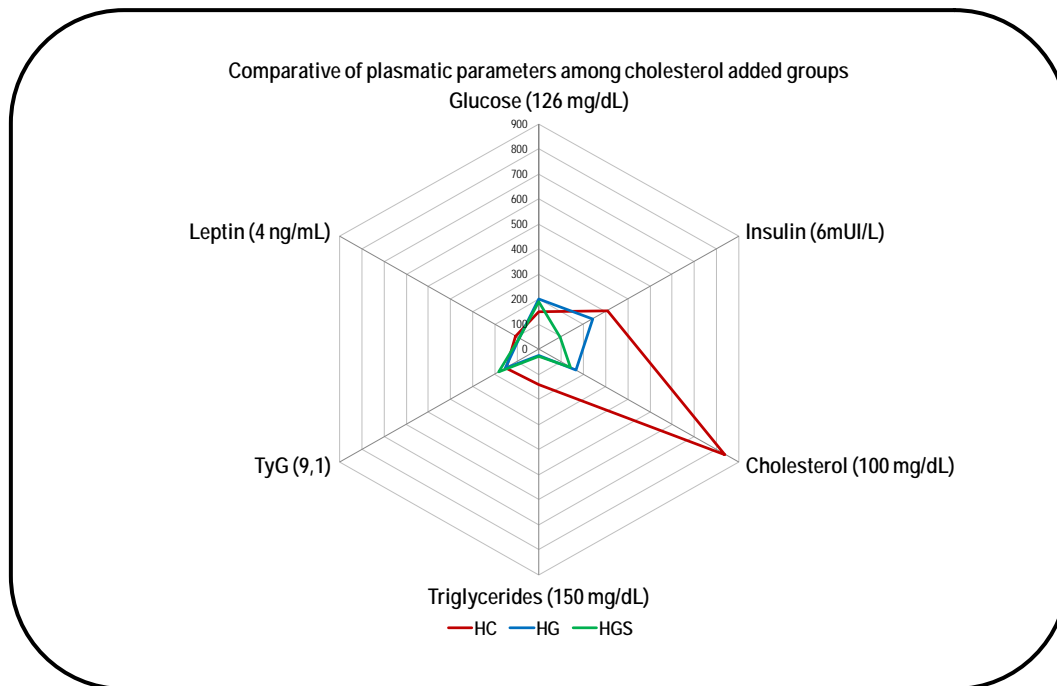
It can be speculated that high amounts of free fatty acids are uptaken by the liver from the adipose tissue contributing to reduce the adipose tissue expansion, probably to esterify hepatic cholesterol and permit its inclusion in VLDL; however, this process would also aggravate insulin resistance due to the toxic presence of increased amount of free fatty acids in the liver.

Thus, in HC vs C rats it can be observed a high increase of plasma cholesterol and cholesterol enriched-VLDL ( $\beta$ -VLDL) and an increase of insulin by 80%. The lipoprotein profile of HC rats with respect to that of their C counterparts evidenced a marked impairment with reduction of HDL and increased presence of remnant lipoproteins (IDL) and TG-enriched LDL.

Food intake was not modified by glucomannan or glucomannan plus spirulina squid surimis in the frame of hypercholesterolemic diets, suggesting that fa/fa rats were refractory to the theoretical leptin gastric production on response to the glucomannan gel formation. However, growth curves were smothered down in HG and HGS animals with respect to HC ones, suggesting certain blocking on any diet components (e.g. fats or cholesterol) by the glucomannan alone or in conjunction with spirulina. In fact the hypercholesterolemic induction observed in the HC group was reduced 9-fold in HG group and 14-fold in the HGS group. Total lipid content of VLDL and IDL+LDL was also diminished, normalizing lipoprotein profile.

All cholesterol enriched diets promoted hyperglycemia, although HG and HGS groups presented higher higher levels. HGS rat insulinemia was significantly lower, but their glycemia was equivalent to that of HG group, suggesting extra benefits in insulin resistance/sensitivity due to spirulina addition. TyG index was significantly improved in HG and HGS rats vs. HC. Thus, HC rats may be suffering, according to the TyG index, from DMT2 and metabolic syndrome, while HG and HGS had mean levels similar to those observed in lean obese rats without metabolic syndrome (Unger y cols., 2014).

Given the central role of obesity in the insulin resistance pathogenesis, Finucane y cols. (2009) proposed that the plasma leptin/adiponectin ratio would reflect compromised adipose tissue function and provide a useful index of insulin action. In line with this previous proposal HC vs. C rats show improved adipose tissue function, as the adiponectin/leptin ratio was highly increased. However, this plasma ratio decreased by HG diet consumption, suggesting a deleterious effect of glucomannan in the frame of hypercholesterolemic diet. Such effect was partially blocked by glucomannan plus spirulina diet.



**Figure 6.9bis.** Comparison of different biomarkers in fa/fa rats fed hyperenergetic, hypersaturated diets, to whose cholesterol and cholic acid was added as hypercholesterolemic agents, containing control-, glucomannan- or glucomannan plus spirulina-squid surimi, (HC, HG and HGS, respectively). Cut-off points used were set at the 100 level.

In the cholesterol added groups it can also be observed a reduction of mitochondrial density in white adipose tissue related to the lesser tissue hypertrophy. The hypercholesterolemic control group (HC) shows higher mitochondria levels than the hypercholesterolemic groups fed with glucomannan or glucomannan plus spirulina, suggesting a higher damage induced by oxidative stress, which would increase their expression in order to compensate certain malfunction.

A higher total histological alteration scores in HC rats vs. C was found due to a higher ballooning score and severe periportal inflammation, both direct consequences of the steatosis and inflammation promoted by the severe hypercholesterolemia in the frame of obesity and DMT2. HG and HGS diets consumption tended to reduce, in a non-significant manner, the steatosis. It can also be observed lower ballooning and periportal inflammation in the HGS group, pointing to an extra benefit of spirulina upon liver damage biomarkers, as HGS rats reach C rat alteration levels.

HC diet consumption reduced significantly the glutathione system with respect to the C group, suggesting an increase in the superoxide radicals creation and elimination cycle, and a CAT diminishing as observed in diabetes (Dhaunsi y cols., 2010). It can also be observed certain compensatory effect of antioxidant enzymes in

order to improve oxidized/reduced glutathione balance. HG and HGS groups increased significantly their redox indexes, resulting in similar levels to C group. According to the antioxidant enzymes results, it can be suggested a lower superoxide radical generation in the groups that consumed glucomannan added diets. HG diet increases CAT and GPx, suggesting improved peroxy radicals, related with the insulinemia decrease observed (Dhaunsi y cols., 2010). These results suggest antioxidant effect of glucomannan. HGS diet kept the antioxidant results of HG diet, showing a modest improvement demanding reduction of antioxidant enzymes expression, also related with an even more marked insulinemia decrease.

As happened in the non-cholesterol added diets, glucomannan induced certain inflammation level, as the eNOS/iNOS index and the TNF- $\alpha$  levels of the HG group reveal. However, HGS diet blocked this inflammation without diminishing the antioxidant effects.

# 7. RESUMEN Y CONCLUSIONES

---





La prevalencia del síndrome metabólico ha aumentado de forma muy importante durante las últimas décadas. Debido a la asociación de patologías que lo constituyen (obesidad, DMT2, dislipidemias, hipertensión, etc.), provoca una disminución muy significativa de la esperanza y calidad de vida, de la productividad de las personas que lo padecen y un incremento del gasto sanitario que compromete la viabilidad de los diferentes sistemas sanitarios.

Para paliar o reducir los efectos adversos atribuidos a dichas enfermedades crónicas, se recurre a estrategias de prevención, mediante modificaciones de la dieta y el estilo de vida. Además, entre los consumidores ha crecido el interés hacia todos los aspectos que mejoran la calidad de vida, lo que está favoreciendo el desarrollo de alimentos funcionales.

Los pescados y los derivados de la pesca pueden servir para la elaboración de surimis que, además de mantener un alto valor nutricional, presentan excelentes propiedades reológicas que le dan un valor añadido para ser empleados como matriz en la incorporación de ingredientes funcionales.

Las ratas Zucker obesas son un modelo de obesidad genética en las que se originan afectaciones metabólicas muy semejantes al síndrome metabólico en humanos, ya que estos animales, además de la obesidad que los caracteriza, se producen varias anomalías endocrinas, habituales también en estos pacientes.

En la presente memoria de Tesis Doctoral se ha estudiado la viabilidad de la utilización de surimis de calamar enriquecidos con glucomanano o glucomanano y espirulina, en un modelo de síndrome metabólico como es la rata Zucker fa/fa, analizando diferentes biomarcadores de obesidad, DMT2, dislipemia y estrés oxidativo.

Para ello se concibieron diferentes dietas hipersaturadas, añadidas o no con agentes hipercolesterolemiantes, que contenían un 30% de surimi de calamar, con celulosa microcristalina o bien con glucomanano al 15% o con glucomanano al 15% y 3 gramos de espirulina por cada kilogramo de dieta.

Tras una semana de adaptación con dieta estándar de crecimiento, las ratas de seis semanas de vida fueron separadas en grupos homogéneos y alimentadas durante siete semanas con las dietas conteniendo los surimis potencialmente funcionales.

Posteriormente se procedió a su sacrificio y extracción de sangre y de los órganos seleccionados para su estudio.

Con la finalidad de conocer los aspectos tanto positivos como negativos del consumo de los surimis de calamar testados, se estudiaron los efectos sobre diferentes marcadores del síndrome metabólico, como: a) La evolución de la ingesta dietética; b) La ganancia de peso y el índice de eficacia alimentaria; c) El tamaño y estructura de los órganos internos, especialmente del hígado; d) El estatus del sistema antioxidante hepático; e) La lipidemia y lipoproteinemia; f) La glucemia, insulinemia y resistencia a la insulina; g) La inflamación general y hepática; h) La densidad mitocondrial del tejido adiposo.

Para el análisis estadístico se empleó la versión 22.0 del programa SPSS (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). Se determinó la normalidad de distribución de los datos mediante el test de Kormogorov-Smirnov. Los resultados se expresaron como los valores medios y su desviación estándar. Se aceptaron diferencias significativas entre grupos para probabilidades  $p < 0,05$ .

Cuando se realizó una comparación estadística cuantitativa, se aplicó el test de análisis de varianza (ANOVA) de dos vías para analizar los efectos y su interacción de los factores colesterol y de glucomanano o glucomanano y espirulina sobre los resultados. El efecto de cada uno de los factores se cuantificó separadamente en las dietas sin colesterol y en aquellas con colesterol mediante el test de ANOVA de una vía seguido de la corrección para múltiples comparaciones de Bonferroni o el de T2 de Tamhane cuando se asumieron varianzas diferentes. El efecto del consumo de colesterol (dietas con colesterol añadido vs. sus correspondientes dietas sin colesterol) se estudió mediante el test de la  $t$  de Student.

Para la comparación de variables cualitativas o semicuantitativas (p.e. en el estudio histológico como infiltración grasa, balonización, grado de inflamación) se empleó el método de la significación exacta bilateral de MonteCarlo. Seguidamente, los grupos se compararon dos a dos usando el test estadístico exacto de Fisher.

Por último, para conocer las posibles relaciones lineales entre parámetros, se empleó el test de correlaciones producto-momento de Pearson.

**Los resultados obtenidos permiten emitir las siguientes conclusiones:**

1. Las dietas experimentales, ricas en ácidos grasos saturados y altamente energéticas, produjeron obesidad, dislipemia, hiperglucemia, hiperinsulinemia, hiperleptinemia y hepatoesteatosis, compatibles con el diagnóstico de síndrome metabólico en las ratas Zucker fa/fa.
2. La inclusión de colesterol en las dietas experimentales afectó de forma negativa a las tasas de crecimiento y por ende al peso final.
3. La adición de harina de Konjac purificada al surimi no redujo la ingesta, pero limitó la ganancia de peso inducida por las dietas control. La espirulina no produjo ningún efecto adicional al observado para el glucomanano.
4. El surimi con glucomanano sólo o en combinación con espirulina mejoró los efectos negativos de la dieta control sobre la hepatomegalia y hepatoesteatosis, reduciendo los marcadores de daño hepáticos y las puntuaciones globales de daño histológico.
5. El consumo de dieta control enriquecida en agentes hipercolesterolemiantes agravaron las tasas de daño total y de inflamación hepáticos produciendo elevadísimas concentraciones plasmáticas de LDH, CK, transaminasas y fosfatasa alcalina, los cuales se redujeron de forma muy importante al incluir en la dieta los surimis de calamar enriquecidos con glucomanano o glucomanano más espirulina.
6. El surimi con glucomanano, sin ninguna aportación significativa de la espirulina, redujo la trigliceridemia y la lipemia y mejoró el perfil lipoproteico, observándose menores cantidades de VLDL e IDL+LDL que en la dieta control.
7. La inclusión de agente hipercolesterolemiantes indujo hipercolesterolemia severa con presencia muy elevada de VLDL e IDL+LDL enriquecidas en colesterol. Este efecto se redujo marcadamente cuando se incorporó a los surimis de calamar glucomanano o glucomanano más espirulina.
8. El estatus antioxidante de las ratas control fue muy deficitario. Los surimis enriquecidos con glucomanano o glucomanano más espirulina mejoraron este estatus, incrementando los niveles de glutatión reducido y glutatión reductasa. La inclusión de glucomanano más espirulina redujo la generación de radicales superóxido, como demuestra una bajada relativa de la superóxido dismutasa.
9. La adición de agente hipercolesterolemiantes agravó el estatus redox hepático en ratas control. En presencia de colesterol y glucomanano, el índice redox mejoró netamente. El análisis de las enzimas antioxidantes parece indicar que las dietas

conteniendo glucomanano y/o espirulina inducen una menor generación de radicales superóxido y una mejora en la eliminación de peróxidos relacionada con la bajada de la insulinemia, efecto que fue inducido de forma más marcada por las dietas que contenían espirulina.

10. Se observaron efectos negativos del consumo de la dieta conteniendo surimi con glucomanano sobre la inflamación hepática valorada por TNF- $\alpha$ , eNOS e iNOS. Estos efectos fueron bloqueados por la inclusión de espirulina.
11. Los resultados en TNF- $\alpha$ , eNOS e iNOS sugieren que la inflamación hepática presente en las ratas fa/fa, se agrava por el consumo de dietas añadidas con el agente hipercolesterolemiante.
12. Los surimis con glucomanano y glucomanano más espirulina redujeron los niveles de glucosa y mejoraron la resistencia a la insulina.
13. La presencia de un agente hipercolesterolemiante no modificó la resistencia a la insulina inducida por las dietas hipersaturadas. La inclusión de glucomanano no mejoró la resistencia a la insulina, pero sí la de espirulina, sugiriendo efectos extra de este producto en el marco de dietas hipercolesterolemiantes.
14. El consumo de dietas con surimis de calamar enriquecidos con glucomanano o glucomanano más espirulina redujo la leptinemia e incrementó marcadamente el cociente adiponectina/leptina en los adipocitos en consonancia con la menor expansión del tejido adiposo.
15. Se sugiere una función mejorada del tejido adiposo en las ratas control hipercolesterolémicas, ya que el cociente adiponectina/leptina en plasma se incrementó enormemente. Tal función mejorada empeora por el consumo de glucomanano en el marco de dietas hipercolesterolemiantes, al reducir dicho cociente en plasma, y se recupera parcialmente por el consumo de glucomanano más espirulina.
16. No se observaron cambios significativos en la densidad mitocondrial del tejido adiposo debidos al consumo de las dietas sin colesterol. No obstante, la densidad mitocondrial tendió a reducirse tras el consumo de dietas enriquecidas en dicho esterol, en particular en el grupo del surimi con glucomanano.

## **Conclusión general**

Atendiendo a los resultados obtenidos en el modelo experimental de obesidad/diabetes utilizado, puede afirmarse que los surimis de calamar conteniendo fibra de glucomanano y/o espirulina podrían considerarse alimentos funcionales, pues han demostrado efectos beneficiosos sobre muchos aspectos del síndrome metabólico. Estos resultados son aún más evidentes y significativos cuando estos alimentos se consumen en el marco de dietas enriquecidas en colesterol. No obstante es importante señalar que las mejoras citadas son sólo parciales, ya que muchos de los animales siguieron presentando ciertas características propias del síndrome metabólico, incluso cuando algunos de sus marcadores se situaron dentro de los intervalos de normalidad.

En contrapartida a los beneficios encontrados sobre la eficiencia energética de la dieta, estructura y daño hepáticos, glucemia, lipidemia, lipoproteinemia y estatus antioxidante, el surimi sólo con glucomanano indujo cierto grado de inflamación hepática, particularmente en el marco de dietas enriquecidas en colesterol, situación que demanda cierta cautela a la hora de impulsar el consumo de estos productos de la pesca potencialmente funcionales para los humanos.

## 7.1. SUMMARY AND CONCLUSIONS

Metabolic syndrome prevalence has grown significantly on the last decades. Due to its constituent pathologies (obesity, DMT2, dyslipidemia or hypertension), the metabolic syndrome leads to a great life expectancy and quality impairment. In addition, people at metabolic syndrome show productivity losses and originate healthcare costs increases, compromising healthcare systems.

To mitigate symptoms of such chronic pathologies, prevention strategies, modifying diet and lifestyle, are encouraged. Moreover, parameters which improve life quality are now an area of interest for consumers, which enforces functional foods development.

Fish and fishery products may be used for surimis elaboration, which display high nutritional values and excellent rheological properties to be employed as an adequate matrix for functional ingredients incorporation.

Zucker obese rats represent a genetic obesity model developing very similar metabolic affectations to those found in human metabolic syndrome. These animals show not only obesity but also frequent endocrine abnormalities, commonly observed in those patients.

In the present PhD memory, it has been studied the utility of squid surimis enriched with glucomannan or glucomannan and spirulina in the frame of a metabolic syndrome model, such as the Zucker fa/fa rat, analyzing different biomarkers of obesity, DMT2, dyslipemia and oxidative stress.

With this aim, hypersaturated fat diets, either added or not with hypercholesterolemic agents, containing 30% squid surimi with microcrystalline cellulose, 15% glucomannan or 15% glucomannan and 3 g/kg diet of spirulina, were designed.

After one week adaptation period on standard rodent diet, six-weeks old rats at the onset were divided in homogeneous groups, and fed with the different potentially functional surimi diets. Later, animals were sacrificed and their blood and selected organs were extracted for their analysis.

In order to ascertain both the positive and the negative effects of the tested surimi-diets, several metabolic syndrome markers were studied: a) feeding intake; b) weight gain and dietary conversion index; c) size and structure of internal organs, specially the liver; d) hepatic antioxidant status; e) lipemia and lipoproteinemia; f)

glycemia, insulinemia and insulin resistance; g) general and hepatic inflammation; h) adipose tissue mitochondrial density.

Statistical analyses were performed using the SPSS version 22.0 statistical analysis package (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). Normality distribution was checked by the Kormogorov-Smirnov test. Results were expressed as means and standard deviations. A two-way ANOVA (cholesterol and diet) was used. *Pair wise* comparisons of diet responses between groups were made employing the Bonferroni or the T2-Tamhane tests. The effect of cholesterol consumption was evaluated using the unpaired Student's *t* test. Parameters not presenting normal distribution in the histological study (fat infiltration, ballooning, inflammation) were compared with the Montecarlo exact bilateral signification method. Subsequently, groups were pairwise compared using the Fisher exact statistical test. Significant differences were set at  $p < 0.05$ . Pearson product moment correlations were prformed to assese relation between parameter data.

#### **Results obtained allow us to state the following conclusions:**

1. Experimental diets, rich in saturated fats and energy, promoted obesity, dislipemia, hyperglycemia, hyperinsulinemia, hyperleptinemia and hepatosteatosi, which are compatible with metabolic syndrome diagnosis.
2. Cholesterol inclusion into experimental diets affected negatively growth rates and, thus, final body weight.
3. Purified Konjac flour inclusion into surimi did not reduce the intake but limited the weight gain induced by the control diets. Spirulina did not exert any additional effect different from those of observed for glucomannan.
4. Both glucomannan or glucomannan plus spirulina surimis, improved the negative effect of the control diet on hepatomegalia and hepatosteatosi, reducing liver damage biomarkers and total histological damage scores.
5. Control diet enriched with cholesterol impaired total alteration and inflammation scores, leading to very high plasma concentrations of LDH, CK, transaminases and alkaline phosphatase, which were drastically reduced when glucomannan or glucomannan and spirulina were included into surimi-diets.

6. Glucomannan added surimi, without extra significant contributions of spirulina, lowered triglyceridemia and lipemia and improved lipoprotein profile, lowering VLDL and IDL+LDL fractions with respect to that of the control diet.
7. The hypercholesterolemic agent ingestion led to severe hypercholesterolemia with elevated presence of cholesterol-enriched VLDL and IDL+LDL. This effect was considerably reduced when glucomannan or glucomannan plus spirulina were added to diet.
8. The antioxidant status of control rats was highly deficient. Squid surimis enriched with glucomannan or glucomannan and spirulina improved this status, increasing reduced glutathione and glutathione reductase. Glucomannan plus spirulina inclusion reduced superoxide radicals generation, which was corroborated by a relative superoxide dismutase lowering.
9. Added cholesterol impaired hepatic redox status in control rats. In presence of cholesterol and glucomannan, the redox index improved markedly. Antioxidant enzymes results suggest that glucomannan and/or spirulina diets induced less superoxide radicals generation and certain peroxides elimination improvement related to the insulinemia decrease, which was higher in spirulina added diets.
10. The consumption of glucomannan-surimi diet exerts deleterious effects on hepatic inflammation, regarding to TNF- $\alpha$ , eNOS and iNOS results. This effect was blocked by spirulina inclusion.
11. Results on TNF- $\alpha$ , eNOS and iNOS suggest that hepatic inflammation present in fa/fa rats was aggravated by the consumption of cholesterol-enriched diets.
12. Glucomannan and glucomannan plus spirulina surimis reduced glycemia and improved insulin resistance.
13. The hypercholesterolemic agent did not modify the insulin resistance induced by hypersaturated diets. Glucomannan inclusion did not improve insulin resistance, but spirulina showed extra effects, improving insulin resistance status in the frame of hypercholesterolemic diets.
14. Glucomannan- and glucomannan plus spirulina-surimis ingestion lowered leptinemia and highly increased the adiponectin/leptin ratio in adipocytes, in concordance with the lower adipose tissue expansion.
15. It can be suggested an adipose tissue function amelioration in control cholesterol-fed rats, as the plasma adiponectin/leptin ratio was highly increased. This improved function was impaired by glucomannan-surimi but partially recovered by glucomannan plus spirulina diet consumption in cholesterol-fed rats.
16. Non-relevant changes were observed on adipose tissue mitochondrial density in non-cholesterol added diets consumption. However, it tended to be lower following

cholesterol-added diets consumption, particularly in the glucomannan surimi group.

**General conclusion:**

According to results obtained in the obesity/diabetes experimental model used, it can be stated that the squid surimis containing glucomannan fiber and/or spirulina can be considered functional foods, as they have induced beneficial effects on many aspects of the metabolic syndrome. These results are even more evident and significant when those foods were consumed in the frame of cholesterol-enriched diets. However, it is important to point out that the cited benefits were only partial, as some of the animals still showed metabolic syndrome characteristics, even while any of certain markers achieved normal levels.

As a sword edge to the benefits found on the dietary efficiency ratio, liver size and damage markers, glycemia, lipidemia, lipoproteinemia, and antioxidant status, the surimi enriched only with glucomannan induced certain degree of hepatic inflammation, especially in the frame of cholesterol-enriched diets, which demands some caution before recommending the consumption of these potentially functional fishery products for humans.



## 8. BIBLIOGRAFÍA

---





- ADA, A. D. A. (2014). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 37(Supplement 1), S81-S90.
- Adams-Huet, B., Devaraj, S., Siegel, D., & Jialal, I. (2014). Increased adipose tissue insulin resistance in metabolic syndrome: relationship to circulating adipokines. *Metab Syndr Relat Disord*, 12(10), 503-507. doi:10.1089/met.2014.0092
- Aebi, H. (1984). [13] Catalase in vitro. *Methods in enzymology*, 105, 121-126.
- Agarkov, A. A., Popova, T. N., Verevkin, A. N., & Matasova, L. V. (2014). Activity of the glutathione antioxidant system and NADPH-generating enzymes in blood serum of rats with type 2 diabetes mellitus after administration of melatonin-correcting drugs. *Bull Exp Biol Med*, 157(2), 198-201. doi:10.1007/s10517-014-2524-y
- Aguilera-García, C., Mesa-García, M., & de Luis Román, D. (2010). Nutrición y enfermedad cardiovascular. In A. Gil (Ed.), *Tratado de Nutrición* (segunda ed., Vol. IV, pp. 491-515). Madrid: Editorial medica panamericana.
- Ahsan, M., Habib, B., Parvin, M., Huntington, T., & Hasan, M. (2008). A review on culture, production and use of spirulina as food for humans and feeds for domestic animals. *FAO Fisheries and Aquaculture Circular* (FAO).
- Alberti, K., Zimmet, P., & Shaw, J. (2006). Metabolic syndrome—a new world-wide definition. A consensus statement from the international diabetes federation. *Diabetic Medicine*, 23(5), 469-480.
- Aleixandre de Artiñano, A., & Miguel Castro, M. (2009). Experimental rat models to study the metabolic syndrome. *Br J Nutr*, 102(9), 1246-1253. doi:10.1017/s0007114509990729
- Aljada, A., Ghanim, H., Assian, E., & Dandona, P. (2002). Tumor necrosis factor-[alpha] inhibits insulin-induced increase in endothelial nitric oxide synthase and reduces insulin receptor content and phosphorylation in human aortic endothelial cells. *Metabolism*, 51(4), 487-491.
- Aljada, A., Ghanim, H., Mohanty, P., Tufail, S., Bandyopadhyay, A., & Dandona, P. (2004). Glucose intake induces an increase in AP-1 and Egr-1 binding activities and tissue factor and matrix metalloproteinase expressions in mononuclear cells and plasma tissue factor and matrix metalloproteinase concentrations. *Am J Clin Nutr*, 80(1), 51-57.
- Amihaesei, I. C., & Chelaru, L. (2014). Metabolic syndrome a widespread threatening condition; risk factors, diagnostic criteria, therapeutic options, prevention and controversies: an overview. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*, 118(4), 896-900.
- Aprikan, O., Busserolles, J., Manach, C., Mazur, A., Morand, C., Davicco, M. J., . . . Demigne, C. (2002). Lyophilized apple counteracts the development of hypercholesterolemia, oxidative stress, and renal dysfunction in obese Zucker rats. *J Nutr*, 132(7), 1969-1976.
- Apt, K. E., & Behrens, P. W. (1999). Commercial developments in microalgal biotechnology. *Journal of Phycology*, 35(2), 215-226.
- Argiles, J. M. (1989). The obese Zucker rat: a choice for fat metabolism 1968-1988: twenty years of research on the insights of the Zucker mutation. *Prog Lipid Res*, 28(1), 53-66.
- Arias-Díaz, J., & Balibrea, J. (2007). Modelos animales de intolerancia a la glucosa y diabetes tipo 2. *Nutr Hosp*, 22(2), 160-168.
- Arkan, M. C., Hevener, A. L., Greten, F. R., Maeda, S., Li, Z.-W., Long, J. M., . . . Karin, M. (2005). IKK- $\beta$  links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nature medicine*, 11(2), 191-198.
- Arner, P. (2002). Insulin resistance in type 2 diabetes: role of fatty acids. *Diabetes/metabolism research and reviews*, 18(S2), S5-S9.
- Ashwell, M. (2002). ILSI Europe Concise monograph series Concepts of functional foods. *ILSI Europe Concise monograph series Volume 40 S*, 7894-7810.
- Aviram, M., & Rosenblat, M. (2004). Paraoxonases 1, 2, and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. *Free*

- Aviram, M., Rosenblat, M., Bisgaier, C. L., Newton, R. S., Primo-Parmo, S. L., & La Du, B. N. (1998). Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *Journal of Clinical Investigation*, 101(8), 1581.
- Bakker, G. C., Van Erk, M. J., Pellis, L., Wopereis, S., Rubingh, C. M., Cnubben, N. H., Hendriks, H. F. (2010). An antiinflammatory dietary mix modulates inflammation and oxidative and metabolic stress in overweight men: a nutrigenomics approach. *Am J Clin Nutr*, 91(4), 1044-1059.
- Banday, A. A., Marwaha, A., Tallam, L. S., & Lokhandwala, M. F. (2005). Tempol reduces oxidative stress, improves insulin sensitivity, decreases renal dopamine D1 receptor hyperphosphorylation, and restores D1 receptor-G-protein coupling and function in obese Zucker rats. *Diabetes*, 54(7), 2219-2226.
- Bantle, J. P., Ratz, S. K., Thomas, W., & Georgopoulos, A. (2000). Effects of dietary fructose on plasma lipids in healthy subjects. *Am J Clin Nutr*, 72(5), 1128-1134.
- Barros, C., & Buenrostro, M. (1999). La alimentación prehispánica en la obra de Sahagún. *Arqueología Mexicana*, 6, 38-45.
- Bastida, S., Sanchez-Muniz, F. J., Cuenca, R., Aragonés, A., & Bravo, C. (2007). Lipid and lipoprotein concentrations at age 4. Association with neonatal and parental levels. *Med Clin (Barc)*, 128(14), 521-528.
- Bate, K. L., & Jerums, G. (2003). 3: Preventing complications of diabetes. *Med J Aust*, 179(9), 498-503.
- Beynen, A. C., Boogaard, A., Van Laack, H. L., & Katan, M. B. (1984). Cholesterol metabolism in two strains of rats with high or low response of serum cholesterol to a cholesterol-rich diet. *J Nutr*, 114(9), 1640-1651.
- Bian, K., Doursout, M. F., & Murad, F. (2008). Vascular system: role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *The Journal of Clinical Hypertension*, 10(4), 304-310.
- Bilheimer, D. W., Eisenberg, S., & Levy, R. I. (1972). The metabolism of very low density lipoprotein proteins I. Preliminary in vitro and in vivo observations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 260(2), 212-221.
- Bocanegra, A., Bastida, S., Benedí, J., Nus, M., Sánchez-Montero, J. M., & Sánchez-Muniz, F. J. (2009). Effect of seaweed and cholesterol-enriched diets on postprandial lipoproteinaemia in rats. *British Journal of Nutrition*, 102(12), 1728-1739.
- Bocanegra, A., Benedí, J., & Sánchez-Muniz, F. (2006). Differential effects of konbu and nori seaweed dietary supplementation on liver glutathione status in normo- and hypercholesterolaemic growing rats. *British journal of nutrition*, 95(04), 696-702. doi:doi:10.1079/BJN20051682
- Bocanegra, A., Nieto, A., Bastida, S., Benedí, J., & Sanchez-Muniz, F. J. (2008). A Nori but not a Konbu, dietary supplement decreases the cholesterolaemia, liver fat infiltration and mineral bioavailability in hypercholesterolaemic growing Wistar rats. *Br J Nutr*, 99(2), 272-280. doi:10.1017/s0007114507801085
- Bondia-Pons, I., Ryan, L., & Martinez, J. A. (2012). Oxidative stress and inflammation interactions in human obesity. *Journal of physiology and biochemistry*, 68(4), 701-711.
- Bonora, E., Targher, G., Alberiche, M., Bonadonna, R. C., Saggiani, F., Zenere, M. B., . . . Muggeo, M. (2000). Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity: studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity. *Diabetes Care*, 23(1), 57-63.
- Borai, A., Livingstone, C., Kaddam, I., & Ferns, G. (2011). Selection of the appropriate method for the assessment of insulin resistance. *BMC Med Res Methodol*, 11, 158. doi:10.1186/1471-2288-11-158

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1), 248-254.
- Burnette, W. N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical biochemistry*, 112(2), 195-203.
- Cai, D., Yuan, M., Frantz, D. F., Melendez, P. A., Hansen, L., Lee, J., & Shoelson, S. E. (2005). Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- $\beta$  and NF- $\kappa$ B. *Nature medicine*, 11(2), 183-190.
- Canales, A., Sánchez-Muniz, F., Bastida, S., Librelotto, J., Nus, M., Corella, D., . . . Benedi, J. (2011). Effect of walnut-enriched meat on the relationship between VCAM, ICAM, and LTB4 levels and PON-1 activity in ApoA4 360 and PON-1 allele carriers at increased cardiovascular risk. *Eur J Clin Nutr*, 65(6), 703-710.
- Carmena, R. (2010). Dyslipidemia in Type 2 Diabetes Mellitus. In e. G. F. J. Serrano Ríos M (Ed.), *Type 2 diabetes mellitus* (pp. 219-230). Barcelona, Spain: Elsevier, SL.
- Carmienke, S., Freitag, M. H., Pischon, T., Schlattmann, P., Fankhaenel, T., Goebel, H., & Gensichen, J. (2013). General and abdominal obesity parameters and their combination in relation to mortality: a systematic review and meta-regression analysis. *Eur J Clin Nutr*, 67(6), 573-585. doi:10.1038/ejcn.2013.61
- Carpentier, A., Giacca, A., & Lewis, G. F. (2001). Effect of increased plasma non-esterified fatty acids (NEFAs) on arginine-stimulated insulin secretion in obese humans. *Diabetologia*, 44(11), 1989-1997. doi:10.1007/s001250100002
- Carvajal-Zarrabal, O., Nolasco-Hipolito, C., Aguilar-Uscanga, M. G., Melo-Santiesteban, G., Hayward-Jones, P. M., & Barradas-Dermitz, D. M. (2014). Avocado oil supplementation modifies cardiovascular risk profile markers in a rat model of sucrose-induced metabolic changes. *Dis Markers*, 2014, 386425. doi:10.1155/2014/386425
- Cascales-Angosto, M. (1999). La toxicidad del oxígeno. Estrés oxidativo. . In R. A. d. F. Instituto de España (Ed.), *Estrés oxidativo, envejecimiento y enfermedad*. (pp. 9-46). Madrid.
- Cascales-Angosto, M. (2015). Obesidad: Pandemia del siglo XXI. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*.
- Chamorro, G., Salazar, M., Gomes de Lima Araújo, K., Pereira dos Santos, C., Ceballos, G., & Fabila Castillo, L. (2002). Actualización en la farmacología de Spirulina (Arthrospira), un alimento no convencional. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 52, 232-240. Retrieved from [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-06222002000300002&nrm=iso](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222002000300002&nrm=iso)
- Chang, E., Kim, L., Park, S. E., Rhee, E. J., Lee, W. Y., Oh, K. W., . . . Park, C. Y. (2015). Ezetimibe improves hepatic steatosis in relation to autophagy in obese and diabetic rats. *World J Gastroenterol*, 21(25), 7754-7763. doi:10.3748/wjg.v21.i25.7754
- Chen, S. Y., Lin, S. J., Lin, S. H., & Chou, Y. Y. (2013). Early adiposity rebound and obesity in children with congenital hypothyroidism. *Pediatr Neonatol*, 54(2), 107-112. doi:10.1016/j.pedneo.2012.10.008
- Chentouf, M., Dubois, G., Jahannaut, C., Castex, F., Lajoix, A. D., Gross, R., & Peraldi-Roux, S. (2011). Excessive food intake, obesity and inflammation process in Zucker fa/fa rat pancreatic islets. *PLoS One*, 6(8), e22954. doi:10.1371/journal.pone.0022954
- Chiang, M. T., Chen, Y. C., & Huang, A. L. (1998). Plasma lipoprotein cholesterol levels in rats fed a diet enriched in cholesterol and cholic acid. *Int J Vitam Nutr Res*, 68(5), 328-334.

- Chow, C. (2008). Biological effects of oxidized fatty acids. . In C. C. K. (Ed.) (Ed.), *Fatty Acids in Foods and Their Implications* (pp. 855-878). FL, USA: CRC Press, Taylor & Francis. Boca Raton,.
- Considine, R. V., & Caro, J. F. (1996). Leptin in humans: current progress and future directions. *Clin Chem*, 42(6 Pt 1), 843-844.
- Cooper, D., Stokes, K. Y., Taylor, A., & Granger, D. N. (2002). Oxidative stress promotes blood cell-endothelial cell interactions in the microcirculation. *Cardiovascular toxicology*, 2(3), 165-180.
- Cordero-Herrera, I., Martín, M. A., Escriva, F., Alvarez, C., Goya, L., & Ramos, S. (2015). Cocoa-rich diet ameliorates hepatic insulin resistance by modulating insulin signaling and glucose homeostasis in Zucker diabetic fatty rats. *J Nutr Biochem*, 26(7), 704-712. doi:10.1016/j.jnutbio.2015.01.009
- Corella, D., & Ordovás, J. M. (2015). Genética de la obesidad. Predictores de la obesidad: el " poder" de las ómicas. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*.
- Cosson, E. (2010). Diagnostic criteria for gestational diabetes mellitus. *Diabetes Metab*, 36(6 Pt 2), 538-548. doi:10.1016/j.diabet.2010.11.007
- Dandona, P., Aljada, A., & Mohanty, P. (2002). The anti-inflammatory and potential anti-atherogenic effect of insulin: a new paradigm. *Diabetologia*, 45(6), 924-930.
- Dandona, P., Aljada, A., Chaudhuri, A., Mohanty, P., & Garg, R. (2005). Metabolic syndrome a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation. *Circulation*, 111(11), 1448-1454.
- Dandona, P., Aljada, A., Mohanty, P., Ghanim, H., Hamouda, W., Assian, E., & Ahmad, S. (2001). Insulin inhibits intranuclear nuclear factor κB and stimulates IκB in mononuclear cells in obese subjects: evidence for an anti-inflammatory effect? *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(7), 3257-3265.
- Dandona, P., Weinstock, R., Thusu, K., Abdel-Rahman, E., Aljada, A., & Wadden, T. (1998). Tumor necrosis factor-α in sera of obese patients: fall with weight loss. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 83(8), 2907-2910.
- de Franca, G. V., Gigante, D. P., & Olinto, M. T. (2014). Binge eating in adults: prevalence and association with obesity, poor self-rated health status and body dissatisfaction. *Public Health Nutr*, 17(4), 932-938. doi:10.1017/s1368980013000591
- de Santa Olalla, L. M., Sánchez-Muniz, F., & Vaquero, M. (2009). N-3 fatty acids in glucose metabolism and insulin sensitivity. *Nutr Hosp*, 24(2), 113-127.
- Deng, R., & Chow, T. J. (2010). Hypolipidemic, antioxidant, and antiinflammatory activities of microalgae *Spirulina*. *Cardiovascular therapeutics*, 28(4), e33-e45.
- Dhaunsi, G. S., Yousif, M. H., Akhtar, S., Chappell, M. C., Diz, D. I., & Benter, I. F. (2010). Angiotensin-(1-7) prevents diabetes-induced attenuation in PPAR-gamma and catalase activities. *Eur J Pharmacol*, 638(1-3), 108-114. doi:10.1016/j.ejphar.2010.04.030
- Doi, K., Matsuura, M., Kawara, A., & Baba, S. (1979). Treatment of diabetes with glucomannan (konjac mannan). *The Lancet*, 313(8123), 987-988.
- Durrington, P., Mackness, B., & Mackness, M. (2001). Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21(4), 473-480.
- Eckerson, H. W., Wyte, C. M., & La Du, B. (1983). The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. *American journal of human genetics*, 35(6), 1126.
- Egger, G., & Dixon, J. (2014). Beyond obesity and lifestyle: a review of 21st century chronic disease determinants. *Biomed Res Int*, 2014, 731685. doi:10.1155/2014/731685
- Esterbauer, H. (1993). Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. *Am J Clin Nutr*, 57(5), 779S-785S.
- European Diabetes Policy Group. (1999). A desktop guide to type 2 diabetes mellitus. *Diabetic Medicine*, 16(9), 716-730.

- FAOSTAT. (2014). Statistical Databases of the Food and Agriculture Organization
- Fernández-Villaverde, A., Benlloch, S., Berenguer, M., Rayón, J. M., Pina, R., & Berenguer, J. (2004). Acute hepatitis of cholestatic type possibly associated with the use of glucomannan (amorphophalus konjac). *Journal of hepatology*, *41*(6), 1061-1062.
- Ferrante, A. (2007). Obesity-induced inflammation: a metabolic dialogue in the language of inflammation. *Journal of internal medicine*, *262*(4), 408-414.
- Fidge, N., & Poulis, P. (1975). Studies on the metabolism of rat serum very low density apolipoprotein. *Journal of lipid research*, *16*(5), 367-378.
- Finelli, C., Padula, M. C., Martelli, G., & Tarantino, G. (2014). Could the improvement of obesity-related co-morbidities depend on modified gut hormones secretion? *World J Gastroenterol*, *20*(44), 16649-16664. doi:10.3748/wjg.v20.i44.16649
- Finucane, F. M., Luan, J., Wareham, N. J., Sharp, S. J., O'Rahilly, S., Balkau, B., . . . Savage, D. B. (2009). Correlation of the leptin:adiponectin ratio with measures of insulin resistance in non-diabetic individuals. *Diabetologia*, *52*(11), 2345-2349. doi:10.1007/s00125-009-1508-3
- Flier, J. S., & Mekalanos, J. J. (2009). Gut check: testing a role for the intestinal microbiome in human obesity. *Sci Transl Med*, *1*(6), 6ps7. doi:10.1126/scitranslmed.3000483
- Friedman, J. (2011). Leptin and the regulation of body weight. In M. Serrano-Rios, J. Ordovás, & J. Gutiérrez-Fuentes (Eds.), *Obesity* (pp. 3-18). Amsterdam: Elsevier.
- Friedman, J. M. (2003). A war on obesity, not the obese. *Science*, *299*(5608), 856-858. doi:10.1126/science.1079856
- Fruhbeck, G. (2010). Is Europe really battling obesity? *Obes Facts*, *3*(4), 219-221. doi:10.1159/000319801
- Fujimoto, M., Tsuneyama, K., Fujimoto, T., Selmi, C., Gershwin, M. E., & Shimada, Y. (2012). Spirulina improves non-alcoholic steatohepatitis, visceral fat macrophage aggregation, and serum leptin in a mouse model of metabolic syndrome. *Digestive and Liver Disease*, *44*(9), 767-774.
- Galera-Martinez, R., Garcia-Garcia, E., Vazquez-Lopez, M. A., Ortiz-Perez, M., Ruiz-Sanchez, A. M., Martin-Gonzalez, M., . . . Bonillo-Perales, A. (2015). PREVALENCE OF METABOLIC SYNDROME AMONG ADOLESCENTS IN A CITY IN THE MEDITERRANEAN AREA: COMPARISON OF TWO DEFINITIONS. *Nutr Hosp*, *32*(n02), 627-633. doi:10.3305/nh.2015.32.2.9278
- Galisteo, M., Sanchez, M., Vera, R., Gonzalez, M., Anguera, A., Duarte, J., & Zarzuelo, A. (2005). A diet supplemented with husks of *Plantago ovata* reduces the development of endothelial dysfunction, hypertension, and obesity by affecting adiponectin and TNF-alpha in obese Zucker rats. *J Nutr*, *135*(10), 2399-2404.
- Garcimartin, A., Merino, J. J., Santos-Lopez, J. A., Lopez-Oliva, M. E., Gonzalez, M. P., Sanchez-Muniz, F. J., & Benedi, J. (2015). Silicon as neuroprotector or neurotoxic in the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line. *Chemosphere*, *135*, 217-224. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.04.060
- Geitler, L. (1925). Cyanophyceae Geitler L and Pascher A, eds. *Die Susswasser—Flora. Gustav Fischer, Jena*, 329.
- Geitler, L. (1932). Cyanophyceae. Kryptogamen-Flora von Deutschland. Osterreich und der Schweiz 14. *Akad. Verlagsges., Leipzig*.
- Gesteiro, E., Bastida, S., & Sanchez Muniz, F. J. (2011). Effects of maternal glucose tolerance, pregnancy diet quality and neonatal insulinemia upon insulin resistance/sensitivity biomarkers in normoweight neonates. *Nutr Hosp*, *26*(6), 1447-1455. doi:10.1590/s0212-16112011000600036
- Gesteiro, E., Bastida, S., & Sanchez-Muniz, F. J. (2009). Insulin resistance markers in term, normoweight neonates. The Merida cohort. *Eur J Pediatr*, *168*(3), 281-288. doi:10.1007/s00431-008-0750-x

- Gesteiro, E., Bastida, S., Vazquez-Velasco, M., Corella, D., Guillen, M., Ordovas, J. M., & Sanchez-Muniz, F. J. (2011). Effects of APOA5 S19W polymorphism on growth, insulin sensitivity and lipoproteins in normoweight neonates. *Eur J Pediatr*, *170*(12), 1551-1558. doi:10.1007/s00431-011-1473-y
- Gomez del Rio, M., Sánchez-Reus, M., Iglesias, I., Pozo, M., Garcia-Arencibia, M., Fernandez-Ruiz, J., . . . Benedí, J. (2013). Neuroprotective properties of standardized extracts of *Hypericum perforatum* on rotenone model of parkinson's disease. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)*, *12*(5), 665-679.
- Gomez-Zorita, S., Fernandez-Quintela, A., Macarulla, M. T., Aguirre, L., Hijona, E., Bujanda, L., . . . Portillo, M. P. (2012). Resveratrol attenuates steatosis in obese Zucker rats by decreasing fatty acid availability and reducing oxidative stress. *Br J Nutr*, *107*(2), 202-210. doi:10.1017/s0007114511002753
- González Canga, A., Fernández Martínez, N., Sahagún, A., García Vieitez, J., Díez Liébana, M., Calle Pardo, Á., . . . Sierra Vega, M. (2004). Glucomanano: propiedades y aplicaciones terapéuticas. *Nutrición Hospitalaria*, *19*(1), 45-50.
- Grune, T., Sommerburg, O., & Siems, W. (2000). Oxidative stress in anemia. *Clinical nephrology*, *53*(1 Suppl), S18-22.
- Guerrero-Romero, F., Simental-Mendía, L. E., González-Ortiz, M., Martínez-Abundis, E., Ramos-Zavala, M. G., Hernández-González, S. O., . . . Rodríguez-Morán, M. (2010). The product of triglycerides and glucose, a simple measure of insulin sensitivity. Comparison with the euglycemic-hyperinsulinemic clamp. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *95*(7), 3347-3351.
- Gutiérrez-Salmeán, G., Fabila-Castillo, L., & Chamorro-Cevallos, G. (2015). Aspectos Nutricionales y Toxicológicos de *Spirulina* (*Arthrospira*). *Nutr Hosp*, *32*(n01).
- Haffner, S. M., Valdez, R. A., Hazuda, H. P., Mitchell, B. D., Morales, P. A., & Stern, M. P. (1992). Prospective analysis of the insulin-resistance syndrome (syndrome X). *Diabetes*, *41*(6), 715-722.
- Hardie, D. G., Scott, J. W., Pan, D. A., & Hudson, E. R. (2003). Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Lett*, *546*(1), 113-120.
- Hardie, L. J., Rayner, D. V., Holmes, S., & Trayhurn, P. (1996). Circulating leptin levels are modulated by fasting, cold exposure and insulin administration in lean but not Zucker (fa/fa) rats as measured by ELISA. *Biochem Biophys Res Commun*, *223*(3), 660-665. doi:10.1006/bbrc.1996.0951
- Harris, W. S., Miller, M., Tighe, A. P., Davidson, M. H., & Schaefer, E. J. (2008). Omega-3 fatty acids and coronary heart disease risk: clinical and mechanistic perspectives. *Atherosclerosis*, *197*(1), 12-24. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2007.11.008
- Hennekens, C. H., & Andreotti, F. (2013). Leading avoidable cause of premature deaths worldwide: case for obesity. *Am J Med*, *126*(2), 97-98. doi:10.1016/j.amjmed.2012.06.018
- Hernandez, A. G. D. (2010). *Tratado de nutrición: Composición y calidad nutritiva de los alimentos* (Vol. 2): Ed. Médica Panamericana.
- Hissin, P. J., & Hilf, R. (1976). A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical biochemistry*, *74*(1), 214-226.
- Hivert, M. F., Vassy, J. L., & Meigs, J. B. (2014). Susceptibility to type 2 diabetes mellitus--from genes to prevention. *Nat Rev Endocrinol*, *10*(4), 198-205. doi:10.1038/nrendo.2014.11
- Hovenaars, F. (2014). *Metabolic adaptation of white adipose tissue to nutritional and environmental challenges*. Wageningen University.
- Hofmann, C., Lorenz, K., Braithwaite, S., Colca, J., Palazuk, B., Hotamisligil, G., & Spiegelman, B. (1994). Altered gene expression for tumor necrosis factor-alpha and its receptors during drug and dietary modulation of insulin resistance. *Endocrinology*, *134*(1), 264-270.

- Holman, B., & Malau-Aduli, A. (2013). Spirulina as a livestock supplement and animal feed. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 97(4), 615-623.
- Hotamisligil, G. S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 444(7121), 860-867.
- Hotamisligil, G. S., Arner, P., Caro, J., Atkinson, R., & Spiegelman, B. (1995). Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*, 95(5), 2409.
- Hotamisligil, G. S., Budavari, A., Murray, D., & Spiegelman, B. M. (1994). Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor-alpha. *Journal of Clinical Investigation*, 94(4), 1543.
- Hotamisligil, G. S., Murray, D. L., Choy, L. N., & Spiegelman, B. M. (1994). Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(11), 4854-4858.
- Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S., & Spiegelman, B. M. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*, 259(5091), 87-91.
- Hullar, M. A., & Lampe, J. W. (2012). The gut microbiome and obesity.
- Ichikawa, H., & Sakata, T. (1997). Effect of L-lactic acid, short-chain fatty acids, and pH in cecal infusate on morphometric and cell kinetic parameters of rat cecum. *Digestive diseases and sciences*, 42(8), 1598-1610.
- Itani, S. I., Ruderman, N. B., Schmieder, F., & Boden, G. (2002). Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and I $\kappa$ B- $\alpha$ . *Diabetes*, 51(7), 2005-2011.
- Iyer, U. (2008). Dhruv. SA, Mani, IU In: Spirulina in Human Nutrition and Health. Gershwin, ME, Belay, A., editor: Boca Raton: CRC Press.
- Janiak, P., Bidouard, J. P., Cadrouvele, C., Poirier, B., Gouraud, L., Grataloup, Y., . . . Herbert, J. M. (2006). Long-term blockade of angiotensin AT1 receptors increases survival of obese Zucker rats. *Eur J Pharmacol*, 534(1-3), 271-279. doi:10.1016/j.ejphar.2006.01.032
- Jáuregui, M. E. C., Carrillo, M. d. I. C. C., & Romo, F. P.-G. (2011). Carotenoides y su función antioxidante: Revisión.
- Jensen, S., Attridge, V., Beaman, J., & Benson, K. (2015). Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of an Aqueous Cyanophyta Extract Derived from *Arthrospira Platensis*: Contribution to Bioactivities by the Non-Phycocyanin Aqueous Fraction. *Journal of medicinal food*.
- Jiménez-Colmenero, F., Sánchez-Muniz, F. J., & Olmedilla-Alonso, B. (2010). Design and development of meat-based functional foods with walnut: Technological, nutritional and health impact. *Food Chem*, 123(4), 959-967.
- Jover-Sanz, E. (1994). Clasificación y diagnóstico de las dislipemias (Classification and diagnostic of dyslipaemias). In M. d. Oya (Ed.), *Metabolismo lipídico. Investigación en biomedicina (Lipid metabolism. Research in biomedicine)*. Spain: Fundación Jiménez Díaz. International Marketing and Communications, S.A.
- Kahn, B. B., & Flier, J. S. (2000). Obesity and insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*, 106(4), 473.
- Kaplan, N. M. (1989). The deadly quartet: upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. *Arch Intern Med*, 149(7), 1514-1520.
- Karkos, P., Leong, S., Karkos, C., Sivaji, N., & Assimakopoulos, D. (2008). Spirulina in clinical practice: evidence-based human applications. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, 27.
- Katz, A., Nambi, S. S., Mather, K., Baron, A. D., Follmann, D. A., Sullivan, G., & Quon, M. J. (2000). Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 85(7), 2402-2410. doi:10.1210/jcem.85.7.6661

- Kenaston, C. B., Wilbur, K. M., Ottolenghi, A., & Bernheim, F. (1955). Comparison of methods for determining fatty acid oxidation produced by ultraviolet irradiation. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 32(1), 33-35.
- Kern, P. A., Ranganathan, S., Li, C., Wood, L., & Ranganathan, G. (2001). Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 280(5), E745-E751.
- Kerner, W., & Bruckel, J. (2014). Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 122(7), 384-386. doi:10.1055/s-0034-1366278
- Kim, F., Pham, M., Luttrell, I., Bannerman, D. D., Tupper, J., Thaler, J., . . . Schwartz, M. W. (2007). Toll-like receptor-4 mediates vascular inflammation and insulin resistance in diet-induced obesity. *Circ Res*, 100(11), 1589-1596. doi:10.1161/circresaha.106.142851
- Kiriyama, S., Enishi, A., & Yura, K. (1974). Inhibitory effect of konjac mannan on bile acid transport in the everted sacs from rat ileum. *J Nutr*, 104(1), 69-78.
- Kishida, N., Okimasu, S., & Kamata, T. (1978). Molecular weight and intrinsic viscosity of konjac gluco-mannan. *Agricultural and Biological Chemistry*, 42(9), 1645-1650.
- Kotronen, A., Peltonen, M., Hakkarainen, A., Sevastianova, K., Bergholm, R., Johansson, L. M., . . . Yki-Jarvinen, H. (2009). Prediction of non-alcoholic fatty liver disease and liver fat using metabolic and genetic factors. *Gastroenterology*, 137(3), 865-872. doi:10.1053/j.gastro.2009.06.005
- Kritchevsky, D., Tepper, S. A., Czarnecki, S. K., & Klurfeld, D. M. (1982). Atherogenicity of animal and vegetable protein: influence of the lysine to arginine ratio. *Atherosclerosis*, 41(2), 429-431.
- Kucera, O., & Cervinkova, Z. (2014). Experimental models of non-alcoholic fatty liver disease in rats. *World J Gastroenterol*, 20(26), 8364-8376. doi:10.3748/wjg.v20.i26.8364
- Kurtz, T. W., Morris, R. C., & Pershadsingh, H. A. (1989). The Zucker fatty rat as a genetic model of obesity and hypertension. *Hypertension*, 13(6 Pt 2), 896-901.
- Laemmli, U. (1970). Most commonly used discontinuous buffer system for SDS electrophoresis. *Nature*, 227, 680-685.
- Lairon, D., & Defoort, C. (2011). Effects of nutrients on postprandial lipemia. *Curr Vasc Pharmacol*, 9(3), 309-312.
- Larqué, C., Velasco, M., Navarro-Tableros, V., Duhne, M., Aguirre, J., Gutiérrez-Reyes, G., . . . Hiriart, M. (2011). Early endocrine and molecular changes in metabolic syndrome models. *IUBMB Life*, 63(10), 831-839.
- Lawrence, R. A. (2012). Reprint of "Glutathione Peroxidase Activity in Selenium-Deficient Rat Liver". *Biochem Biophys Res Commun*, 425(3), 503-509.
- Lee, J. Y., Ye, J., Gao, Z., Youn, H. S., Lee, W. H., Zhao, L., . . . Hwang, D. H. (2003). Reciprocal modulation of Toll-like receptor-4 signaling pathways involving MyD88 and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT by saturated and polyunsaturated fatty acids. *Journal of Biological Chemistry*, 278(39), 37041-37051.
- Leonard, B. L., Watson, R. N., Loomes, K. M., Phillips, A. R., & Cooper, G. J. (2005). Insulin resistance in the Zucker diabetic fatty rat: a metabolic characterisation of obese and lean phenotypes. *Acta Diabetol*, 42(4), 162-170. doi:10.1007/s00592-005-0197-8
- Lequin, R. M. (2005). Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin Chem*, 51(12), 2415-2418.
- Lin, H., Pang, J., Fan, L., & Chen, J. (2010). Advances in immunological activities of Konjac glucomannan. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 26(11), 1404-1406.
- Lin, R. C. (1985). Serum cholesterol, lecithin-cholesterol acyltransferase, and hepatic hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase activities of lean and obese

- Zucker rats. *Metabolism*, 34(1), 19-24.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *methods*, 25(4), 402-408.
- Livesey, G., Taylor, R., House, P., & Lane, B. (2006). *A systematic review of the glycaemic response to foods and health*. Paper presented at the ILSI Europe workshop. Glycaemic response on health.
- Luan, B., Goodarzi, M. O., Phillips, N. G., Guo, X., Chen, Y. D., Yao, J., . . . Montminy, M. (2014). Leptin-mediated increases in catecholamine signaling reduce adipose tissue inflammation via activation of macrophage HDAC4. *Cell Metab*, 19(6), 1058-1065. doi:10.1016/j.cmet.2014.03.024
- Maekaji, K. (1974). The mechanism of gelation of konjac mannan. *Agricultural and Biological Chemistry*, 38(2), 315-321.
- MAGRAMA, M. d. A., Alimentación y Medio Ambiente. (2014). Panel de consumo alimentario. Retrieved from <http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/servicios/>.
- Mahfouz, M. M., & Kummerow, F. A. (2000). Cholesterol-rich diets have different effects on lipid peroxidation, cholesterol oxides, and antioxidant enzymes in rats and rabbits. *J Nutr Biochem*, 11(5), 293-302.
- Maleckas, A., Venclauskas, L., Wallenius, V., Lonroth, H., & Fandriks, L. (2015). Surgery in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Scand J Surg*, 104(1), 40-47. doi:10.1177/1457496914561140
- Mannu, G. S., Zaman, M. J., Gupta, A., Rehman, H. U., & Myint, P. K. (2012). Update on guidelines for management of hypercholesterolemia. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 10(10), 1239-1249. doi:10.1586/erc.12.94
- Marklund, S. L. (1985). Pyrogallol autoxidation. *Handbook of methods for oxygen radical research*. CRC Press, Boca Raton, 243-247.
- Martínez Sesmero, J. (2013). Riesgo cardiovascular en el estudio área de Toledo.
- Martinez, J. (2006). Mitochondrial oxidative stress and inflammation: an slalom to obesity and insulin resistance. *Journal of physiology and biochemistry*, 62(4), 303-306.
- Martínez-Cayuela, M. (2010). Estrés oxidativo y mecanismos de defensa antioxidante. In A. Gil-Hernández (Ed.), *Tratado de Nutrición. Bases Fisiológicas y Bioquímicas de la Nutrición*. (Vol. Tomo I, pp. pp. 455-480). Madrid, España: Editorial Médica Panamericana.
- Mataix, J. (2001). Aceite de oliva virgen: nuestro patrimonio alimentario. *Universidad de Granada-Puleva Food, Granada*.
- Mathe, D. (1995). Dyslipidemia and diabetes: animal models. *Diabete & metabolisme*, 21(2), 106-111.
- Matthews, D., Hosker, J., Rudenski, A., Naylor, B., Treacher, D., & Turner, R. (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and  $\beta$ -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, 28(7), 412-419.
- Meigs, J. B., Wilson, P. W., Nathan, D. M., D'Agostino, R. B., Williams, K., & Haffner, S. M. (2003). Prevalence and characteristics of the metabolic syndrome in the San Antonio Heart and Framingham Offspring Studies. *Diabetes*, 52(8), 2160-2167.
- Mells, J. E., Fu, P. P., Kumar, P., Smith, T., Karpen, S. J., & Anania, F. A. (2015). Saturated fat and cholesterol are critical to inducing murine metabolic syndrome with robust nonalcoholic steatohepatitis. *J Nutr Biochem*, 26(3), 285-292. doi:10.1016/j.jnutbio.2014.11.002
- Michels, A., Zhang, L., Khadra, A., Kushner, J. A., Redondo, M. J., & Pietropaolo, M. (2015). Prediction and prevention of type 1 diabetes: update on success of prediction and struggles at prevention. *Pediatr Diabetes*, 16(7), 465-484.

- Miranda, M., Cintra, R., Barros, S., & Mancini-Filho, J. (1998). Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*. *Brazilian Journal of Medical and biological research*, 31(8), 1075-1079.
- Mohanty, P., Ghanim, H., Hamouda, W., Aljada, A., Garg, R., & Dandona, P. (2002). Both lipid and protein intakes stimulate increased generation of reactive oxygen species by polymorphonuclear leukocytes and mononuclear cells. *Am J Clin Nutr*, 75(4), 767-772.
- Mootha, V. K., Lindgren, C. M., Eriksson, K.-F., Subramanian, A., Sihag, S., Lehar, J., . . . Laurila, E. (2003). PGC-1 $\alpha$ -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nature genetics*, 34(3), 267-273.
- Most, J., Goossens, G. H., Jocken, J. W., & Blaak, E. E. (2014). Short-term supplementation with a specific combination of dietary polyphenols increases energy expenditure and alters substrate metabolism in overweight subjects. *Int J Obes (Lond)*, 38(5), 698-706. doi:10.1038/ijo.2013.231
- Moura, L. P., Puga, G. M., Beck, W. R., Teixeira, I. P., Ghezzi, A. C., Silva, G. A., & Mello, M. A. (2011). Exercise and spirulina control non-alcoholic hepatic steatosis and lipid profile in diabetic Wistar rats. *Lipids Health Dis*, 10, 77. doi:10.1186/1476-511x-10-77
- Murata, M., Sano, Y., Ishihara, K., & Uchida, M. (2002). Dietary fish oil and *Undaria pinnatifida* (wakame) synergistically decrease rat serum and liver triacylglycerol. *J Nutr*, 132(4), 742-747.
- Nagaoka, S., Shimizu, K., Kaneko, H., Shibayama, F., Morikawa, K., Kanamaru, Y., . . . Kato, T. (2005). A novel protein C-phycoerythrin plays a crucial role in the hypocholesterolemic action of *Spirulina platensis* concentrate in rats. *J Nutr*, 135(10), 2425-2430.
- Nilsson, P., Engström, G., & Hedblad, B. (2007). The metabolic syndrome and incidence of cardiovascular disease in non-diabetic subjects—a population-based study comparing three different definitions. *Diabetic Medicine*, 24(5), 464-472.
- Noratto, G., Martino, H. S., Simbo, S., Byrne, D., & Mertens-Talcott, S. U. (2015). Consumption of polyphenol-rich peach and plum juice prevents risk factors for obesity-related metabolic disorders and cardiovascular disease in Zucker rats. *J Nutr Biochem*, 26(6), 633-641. doi:10.1016/j.jnutbio.2014.12.014
- Nus, M., Muniz, F. J. S., & Montero, J. M. S. (2008). *Arilesterasa. Aspectos metodológicos y funcionales de una enzima clave en la enfermedad cardiovascular. Parte I*. Paper presented at the Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia.
- Nus, M., Sánchez-Muniz, F. J., & Montero, J. M. S. (2008). *Arilesterasa. Aspectos metodológicos y funcionales de una enzima clave en la enfermedad cardiovascular. Parte II*. Paper presented at the Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia.
- Ochoa, J. J., Quiles, J. L., Ibanez, S., Martinez, E., Lopez-Frias, M., Huertas, J. R., & Mataix, J. (2003). Aging-related oxidative stress depends on dietary lipid source in rat postmitotic tissues. *J Bioenerg Biomembr*, 35(3), 267-275.
- Ofei, F., Hurel, S., Newkirk, J., Sopwith, M., & Taylor, R. (1996). Effects of an engineered human anti-TNF- $\alpha$  antibody (CDP571) on insulin sensitivity and glycemic control in patients with NIDDM. *Diabetes*, 45(7), 881-885.
- Ogden, C. L., Carroll, M. D., Kit, B. K., & Flegal, K. M. (2013). Prevalence of obesity among adults: United States, 2011-2012. *NCHS Data Brief*(131), 1-8.
- Olivero-David, R., Schultz-Moreira, A., Vázquez-Velasco, M., González-Torres, L., Bastida, S., Benedí, J., . . . Sánchez-Muniz, F. J. (2011). Effects of Nori-and Wakame-enriched meats with or without supplementary cholesterol on

- arylesterase activity, lipaemia and lipoproteinaemia in growing Wistar rats. *British journal of nutrition*, 106(10), 1476-1486.
- Oliveros, E., Somers, V. K., Sochor, O., Goel, K., & Lopez-Jimenez, F. (2014). The concept of normal weight obesity. *Prog Cardiovasc Dis*, 56(4), 426-433. doi:10.1016/j.pcad.2013.10.003
- Olmedilla-Alonso, B., Jiménez-Colmenero, F., & Sánchez-Muniz, F. J. (2013). Development and assessment of healthy properties of meat and meat products designed as functional foods. *Meat Science*, 95(4), 919-930.
- OMS, W. H. O. (1999). *Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Report in english of a WHO Consultation.* Retrieved from Geneva:
- O'Neill, S., & O'Driscoll, L. (2015). Metabolic syndrome: a closer look at the growing epidemic and its associated pathologies. *Obes Rev*, 16(1), 1-12. doi:10.1111/obr.12229
- Onishi, N., Kawamoto, S., Suzuki, H., Santo, H., Aki, T., Shigeta, S., . . . Ono, K. (2007). Dietary pulverized konjac glucomannan suppresses scratching behavior and skin inflammatory immune responses in NC/Nga mice. *International archives of allergy and immunology*, 144(2), 95-104.
- Ordovás, J. M. (2010). Gene-environment interactions predisposing to type 2 diabetes mellitus. In M. G.-F. Serrano-Ríos, J.A. (Ed.), *Type 2 diabetes mellitus* (pp. 79-87). Barcelona, Spain: Elsevier.
- Orgaz Gallego, M. P., Bermejo Lopez, P., Tricio Armero, M. A., Abellan Aleman, J., Solera Albero, J., & Tarraga Lopez, P. J. (2015). METABOLIC SYNDROME AND ITS COMPONENTS IN SPANISH POSTMENOPAUSAL WOMEN. *Nutr Hosp*, 32(n02), 656-666. doi:10.3305/nh.2015.32.2.9211
- Ou, Y., Lin, L., Yang, X., Pan, Q., & Cheng, X. (2013). Antidiabetic potential of phycocyanin: effects on KKAy mice. *Pharm Biol*, 51(5), 539-544. doi:10.3109/13880209.2012.747545
- Paglia, D. E., & Valentine, W. N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 70(1), 158-169.
- Panis, C., Herrera, A. C., Aranome, A. M., Victorino, V. J., Michelletti, P. L., Morimoto, H. K., . . . Cecchini, R. (2014). Clinical insights from adiponectin analysis in breast cancer patients reveal its anti-inflammatory properties in non-obese women. *Mol Cell Endocrinol*, 382(1), 190-196. doi:10.1016/j.mce.2013.09.030
- Patti, M. E., Butte, A. J., Crunkhorn, S., Cusi, K., Berria, R., Kashyap, S., . . . Saccone, R. (2003). Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(14), 8466-8471.
- Petersen, K. F., Befroy, D., Dufour, S., Dziura, J., Ariyan, C., Rothman, D. L., . . . Shulman, G. I. (2003). Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. *Science*, 300(5622), 1140-1142. doi:10.1126/science.1082889
- Plaza-Diaz, J., Gomez-Llorente, C., Abadia-Molina, F., Saez-Lara, M. J., Campaña-Martin, L., Muñoz-Quezada, S., . . . Fontana, L. (2014). Effects of *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 and *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 on hepatic steatosis in Zucker rats.
- Plomgaard, P., Bouzakri, K., Krogh-Madsen, R., Mittendorfer, B., Zierath, J. R., & Pedersen, B. K. (2005). Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces skeletal muscle insulin resistance in healthy human subjects via inhibition of Akt substrate 160 phosphorylation. *Diabetes*, 54(10), 2939-2945.
- Portero McLellan, K. C., Wyne, K., Villagomez, E. T., & Hsueh, W. A. (2014). Therapeutic interventions to reduce the risk of progression from prediabetes to type 2 diabetes mellitus. *Ther Clin Risk Manag*, 10, 173-188. doi:10.2147/tcrm.s39564

- Raju, J., & Bird, R. P. (2006). Alleviation of hepatic steatosis accompanied by modulation of plasma and liver TNF-alpha levels by *Trigonella foenum graecum* (fenugreek) seeds in Zucker obese (fa/fa) rats. *Int J Obes (Lond)*, *30*(8), 1298-1307. doi:10.1038/sj.ijo.0803254
- Ramírez-Moreno, L., & Olvera-Ramírez, R. (2006). Uso tradicional y actual de spirulina sp. (*arthrospira* sp.). *Interciencia*, *31*, 657-663. Retrieved from [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-18442006000900008&nrm=iso](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442006000900008&nrm=iso)
- Recuerda Girela, M. A. (2006). Seguridad alimentaria y nuevos alimentos: régimen jurídico-administrativo. *Pamplona, Aranzadi*.
- Riss, J., Decorde, K., Sutra, T., Delage, M., Baccou, J. C., Jouy, N., . . . Rouanet, J. M. (2007). Phycobiliprotein C-phycoyanin from *Spirulina platensis* is powerfully responsible for reducing oxidative stress and NADPH oxidase expression induced by an atherogenic diet in hamsters. *J Agric Food Chem*, *55*(19), 7962-7967. doi:10.1021/jf070529g
- Rodriguez-Rodriguez, E., Lopez-Plaza, B., Lopez-Sobaler, A. M., & Ortega, R. M. (2011). Prevalencia de sobrepeso y obesidad en adultos españoles. *Nutr Hosp*, *26*(2), 355-363. doi:10.1590/s0212-16112011000200017
- Sainz, N., Barrenetxe, J., Moreno-Aliaga, M. J., & Martinez, J. A. (2015). Leptin resistance and diet-induced obesity: central and peripheral actions of leptin. *Metabolism*, *64*(1), 35-46. doi:10.1016/j.metabol.2014.10.015
- Samuels, R., Mani, U., Iyer, U., & Nayak, U. (2002). Hypocholesterolemic effect of *Spirulina* in patients with hyperlipidemic nephrotic syndrome. *Journal of medicinal food*, *5*(2), 91-96.
- Sánchez, M., Bernal-Castillo, J., Rozo, C., & Rodríguez, I. (2003). *Spirulina* (*arthrospira*): an edible microorganism: a review. *Universitas Scientiarum*, *8*(1), 7-24.
- Sánchez-Alonso, I., Careche, M., & Borderías, A. J. (2007). Method for producing a functional protein concentrate from giant squid (*Dosidicus gigas*) muscle. *Food Chem*, *100*(1), 48-54.
- Sanchez-Alonso, I., Solas, M. T., & Borderías, A. J. (2007). Technological implications of addition of wheat dietary fibre to giant squid (*Dosidicus gigas*) surimi gels. *Journal of Food Engineering*, *81*(2), 404-411.
- Sánchez-Muniz, F. (2003). Los Lípidos. In G.-A. MT (Ed.), *Nutrición y Dietética*. (pp. 119-133). Universidad de León, León,: García-Fernández MC, eds.
- Sánchez-Muniz, F. J. (2004). Alimentos funcionales: carne y derivados cárnicos. Presente y perspectivas. In F. J. S.-M. y B. o. A. F. Jiménez Colmenero (Ed.), *La carne y productos cárnicos como alimentos funcionales* (pp. 39-58): Fundación Española de la Nutrición.
- Sanchez-Muniz, F. J. (2012). Dietary fibre and cardiovascular health. *Nutr Hosp*, *27*(1), 31-45. doi:10.1590/s0212-16112012000100005
- Sanchez-Muniz, F. J., & Bastida, S. (2008). Do not use the Friedewald formula to calculate LDL-cholesterol in hypercholesterolaemic rats. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *110*(4), 295-301.
- Sánchez-Muniz, F. J., & Sesmero, J. M. M. (2005). Efecto de los hábitos dietéticos sobre los factores de riesgo asociados al síndrome metabólico. *ANS. Alimentación, nutrición y salud*, *12*(3), 108-112.
- Sanchez-Muniz, F. J., Cava, F., Viejo, J. M., Higon, E., & Cuesta, C. (1995). Olive oil- and sunflower oil-fried sardines in the prevention of rat hypercholesterolemia. *Z Ernährungswiss*, *34*(1), 16-21.
- Sanchez-Muniz, F. J., Garcia-Linares, M. C., Garcia-Arias, M. T., Bastida, S., & Viejo, J. (2003). Fat and protein from olive oil-fried sardines interact to normalize serum lipoproteins and reduce liver lipids in hypercholesterolemic rats. *J Nutr*, *133*(7), 2302-2308.

- Sanchez-Muniz, F. J., Gesteiro, E., Esparrago Rodilla, M., Rodriguez Bernal, B., & Bastida, S. (2013). La alimentación de la madre durante el embarazo condiciona el desarrollo pancreático, el estatus hormonal del feto y la concentración de biomarcadores al nacimiento de diabetes mellitus y síndrome metabólico. *Nutr Hosp*, 28(2), 250-274. doi:10.3305/nh.2013.28.2.6307
- Sánchez-Muniz, F., & Sanz-Pérez, B. (2015). IMPORTANCIA DE LA DIETA EN LA OBESIDAD. In Antonio L. Doadrio Villarejo (Ed.), *Obesidad. Segundo Curso Avanzado sobre Obesidad* (Vol. Monografía XXXIX, pp. 76-117). Madrid, España: Instituto de España. Real Academia de Farmacia.
- Sánchez-Pozo, A., Gil, A., & Gil, A. (2010). Metabolismo de lípidos. *Tratado de Nutrición. Acción Médica, Madrid*, 1, 523-560.
- Schultz Moreira, A. R., Garcia-Fernandez, R. A., Bocanegra, A., Mendez, M. T., Bastida, S., Benedi, J., . . . Sanchez-Muniz, F. J. (2013). Effects of seaweed-restructured pork diets enriched or not with cholesterol on rat cholesterolaemia and liver damage. *Food Chem Toxicol*, 56, 223-230. doi:10.1016/j.fct.2013.02.028
- Schultz, A. B., & Edington, D. W. (2009). Metabolic syndrome in a workplace: prevalence, co-morbidities, and economic impact. *Metab Syndr Relat Disord*, 7(5), 459-468. doi:10.1089/met.2009.0008
- Schultz-Moreira, A. R., Benedi, J., González-Torres, L., Olivero-David, R., Bastida, S., Sánchez-Reus, M. I., . . . Sánchez-Muniz, F. J. (2011). Effects of diet enriched with restructured meats, containing *Himanthalia elongata*, on hypercholesterolaemic induction, CYP7A1 expression and antioxidant enzyme activity and expression in growing rats. *Food Chem*, 129(4), 1623-1630.
- SEEDO, C. (2000). para la evaluación del sobrepeso y la obesidad y el establecimiento de criterio de intervención terapéutica. Sociedad Española para el estudio de la obesidad (SEEDO).(2000). *Medicina Clínica*, 115, 585-595.
- Serrano-Ríos M, G.-F. J. (2011). Obesity and Type 2 Diabetes Mellitus. The reciprocal impact. In O. J. Serrano-Ríos M, Gutiérrez-Fuentes JA (Ed.), *Obesity* (pp. 215-232). Barcelona (Spain): Elsevier España.
- Shah, N. C., Shah, G. J., Li, Z., Jiang, X. C., Altura, B. T., & Altura, B. M. (2014). Short-term magnesium deficiency downregulates telomerase, upregulates neutral sphingomyelinase and induces oxidative DNA damage in cardiovascular tissues: relevance to atherogenesis, cardiovascular diseases and aging. *Int J Clin Exp Med*, 7(3), 497-514.
- Shahid, A., Rana, S., Mahmood, S., & Saeed, S. (2015). Role of leptin G-2548A polymorphism in age- and gender-specific development of obesity. *J Biosci*, 40(3), 521-530.
- Shinkyo, R., & Guengerich, F. P. (2011). Cytochrome P450 7A1 Cholesterol 7 $\alpha$ -Hydroxylation INDIVIDUAL REACTION STEPS IN THE CATALYTIC CYCLE AND RATE-LIMITING FERRIC IRON REDUCTION. *Journal of Biological Chemistry*, 286(6), 4632-4643.
- Sili, C., Torzillo, G., & Vonshak, A. (2012). *Arthrospira* (Spirulina) *Ecology of Cyanobacteria II* (pp. 677-705): Springer.
- Sotiroudis, T. G., & Sotiroudis, G. T. (2013). Health aspects of Spirulina (*Arthrospira*) microalga food supplement. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 78(3), 395-405.
- Stanton, R. C. (2012). Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and cell survival. *IUBMB Life*, 64(5), 362-369. doi:10.1002/iub.1017
- Steinberg, G. R. (2007). Inflammation in obesity is a common link between defects in fatty acid metabolism and insulin resistance. *Cell Cycle*, 6(8), 888-894.
- Stizenberger, E. (1852). *Spirulina* und *Arthrospira* (nov. gen.). *Hedwigia*, 1, 32-34.
- Sutttnar, J., Čermák, J., & Dyr, J. E. (1997). Solid-phase extraction in malondialdehyde analysis. *Analytical biochemistry*, 249(1), 20-23.

- Suzuki, K., Jayasena, C. N., & Bloom, S. R. (2012). Obesity and appetite control. *Exp Diabetes Res*, 2012, 824305. doi:10.1155/2012/824305
- Terpstra, A. H., Sanchez-Muniz, F. J., West, C. E., & Woodward, C. J. (1982). The density profile and cholesterol concentration of serum lipoproteins in domestic and laboratory animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 71(4), 669-673.
- Thorburn, A. W., Crapo, P. A., Griver, K., Wallace, P., & Henry, R. R. (1990). Long-term effects of dietary fructose on carbohydrate metabolism in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism*, 39(1), 58-63.
- Tie, G., Messina, K. E., Yan, J., Messina, J. A., & Messina, L. M. (2014). Hypercholesterolemia induces oxidant stress that accelerates the ageing of hematopoietic stem cells. *J Am Heart Assoc*, 3(1), e000241. doi:10.1161/jaha.113.000241
- Tomaselli, L., Boldrini, G., & Margheri, M. (1997). Physiological behaviour of *Arthrospira* (Spirulina) maxima during acclimation to changes in irradiance. *Journal of applied phycology*, 9(1), 37-43.
- Torres-Duran, P. V., Ferreira-Hermosillo, A., & Juarez-Oropeza, M. A. (2007). Antihyperlipemic and antihypertensive effects of *Spirulina maxima* in an open sample of Mexican population: a preliminary report. *Lipids Health Dis*, 6(1), 33.
- Tovar, A. R., Diaz-Villasenor, A., Cruz-Salazar, N., Ordaz, G., Granados, O., Palacios-Gonzalez, B., . . . Torres, N. (2011). Dietary type and amount of fat modulate lipid metabolism gene expression in liver and in adipose tissue in high-fat diet-fed rats. *Arch Med Res*, 42(6), 540-553. doi:10.1016/j.arcmed.2011.10.004
- Tranchida, F., Tchiakpe, L., Rakotoniaina, Z., Deyris, V., Ravion, O., & Hiol, A. (2012). Long-term high fructose and saturated fat diet affects plasma fatty acid profile in rats. *Journal of Zhejiang University Science B*, 13(4), 307-317.
- Tripathy, D., Mohanty, P., Dhindsa, S., Syed, T., Ghanim, H., Aljada, A., & Dandona, P. (2003). Elevation of free fatty acids induces inflammation and impairs vascular reactivity in healthy subjects. *Diabetes*, 52(12), 2882-2887.
- Turkoglu, A., Boyuk, A., Tanriverdi, M. H., Gunduz, E., Dusak, A., Kaplan, I., & Gumus, M. (2014). The potential role of BMI, plasma leptin, nesfatin-1 and ghrelin levels in the early detection of pancreatic necrosis and severe acute pancreatitis: a prospective cohort study. *Int J Surg*, 12(12), 1310-1313. doi:10.1016/j.ijso.2014.10.040
- Turpin, P. (1829). *Spirulina oscillarioide* *Dictionnaire des Sciences Naturelles* (Vol. 50, pp. 309-310). Paris: De Lévrault.
- Unger, G., Benozzi, S. F., Perruzza, F., & Pennacchiotti, G. L. (2014). Triglycerides and glucose index: a useful indicator of insulin resistance. *Endocrinol Nutr*, 61(10), 533-540. doi:10.1016/j.endonu.2014.06.009
- Vahouny, G. V., Adamson, I., Chalcarz, W., Satchithanandam, S., Muesing, R., Klurfeld, D. M., . . . Kritchevsky, D. (1985). Effects of casein and soy protein on hepatic and serum lipids and lipoprotein lipid distributions in the rat. *Atherosclerosis*, 56(2), 127-137.
- Vázquez, J., & Sánchez-Muniz, F. (1994). Revisión: Proteína de pescado y metabolismo del colesterol. *Revista española de ciencia y tecnología de alimentos*, 34(6), 589-608.
- Vázquez-Velasco, M., Esperanza Díaz, L., Lucas, R., Gómez-Martínez, S., Bastida, S., Marcos, A., & Sánchez-Muniz, F. J. (2011). Effects of hydroxytyrosol-enriched sunflower oil consumption on CVD risk factors. *British journal of nutrition*, 105(10), 1448-1452.
- Vázquez-Velasco, M., González-Torres, L., López-Gasco, P., Bastida, S., Benedí, J., González-Muñoz, M. J., & Sánchez-Muniz, F. J. (2015). Effects of glucomannan/spirulina-surimi on liver oxidation and inflammation in Zucker rats fed atherogenic diets. *Journal of physiology and biochemistry*, 1-12.

- Vazquez-Velasco, M., Gonzalez-Torres, L., Lopez-Gasco, P., Bastida, S., Benedi, J., Sanchez-Reus, M. I., . . . Sanchez-Muniz, F. J. (2014). Liver oxidation and inflammation in Fa/Fa rats fed glucomannan/spirulina-surimi. *Food Chem*, *159*, 215-221. doi:10.1016/j.foodchem.2014.03.015
- Vázquez-Velasco, M., González-Torres, L., Méndez, M. T., Bastida, S., Benedí, J., González-Muñoz, M. J., & Sánchez-Muniz, F. J. (2015). Dietas hipersaturadas conteniendo surimi de calamar enriquecido con glucomanano y glucomanano/espirlina afectan a la glucemia y los niveles plasmáticos y adiposos de leptina y adiponectina en ratas fa/fa en crecimiento. *Nutr Hosp*, *32*(n06).
- Vázquez-Velasco, M., González-Torres, L., Olivero-David, R., Bastida, S., Benedí, J., Sánchez-Reus, M., . . . Sánchez-Muniz, F. J. (2013). Lipoproteinemia and arylesterase activity in Zucker Fa/Fa rats fed glucomannan/spirulina-enriched squid-surimi. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *115*(11), 1274-1283.
- Viejo, J. M. (1992). *Utilización de sardinas fritas en aceite de oliva en el tratamiento de hipercolesterolemia experimental inducida por dieta*. Universidad Complutense de Madrid.
- Viejo, J., Bastida, S., Sanchez-Muniz, F. J., Garcia-Linares, M. C., & Garcia-Arias, M. T. (2003). Effect of olive oil-fried sardine consumption on liver lipid composition and fatty acid cholesterol esterification in hypercholesterolemic rats. *Food science and technology international*, *9*(5), 329-338.
- Villagrán Pérez, S., Rodríguez-Martín, A., Novalbos Ruiz, J., Martínez Nieto, J., & Lechuga Campoy, J. (2010). Hábitos y estilos de vida modificables en niños con sobrepeso y obesidad. *Nutr Hosp*, *25*(5), 823-831.
- Villalobos, M. E., Sanchez-Muniz, F. J., Acin, M. T., Vaquero, M. P., Higuera, F. J., & Bastida, S. (2010). [Similarities, differences and agonisms of pleiotropic effects of statins and omega-3 fatty acids]. *Nutr Hosp*, *25*(6), 889-909.
- Vonshak, A. (1997). *Spirulina platensis (Arthrospira) physiology, cell biology and biotechnology*. Ed Vonshak A: Taylor & Francis, London, Great Britain (Preface ix).
- Vuksan, V., Jenkins, D. J., Spadafora, P., Sievenpiper, J. L., Owen, R., Vidgen, E., . . . Bruce-Thompson, C. (1999). Konjac-mannan (glucomannan) improves glycemia and other associated risk factors for coronary heart disease in type 2 diabetes. A randomized controlled metabolic trial. *Diabetes Care*, *22*(6), 913-919.
- Wallace, D. C. (2005). A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annual review of genetics*, *39*, 359.
- Wang, Y., Li, J. Y., Han, M., Wang, W. L., & Li, Y. Z. (2015). Prevention and treatment effect of total flavonoids in *Stellera chamaejasme* L. on nonalcoholic fatty liver in rats. *Lipids Health Dis*, *14*, 85. doi:10.1186/s12944-015-0082-6
- Wei, N., & Florez, J. (2010). The molecular and genetic basis of type 2 Diabetes Mellitus In M. y. G.-F. J. Serrano-Ríos (Ed.), *Type 2 Diabetes Mellitus* (pp. 53-77). Amsterdam: Elsevier.
- Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., & Ferrante Jr, A. W. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation*, *112*(12), 1796.
- Winiarska, K., Focht, D., Sierakowski, B., Lewandowski, K., Orłowska, M., & Usarek, M. (2014). NADPH oxidase inhibitor, apocynin, improves renal glutathione status in Zucker diabetic fatty rats: A comparison with melatonin. *Chemico-biological interactions*, *218*, 12-19.
- Wirth, A., Wabitsch, M., & Hauner, H. (2014). The prevention and treatment of obesity. *Dtsch Arztebl Int*, *111*(42), 705-713. doi:10.3238/arztebl.2014.0705

- Wisløff, U., Najjar, S. M., Ellingsen, Ø., Haram, P. M., Swoap, S., Al-Share, Q., . . . Koch, L. G. (2005). Cardiovascular risk factors emerge after artificial selection for low aerobic capacity. *Science*, *307*(5708), 418-420.
- Wong, K., Sam, S., Cheung, P., & Ang, P. (1999). Changes in lipid profiles of rats fed with seaweed-based diets. *Nutrition Research*, *19*(10), 1519-1527.
- Yan, L.-J., Orr, W. C., & Sohal, R. S. (1998). Identification of oxidized proteins based on sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis, immunochemical detection, isoelectric focusing, and microsequencing. *Analytical biochemistry*, *263*(1), 67-71.
- Yang, W. M., Jeong, H. J., Park, S. Y., & Lee, W. (2014). Induction of miR-29a by saturated fatty acids impairs insulin signaling and glucose uptake through translational repression of IRS-1 in myocytes. *FEBS Lett*, *588*(13), 2170-2176. doi:10.1016/j.febslet.2014.05.011
- Yassin, D. J., Doros, G., Hammerer, P. G., & Yassin, A. A. (2014). Long-term testosterone treatment in elderly men with hypogonadism and erectile dysfunction reduces obesity parameters and improves metabolic syndrome and health-related quality of life. *J Sex Med*, *11*(6), 1567-1576. doi:10.1111/jsm.12523
- Yki-Jarvinen, H. (2014). Non-alcoholic fatty liver disease as a cause and a consequence of metabolic syndrome. *Lancet Diabetes Endocrinol*, *2*(11), 901-910. doi:10.1016/s2213-8587(14)70032-4
- Yu, B. P. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological reviews*, *74*(1), 139-162.
- Yuan, Y., & Kitts, D. (1997). Endogenous antioxidants: Role of antioxidant enzymes in biological systems. *Natural Antioxidants: Chemistry, Health Effects, and Applications, Champaign, Illinois: AOCS Press*, *15*, 258-270.
- Zhang, H. H., Halbleib, M., Ahmad, F., Manganiello, V. C., & Greenberg, A. S. (2002). Tumor necrosis factor- $\alpha$  stimulates lipolysis in differentiated human adipocytes through activation of extracellular signal-related kinase and elevation of intracellular cAMP. *Diabetes*, *51*(10), 2929-2935.
- Zheng, J., Inoguchi, T., Sasaki, S., Maeda, Y., McCarty, M. F., Fujii, M., . . . Takayanagi, R. (2013). Phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis* protect against diabetic nephropathy by inhibiting oxidative stress. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *304*(2), R110-R120.
- Zhou, H., Li, Z., Silver, D. L., & Jiang, X. C. (2006). Cholesteryl ester transfer protein (CETP) expression enhances HDL cholesteryl ester liver delivery, which is independent of scavenger receptor BI, LDL receptor related protein and possibly LDL receptor. *Biochim Biophys Acta*, *1761*(12), 1482-1488. doi:10.1016/j.bbali.2006.09.008
- Zimmet, P., Alberti, K., & Shaw, J. (2001). Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*, *414*(6865), 782-787.

## 9. ANEXO

---







## MIGUEL VÁZQUEZ VELASCO



PhD en Dpto. de Nutrición y Bromatología I (Nutrición) | Facultad de Farmacia | UCM

- 📍 Pza. Ramón y Cajal s/n | 28040 Madrid (Spain)
- 📞 +34 91 394 18 28 | +34 636 926 284
- ✉️ [m.vazquez@ucm.es](mailto:m.vazquez@ucm.es)

### FORMACIÓN ACADÉMICA

2009 Actualidad	<b>Doctorando</b> en los Departamentos de Nutrición, Bromatología I (Nutrición) y de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid
2014	<b>Estancia científica en Wageningen University</b> , Holanda
2008 2009	<b>Master en Ciencias Farmacéuticas</b> en “ <i>Efectos del consumo de aceite de girasol con hidroxitirosol sobre la oxidación de las LDL y la actividad arilesterasa</i> ”, Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición), Universidad Complutense de Madrid
2007	<b>Licenciado en Farmacia</b> , Universidad Complutense de Madrid
2007	<b>Curso de Industria Farmacéutica</b> , Universidad Complutense de Madrid
2003	<b>Curso de Marketing Farmacéutico</b> , Universidad Complutense de Madrid

### PARTICIPACIÓN EN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

PROYECTOS / TRABAJOS / ESTUDIOS	
1	
Título:	Derivados de cárnicos con algas. Implicaciones en el metabolismo lipoproteico, status antioxidante y apoptosis.
Entidad / Organismo	Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición), Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.
Duración	De 2005 a 2008.
Responsable	Francisco José Sánchez Muniz. (UCM).
Entidad financiadora	Ministerio de Educación y Ciencia. Secretaria de Estado de Universidades e Investigación. Secretaria General de Política Científica y Tecnológica, AGL-2008 04892-C03-02.

2	
Título:	Ingesta de Konjac glucomanano y prevención de la obesidad en ratas Zucker. Efectos sobre marcadores de riesgo cardiovascular y expresión de genes relacionados con la obesidad, metabolismo glucolipídico.
Entidad / Organismo	Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición) y Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.
Duración	De 2009 a 2011.
Responsable	Juana Benedí González.
Entidad financiadora	Ministerio de Educación y Ciencia, Secretaría de Estado de Universidades e Investigación, Secretaría General de Política Científica y Tecnológica, AGL-2008 04892-C03-02

3	
Título:	Productos cárnicos para el siglo XXI, seguros, nutritivos y saludables.
Entidad / Organismo	Departamento de Farmacología y Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición), Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.
Duración	De 2007 a 2011.
Responsable	Coordinador general. J. Antonio Ordoñez (UCM).
Entidad financiadora	Consolider-Ingenio 2010, CSD 2007-00016.

## PUBLICACIONES

### PUBLICACIONES ARTÍCULOS EN FORMA DE ABSTRACTS EN REVISTAS CIENTÍFICAS INDEXADAS (SCIENTIFIC CITATION INDEX)

CLAVE: Abstract; JCR: Journal Citation Report

1	
Autores:	Vázquez-Velasco, M.; Schultz, A.; González-Torres, L.; Lucas, R.; Olivero, R.; González-Muñoz, M.J.; Benedí, J.; Bastida, S.; Sánchez-Muniz, F.J.
Título:	Effects of nori-enriched meat consumption on arylesterase activity and cholesterol in Wistar rats.
Revista:	<b>European Journal of Pharmacology</b> 66:S99 (2010)
Clave:	Abstract
ISSN/JCR	0014-2999/029-6651 (JCR 2010, 90 de 252 de Pharmacology and Pharmacy, impact factor 2.737)

**2**

Autores:	Schulth Moreira, A.R.; Olivero David, R.; González-Torres, R.; Vázquez-Velasco, M.; Bastida, S.; Benedi, J.; Sánchez-Muniz, F.J.;
Título:	Effects of restructured meats containing sea spaghetti on liver cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase expression in normal and hypercholesterolemic male Wistar rats.
Revista:	<b>Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics</b> 3(2-3), 49-126 (2010)
Clave:	Abstract P025, page 79
ISSN/JCR	1661-6499 (JCR 2010, 50 de 70 en Nutrition and Dietetics, impact factor 1.304)

**3**

Autores:	Vázquez-Velasco, M; González-Torres, L; Bastida, S; Sánchez-Muniz, FJ; Benedí, J.
Título:	Squid surimi enriched with glucomannan decreased liver damage in cholesterol fed Fa/Fa rats.
Revista:	<b>Nutrición Hospitalaria</b> 27, 43 (2012)
Clave:	Abstract
ISSN/JCR	0212-1611 (JCR 2012, 57 de 76 en Nutrition and Dietetics, impact factor 1,305)

**4**

Autores:	Vázquez-Velasco, M; González-Torres, L; Bastida, S; Sánchez-Muniz, FJ; Benedí, J.
Título:	Spirulin inclusion reduced inflammation induced by glucomannan enriched squid surimi in Fa/Fa rats.
Revista:	<b>Nutrición Hospitalaria</b> 27, 43 (2012)
Clave:	Abstract
ISSN/JCR	0212-1611 (JCR 2012, 57 de 76 en Nutrition and Dietetics, impact factor 1,305)

**5**

Autores:	Vázquez-Velasco, M.; González-Torres, L.; López-Gasco, P.; Garcimartín, A.; González-Muñoz, M.J.; Benedí, J.; Bastida, S.; Sánchez-Muniz, F.J.
Título:	Restructured squid-surimi enriched in glucomannan improves the antioxidante staus in obese Zucker rats.
Revista:	<b>Annals of Nutrition and Metabolism</b> 63(suppl.1): 1617 (2013)
Clave:	Abstract
ISSN/JCR	0250-6807 y 1421-9697 (JCR 2013, 30 de 78 en Nutrition and Dietetics, impact factor 2.747)

PUBLICACIONES ARTÍCULOS  
EN REVISTAS CIENTÍFICAS INDEXADAS (SCIENTIFIC CITATION INDEX)

CLAVE: A=artículo, R=review

**1**

Autores:	Vázquez, J. y Sánchez-Muniz, F.J.
Título:	"Proteína de pescado y metabolismo de colesterol"
Revista:	<b>Revista Española de Ciencia y Tecnología de los Alimentos</b> 34: 589-608 (1994).
Clave: R	ISI Web. JCR (1994). <b>Índice impacto: 0.087 (64 de 70 en Food Science &amp; Technology)</b>
ISSN	0034-7698

**2**

Autores:	Vázquez-Velasco, M.; Lucas, R.; Diaz, L.E.; Gómez-Martínez, S.; Bastida, S.; Marcos, A.; Sánchez-Muniz, F.J.
Título:	Effects of hydroxytyrosol-enriched sunflower oil consumption on cardiovascular disease risk factors
Revista:	<b>British Journal of Nutrition</b> 105:1448-1452 (2011). Corrigendum in Br J Nutr 105: 1712 (2011)
Clave: A	ISI Web. JCR. (2011). <b>Índice impacto: 3.013 (19 de 74 en Nutrition &amp; Dietetics)</b>
ISSN	0007-1145

**3**

Autores:	Olivero-David, R.; Schultz-Moreira, A.; Vázquez-Velasco, M.; González-Torres, L.; Bastida, S.; Benedí, J.; Sánchez-Reus, M.I., González-Muñoz, M.J. and Sánchez-Muniz, F.J.
Título:	Effects of Nori- and Wakame-enriched meat with or without supplementary cholesterol on arylesterase activity, lipaemia, and lipoproteinaemia in growing Wistar rats
Revista:	<b>British Journal of Nutrition</b> 106:1476-1486 (2011).
Clave: A	ISI Web. JCR. (2011). <b>Índice impacto: 3.013 (19 de 74 en Nutrition &amp; Dietetics)</b>
ISSN	0007-1145

**4**

Autores:	Gesteiro, E.; Bastida, S.; Vázquez-Velasco, M.; Corella, D.; Ordovas, J.M.; Sánchez-Muniz, F.J.
Título:	Effect of APO A5 S19W polymorphism on growth, insulin sensitivity and lipoproteins in normoweight neonates
Revista:	<b>European Journal of Pediatrics.</b> 170:1551-1558 (2011).
Clave: A	ISI Web. JCR. (2011). <b>Índice impacto: 1.879 (39 de 113 de Pediatrics)</b>
ISSN	0340-6199

5	
Autores:	Vázquez-Velasco, M.; González-Torres, L.; Olivero-David, R.; Bastida, S.; Benedí, J.; Sánchez-Reus, M.I.; González-Muñoz, M.J.; and Sánchez-Muniz, F.J.
Título:	Lipoproteínaemia and arylesterase activity in Zucker Fa/Fa rats fed glucomannan/spirulina-enriched squid surimi.
Revista:	<b>European Journal of Food Science and Technology</b> 115: 1274-1283 (2013).
Clave: A	ISI Web. JCR. (2013). <b>Índice impacto: 2,033 (36 de 123 en Food Science &amp; Technology)</b>
ISSN	1438-7697

6	
Autores:	Schultz Moreira, A.; Olivero David, R.; Vázquez-Velasco, M.; González-Torres, L.; Benedí, J.; Bastida, S. and Sánchez-Muniz, F.J.
Título:	Protective effects of Sea Spaghetti-enriched restructured pork against dietary cholesterol. Effects on arylesterase and lipoprotein profile and composition of growing rats.
Revista:	<b>Journal of Medicinal Food</b> 17: 921-928 (2014)
Clave: A	ISI Web. JCR. (2014). <b>Índice impacto: 1,699 (48 de 123 en Food Science &amp; Technology; 54 de 78 en Nutrition &amp; Dietetics)</b>
ISSN	1906-620X

7	
Autores:	Vázquez-Velasco, M.; González-Torres, L.; López-Gasco, P.; Bastida, S.; Benedí, J.; Sánchez-Reus, M.I.; González-Muñoz, M.J.; and Sánchez-Muniz, F.J.
Título:	Liver oxidation and inflammation in Fa/Fa rats fed glucomannan spirulina-surimi
Revista:	<b>Food Chemistry</b> 159: 215-221 (2014)
Clave: A	ISI Web. JCR. (2014). <b>Índice impacto: 3,391 (8 de 123 en Food Science &amp; Technology; 19 de 77 en Nutrition &amp; Dietetics)</b>
ISSN	1661-6596

8	
Autores:	Vázquez-Velasco, M.; González-Torres, L.; López-Gasco, P.; Bastida, S.; Benedí, J.; González-Muñoz, M.J.; Sánchez-Muniz, F.J.
Título:	Effects of glucomannan/spirulina-surimi on liver oxidation and inflammation in Zucker rats fed atherogenic diets
Revista:	<b>Journal of Physiology and Biochemistry</b> (2015). Aug 4. [Epub ahead of print] DOI 10.1007/s13105-015-0425-9
Clave: A	ISI Web. JCR. (2014). <b>Índice impacto: 1.969 (51 de 83 en Physiology y 210 de 289 en Biochemistry &amp; Molecular Biology)</b>
ISSN	1138-7548

## 9

Autores:	González-Torres, L., Vázquez-Velasco, M., Olivero-David, R., Bastida, S., Benedí, J., Raposo González, R., González-Muñoz, M.J., Sánchez-Muniz, F.J.
Título:	Glucomannan and glucomannan plus spirulina added to pork significantly block dietary cholesterol effects on lipoproteinaemia, arylesterase activity and CYP7A1 expression in Zucker fa/fa rats.
Revista:	<b>Journal of Physiology and Biochemistry</b> (2015). Accepted for publication in October 2015. Manuscrito JPBX-D-15-00306R1
Clave: A	ISI Web. JCR. (2014). <b>Índice impacto: 1.969 (51 de 83 en Physiology y 210 de 289 en Biochemistry &amp; Molecular Biology)</b>
ISSN	1138-7548

## 10

Autores:	Vázquez-Velasco, M., González-Torres, L., Méndez, M.T., Bastida, S., Benedí, J., González-Muñoz, M.J., Sánchez-Muniz, F.J.
Título:	Glucomannan and glucomannan plus spirulina-enriched squid-surimi added to high saturated diet affect glycemia, plasma and adipose leptin and adiponectin levels in growing fa/fa rats
Revista:	<b>Nutrición Hospitalaria</b> 32: 00-00 (2015). Accepted for publication in Octubre 2015. Manuscrito 9963
Clave: A	ISI Web. JCR. (2014). <b>Índice de impacto: 1.040 (64 de 77 en Nutrition and Dietetics)</b>
ISSN	0212-1611

## 11

Autores:	Vázquez-Velasco, M., González-Torres, L., García-Fernández, R.A.; Méndez, M.T., Bastida, S., Benedí, J., González-Muñoz, M.J., Sánchez-Muniz, F.J.
Título:	Glucomannan and glucomannan plus spirulina-enriched squid surimis affect liver and heart histological damage on Zucker fa/fa rats fed atherogenic diets enriched or not in cholesterol
Revista:	<b>Food Chemistry and Toxicology</b> (2015). Manuscrito FCT-D-15-01498 September 2015
Clave: A	ISI Web. JCR. (2014). <b>Índice de impacto: ..... (.. de 77 en Nutrition and Dietetics)</b>
ISSN	

## PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS

### CONTRIBUCIONES A CONGRESOS NACIONALES COMUNICACIONES ORALES Y POSTERS

1	
Autores:	Vázquez-Velasco, M.; Lucas, R.; Diaz-Prieto, LE, Gómez-Martínez, S.; Marcos, A.; Sánchez-Muniz, F.J.
Título:	El consumo de aceite de girasol enriquecido con hidroxitirosol mejora en voluntarios la actividad arilesterasa y disminuye la peroxidación de LDL
Lugar	Sitges (Barcelona)
Fecha	11-13 de junio de 2009
Entidad organizadora	XI CONGRESO NACIONAL DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE NUTRICIÓN. "Logros y Retos en Alimentación: Innovación y Consumo.
Carácter	Comunicación Oral. O-080-0. Sesión I. 4OR Publicado en: Abstracts del Congreso y en <i>Nutrición Hospitalaria</i> 25: 1; 133-134 (2010)

2	
Autores	Vázquez-Velasco, M.; Lucas, R.; Olivero, R.; Benedí, J.; Bastida, S.; Sánchez-Muniz, F.J.
Título	Efecto del consumo de cárnicos enriquecidos con alga Wakame o Espagueti sobre la actividad arilesterasa en ratas Wistar.
Lugar	Sitges (Barcelona)
Fecha	11-13 de junio de 2009
Entidad organizadora	XI CONGRESO NACIONAL DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE NUTRICIÓN. "Logros y Retos en Alimentación: Innovación y Consumo".
Carácter	Comunicación Oral. O-080-0. Sesión I. 5OR Publicado en: Abstracts del Congreso y en <i>Nutrición Hospitalaria</i> 25: 1; 134 (2010)

3	
Autores	Vázquez-Velasco, M.; Schultz, A.; González-Torres, L.; Lucas, R.; Olivero, R.; González-Muñoz, M.J.; Benedí, J.; Bastida, S.; Sánchez-Muniz, F.J.
Título	Effects of nori-enriched meat consumption on arylesterase activity and cholesterol in Wistar rats.
Lugar	León
Fecha	15 al 17 de Septiembre 2010
Entidad organizadora	XXXII CONGRESO DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE FARMACOLOGÍA
Carácter	Póster. P-62. Publicado en <i>European Journal of Pharmacology</i> 66:S99 (2010)

4	
Autores	Vázquez-Velasco M, González-Torres L, Bastida S, Sánchez-Muniz FJ.
Título	Squid surimi enriched with glucomannan decreased liver damage in cholesterol fed Fa/Fa rats
Lugar	Zaragoza
Fecha	27 al 29 de septiembre de 2012
Entidad organizadora	XIV CONGRESO DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE NUTRICIÓN
Carácter	<i>Poster 065. Alimentos Publicado en Nutrición Hospitalaria 2012, 27: 43</i>

5	
Autores	Vázquez-Velasco M, González-Torres L, Bastida S, Sánchez-Muniz FJ, Benedí J.
Título	Spirulin inclusion reduced inflammation induced by glucomannan enriched squid surimi in Fa/Fa rats
Lugar	Zaragoza
Fecha	27 al 29 de septiembre de 2012
Entidad organizadora	XIV CONGRESO DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE NUTRICIÓN
Carácter	<i>Poster 066. Alimentos Publicado en Nutrición Hospitalaria 2012, 27: 43</i>

6	
Autores	Vázquez-Velasco M, González-Torres L, Garcimartín A, Bastida S, Sánchez-Muniz FJ, Benedí J.
Título	El surimi de calamar enriquecido con glucomanano y espirulina reduce el daño hepático en ratas fa/fa alimentadas con una dieta rica en colesterol.
Lugar	Cádiz
Fecha	7-10 Noviembre 2012
Entidad organizadora	IX CONGRESO SOCIEDAD ESPAÑOLA DE NUTRICIÓN COMUNITARIA
Carácter	<i>Poster P3_93 039-P. Publicado en Rev Esp Nutr Comunitaria 2012 18 (Supl 3), 71.</i>

**CONTRIBUCIONES A CONGRESOS INTERNACIONALES  
COMUNICACIONES ORALES Y POSTERS**

**1**

Autores:	Sánchez-Muniz, F.J.; Gesteiro, E.; Vázquez-Velasco, M.; Lucas, R.; Bastida, S.
Título:	Arylesterase activity in neonates from the Merida's cohort
Lugar	Hamburg, Germany
Fecha	20 - 23 June, 2010
Entidad organizadora	78TH EUROPEAN ATHEROSCLEROSIS SOCIETY CONGRESS
Carácter	Poster. Publicado en Memory stick: A-226-0001-01041

**2**

Autores	Schultz Moreira, A.R.; Olivero-David, R.; González-Torres, L.; Vazquez-Velasco, M.; Bastida, S.; Benedí, J.; Sánchez-Muniz, F.J.
Título	Effect of restructured meats containing sea spaguetti on liver cholesterol 7- $\alpha$ hydroxylase expression in normal and hypercholesterolemic male Wistar rats
Lugar	Pamplona, Spain
Fecha	November 17-20, 2010
Entidad organizadora	IV Congress of the International Society of Nutrigenetics/Nutrigenomics (ISNN)
Carácter	Poster, P-025. Published in <i>J Nutrigenet Nutrigenomics 2010; 3 :79</i>

**3**

Autores	González-Torres, L.; Vázquez-Velasco, M.; Olivero, R.; Bastida, S.; Sánchez-Muniz, F.J.; Sánchez-Reus, M.I.; González-Muñoz, M.J.; Benedí, J.
Título	Paradoxical effects in Zucker Fa-fa rats of consumption of diets containing Konjac flour enriched meat on insulin resistance/sensibility biomarkers
Lugar	Madrid, Spain
Fecha	April 6-9, 2011
Entidad organizadora	4TH INTERNATIONAL CONGRESS ON PREDIABETES AND THE METABOLIC SYNDROME
Carácter	Poster, Published in <i>Journal of Diabetes</i> , 2011; 3, suppl, 1 171. ISSN 1753-0393

4	
Autores	González-Torres, L.; Vázquez-Velasco, M.; Schultz, A.; Bastida, S.; Sánchez-Muniz, F.J.; Sánchez-Reus, M.I.; Méndez, M.; González-Muñoz, M.J.; Benedí, J.
Título	Effects on adiposity, organ weight and liver damage biomarkers on Fa-Fa rats fed with restructured meat enriched with glucomannan and spirulin.
Lugar	Madrid, Spain
Fecha	April 6-9, 2011
Entidad organizadora	4TH INTERNATIONAL CONGRESS ON PREDIABETES AND THE METABOLIC SYNDROME
Carácter	Poster, Published in <i>Journal of Diabetes</i> , 2011; 3, suppl, 1 146. ISSN 1753-0393

5	
Autores	Vázquez-Velasco, M.; González-Torres, L.; Schultz, A.; Bastida, S.; Sánchez-Muniz, F.J.; Sánchez-Reus, M.I.; González-Muñoz, M.J.; Benedí, J.
Título	Insulin resistance/sensitivity biomarkers changes in Zucker Fa/Fa rats fed diabetogenic diet enriched in squid surimi containing glucomannan and a microalga
Lugar	Gothenburg, Sweden
Fecha	June 26 - 29, 2011
Entidad organizadora	79TH EUROPEAN ATHEROSCLEROSIS SOCIETY CONGRESS
Carácter	Poster A-340-0013-01251

6	
Autores	Vázquez-Velasco, M.; González-Torres, L.; Olivero, R.; Bastida, S.; Sánchez-Muniz, F.J.; Sánchez-Reus, M.I.; González-Muñoz, M.J.; Benedí, J.
Título	Effects of consumption of hypercholesterolemic diets containing glucomannan and spirulin-enriched squid-surimi on plasma lipid concentrations in Zucker Fa-Fa rats
Lugar	Gothenburg, Sweden
Fecha	June 26 - 29, 2011
Entidad organizadora	79TH EUROPEAN ATHEROSCLEROSIS SOCIETY CONGRESS
Carácter	Poster A-340-0013-01253

7	
Autores	Benedí J, González-Torres L, Vázquez-Velasco M, Bastida S, Sánchez-Muniz FJ.
Título	Restructured meat enriched in glucomannan increases the pAMPK levels and ameliorates dyslipidemia in Fa/Fa rats
Lugar	Granada
Fecha	17-20, JULY, 2012
Entidad organizadora	6TH EUROPEAN CONGRESS OF PHARMACOLOGY
Carácter	

8	
Autores	González-Torres L, Vázquez-Velasco M, Matos C, Bastida S, Sánchez-Muniz FJ, Benedí J.
Título	Liver damage of Fa/Fa rats fed with restructured pork enriched with cholesterol
Lugar	Braganza, Portugal
Fecha	16-19, Setembro, 2012
Entidad organizadora	11º ENCONTRO DE QUÍMICA DOS ALIMENTOS. QUALIDADE DOS ALIMENTOS: NOVOS DESAFIOS
Carácter	Poster CP1173. Libro de resúmenes ISBN 978-972-745-132-6

9	
Autores	Garci-Martin A, Fonseca CS, G Bastida S, Vázquez-Velasco M, González-Torres L; Benedí J, Sánchez-Muniz FJ.
Título	Restructured meat containing <i>Himanthalia elongate</i> acts as a competitive $\alpha$ -glucosidase inhibitor. Potential utilities
Lugar	Braganza, Portugal
Fecha	16-19, Setembro, 2012
Entidad organizadora	11º ENCONTRO DE QUÍMICA DOS ALIMENTOS. QUALIDADE DOS ALIMENTOS: NOVOS DESAFIOS
Carácter	Poster CP196. Libro de resúmenes ISBN 978-972-745-132-6

**10**

Autores	Vázquez-Velasco, M.; González-Torres, L.; López-Gasco, P.; Garcimartín, A.; González-Muñoz, M.J.; Benedí, J.; Bastida, S.; Sánchez-Muniz, F.J.
Título	Restructured squid-surimi enriched in glucomannan improves the antioxidante staus in obese Zucker rats.
Lugar	Granada (Spain)
Fecha	15-20 September, 2013
Entidad organizadora	20th INTERNATIONAL CONGRESS OF NUTRITION
Carácter	e-Poster Presentation PO2798. Publicado en <i>Annals of Nutrition and Metabolism</i> 2013; 63(suppl.1): 1617.

**11**

Autores	Vázquez-Velasco, M.; González-Torres, L.; Benedí, J.; Bastida, S.; Sánchez-Muniz, F.J.; Keijer, J.; van Schothorst E.M.
Título	Glucomannan <i>plus</i> spirulina-enriched squid surimi prevents AMPK inhibition on Zucker fa/fa rats fed hyperlipemic diets
Lugar	Nijmegen, The Netherlands
Fecha	July 3-5, 2014
Entidad organizadora	EUROPEAN ASSOCIATION FOR CLINICAL PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS (EACPT) 2014 SUMMER FOCUS MEETING
Carácter	Oral presentation, publicado en <i>Clinical Therapeutics</i> 2014; 36(8S), e15-e15

**CONOCIMIENTO DE IDIOMAS**

Nativo	ESPAÑOL
Fluido	INGLÉS
2007	TOEFL test, ACCESS School of English, Toronto (Canada)

## GRANDES EQUIPOS Y TÉCNICAS ESPECÍFICAS QUE UTILIZA

**Abreviaturas.** F= (uso) Frecuente; O= (uso) ocasional

**Instituciones.** UCM (Universidad Complutense de Madrid); WUR (Wageningen University)

EQUIPOS	USUARIO	INSTITUCIÓN
Cromatografía líquida de Alta Resolución (HPLC-UV) y (HPLC-RI)	F	UCM
Espectrofotometro UV/Visible	F	UCM, WUR
Espectrofluorimetro	F	UCM, WUR
Termociclador para PCR convencional y PCR a tiempo real	F	UCM, WUR
TÉCNICAS ESPECÍFICAS	USUARIO	INSTITUCIÓN
Aislamiento de lipoproteínas	F	UCM
Determinación de actividad enzimática por fluorescencia	F	UCM
Determinación de peroxidación lipídica y fraccionamiento de fases por HPLC	O	UCM
Determinación de expresión génica de enzimas por RT-PCR	F	UCM, WUR
Determinación de la actividad enzimática PON-1 de la arilesterasa	F	UCM
Aislamiento de células hepáticas (hepatocitos) en ratas de experimentación, para el análisis de apoptosis y ciclo celular.	F	UCM



