



**Universitat de les  
Illes Balears**

**TESIS DOCTORAL**

**2018**

**ESTUDIO DEL CINAMALDEHÍDO Y EL  
EUGENOL COMO COMPUESTOS  
POTENCIALMENTE BIOACTIVOS EN EL  
CONTROL DE LA OBESIDAD Y ALTERACIONES  
ASOCIADAS**

**Alberto Ángel Martín**





**Universitat de les  
Illes Balears**

**TESIS DOCTORAL  
2018**

**Doctorado en Nutrigenómica y Nutrición Personalizada  
ESTUDIO DEL CINAMALDEHÍDO Y EL  
EUGENOL COMO COMPUESTOS  
POTENCIALMENTE BIOACTIVOS EN EL  
CONTROL DE LA OBESIDAD Y ALTERACIONES  
ASOCIADAS**

**Alberto Ángel Martín**

**Director: Prof. Andreu Palou Oliver**

**Directora: Dra. Juana Sánchez Roig**

**Tutora: Dra. Ana María Rodríguez Guerrero**

**Doctor por la Universidad de las Islas Baleares**



Los directores de Tesis Doctoral

Prof. Andreu Palou Oliver  
Catedrático de Universidad  
De Bioquímica y Biología Molecular

Dra. Juana Sánchez Roig  
Investigadora Ramón Y Cajal  
Laboratorio de Biología Molecular,  
Nutrición y Biotecnología

El interesado

Sr. Alberto Ángel Martín



## **Agradecimientos**

Al profesor y director de tesis Dr. Andreu Palou Oliver le expreso mis más sinceros agradecimientos por aceptarme en su equipo de investigación. Lo respeto y admiro por su profesionalismo y trayectoria. Es un honor trabajar con usted. Gracias por el apoyo que me brindo todos estos años. Realmente es un ejemplo para todos los que hemos decidido recorrer el camino de la ciencia. Muchas gracias.

Gracias a mi directora, la Dra. Juana Sánchez Roig, puedo afirmar con el corazón que me faltarían hojas para expresar todo el agradecimiento que tengo, porque tu amistad que es muy valiosa para mí. Gracias por aceptar dirigir mi trabajo sin conocerme. Por tu constante ejemplo de esfuerzo y dedicación. Por enseñarme a hacer las cosas bien. Por tu ayuda y apoyo incondicional en los momentos más difíciles. Por la confianza que me tienes desde la primera vez que nos vimos en el aeropuerto de Palma. Eres parte de mi familia. Muchas gracias Joana.

Gracias a los profesores del LBNB, Dra. Catalina Picó, Dra. Luisa Bonet, Dra. Francisca Serra, Dra. Paula Oliver, Dra. Ana María Rodríguez, Dra. Mariona Palou, Dr. Joan Ribot, Dra. Bárbara Reynes, Dr. Pep Mercader, Cada uno de ustedes apporto sus consejos y recomendaciones que me ayudaron a realizar un buen trabajo diario en el laboratorio.

Gracias Enzo por tu excelente trabajo y por poner a mi disposición, de forma muy generosa, equipos, materiales y mucho conocimiento. Gracias porque siempre tienes una palabra de ánimo que nos alegra el día a todos.

Gracias a mis amigos de laboratorio, Dr. Petar, Dra. Alice, Dr. Xisco, Dra. Nara, Dr, Heriberto, Dra, Andrea Arreguin, Dra. Marga Cifre, Andrea Guille, Miguel García, Bea, Ángel, Madhu, Paula Nuñez, David Otero, Marta Alonso, Antoni Asencio, Bojan Stojnić, gracias por su calidad humana y apoyo. Las verdaderas amistades no tienen barreras.

Gracias a la Dra. Estefanía García por sus recomendaciones, ejemplo, por ser una persona transparente y tener un alma noble, gracias por tu amistad.

Gracias Alba Serrano Bengoechea, por tus consejos y comentarios que siempre alegran el alma.

Gracias Zhi Xin Yau Qiu, por tu experiencia, espíritu científico y esfuerzo, pero lo más importante por tu amistad. Fue un privilegio compartir contigo este camino.

Gracias Raúl Gil, realmente el humor es algo muy serio. Gracias por el kit de canelo deportivo y el kit de CNA y EU. Gracias por el diseño gráfico de la portada de esta tesis. Gracias por toda tu ayuda y gracias por tu amistad. Espero verte en Colombia.

Gracias CatiDora, me daba ilusión y alegría llegar temprano al laboratorio por tu calidad como persona. Te deseo de corazón lo mejor de la vida. Gracias por tu amistad.

Gracias a mi socio y amigo Sebastià Galmés, por el diseño de la señalización de los adipocitos, por curso de Mallorca intensivo C1, gracias por los viejos tiempos de fútbol. También espero verte en Colombia para que Raúl no se sienta solo en el vuelo.

Gracias Agustí Sabater por tu calidad como investigador y como persona. Gracias por que también contribuiste a ampliar mis expresiones Mallorquinas “M’agrada molt el pa amb oli”, “Ja diré cosas” Gracias por tus consejos y tu amistad.

Gracias Andrea Mosqueda, con tu compañía ir al estabulario fue una tarea ligera, gracias por tu ayuda y lo más importante, gracias por tu amistad. Nos vemos en México.

Gracias a la mis amigos, Carol, Miguel, Azucena, Mónica, Oliva, Tania, Julia, Natalia, Marisol, Gaby, Raúl, Hernel, Luis, José, Sandra, Stelia, Jonny, Vika, Martha, Oscar, Elizabeth, Diana, Gloria, Edna, Libia, Karolay, Javier, Ramón, Antonio, Michaela, Noely, Joan, Presides y Rafael, gracias por sus oraciones y por confiar en mí.

Gracias a la Fundación Carolina y especialmente a Juan Torres, Coordinador del Doctorado.

Gracias a la Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

No tengo palabras para agradecer todo el apoyo incondicional de mi familia. Gracias a mis hermanos, Amanda, Andrés y Estella, por su ejemplo de constancia y rectitud. A mi hermano Nelson gracias por su compañía y consejos en cada instante de mi vida.

A mi padre Andrés Ángel porque allí donde esté su alma, hoy no habrá nadie más orgulloso.

Gracias a Jesús, el mejor ejemplo de obediencia y rectitud en toda la historia de la humanidad, del mundo mundial, cuyo ejemplo es digno de imitar. A Él que me ha dado la oportunidad de existir y conocerlo, que me guía y a pesar de todo no me abandona.

Le dedico esta tesis al Ángel que DIOS envió para protegerme, mi madre, María Susana Martín Puentes, mujer virtuosa que con su amor incondicional siempre ha estado conmigo, dándome su ejemplo de superación y cada día se levantaba muy temprano a enseñarme que las cosas se logran con sacrificio. Ha hecho tantos esfuerzos para que yo llegara hasta aquí y quien aún pone toda su esperanza en mí.

Gracias a todos.



## ÍNDICE

Agradecimientos	I
Abreviaturas	V
Resumen	XI
Lista de artículos originales derivados de la tesis	XVII
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. La obesidad y su prevalencia en el mundo	3
1.2. Enfermedades metabólicas asociadas a la obesidad	4
1.3. Factores que afectan a la obesidad	5
1.3.1. Factores genéticos	6
1.3.2. Factores ambientales	7
1.3.3. Programación metabólica	9
1.4. El tejido adiposo blanco	11
1.4.1. Adipogénesis	11
1.4.2. Hiperplasia e hipertrofia del adipocito	13
1.4.3. Metabolismo lipídico	14
1.5. Compuestos bioactivos en el tratamiento de la obesidad y enfermedades metabólicas asociadas	18
1.5.1. Ejemplos concretos de compuestos bioactivos: eugenol, cinamaldehído	21
<b>2. Objetivos y planteamiento experimental</b>	<b>25</b>
<b>3. Materiales y métodos</b>	<b>33</b>
3.1. Cultivo <i>In vitro</i> de la línea celular 3T3-L1	35
3.1.1. Tratamientos experimentales <i>In vitro</i>	35
3.1.2. Tinción <i>oil red</i> en cultivos celulares	36
3.1.3. Determinación de la viabilidad en cultivos celulares	36
3.2. Experimentación Animal	37
3.2.1. Composición de la dieta	37
3.2.2. Tratamientos experimentales <i>In vivo</i>	38
3.2.3. Composición corporal	39
3.2.4. Extracción de sangre en ayuno	39
3.2.5. Sacrificio y toma de muestras	40
3.3. Análisis morfométrico del tejido adiposo blanco	40
3.4. Extracción de ARN	41
3.4.1. Aislamiento de ARN mediante E.Z.N.A® Total RNA Kit 1	41
3.4.2. Aislamiento de ARN utilizando TriPure	41
3.4.3. Cuantificación del ARN	42
3.5. Análisis de RT-PCR a tiempo real	42
3.5.1. Retrotranscripción	42
3.5.2. PCR a tiempo real	43

3.6. <i>Western blot</i>	45
3.6.1. Preparación de las muestras	45
3.6.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS- PAGE)	46
3.6.3. Electrotransferencia	46
3.6.4. Inmunodetección	47
3.6.5. Escaneado y cuantificación	47
3.7. Determinación de parámetros séricos por técnicas inmunológicas	48
3.7.1. Determinación de la concentración de leptina	48
3.7.2. Determinación de la concentración de insulina	48
3.7.3. Determinación de la concentración de ghrelina	49
3.8. Determinación de parámetros séricos por técnicas enzimáticas.	49
3.8.1. Determinación de triglicéridos circulantes	49
3.8.2. Determinación de ácidos grasos libres circulantes NEFAs	50
3.8.3. Determinación de los niveles de colesterol	51
3.8.4. Determinación de fosfatasa alcalina	51
3.8.5. Determinación de los niveles de aspartato aminotransferasa (AST)	52
3.8.6. Determinación de los niveles de alanina aminotransferasa (ALT)	52
3.8.7. Determinación de la concentración de glucosa	53
3.9. Determinación del índice HOMA-IR	53
3.10. Análisis estadístico	53
<b>4. Resultados y Discusión</b>	<b>55</b>
4.1. Capítulo 1	57
4.1.1. Resultados	58
4.1.2. Discusión	70
4.1.3. Conclusiones	72
4.2. Capítulo 2	73
4.2.1. Resultados	74
4.2.2. Discusión	88
4.2.3. Conclusiones	91
<b>5. Recapitulación</b>	<b>93</b>
<b>6. Conclusiones</b>	<b>99</b>
<b>7. Referencias</b>	<b>103</b>

## Abreviaturas

Lista de las abreviaturas utilizadas en la tesis:

- °C: Grado Centigrado  
 µg/mL: Microgramos por mililitro  
 µm: Micras  
 Abs: Absorbancia  
 Acetil-CoA: Acetil-coenzima A  
 ACOD: Acil-CoA oxidasa (*Acil-CoA oxidase*)  
 Ad libitum: Como lo desee (*As you Desire*)  
 ADN: Ácido desoxirribonucleico  
 ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario  
 (*Desoxirribonucleico Acido Complementary*)  
 ALP: Fosfatasa alcalina (*Alkaline Phosphatase*)  
 ALT: Alanina aminotransferasa (*Alanine Aminotransferase*)  
 ANOVA: Analisis de varianza (*ANalysis Of VAriance*)  
 Apo B-100: Apolipoproteína B-100  
 ARN: Ácido ribonucleico  
 ARNm: Ácido ribonucleico mensajero  
 AST: Aspartato aminotransferasa (*Aspartate Aminotransferase*)  
 ATGL: Lipasa de triglicéridos (*Adipose Triglyceride Lipase*)  
 ATP: Trifosfato de adenosina (*Adenosine Triphosphate*)  
 AxTto: Ayuno por Tratamiento  
 BAT: Tejido adiposo blanco  
 BBS: Síndrome de Bardet-Biedl (*Bardet-Biedl Syndrome*)  
 BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*)  
 BHT: Butil Hidroxitolueno  
 BSA: Albúmina de suero bovino (*Bovine Serum Albumin*)  
 C/EBPs: Proteína de unión al potenciador CCAAT  
 (*CCAAT/Enhancer-Binding Proteins*)  
 CAM: Medicina complementaria y alternativa  
 (*Complementary and Alternative Medicine*)  
 Cd36: Grupo de diferenciación 36 ó Translocasa de ácidos grasos  
 (*Cluster of Differentiation 36 or Fatty Acid Translocase*)  
 CDKs: Enzimas quinasas dependientes de ciclinas (*Cyclin-Dependent Kinase Enzymes*)  
 CIBERObn: Centro de investigación Biomédica en Red Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición  
 Cidea: Efecto tipo A subunidad  $\alpha$  de fragmentación de ADN inductor de muerte celular/ (*Cell Death-inducing DNA fragmentation,  $\alpha$  Subunit-like Effector A*)  
 CKI: Proteínas inhibidoras de Cdk (*Cdk Inhibitory Proteins*)  
 cm<sup>2</sup>: Centímetro cuadrado  
 CNA: Cinamaldehído  
 CO<sub>2</sub>: Dióxido de carbono (*Carbon Dioxide*)  
 CPK: Creatina fosfoquinasa (*Creatine Phospho Kinase*)  
 Cpt1b: Carnitina palmítoiltransferasa 1b (*Carnitine Palmitoyl Transferasa 1b*)  
 Ct: Ciclo umbral (*Cycle Threshold*)  
 dATP: Trifosfato de desoxiadenosina (*Deoxyadenosine Triphosphate*)  
 dCTP: Desoxicitidina trifosfato (*Deoxycytidine Triphosphate*)  
 dGTP: Desoxiguanosina trifosfato (*Deoxyguanosine Triphosphate*)  
 DMEM: Medio de Eagle modificado por Dulbecco

- (*Dulbecco's Modified Eagle's médium*)  
DMS: Desviación media estándar (*Means Standard Deviations*)  
dTTP: Desoxitimidina trifosfato (*Deoxythymidine Triphosphate*)  
ECV: Enfermedades cardiovasculares  
EEUU: Estados Unidos (*United States*)  
EIA: Inmunoensayo enzimático (*Enzyme Immunoassay*)  
EL: Lipasa endotelial (*Endotelial Lipase*)  
ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas  
(*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)  
ET: Capacidad Antioxidante como Equivalente Trolox  
(*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*)  
ETV5: Factor de transcripción variante 5 (*Transcription Factor Etv5*)  
EU: Eugenol  
F: Sentido (*Forward*)  
Fab: Fracmento de unión al antígeno (*Fragment Antigen Binding*)  
FABP4: Proteína de unión a ácidos grasos 4 (*Fatty Acid Binding Protein 4*)  
FAIM2: Molécula inhibidora de la apoptosis Fas 2  
(*Fas Apoptotic Inhibitory Molecule 2*)  
Fasn: Ácido graso sintasa (*Fatty Acid Synthase*)  
FBS: Suero fetal bovino (*Fetal Bovine Serum*)  
Fc: Fragmento cristalino o cristalizabile (*Fragment Crystallizable*)  
Fgf21: Factor de crecimiento de fibroblastos 21 (*Fibroblast Growth Factor 21*)  
FTO: Proteína asociada a la masa grasa y obesidad  
(*Fat Mass and Obesity-Associated Protein*)  
Gck: Glucoquinasa (*Glucokinase*)  
GGT: Gamma-glutamyl transpeptidasa (*Gamma Glutamyl Transpeptidase*)  
Ghsr: Receptor de secretagogos de la hormona del crecimiento  
(*Growth Hormone Secretagogue Receptor*)  
GLUT4: Proteína transportadora de glucosa tipo 4 (*Glucose Transporter Type 4*)  
GNPDA2: Glucosamina-6-fosfato desaminasa 2  
(*Glucosamine-6-Phosphate Deaminase 2*)  
GWAS: Estudios de asociación del genoma completo  
(*Genome-Wide Association Studies*)  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrógeno  
HbA1c: Hemoglobina glicosilada A1c  
HDL: Lipoproteínas de alta densidad (*High Density Lipoproteins*)  
HFD: Dietas ricas en grasa (*High Fat Diets*)  
Hk2: Hexoquinasa 2 (*Hexokinase 2*)  
HL: Lipasa hepática  
HOMA-IR: Modelo homeostático de resistencia a la insulina  
(*Homeostatic Model of Insulin Resistance*)  
HOXB5: Homeobox B5 (*Homeobox B5*)  
HPS: Síndrome de Happy-Puppet (*Happy-Puppet Syndrome*)  
HRP: Peroxidasa del rábano (*Horseradish Peroxidase*)  
HSL: Lipasa sensible a hormonas (*Hormone-Sensitive Lipase*)  
HSP90: Proteína de shock térmico de 90 kDa (*Heat Shock Protein 90*)  
IL-6: Interleucina-6 (*Interleukin-6*)  
IMC: Índice de masa corporal  
IngTAB: Tejido adiposo blanco inguinal  
Insr: Receptor de insulina (*Insulin Receptor*)

INTERHEART: Estudio del efecto de los factores de riesgo potencialmente modificables asociados con el infarto de miocardio (*Study The Effect of Potentially Modifiable Risk Factors Associated with Myocardial Infarction*)  
 Irs1: Receptor de insulina sustrato 1 (*Insulin Receptor Substrate 1*)  
 KCTD15: Canal de potasio que contiene dominio 15 de tetramerización (*Potassium Channel Tetramerization Domain Containing 15*)  
 kDa: Kilodalton  
 kg: Kilogramo  
 LBNB: Laboratorio de Biología Molecular, Nutrición y Biotecnología  
 LCAT: Enzima lecitin-colesterol-aciltransferasa (*Lecithin-Cholesterol-Acyltransferase Enzyme*)  
 LDL: Lipoproteínas de baja densidad (*Low Density Lipoproteins*)  
 LEP: Síndrome deficiencia de leptina (*Leptin Deficiency Syndrome*)  
 Lep: Leptina (*Leptin*)  
 Lepr: Receptor de la leptina (*Leptin Receptor*)  
 LEPR: Síndrome deficiencia del Receptor de Leptina (*Leptin Receptor Deficiency Syndrome*)  
 Lipe: Gen que codifica a la Lipasa sensible a hormonas (*Gene Encoding Hormone-Sensitive Lipase*)  
 LMF1: Proteína lipasa 1  
 Lp(a): Lipoproteína (a)  
 Lpl: Lipoproteína lipasa (*Lipoprotein Lipase*)  
 MC4R: Receptor de la melanocortina 4 (*Melanocortin 4 receptor*)  
 MDH: Enzima malato deshidrogenasa (*Enzyme Malate Dehydrogenase*)  
 MEHA: 3-metil-N-etil-N β-hidroxietil-Anilina (*3-methyl-N-ethyl-N β-hydroxyethyl-Aniline*)  
 mg: Miligramo  
 MgCl<sub>2</sub>: Cloruro de Magnesio (*Magnesium Chloride*)  
 MGL: Lipasa de monoglicéridos (*Monoglyceride Lipase*)  
 Mgl: Leucemia mieloide linfocítica (*Myeloid-Lymphoid Leukemia*)  
 MIM: Herencia mendeliana en el hombre (*Mendelian Inheritance in Man*)  
 min: Minuto  
 miRNAs: Ácido ribonucleico no codificante (*Small Non-coding RNA Molecule*)  
 mL: Mililitro  
 MTCH2: Homólogo portador mitocondrial 2 (*Mitochondrial Carrier Homolog 2*)  
 NADH: Cofactor dinucleótido de nicotinamida (*Nicotinamide Dinucleotide Cofactor*)  
 NEGR1: Regulador de crecimiento neuronal 1 (*Neuronal Growth Regulator 1*)  
 NEFA: Ácidos grasos no esterificados (Non Esterified Fatty Acids)  
 NHANES: Encuesta Nacional de Examen de Salud y Nutrición (*The National Health and Nutrition Examination Survey*)  
 nm: Nanómetro  
 nM: Nanomolar  
 Npy: Neuropeptido Y (*Neuropeptide Y*)  
 O<sub>2</sub><sup>-</sup>: Aniones superóxido  
 OECD: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (*Organisation for Economic Co-operation and Development*)  
 OH: Radicales hidroxilo  
 OLFM4: Olfactomedina 4 (*Olfactomedin 4*)  
 ORAC: Capacidad de absorción de radicales libres (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*)

- p53: Proteína supresora de tumores p53 (*p53 Tumor Suppressor Protein*)  
PBS: Solución salina tamponada con fosfato (*Phosphate Buffered Saline*)  
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)  
Pdk4: Piruvato deshidrogenasa lipoamida quinasa isozima 4  
(*Pyruvate dehydrogenase lipoamide kinase isozyme 4*)  
Per se: Por sí mismo  
pH: Potencial de hidrógeno (*Potential of Hydrogen*)  
PLTP: Proteína transferidora de fosfolípidos (*Phospholipid Transfer Protein*)  
Pnpla2: Triglicérido lipase adiposa ATGL  
(*Patatin-like Phospholipase Domain Containing 2*)  
POD: Peroxidasa (*Peroxidase*)  
POMC: Proopiomelanocortina (*Pro-opiomelanocortin*)  
Ppara: Receptor Alpha Activado por el Factor Proliferador de Peroxisomas  
(*Peroxisome Proliferator Activated Receptor alpha*)  
PPAR $\gamma$ : Receptor Gamma Activado por el Factor Proliferador de Peroxisomas  
(*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma*)  
PQQ: Coenzima quinona de pirroloquinolina (*Pyrroloquinoline Quinone*)  
pRb: Gen que codifica a la proteína del retinoblastoma  
(*Gene that codes for the Retinoblastoma Protein*)  
PWS: Síndrome de Prader-Willi (*Prader-Willi Syndrome*)  
QM: Quilomicrones  
R: Antisentido (*Reverse*)  
RIPA: Tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación  
(*Radioimmunoprecipitation Assay Buffer*)  
RMN: Resonancia magnética nuclear  
rpTAB: Tejido adiposo blanco retroperitoneal  
Slc2a4: Transportador 4 de glucosa (GLUT4)  
(*Solute Carrier Family 2 Facilitated Glucose Transporter Member 4*)  
SCD1: Esteroil conezima A desaturasa 1 (*Stearoyl-Coenzyme A Desaturase 1*)  
SDS - PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)  
SDS: Dodecil sulfato de sodio (*Sodium Dodecyl Sulfate*)  
Se: Selenio  
SEC16B: Proteína transportadora de proteínas Sec16B  
(*Protein transport protein Sec16B*)  
SEM: Error estándar de la media (*Standard Error of the Mean*)  
SH2B1: Proteína adaptadora 1 SH2B (*Adapter Protein 1 - SH2B*)  
Slc24a: Familia SLC24 de intercambiadores de sodio / potasio / calcio  
(*Family of Sodium/Potassium/Calcium Exchangers*)  
SNPs: Polimorfismos de un solo nucleótido (*Single Nucleotide Polymorphisms*)  
Socs3: Supresor de señalización de citocinas 3 (*Suppressor of Cytokine Signaling 3*)  
SPSS: Paquete estadístico para ciencias sociales  
(*Statistical Package for the Social Sciences*)  
Srebf1: Factor de transcripción de unión al elemento regulador de esteroides 1  
(*Sterol Regulatory Element Binding Transcription Factor 1*)  
SREBP-1c: Proteína de unión al elemento regulador del esteroide 1c  
(*Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1c*)  
Stat3: Transductor de señal y activador de la transcripción 3  
(*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*)  
T0: Tiempo 0

T2: Tiempo 2  
T4: Tiempo 4  
T8: Tiempo 8  
TAM: Tejido adiposo marrón  
TBS: Solución buffer de transferencia (*Transfer Buffer Solution*)  
TMEM18: Proteína transmembrana 18 (*Transmembrane Protein 18*)  
TNF $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor Alpha*)  
TNNI3K: Kinasa interactuante TNNI3 (*Interacting Kinase TNNI3*)  
Tto: Tratamiento  
U/mL: Unidad de actividad enzimática por mililitro  
UCP1: Proteína desacoplante 1 (*Uncoupling Protein 1 Mitochondrial Proton Carrier*)  
UIB: Universidad de las Islas Baleares (*Universitat de les Illes Balears*)  
V: Voltios  
VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad (*Very Low-Density Lipoprotein*)  
WD: Dieta obesogénica (*Western Diet*)  
WHO: Organización Mundial de la Salud (*World Health Organization*)  
WR: Reactivo de trabajo (*Working reagent*)







Universitat  
de les Illes Balears

## Estudio del cinamaldehído y el eugenol como compuestos potencialmente bioactivos en el control de la obesidad y alteraciones asociadas

Programa de doctorado de Nutrigenómica y Nutrición Personalizada  
Universidad de las Islas Baleares

### RESUMEN

La obesidad y la diabetes mellitus afectan a más de un tercio de la población mundial actual y, si la tendencia continúa, para 2030 se estima que el 38% de la población adulta mundial tendrá sobrepeso y otro 20% será obeso. En un intento de mejorar los resultados de los tratamientos de la obesidad y enfermedades asociadas hay una tendencia emergente en la investigación científica actual, que busca nuevas moléculas que puedan usarse como biomoléculas funcionales para el control de la obesidad y sus comorbilidades. El clavo de olor y la canela se han utilizado tradicionalmente por sus propiedades para manejar numerosas condiciones de salud y como especias en la industria de alimentos, estas especias han sido descritas ampliamente por tener propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, y/o antidiabéticas. El cinamaldehído (CNA), es el compuesto mayoritario de la canela y el eugenol (EU) es el compuesto mayoritario del clavo de olor.

En esta tesis doctoral se han seleccionado dos compuesto potencialmente bioactivos, cinamaldehído y eugenol, con **el objetivo** de estudiar su efecto *in vitro* e *in vivo*, de forma individual y de forma conjunta, para caracterizar los mecanismos moleculares de sus efectos en el control de la adiposidad, y un posible efecto sinérgico de estos dos compuestos.

Nuestro primer objetivo ha sido caracterizar *in vitro* el efecto del eugenol y cinamaldehído y su combinación en la expresión de genes clave implicados en el metabolismo lipídico en el adipocitos maduro y durante la adipogénesis. Para ello se trataron los cultivos de preadipocitos de la línea 3T3-L1 durante todo el proceso de diferenciación y en etapa de adipocitos maduros con diferentes dosis de EU, CNA y EU+CNA durante 24 horas. Los resultados indican que el eugenol y cinamaldehído afectan la expresión de genes implicados en el metabolismo lipídico en adipocitos maduros de la línea celular 3T3-L1. En concreto, el tratamiento con EU (400  $\mu$ M) disminuye la expresión del ARNm de *Fasn* y *Lipe* y el tratamiento con CNA (400  $\mu$ M) disminuye la expresión de *Fasn* y aumenta la expresión de *Cpt1b* en comparación con el tratamiento control. El tratamiento combinado EU+CNA tiene un efecto sinérgico en la inhibición dosis-respuesta de la expresión de los genes lipogénicos (*Srebf1*, *Pparg*, *Fasn*), sugiriendo un efecto antilipogénico de estos compuestos. Los compuestos bioactivos eugenol, cinamaldehído y su tratamiento combinado afectan la expresión de genes clave implicados en el metabolismo lipídico en adipocitos maduros, pero no afectan al proceso de diferenciación o adipogénesis.

El segundo objetivo ha sido estudiar en ratas *Wistar* macho adultas la capacidad del eugenol y el cinamaldehído para contrarrestar el desarrollo de obesidad ante una dieta obesogénica. Para ello, estudiamos *in vivo* el efecto de la administración oral de EU, CNA y la combinación de ambos EU+CNA en ratas *Wistar* macho de 4 meses de edad alimentadas con una dieta obesogénica. Distribuimos los animales en cinco grupos experimentales: CONTROL (ratas alimentadas con una dieta estándar), WD (ratas alimentadas con dieta obesogénica comercial, rica en grasas y azúcares simples (dieta *western diet*)), WD+EU (ratas alimentadas con una dieta obesogénica comercial y que recibieron diariamente vía oral 40mg/kg/día de eugenol), WD+CNA (ratas alimentadas con una dieta obesogénica comercial y que recibieron diariamente vía oral 250mg/kg/día de cinamaldehído), WD+EU+CNA (ratas alimentadas con una dieta obesogénica comercial y que recibieron diariamente vía oral 40+250 mg/kg/día de eugenol y cinamaldehído, respectivamente). El tratamiento se realizó durante 30 días. Se analizó diariamente la evolución del peso y la ingesta de alimento. Se tomaron medidas de la grasa corporal al inicio y al final del estudio. En el día 15 de experimentación se extrajeron muestras de sangre de la vena safena de los animales en condiciones de ayuno. Analizamos la expresión de genes de interés relacionados con el metabolismo lipídico y el tamaño de los adipocitos del tejido adiposo blanco retroperitoneal e inguinal. Hemos observado que el tratamiento con CNA parece ejercer un cierto efecto anorexigénico que podría explicar la menor ganancia de peso y grasa corporal de los animales. Además, la administración de CNA a ratas alimentadas con una dieta obesogénica reduce el tamaño de los adipocitos y mejora los niveles circulantes de insulina. Los animales del grupo WD+EU, pese a tener una ingesta calórica similar al grupo WD, presentaron un menor peso corporal al final del tratamiento comparado con el grupo WD. Los animales que recibieron el tratamiento combinado presentan efectos muy similares a los observados en animales tratados sólo con CNA, por lo que deducimos que los efectos observados del tratamiento combinado se deben principalmente a los efectos del CNA

Por tanto, el cinamaldehído y el eugenol emergen como posibles compuestos bioactivos potenciales como terapia de control de la obesidad y alteraciones asociadas. La administración de cinamaldehído (250mg/kg/día) previene del incremento en el peso corporal y del aumento del porcentaje de grasa en animales alimentados con una dieta obesogénica. Además, el tamaño de los adipocitos en el tejido adiposo blanco retroperitoneal es menor en los que recibieron WD+CNA que en animales WD, y similar a los adipocitos de los animales del grupo control. Estos compuestos, particularmente el CNA, se muestran eficaces para contrarrestar el desarrollo de obesidad ante una dieta obesogénica.



## Estudi del cinamaldehyd i l'eugenol com a compostos potencialment bioactius en el control de l'obesidad i alteracions associades

Programa de doctorat de Nutrigenòmica i Nutrició Personalitzada  
Universitat de las Isles Balears

### RESUM

L'obesitat i la diabetis mellitus afecten més d'un terç de la població mundial actual i, si aquesta tendència continua, s'estima que l'any 2030 el 38% de la població adulta tindrà sobrepès i un 20% serà obès. Per millorar els resultats dels tractaments de l'obesitat i malalties associades hi ha una tendència emergent en la recerca científica actual, que cerca noves molècules que puguin emprar-se com biomolècules funcionals per al control de l'obesitat i les seves comorbilitats. El clau d'olor i la canyella s'han utilitzat tradicionalment per les seves propietats relacionades amb la salut i com espècies a la indústria d'aliments. S'ha descrit àmpliament a la bibliografia científica que aquestes espècies poden tenir propietats antioxidants, antiinflamatòries, i/o antidiabètiques. El cinamaldehyd (CNA), és el compost majoritari de la canyella i l'eugenol (EU) és el compost majoritari del clau d'olor.

En aquesta tesi doctoral s'han seleccionat dos compostos potencialment bioactius, cinamaldehyd i eugenol, amb l'**objectiu** d'estudiar el seu efecte *in vitro* i *in vivo*, de forma individual i de forma conjunta, per caracteritzar els mecanismes moleculars dels seus efectes en el control de l'adipositat, i per caracteritzar un possible efecte sinèrgic d'aquests dos compostos.

El nostre primer objectiu ha estat caracteritzar *in vitro* l'efecte del cinamaldehyd i de l'eugenol, i de la seva combinació en l'expressió de gens clau implicats en el metabolisme lipídic al adipòcits madur i durant l'adipogènesi. Per a això es van tractar els cultius de preadipòcits de la línia 3T3-L1 durant tot el procés de diferenciació i en etapa d'adipòcits madurs amb diferents dosis d'EU, CNA i EU+CNA durant 24 hores. Els resultats indiquen que l'eugenol i cinamaldehyd afecten l'expressió de gens implicats en el metabolisme lipídic en adipòcits madurs de la línia cel·lular 3T3-L1. En concret, el tractament amb EU (400 µM) disminueix l'expressió de l'ARNm de *Fasn* i *Lipe* i el tractament amb CNA (400 µM) disminueix l'expressió de *Fasn* i augmenta l'expressió de *Cpt1b* en comparació amb el tractament control. El tractament combinat EU+CNA té un efecte sinèrgic en la inhibició dosi-resposta de l'expressió dels gens lipogènics (*Srebf1*, *Pparg*, *Fasn*), el que suggereix un efecte antilipogènic d'aquests compostos. L'eugenol, cinamaldehyd i el seu tractament combinat afecten l'expressió de gens clau implicats en el metabolisme lipídic en adipòcits madurs, però no afecten el procés de diferenciació o adipogènesi.

El segon objectiu ha estat estudiar en rates Wistar mascle adultes la capacitat del cinamaldèhid i de l'eugenol per contrarestar el desenvolupament d'obesitat front d'una dieta obesogènica. Per a això, vam estudiar *in vivo* l'efecte de l'administració oral d'EU, CNA i la seva combinació EU+CNA en rates Wistar mascle de 4 mesos d'edat alimentades amb una dieta obesogènica. Els animals es distribuïren en cinc grups experimentals: CONTROL (rates alimentades amb una dieta estàndard), WD (rates alimentades amb dieta obesogènica comercial, rica en greixos i sucres simples (*dieta western diet*)), WD+EU (rates alimentades amb una dieta obesogènica comercial i que van rebre diàriament via oral 40 mg/kg/dia d'eugenol), WD+CNA (rates alimentades amb una dieta obesogènica comercial i que van rebre diàriament via oral 250mg/kg/dia de cinamaldehyd), WD+EU+CNA (rates alimentades amb una dieta obesogènica comercial i que van rebre diàriament via oral 40+250 mg/kg/dia d'eugenol i cinamaldehyd, respectivament). El tractament es va realitzar durant 30 dies. Es va analitzar diàriament l'evolució del pes i la ingesta d'aliment. Es van prendre mesures del greix corporal a l'inici i al final de l'estudi. Després de 15 dies d'experimentació es van extreure mostres de sang de la vena safena dels animals en condicions de dejuni. Analitzarem l'expressió de gens d'interès relacionats amb el metabolisme lipídic i la mida dels adipòcits del teixit adipós blanc retroperitoneal i inguinal. Hem observat que el tractament amb CNA sembla exercir un cert efecte anorexigènic que podria explicar el menor guany de pes i greix corporal dels animals. A més, l'administració de CNA a rates alimentades amb una dieta obesogènica redueix la mida dels adipòcits i millora els nivells circulants d'insulina. Els animals del grup WD+EU, tot i tenir una ingesta calòrica similar al grup WD, van presentar un menor pes corporal al final del tractament comparat amb el grup WD. Els animals que van rebre el tractament combinat presenten efectes molt similars als observats en animals tractats només amb CNA, de manera que deduïm que els efectes observats en el grup que rebé el tractament combinat es deuen principalment a l'efecte del CNA

Per tant, el cinamaldehyd i l'eugenol emergeixen com a possibles compostos bioactius potencials com a teràpia de control de l'obesitat i alteracions associades. L'administració de cinamaldehyd (250mg/kg/dia) prevé l'increment en el pes corporal i de l'augment del percentatge de greix en animals alimentats amb una dieta obesogènica. A més, la mida dels adipòcits en el teixit adipós blanc retroperitoneal és menor en els que van rebre WD+CNA que en animals WD, i similar als adipòcits dels animals del grup control. Aquests compostos, particularment el CNA, es mostren eficaces per contrarestar el desenvolupament d'obesitat davant d'una dieta obesogènica.



Universitat  
de les Illes Balears

## Study of cinnamaldehyde and eugenol as potentially bioactive compounds in the control of obesity and associated disorders

Doctoral Program in Nutrigenomics and Personalized Nutrition  
Universidad de las Islas Baleares

### ABSTRACT

Obesity and diabetes mellitus affect more than a third of the world's current population and if the trend continues by 2030 it is estimated that 38% of the world's adult population will be overweight and another 20% will be obese. In an attempt to improve the results of treatments for obesity and associated diseases, there is an emerging trend in current scientific research, which seeks new molecules that can be used as functional biomolecules to control obesity and its comorbidities. Clove and cinnamon have traditionally been used for their properties to manage numerous health conditions as spices in the food industry, these spices have been widely described as having antioxidant, anti-inflammatory, and / or antidiabetic properties. Cinnamaldehyde (CNA) is the major compound of cinnamon and eugenol (EU) is the major compound of clove.

In this doctoral thesis two potentially bioactive compounds cinnamaldehyde and eugenol have been selected with the aim of studying their effect *in vitro* and *in vivo*, individually to characterize the molecular mechanisms of their effects in the control of adiposity, also in combination to identify a possible synergistic effect of these two compounds.

Our first objective has been to characterize *in vitro* the effect of cinnamaldehyde, eugenol and their combination in the expression of key genes involved in lipid metabolism in mature adipocytes and during adipogenesis. For this, pre-adipocyte cultures of line 3T3-L1 were treated during the whole process of differentiation and in stages of mature adipocytes with different doses of EU, CNA and EU + CNA during 24 h. The results indicate that eugenol and cinnamaldehyde affect the expression of genes involved in lipid metabolism in mature adipocytes of the 3T3-L1 cell line. In particular, the treatment with EU (400  $\mu$ M) decreases the expression of *Fasn* and *Lipe* mRNA and the treatment with CNA (400  $\mu$ M) decreases the expression of *Fasn* and increases the expression of *Cpt1b* compared to the control treatment. The combined treatment EU + CNA has a synergistic effect on the dose-response inhibition of the expression of lipogenic genes (*Srebf1*, *Pparg*, *Fasn*), suggesting an antilipogenic effect of these compounds. The bioactive compounds eugenol, cinnamaldehyde and its combined treatment affect the expression of key genes involved in lipid metabolism in mature adipocytes, but do not affect the process of differentiation or adipogenesis.

The second objective has been to study in adult male *Wistar* rats, the capacity of cinnamaldehyde and eugenol to counteract the development of obesity in the face of an obesogenic diet. To this end, we studied *in vivo* the effect of oral administration of EU, CNA and the combination of both EU+CNA in 4-month-old male *Wistar* rats fed an obesogenic diet. We distributed the animals in five experimental groups: CONTROL (rats fed a standard diet), WD (rats fed commercial obesogenic diet, rich in fats and simple sugars (*western diet*)), WD+EU (rats fed a commercial obesogenic diet and received daily orally 40mg/kg/day of eugenol), WD+CNA (rats fed a commercial

obesogenic diet and receiving orally 250mg/kg/day of cinnamaldehyde orally), WD+EU+CNA (rats fed a commercial obesogenic diet and received daily orally 40+250mg/kg/day of eugenol and cinnamaldehyde, respectively). The treatment lasted for 30 days. The evolution of weight and food intake was daily analyzed. Measurements of body fat were taken at the beginning and end of the study. On 15th day of experimentation, blood samples were taken from the saphenous vein of the animals under fasting conditions. We analyzed the expression of genes of interest related to lipid metabolism and the size of the adipocytes of the retroperitoneal and inguinal white adipose tissue. We have observed that the treatment with CNA seems to exert a certain anorexic effect that could explain the lower weight gain and body fat of the animals. In addition, the administration of CNA to rats fed an obesogenic diet reduces the size of adipocytes and improves circulating insulin levels. The animals of the WD+EU group, despite of having a caloric intake similar to the WD group, had a lower bodyweight at the end of the treatment compared to the WD group. The animals that received the combined treatment have very similar effects to those observed in animals treated only with CNA, so we conclude that the observed effects of the combined treatment are mainly due to the effects of the CNA.

Therefore, eugenol and cinnamaldehyde emerge as possible bioactive compounds in the control therapy of obesity and associated disorders. The administration of cinnamaldehyde (250mg/kg/day) to animals fed with the *western diet*, prevents the increase in weight and increase in the percentage of fat associated with the intake of the obesogenic diet. In addition, the size of the adipocytes in the white retroperitoneal adipose tissue is smaller in those who receives WD+CNA than in *western diet* animals, and similar to the adipocytes of the animals of the control group. It has been shown that these compounds are effective in counteracting the development of obesity under an obesogenic diet.

## Lista de artículos originales directamente derivados de la tesis

Esta tesis está basada en los siguientes manuscritos originales:

- 1.- **Ángel A.**, Palou A., Sánchez J. La administración conjunta de eugenol y cinamaldehído en adipocitos maduros 3T3-L1 produce un efecto hipolipídico que podría estar mediado por la inhibición en la expresión de genes lipogénicos. Manuscrito en preparación.
- 2.- **Ángel A.**, Sánchez J., Palou A. La administración de eugenol (EU), cinamaldehído (CNA) y el tratamiento combinado (EU+CNA) disminuye la ganancia de peso corporal en ratas alimentadas con una dieta obesogénica. Manuscrito en preparación.

### Contribución en cada uno de los manuscritos

**Manuscrito 1:** Llevé a cabo los cultivos celulares así como los tratamientos en adipocitos maduros y durante la diferenciación. Realicé la extracción de ARN y el análisis de los genes de interés. Así como la tinción *Oil-Red* y el test de viabilidad celular. Participé en el análisis, incluyendo el análisis estadístico, la representación y la interpretación de los resultados obtenidos. Colaboré en la escritura del primer borrador del manuscrito.

**Manuscrito 2:** Llevé a cabo el manejo de animales (seguimiento del peso e ingestas, tratamientos, medida de la grasa corporal, extracción de sangre y colaboración en el sacrificio). Realicé las determinaciones de los parámetros sanguíneos, la extracción de ARN y el análisis de los genes de interés, el análisis por *western blot* de los niveles de UCP1 en el tejido adiposo marrón y el análisis de la morfometría de los adipocitos. Participé en el análisis, incluyendo el análisis estadístico, la representación y la interpretación de los resultados obtenidos. Colaboré en la escritura del primer borrador del manuscrito.







# 1

## INTRODUCCIÓN

***Jeremías 29:11-13** “Yo sé los planes que tengo para ustedes, planes para su bienestar y no para su mal, a fin de darles un futuro lleno de esperanza. Yo, el Señor, lo afirmo. Entonces ustedes me invocarán, y vendrán a mí en oración y yo los escucharé. Me buscarán y me encontrarán, porque me buscarán de todo corazón.”*



## 1. Introducción

### 1.1. La obesidad y su prevalencia en el mundo

La obesidad es considerada una enfermedad crónica, con una etiología multifactorial que involucra la combinación de factores genéticos y ambientales, incluyendo la alimentación y un estilo de vida sedentario [1–4]. La obesidad presenta una elevada prevalencia a nivel mundial y se asocia a los hábitos alimentarios poco saludables como el exceso en el consumo de alimentos y bebidas con alto contenido calórico [3–8]. La obesidad se caracteriza por el aumento en los depósitos de lípidos en el tejido adiposo. Este exceso de adiposidad afecta los procesos metabólicos y endocrinos del balance energético, especialmente el tejido adiposo localizado en la zona abdominal, favoreciendo el desarrollo de enfermedades crónicas relacionadas con el síndrome metabólico [4, 8, 9]. Además, hay una preocupación en particular porque la obesidad está aumentando entre los niños y adolescentes y también porque el costo social y de atención médica para el tratamiento de la obesidad es muy elevado [1, 2, 4, 8]. Por esta razón la obesidad es ampliamente reconocida como una de las principales amenazas para la salud en la mayoría de sociedades industrializadas o en desarrollo económico alrededor del mundo y conocida como la epidemia del siglo XXI [1, 2, 4, 8].

La Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD) ha presentado el informe “*Obesity Update 2017*” donde se evidencia un incremento respecto a años anteriores en las tasas de sobrepeso y obesidad entre adultos de los países miembros [10]. Los resultados muestran que los EE.UU se encuentran situados en el primer lugar con una tasa de obesidad de 38,2%, en segundo lugar México con 32,4%, Nueva Zelanda en tercer lugar con 30,7%, y Hungría en cuarta posición con un 30% [10]. Colombia actualmente cuenta con una tasa del 20,9% y España con 16,7% [10]. Las proyecciones hasta el año 2030 muestran un aumento constante en las tasas de obesidad [10]. Se prevé que las tasas de obesidad sean particularmente altas en los EE.UU con 47%, México con 39% e Inglaterra con el 35% [10]. Además, se estima que la obesidad en España casi coincida con la de Francia, con un 21% [10].

En el Congreso Europeo de Obesidad (ECO) realizado en Portugal, se presentó un informe de la Organización Mundial de la Salud (WHO, de sus siglas en inglés) sobre la prevalencia de la obesidad en Europa [11, 12]. Este informe reveló que la prevalencia de la obesidad se incrementó en todo el continente europeo en general y esta tendencia probablemente continuará incrementando [11, 12]. También reveló que el número de adolescentes obesos sigue aumentando en muchos países de Europa, ya que se estima que uno de cada tres adolescentes tiene sobrepeso u obesidad [11, 12]. El estudio también presentó datos que evidencian que las mayores tasas de obesidad están en los países del sur de Europa y del Mediterráneo [11, 12]. Asimismo, llama la atención que la epidemia ha tenido una rápida transición al sobrepeso y la obesidad en Europa del Este, donde históricamente las tasas han sido más bajas [11, 12]. Los mayores niveles de obesidad entre los adolescentes se encuentran actualmente en Grecia, Macedonia, Eslovenia, Croacia y Portugal [11, 12].

## 1.2. Enfermedades metabólicas asociadas a la obesidad

La homeostasis energética es un proceso muy importante para el funcionamiento celular, existiendo una regulación en el control del almacenamiento y el gasto de energía [13]. Esta homeostasis es modulada por señales neuronales y endocrinas en el sistema nervioso central, sistema endocrino, sistema gastrointestinal, y con una participación clave del tejido adiposo [13–15]. La ruptura de este equilibrio se asocia al desarrollo de las enfermedades metabólicas asociadas a la obesidad como la resistencia a la insulina, diabetes mellitus Tipo 2, y las enfermedades cardiovasculares [13, 15].

Los adipocitos no son simples depósitos de almacenamiento de energía para el cuerpo. Son un tipo de células involucradas en la generación de muchas señales endocrinas, paracrinas y autocrinas que incluyen citocinas, factores de crecimiento y otras señales hormonales con múltiples funciones en el metabolismo energético [13–15]. Por citar algunos ejemplos, el tejido adiposo es responsable de la síntesis y secreción de hormonas para el control de la ingesta alimentaria (leptina), control de la sensibilidad a la insulina y mediadores del proceso inflamatorio (factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleucina-6 (IL-6), resistina, visfatina, adiponectina) Así, los pequeños adipocitos en individuos delgados promueven la homeostasis metabólica; mientras los adipocitos agrandados de individuos obesos tienden a reclutar macrófagos y promueven así la inflamación crónica asociada a la obesidad [16, 17].

### *Relación de la obesidad y la inflamación*

Como se ha comentado anteriormente, la obesidad desencadena un estado inflamatorio crónico de bajo grado a medida que una persona aumenta más de peso [16, 18]. Esta inflamación provoca un efecto adverso para los adipocitos por la acumulación de macrófagos, es mayor en el tejido adiposo de individuos obesos, ya que se induce a moléculas derivadas de un estado pro inflamatorio [16, 18, 19].

Además, los mediadores inflamatorios como las citocinas y el exceso en la dieta de la glucosa y ácidos grasos pro-inflamatorios de la familia omega-6 por ejemplo, (el ácido araquidónico presente en la grasa animal de vacuno, cerdo, cordero y derivados lácteos), actúan conjuntamente para agravar la resistencia de la insulina [20–22]. De esta manera inicia el deterioro en la cascada de señalización de la insulina en el tejido adiposo, el hígado y el músculo esquelético [21–23]. Este deterioro exacerba el aumento en los depósitos de lípidos, aumenta también la resistencia a la insulina y finalmente se produce como un círculo vicioso la constante inflamación metabólica sistémica [21, 22, 24]. Por esta razón a mayor obesidad, mayor inflamación metabólica [21, 22, 24]. Esta respuesta inflamatoria crónica asociada a la obesidad es la razón fundamental por la cual la obesidad afecta los procesos metabólicos y endocrinos, siendo un agente causal del desarrollo de algunas enfermedades crónicas como el hígado graso, la hipertensión, la dislipidemia, la diabetes tipo 2, la apnea del sueño, los trastornos musculoesqueléticos y algunos cánceres [21, 24].

### ***Relación de la obesidad, las enfermedades cardiovasculares y el síndrome metabólico***

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) hacen referencia a las alteraciones que afectan el corazón y los vasos sanguíneos [25]. Estas alteraciones se deben principalmente a la acumulación como placas en las paredes de los vasos sanguíneos o arterias de la grasa, el colesterol, el calcio y otras sustancias que se encuentran en la sangre [25, 26]. Con el tiempo, estas placas pueden causar endurecimiento de las arterias, también pueden estrecharlas u obstruirlas completamente [25, 26].

El conjunto conocido como ECV, está integrado por la hipertensión, infarto de miocardio, aterosclerosis, arritmias, enfermedad cardíaca valvular, coagulopatías y accidente cerebrovascular [25, 27]. Estas enfermedades son la mayor causa de morbilidad y muerte prematura en todo el mundo [25, 27, 28].

El sedentarismo, la obesidad y los hábitos alimenticios con alta presencia de sal, carbohidratos refinados y grasas saturadas dan lugar a la disfunción endotelial [25, 27, 28]. Esto produce un aumento marcado en la presión arterial, aumenta los procesos de coagulación sanguínea, disminuye la capacidad fibrinolítica y produce la pérdida en la remodelación vascular [25, 27, 29]. Además aumenta los niveles plasmáticos de colesterol total y lipoproteínas de baja densidad (LDL) [25, 27, 29].

Se denomina síndrome metabólico al conjunto de alteraciones metabólicas que agrupa a la obesidad central, presión arterial elevada, niveles altos de glucemia, niveles altos de colesterol y triglicéridos y la disminución de colesterol asociado a proteínas de alta densidad (HDL) [30]. La obesidad es un importante factor de riesgo modificable que contribuye al desarrollo de la diabetes mellitus tipo 2, hipertensión, ECV y el síndrome metabólico [30]. Una de las causas más importantes del síndrome metabólico es la obesidad, por eso, a mayores niveles de obesidad, mayor será el riesgo de desarrollar el síndrome metabólico [25, 27, 31].

Evidencia científica proporcionada por el estudio INTERHEART, mostró que aproximadamente el 80% de las ECV se pueden prevenir con ejercicio, hábitos dietéticos saludables, manteniendo un peso corporal sano y no fumar [32]. Una actividad física moderada (aproximadamente 30 min/día) tiene efectos altamente beneficiosos en la disminución del riesgo de una ECV [32]. Cambios en los patrones dietéticos que incluyan una dieta Mediterránea, consumo de ácidos grasos omega 3, consumo de alimentos con capacidad antioxidante y disminución de carbohidratos de alta carga glucémica, disminución de la ingesta de grasas saturadas, aumento del contenido de fibra dietética y una mayor ingesta de frutas y verduras frescas también han demostrado ser buenas estrategias para la reducción de la obesidad, y también ser útiles para limitar la progresión de las ECV y el síndrome metabólico [25, 31, 33].

### **1.3. Factores que afectan a la obesidad**

Existe una amplia variedad de factores que pueden influir y causar obesidad, tanto en niños como en adultos. Estos factores se relacionan con el entorno, el comportamiento, el estilo de vida, los mecanismos biológicos y la genética [34]. Los factores genéticos contribuyen de forma muy importante en el desarrollo de la obesidad [3, 35–37]. Pero

sin restar importancia, el factor ambiental también es muy importante, porque al analizar el cambio en el comportamiento de los humanos a través del tiempo se observa una menor actividad física y la ingesta de grandes cantidades de alimentos con alta densidad energética [35–37]. Estos cambios han ocurrido en un período muy corto, aproximadamente en los últimos 200 años [35–37]. Este tiempo no ha sido suficiente para modificar la carga genética y suprimir la expresión de genes que han permitido sobrevivir frente a la escasez de alimento desde hace más de 250.000 años [36, 37]. Nuestros genes han permitido que en temporadas de escasez de alimentos, la tasa metabólica aumente su eficiencia energética, logrando mantener las funciones del organismo con un limitado consumo de energía [36, 37]. Por el contrario, esto permite que en presencia de un ambiente de abundancia, la ingesta excesiva de energía también se almacene eficientemente en forma de lípidos [35–38].

### 1.3.1. Factores genéticos

Varios estudios de asociación del genoma completo (GWAS, *genome-wide association studies*), han analizado diferentes variaciones genéticas a lo largo de todo el genoma humano con el objetivo de identificar su asociación a la obesidad [3, 39]. Los GWAS han desvelado asociaciones de ciertos polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) con el índice de masa corporal (IMC), la relación cintura-cadera y otros rasgos de adiposidad [3]. En total se han identificado más de 300 SNPs [3]. Estos conocimientos son importantes para el diseño y producción de nuevos fármacos contra la obesidad y también para el desarrollo de la nutrición personalizada.

El desarrollo de la obesidad puede deberse a la alteración en un solo gen [3, 40]. Actualmente, la identificación de los factores genéticos han relacionado mutaciones simples que contribuyen al desarrollo de la obesidad monogénica [3]. Aunque son poco frecuentes y los mecanismos son múltiples, citamos como ejemplo algunos síndromes que presentan una obesidad hereditaria originada en un gen único disfuncional como el síndrome de Prader-Willi (PWS MIM 176270) que induce a una resistencia a la insulina y es una forma relativamente común de herencia monogénica [40], el síndrome de Happy-Puppet o Angelman (HPS MIM 105830) que se asocia a retardo mental, obesidad, retraso en el desarrollo y baja estatura [40, 41], el síndrome de Bardet-Biedl (BBS MIM 209900) que muestra herencia autosómica recesiva, caracterizado por obesidad, hipogonadismo, retardo mental y polidactilia [41–43]. La deficiencia de leptina en humanos (LEP MIM 164160) es debido a una mutación en el gen de la leptina ( $\Delta G133$ ), también se han observado mutaciones en los exones del receptor de la leptina (LEPR MIM 601007) que da como resultado un receptor de leptina truncado que carece de los dominios transmembrana e intracelular [44]. Estas mutaciones se asocian con la obesidad mórbida de inicio temprano [44]. La leptina es una hormona secretada principalmente por los adipocitos, su deficiencia en humanos se describió por primera vez en una familia consanguínea de origen paquistaní [44, 45]. Los padres, que eran primos de primer grado, no manifestaron obesidad, pero dos de sus hijos mostraron obesidad extrema [44, 45]. Además, recientemente se ha descrito que una mutación en

el gen del receptor de las melanocortinas (MCR4) está asociado al desarrollo precoz de obesidad severa en edades infantiles [46].

Además de las alteraciones en genes relacionadas con la obesidad, los estudios de GWAS han determinado que variaciones en un solo SNP se asocian a características relacionadas con la obesidad. Estos SNPs se asocian con la obesidad, porque aparecen frecuentemente en individuos obesos pero no entre individuos delgados. Es así como estas variantes genéticas parecen predisponer a las personas a consumir mayores cantidades de alimentos [39]. En estos estudios de asociación (GWAS) se han identificado varios *loci* asociados a un mayor IMC; Por ejemplo los *loci* en los genes FTO, TMEM18, POMC, MC4R, FAIM2, TNNI3K, SEC16B, SH2B1, BDNF, GNPDA2, NEGR1, ETV5, MTCH2 y KCTD15 [47, 48]. Además, se ha descrito que existe una relación muy estrecha entre el índice de masa corporal en niños con elevada adiposidad y dos *loci* (OLFM4 y HOXB5) [49, 50].

Un ejemplo claro de que estas variantes en el genoma se relacionan con la obesidad es el caso del SNP en el gen FTO, porque se encontró que en las personas que portan dos copias del alelo de riesgo, pesan en promedio 3 kg más que aquellas que no tienen ninguna copia [51], además se sienten más hambrientos después de comer porque tienen niveles más altos de la hormona estimulante del apetito ghrelina [52].

Otra evidencia, es una variante en el gen MC4R que se asocia a obesidad y a la disminución en los niveles de saciedad, una mayor sensación de hambre en niños y adultos y el aumento de la ingesta de energía total [53, 54]. Además se ha descrito que una variante de riesgo en el gen MCR4 se asocia con la adiposidad en niños menores de 9 años [53, 55].

### **1.3.2. Factores ambientales**

Las personas pueden obtener energía de diferentes fuentes como de proteínas (1 gramo de proteína aporta 4 Calorías), carbohidratos (1 gramo de carbohidratos aporta 4 Calorías), grasas (1 gramo de grasa aporta 9 Calorías) y alcohol (1 gramo de alcohol aporta 7 Calorías) y la gastan a través de tres mecanismos: la tasa metabólica en reposo, que es la cantidad de energía que consume el organismo en reposo; el efecto térmico de los alimentos, que es el costo energético de absorber y metabolizar los alimentos consumidos; y la energía gastada a través de la actividad física, de esta manera se regula el balance energético para mantener la homeostasis del peso corporal [56, 57].

Si tomamos como ejemplo a una persona que es muy activa físicamente, esta puede mantener un equilibrio energético y un peso sano al ingerir y gastar 3.000 kcal al día [57]. Esa misma persona, si adopta un estilo de vida sedentario, podría mantener el equilibrio energético y el mismo peso corporal saludable al ingerir y gastar 2.000 kcal al día [57]. Finalmente, si esa persona sedentaria no reduce suficientemente la ingesta de alimentos altamente energéticos para igualar el gasto, con el tiempo, logra un balance positivo de energía favoreciendo el desarrollo de obesidad [57].

La ingesta de alimentos altamente energéticos es responsable del incremento en la prevalencia de la obesidad, aunque son diversos los factores ambientales que pueden

incidir. Por citar un ejemplo, México presenta una de las mayores tasa de obesidad en el mundo, presentando una transición nutricional con una disminución de dietas caseras, en contraste con un aumento en el consumo de alimentos ultraprocesados con alta densidad energética, grasas saturadas y bajo contenido de fibra [58]. La ingesta de agua de los niños mexicanos de 1 a 18 años tiene un total diario por debajo de los niveles recomendados y el principal consumo de líquidos son leche rica en grasas, zumos de frutas edulcorados y refrescos carbonatados tipo sodas [59]. Entre 1999 y 2006, se reportó entre los niños mexicanos y adolescentes un aumento del 226% en el consumo de bebidas carbonatadas y bebidas endulzadas [60]. De esta manera se relaciona como el comportamiento dietético con ingesta de alimentos con alta densidad energética influye de manera negativa en el balance de energía desarrollando obesidad en la niñez y la adolescencia [61]. Estos hábitos alimentarios poco saludables han ocasionado un aumento muy importante en la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad desde 1999 entre los niños y adolescentes mexicanos [61].

Respecto al efecto de la actividad física sobre la obesidad, un estudio mostró que en los Estados Unidos, el gasto de energía diario debido a la actividad física relacionada con el trabajo ha disminuido cerca de 200 kcal durante los últimos 50 años tanto en hombres como en mujeres, y esta reducción se asocia con el aumento en el peso corporal medio durante este tiempo [62]. Por ejemplo, desde 1960-02 hasta 2003-06 se calculó que el gasto de la energía diaria relacionada con la ocupación disminuyó en 142 calorías en los hombres [62]. Como resultado se observó un aumento en el peso promedio de referencia de 76,9 kg en 1960-02, a 91,8 kg en 2003-06 en el peso medio reportado en la encuesta de NHANES, los resultados fueron similares en las mujeres [62].

Así mismo, un estudio examinó las tendencias de la población de Finlandia desde 1982 a 2012, se evidencia que durante 30 años se han producido cambios marcados, disminuyendo el tiempo total de actividad física del trabajo en los hombres de 17% a 12% y las mujeres de 30% a 20% [63]. La actividad física ocupacional también disminuyó en los hombres de 48% a 36%, y las mujeres de 26% a 21%. Particularmente se relaciona la menor actividad física con el aumento del IMC [63].

El estilo de vida sedentario aumenta la prevalencia de la obesidad y ambos afectan negativamente las ECV [64]. En Estados Unidos se realizó una encuesta en adultos sobre el nivel de actividad física; los resultados mostraron que las personas que informaron no tener tiempo libre para realizar actividad física vivían en las áreas de las ciudades donde las tasas de obesidad es mayor al 30% [64]. Así la prevalencia de la obesidad y la inactividad física puede predecir el riesgo de muerte por ECV. Fomentar la pérdida de peso y promover el aumento de la actividad física son terapias cruciales para la prevención de las ECV [64].

La actividad física tiene la capacidad de regular el equilibrio energético, aumentando el gasto de energía, pero en los ambientes que promueven un estilo de vida sedentario, la epidemia de la obesidad continuará en aumento, mientras disminuye el gasto de energía requerido para la vida diaria y las personas persistan consumiendo más energía de la que



gastan [65]. Por esta razón fomentar la actividad física tiene un importante potencial en el control de la obesidad [65].

### 1.3.3. Programación metabólica

La programación metabólica es un proceso de adaptación de los mecanismos biológicos responsables del desarrollo intrauterino, influenciados por la nutrición de la madre y los factores ambientales [66]. Esta adaptación a las condiciones de estrés durante la vida intrauterina, pueden provocar adaptaciones metabólicas y fisiológicas en los tejidos y órganos para que se garantice la supervivencia del feto [67]. Estos cambios pueden ser irreversibles y persistir a lo largo de la vida produciendo una susceptibilidad en los adultos a desarrollar enfermedades crónicas [68].

El grupo del Dr. David Barker introdujo la hipótesis que postula que los eventos durante el desarrollo temprano, tienen un gran impacto en el riesgo para desarrollar enfermedades en los adultos [69]. Por ejemplo, el bajo peso al nacer, es un marcador del crecimiento y nutrición fetal deficiente y está relacionado con un mayor riesgo de enfermedades crónicas como las ECV, la hipertensión, la obesidad y la resistencia a la insulina [70]. La hipótesis de Barker explica una parte de los casos del síndrome metabólico caracterizado por obesidad y diabetes tipo 2 en la edad adulta [69–71]. El bajo peso al nacer se ve reflejado como una modificación en la programación celular en cuanto al gasto energético y producción de insulina [69, 70]. La programación metabólica puede afectarse por la alteración de la expresión de los genes en el útero de acuerdo con la disponibilidad de nutrientes, que actúan directamente en las células o, de modo indirecto por medio de señales hormonales [72, 73].

Algunos estudios realizados con animales han demostrado este fenómeno de programación metabólica al evidenciar como el feto puede adaptarse a la malnutrición, alterando la producción de hormonas que regulan el crecimiento fetal y la necesidad de nutrientes [74]. También alteran la sensibilidad de los tejidos a esas hormonas [74]. Un ejemplo de esta programación metabólica sucede cuando el feto adapta su metabolismo, durante los días de reducción en el suministro de glucosa o hipoglucemia se estimula la glucogenólisis, gluconeogénesis y aumenta las tasas de oxidación de aminoácidos [75]. El feto desarrolla mecanismos que tienden a mantener su metabolismo energético relativamente constante, incluso puede redistribuir el flujo sanguíneo para proteger los órganos más importantes de la falta de nutrientes, de esta manera es capaz de adaptarse a un crecimiento más lento [76].

Los diversos trabajos sobre programación metabólica de la obesidad del grupo de investigación del Dr. Palou reflejan que la programación nutricional en los primeros períodos de la vida es un fenómeno que afecta las funciones metabólicas y fisiológicas a lo largo de la vida (Revisado en [77, 78]). La restricción de alimentos durante la gestación puede conducir a adaptaciones permanentes con efectos duraderos en el metabolismo de la descendencia e influir en el desarrollo de diferentes enfermedades crónicas asociadas con la obesidad [78]. Una restricción de calorías del 20% durante los primeros 12 días de gestación programa a la descendencia para una mayor ingesta de

alimentos en ambos sexos, que en el caso de los machos resulta en un mayor peso corporal [79]. Estos animales están programados para una alteración de la sensibilidad a la insulina y una resistencia central a la leptina [80]. Esta restricción calórica moderada durante la gestación afecta la estructura y la función hipotalámica de la descendencia, repercutiendo en su respuesta a condiciones de alimentación/ayuno [81]. Estos efectos de programación podrían estar asociados con la ausencia del pico de leptina que se produce durante la lactancia (*leptin surge*) [82]. De hecho algunas de las alteraciones producidas por la restricción calórica moderada durante la gestación son revertidas con la ingesta oral de dosis fisiológicas de leptina durante la lactancia [83–86].

La suplementación con leptina durante la lactancia en ratas tiene efectos protectores contra el desarrollo de la obesidad y otras alteraciones metabólicas en la vida adulta [87, 88]. La suplementación oral con dosis fisiológicas de leptina durante la lactancia en crías produce una disminución en la ingesta de alimentos, preferencias a favor del consumo de hidratos de carbono frente a las grasas, reducción del peso corporal y también la protección contra el sobrepeso en la edad adulta [89]. Además, esta suplementación oral con leptina durante la lactancia mejora la sensibilidad a la insulina y también protege contra la obesidad en la adultez [89–91].

Al contrario de lo que sucede con la restricción calórica materna durante la gestación, la restricción calórica materna durante la lactancia en ratas se ha asociado con una mejora de la sensibilidad a la insulina y la leptina en la descendencia [92]. Además la restricción calórica materna durante la gestación programa la descendencia para un mejor metabolismo de los lípidos y tener un peso corporal más saludable [93].

También se ha observado que existe una programación metabólica debido a la sobrealimentación temprana, es decir en el periodo pre y postnatal se establece una disposición permanente a la obesidad, hiperleptinemia, hiperglucemia, hiperinsulinemia y un aumento en la resistencia a la insulina debido al exceso de energía durante estas etapas [94]. Esta programación metabólica se puede originar por modificaciones epigenéticas adquiridas por la dieta que alteran los patrones de metilación del ADN de las regiones promotoras de los genes claves en la regulación de por vida de la ingesta de alimentos y el peso corporal [95]. Los mecanismos epigenéticos de regulación génica tales como la metilación de ADN, modificación de histonas y el ARN no codificante (miRNAs), pueden ser alterados por la influencia del estado nutricional [95]. Estas alteraciones son determinadas por el ambiente celular sin cambios en la secuencia del ADN [96]. Estos cambios genéticos afectan el patrón de metilación, específicamente en la zona del promotor de genes críticos para la regulación del metabolismo energético [96]. Esta es la razón por la que la sobrealimentación puede ser un factor de riesgo epigenético de programación de la obesidad y las complicaciones asociadas al síndrome metabólico [96, 97]. De esta manera se ha podido identificar que la obesidad estará determinada por la carga genética, sumada en gran medida a los factores ambientales, entre ellos los cambios producidos durante el desarrollo en etapas tempranas de la vida [98]. Estos cambios pueden dar lugar a una huella metabólica que genera alteraciones fisiológicas y bioquímicas a largo plazo con sus consecuencias para la salud a largo plazo [98].

Por ejemplo, se ha descrito en ratas que están lactando a sus crías y que durante la lactancia consumen una dieta de cafetería, existen efectos duraderos en el metabolismo de sus crías. Estos efectos no están asociadas con un mayor peso corporal pero sí con una mayor acumulación de grasa, de forma similar al fenotipo “falso delgado” [99]. Además, un corto período de exposición a una dieta de cafetería en las crías jóvenes de rata, es suficiente para alterar la respuesta metabólica en condiciones de alimentación/ayuno en el tejido adiposo blanco, y por lo tanto induce una acumulación de grasa corporal exacerbada y un aumento del riesgo metabólico, sin efectos aparentes sobre el peso corporal [100].

#### **1.4. El tejido adiposo**

Como se ha comentado anteriormente, el metabolismo energético se mantiene en equilibrio mediante un complejo sistema homeostático en el que participan múltiples tejidos y órganos [101]. Por consiguiente, algún defecto adquirido o heredado en cualquier parte de este complejo sistema puede conducir al desarrollo de varios trastornos metabólicos, como la diabetes mellitus tipo 2, la obesidad y el síndrome metabólico [101]. En la regulación metabólica, el tejido adiposo desempeña un papel muy importante porque tiene la capacidad para almacenar el exceso de lípidos, protegiendo a los demás tejidos y órganos de los efectos nocivos de la acumulación de grasa y también porque secreta una variedad de hormonas que coordinan la respuesta metabólica en los tejidos y órganos en todo el cuerpo [101].

El tejido adiposo puede clasificarse en tejido adiposo blanco, tejido adiposo marrón y adipocitos *beige* o *brite* (del inglés *brown in white*) [102]. La característica principal del tejido adiposo blanco es almacenar el exceso de energía en forma de triglicéridos en una gran vacuola lipídica en su interior. El tejido adiposo marrón presenta muchas mitocondrias y disipa la energía química en forma de calor a través de los altos niveles de la proteína desacoplante 1 (UCP1) para contrarrestar la hipotermia y la obesidad quemando lípidos principalmente [102, 103]. Su red de vascularización y los citocromos en sus mitocondrias son los responsables de su color oscuro [103]. En términos fisiológicos, el aumento del tejido adiposo marrón podría ser útil en la prevención de la obesidad, ya que permite que la energía se disipe en forma de calor sin producir ATP, lo que protegería contra el desarrollo de obesidad [104]. Los adipocitos beige también tiene características termogénicas por la expresión de UCP1 que puede estar estimulada por el estrés, el frío o los agonistas selectivos de receptores  $\beta$ -3 adrenérgicos que imitan el estrés por frío [102]. La función termogénica del tejido adiposo BAT y los adipocitos beige también tendrían potencial aplicación terapéutica en las enfermedades metabólicas asociadas a la obesidad [102, 105].

##### **1.4.1. Adipogénesis**

El adipocito, es la célula encargada de secretar hormonas y administrar los lípidos corporales. El correcto tamaño y la cantidad de los adipocitos presentes en un organismo determinan la capacidad para almacenar el exceso de nutrientes de forma segura y sin sobrecarga metabólica.

La adipogénesis es el proceso mediante el cual las células madre precursoras se diferencian en adipocitos maduros (Revisado en [106]). Se ha demostrado que un miembro de la superfamilia de receptores nucleares, el receptor gamma activado por el factor proliferador de peroxisoma (PPAR $\gamma$ ), actúa como el regulador principal de la adipogénesis [104, 107]. Las proteínas (C/EBPs, "CCAAT/enhancer-binding proteins")  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\delta$  son proteínas implicadas en el proceso de regulación en el inicio la adipogénesis [106]. Por otro lado, la proteína de unión a ácidos grasos 4 (FABP4), adiponectina y la ácido graso sintasa (FAS) son característicos en la formación y maduración de los adipocitos [106]. El complejo mecanismo de la adipogénesis da como resultado el desarrollo del tejido adiposo y a su vez contribuye en el control de la homeostasis energética sistémica [108]. El tejido adiposo blanco puede almacenar el exceso de lípidos hasta un cierto grado; de no ser así, el exceso de lípidos se depositaría en otro lugar, con efectos potencialmente nocivos [109].

La diferenciación de los adipocitos, así como la lipogénesis y la lipólisis están modulados por la maquinaria de la división celular [110]. Los reguladores del ciclo celular responden a las señales intra y extracelulares, estas señales influyen sobre la actividad de los reguladores centrales para controlar la progresión a través del ciclo celular y aseguran los diferentes puntos de control para la proliferación celular [111]. Las señales positivas, como los factores de crecimiento, aumentan la actividad de las ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas (Cdks) mientras que las señales negativas como el daño al ADN, generalmente disminuyen o bloquean la actividad [111]. Cuando hay daño del ADN, las células deben ser capaces de repararlo si es posible o prevenir la división celular si no es posible [111]. La proteína supresora de tumores p53 es clave en la respuesta al daño del ADN, ya que trabaja en múltiples niveles para asegurar que las células no transmitan su ADN dañado a través de la división celular [111, 112]. Primero, detiene el ciclo celular en el punto de control G1 al activar la producción de las proteínas inhibitoras de Cdk (CKI) [111, 112]. Las proteínas CKI se fijan a los complejos Cdk-ciclina y bloquean su actividad, ganando tiempo para la reparación del ADN [111, 112]. La segunda función de p53 es activar las enzimas de reparación del ADN [111, 112]. Si el daño al ADN no es reparable, p53 desempeñará su tercera función, activar la muerte celular programada para que el ADN dañado no sea transmitido [111, 112].

Tras la activación del mitógeno, CDK4/6 y CDK2, con las ciclinas de tipo D y E, respectivamente, fosforilan las proteínas del retinoblastoma (pRB), p107 y p130, liberando así los factores de transcripción E2F y permitiendo la transcripción de genes necesarios para la transición de G1/S y para la síntesis de ADN [111, 112]. CDK2 y CDK1, con las ciclinas tipo A y tipo B, respectivamente, aseguran la progresión a las fases G2 y M [111, 113]. Para evitar la proliferación de células no saludables, varios puntos de control de calidad activan el arresto del ciclo celular para permitir la reparación de los defectos identificados o para prevenir la multiplicación de las células dañadas [113, 114].

Un paso inicial del proceso de adipogénesis es el reingreso al ciclo celular del preadipocito que estaba detenido por el gen *Rb* que codifica a la proteína del

retinoblastoma (pRb), una proteína supresora de tumores que impide la proliferación celular [115, 116]. Cuando la pRb se une al factor de transcripción E2F se desfosforila y se impide la transcripción de sus genes diana. De esta manera se inhibe la progresión del ciclo celular antes de la entrada en mitosis [115, 116]. Pero al unirse con las enzimas quinasas dependientes de ciclinas (Cdk), este complejo hiperfosforila la pRb y se activa la progresión del ciclo celular de G1 a la fase S [115, 116]. Y justo antes que el preadipocito entre en estado de diferenciación terminal, Rb vuelve a un estado hipofosforilado, secuestrado por el factor de transcripción E2F haciendo que las células salgan permanentemente del ciclo celular [115, 116]. El preadipocito que entra en un estado terminal diferenciado sufre una inducción a la etapa de diferenciación mediada por los dos factores de transcripción más importantes para el proceso de diferenciación C/EBP $\alpha$  y el receptor nuclear PPAR $\gamma$  [117]. La implicación de la proteína del Retinoblastoma en la adipogénesis fue descrita por primera vez en nuestro laboratorio [118, 119], y también se describió su potencial impacto en las alteraciones de la obesidad [120].

#### **1.4.2. Hiperplasia e hipertrofia del adipocito**

La distribución de la grasa corporal varía entre individuos, pero es bien conocido que las mujeres suelen tener un mayor porcentaje de grasa corporal que los hombres [121]. Las diferencias en el número de receptores hormonales, y en las concentraciones plasmáticas de leptina, contribuyen a las diferencias de género en la distribución de la grasa corporal [122]. Este porcentaje de grasa corporal se puede ver reflejado en una mayor hipertrofia de los adipocitos [121]. Además las personas obesas tienen un número total de adipocitos más alto, y esto se puede apreciar ya en la obesidad infantil [123].

Los preadipocitos están localizados en los espacios perivasculares que rodean los pequeños vasos del tejido adiposo, pero los preadipocitos derivados del tejido adiposo subcutáneo tienen una mayor capacidad de proliferación en comparación con los preadipocitos viscerales [124]. Igualmente, el número de adipocitos depende del equilibrio entre la adipogénesis y la muerte celular. En la obesidad suele ser evidente el aumento excesivo de la grasa corporal total en virtud de la hiperplasia e hipertrofia de los adipocitos [121, 125].

La alteración en la estructura morfológica del tejido adiposo, también altera su función, esto se relaciona con graves trastornos metabólicos, incluyendo la propia obesidad, el síndrome metabólico, la lipodistrofia y la caquexia [126]. La falla del tejido adiposo se inicia cuando se alteran algunos de los factores clave implicados en la lipogénesis como PPAR $\gamma$ , FASN, SCD1, y FABP4 [127]. Por otro lado, los mecanismos implicados en la capacidad de expansión del tejido adiposo también se ven afectados, hipertrofia predominante a través de un aumento de la apoptosis y una disminución de la adipogénesis y la angiogénesis [127].

La hipertrofia de los adipocitos no es solo una característica del tejido adiposo en la obesidad, también se asocia con el desarrollo de la obesidad asociada a una patología

[128]. En particular, la hipertrofia dada por el crecimiento excesivo y anormal del tamaño de los adipocitos se correlaciona con la alteración de la homeostasis de glucosa, la dislipidemia y la inflamación [129]. Esto sugiere que la inflamación y la liberación de adipocinas determinan gran parte de las consecuencias patológicas de la obesidad [129]. Por el contrario, en individuos obesos sin enfermedad metabólica se encuentran adipocitos de tamaño más pequeño, a esto se le considera una "obesidad metabólicamente sana" en comparación con la obesidad de individuos que presentan complicaciones metabólicas [130]. Los adipocitos grandes son más deletéreos, en la medida en que han perdido la capacidad para expandirse, limitando así el almacenamiento de ácidos grasos en el tejido adiposo y la consecuencia es que aumentan los niveles de lípidos circulantes [130]. También se ha podido observar que los adipocitos viscerales de individuos obesos con una mayor alteración metabólica se caracterizan por tener una alta proporción de adipocitos con hipertrofia [131]. Si se comparan a dos personas con obesidad y que tienen el mismo peso, se predice que aquella que presenta una "obesidad metabólicamente sana" tiene un mayor número de adipocitos en comparación con la persona obesa que presenta resistencia a la insulina y que presenta una mayor hipertrofia de los adipocitos. Esto sugiere que la hipertrofia de los adipocitos está mucho más asociada con alteraciones metabólicas que la adiposidad con hiperplasia [130].

En condiciones normales de balance energético los adipocitos blancos tienen una gota lipídica grande, que abarca la mayor parte de su citoplasma y el núcleo está localizado a un lado de la célula [131]. En contraste, en condiciones de un consumo excedente de energía, los adipocitos se vuelven hipertróficos y el tejido adiposo presenta hiperplasia a fin de aumentar su capacidad de almacenamiento lipídico, manteniendo así los niveles de glucosa en sangre y los de ácidos grasos por debajo de los niveles tóxicos [131]. No obstante, los adipocitos tienen un punto de saturación en que pierden la capacidad de almacenar más lípidos [131, 132], y cuando los adipocitos están completamente llenos de lípidos, expresan señales de estrés [131, 132]. Se ha demostrado que los adipocitos hipertróficos con gotículas de lípidos grandes y uniloculares han reducido la capacidad para la absorción de la glucosa, aumentan la respuesta proinflamatoria y desarrollan resistencia a la insulina [133]. Esta resistencia a la insulina se asocia con el déficit de la movilización a la membrana plasmática de la proteína transportadora de glucosa tipo 4 (GLUT4) [133]. Por lo tanto, la capacidad de expansión limitada del adipocito y el aumento en los lípidos circulantes son los principales contribuyentes del progresivo deterioro metabólico sistémico [134]. El deterioro en los adipocitos de la absorción de los ácidos grasos y el aumento de las tasas de lipólisis, dan como resultado un mayor flujo de ácidos grasos hacia el hígado [134]. Esto conduce al síndrome del hígado graso no alcohólico, que puede progresar a esteatosis hepática no alcohólica que implica inflamación lobular y fibrosis [135]. El desarrollo de la enfermedad hepática crónica progresiva está fuertemente asociadas con la enfermedad cardiometabólica [135].

### 1.4.3. Metabolismo lipídico

El interés científico por el tratamiento del síndrome metabólico y las enfermedades cardiovasculares, han favorecido el estudio y ayudado a entender la fisiología del metabolismo lipídico incluyendo el efecto de la absorción intestinal de colesterol, el metabolismo periférico de las partículas ricas en triglicéridos, el metabolismo hepático de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y el papel de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) [136]. Los triglicéridos, los fosfolípidos y el colesterol ingeridos en la dieta son absorbidos en los enterocitos intestinales, transportados hacia los tejidos a través del sistema linfático por lipoproteínas transportadoras denominadas quilomicrones (QM), estas lipoproteínas son de baja densidad y gran diámetro [137].

#### *Absorción intestinal de lípidos*

Los triglicéridos y el colesterol ingerido en la dieta, primero deben ser hidrolizados por acción de varias lipasas en el seno del lumen intestinal para poder ser absorbidos principalmente en el yeyuno proximal [138]. Los ésteres de colesterol serán hidrolizados a colesterol libre y ácidos grasos libres [138]. Una vez hidrolizado son absorbidos y para ello deben ser solubilizados en micelas formadas con las sales biliares [139]. La lipasa pancreática digiere los triglicéridos hasta ácidos grasos libres y monoglicéridos, estos productos se transportan en forma de micelas al epitelio intestinal donde son absorbidas a través de la membrana plasmática de los enterocitos [139, 140]. Allí se difunde en el retículo endoplasmático, donde son reesterificados de nuevo a triglicéridos y posteriormente son empaquetados en los quilomicrones [141]. Los quilomicrones se transportan por la linfa y de allí a la circulación sanguínea llegando a los diferentes tejidos [140].

#### *Catabolismo de partículas ricas en triglicéridos*

Los quilomicrones transportan los triglicéridos absorbidos de la dieta y las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), transportan los triglicéridos provenientes del hígado [142]. Estas lipoproteínas al llegar al torrente sanguíneo se unen a la superficie endotelial de los capilares sanguíneos donde son sustratos de la lipoproteína lipasa (LPL) [142]. Esta LPL es la enzima encargada de la hidrólisis de los triglicéridos, que requiere como activador la Apo-CII que está presente en las VLDL [143]. Un potencial inhibidor de la acción de la LPL es la angiopoyetina 4 (Angptl4), una proteína plasmática que se activa en condiciones de ayuno e inhibe la actividad de LPL y, presumiblemente, de la lipasa hepática (HL) y la lipasa endotelial (EL), promoviendo la conversión de los dímeros activos de las lipasas en monómeros inactivos [144]. Las dos lipasas EL y HL participan también en la hidrólisis de fosfolípidos y los triglicéridos de las VLDL [145]. La LPL es sintetizada por los adipocitos y para volverse activa, se debe someter a un proceso de maduración y ser transportada al endotelio de los vasos sanguíneos [144]. Estos procesos dependen, al menos en parte, del factor de maduración de la proteína lipasa 1 (LMF1) [144].

### ***Lipoproteínas de baja densidad***

Las LDL son partículas ricas en colesterol que son captadas por las células que, de ese modo, se proveen del colesterol que requieren [146]. La hipercolesterolemia favorece el desarrollo de la aterogénesis y como las LDL comprenden el 60-70% del colesterol total sérico, son las principales lipoproteínas aterogénicas [147]. Un colesterol LDL aumentado constituye un factor de riesgo para la enfermedad cardiovascular [148]. La Apo B-100 es su principal apolipoproteína [146, 149]. Por otro lado, cabe destacar la Lipoproteína (a) Lp(a) que es sintetizada y secretada por el hígado e incluye una masa lipídica de colesterol LDL y apo B-100 rodeada por una apolipoproteína (a) [146, 149]. Lp(a) posee una relación 1:1 de apo(a) y apo B-100, y ambas apolipoproteínas se unen por un enlace disulfuro [146, 149]. Lp(a) ha sido detectada en la pared arterial donde parece ser retenida con mayor avidez que la partícula de LDL y también se han hallado fragmentos de Lp(a) en ateromas humanos [150]. Todo esto indicaría que Lp(a) atraviesa la barrera endotelial para acumularse dentro del espacio subendotelial y podría sufrir diversas modificaciones que la harían más aterogénica [150, 151]. De hecho Lp(a) oxidada ha sido encontrada en lesiones ateroscleróticas y más estrechamente asociada con el engrosamiento de las capas íntima-media de la arteria carótida [150, 151]. Además los niveles plasmáticos elevados de Lp(a) oxidada están asociados con la presencia y severidad del síndrome agudo coronario [151]. También, basados en la gran homología existente entre Lp(a) y plasminógeno, se ha postulado que Lp(a) podría interferir con el plasminógeno e inhibir de ese modo la lisis de los coágulos sanguíneos [149]. Todas esas acciones convierten a la Lp(a) en un factor de riesgo independiente de ECV [149]. Por último es necesario considerar que los niveles aumentados de los triglicéridos con frecuencia se asocian con niveles disminuidos de colesterol HDL y con la presencia predominante de partículas de LDL pequeñas y densas [152]. A estos tres hallazgos (niveles altos de triglicéridos, niveles altos de LDL y niveles bajos de HDL), se les considera la triada aterogénica y suelen encontrarse en personas con resistencia a la insulina, diabetes tipo 2 y obesidad [152].

### ***Lipoproteínas de alta densidad***

Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) se caracterizan por ser las lipoproteínas más densas y pequeñas del plasma, compuestas por 25% de fosfolípidos, 3% de triglicéridos, 4% de colesterol libre, 12% de ésteres de colesterol y un 50% de proteínas [153]. La Apo-AI es la principal proteína de las HDL y constituye aproximadamente el 70% del contenido proteico [154]. La Apo-AI se transforma en una partícula más esférica por acción de la enzima lecitin-colesterol-aciltransferasa (LCAT) en una reacción donde el colesterol libre se transforma en colesterol esterificado [155]. La partícula esférica se considera una HDL madura, capta colesterol de células extrahepáticas y los esterifica por acción de la LCAT [155]. De esta forma la HDL se carga de colesterol esterificado y aumenta su tamaño [156]. Además, la HDL madura intercambia el colesterol esterificado por triglicéridos con las lipoproteínas VLDL, LDL y los quilomicrones [156]. La HDL madura recibe también fosfolípidos de la VLDL por medio de la proteína transferidora de fosfolípidos (PLTP) [156]. La Apo-AI también puede liberarse por la acción de la PLTP, mediante la fusión de dos partículas de HDL con la liberación



subsecuente de esta proteína [156]. Finalmente la partícula de HDL llega al hígado y descarga su contenido de colesterol esterificado [156]. Esto es seguido por el desprendimiento de la HDL que al perder parte de su contenido ha reducido su tamaño y su contenido de colesterol esterificado, y así retorna al torrente sanguíneo para iniciar un nuevo ciclo [156].

### ***Lipogénesis***

La lipogénesis es el proceso de biosíntesis de ácidos grasos a partir de acetil-CoA, también se suele considerar que incluye la formación de triglicéridos a partir de la unión (esterificación) de tres ácidos grasos libres con un glicerol [157]. La síntesis ocurre principalmente en el citoplasma de las células del tejido adiposo y el hígado [158]. Después de la ingesta de alimentos, el hígado absorbe nutrientes a través de la vena porta y el exceso de carbohidratos se convierte en triglicéridos, mientras que en condiciones de ayuno, este proceso lipogénico se reduce [159]. La ácido graso sintasa (FAS) cataliza la síntesis de novo de los ácidos grasos en el hígado [160]. La proteína de unión al elemento regulador del esteroil (SREBP-1c) también juega un papel importante para controlar la lipogénesis hepática [159]. En ayuno, la expresión del ARNm del gen *Srebf1* disminuye, resultando en cantidades reducidas de proteína SREBP-1c, con las correspondientes disminuciones de la expresión de dianas activadas por SREBP-1c, entre ellas el gen que codifica para FAS [159].

Los triglicéridos sintetizados *de novo* en el hígado se empaquetan en las VLDL que se secretan a la circulación [161]. Una vez en la circulación, las VLDL entran en contacto con la LPL en los capilares del tejido adiposo, músculo cardíaco y esquelético; estos tejidos requieren cantidades importantes de ácidos grasos para almacenamiento o para obtener energía [161].

Como se ha comentado anteriormente, la LPL participa de manera fundamental en la captación de lípidos plasmáticos [161]. Por ejemplo, en la glándula mamaria, la síntesis de LPL se induce durante embarazo y la lactancia, tal vez por los efectos de la prolactina [162]. En el tejido adiposo marrón, la actividad de la LPL aumenta durante la exposición al frío por una estimulación  $\beta$ -adrenérgica [163]. El estrés, tanto crónico como agudo, disminuye la actividad de la LPL en el tejido adiposo blanco pero aumenta la actividad LPL en el músculo cardíaco, esquelético y las glándulas suprarrenales; estos cambios pueden estar mediados por catecolaminas [164]. Durante el ayuno, el aumento de la actividad de la LPL proporciona una fuente complementaria de ácidos grasos libres, lo que permite que el corazón mantenga su alto gasto energético [165]. Durante la diferenciación de los adipocitos, la insulina aumenta la transcripción de genes de la LPL al aumentar el nivel de ARNm de LPL y regulando la actividad de LPL a través de mecanismos postranscripcionales y postraduccionales [161]. La glucosa también aumenta actividad de la LPL en el tejido adiposo, además, la glucosa potencia el efecto estimulante de la insulina pero no afecta el nivel de ARNm de la LPL [166].

### **Lipólisis**

La liberación por el tejido adiposo de energía metabólica en forma de ácidos grasos está controlada por una compleja serie de cascadas de señalización que resultan en la activación de la lipólisis [167]. La lipólisis inicia con la movilización de las grasas, mediante la hidrólisis secuencial de los triglicéridos almacenados en las gotas lipídicas de los adipocitos [168]. Los triglicéridos se transforman en diglicéridos, luego en monoglicéridos y finalmente resultan tres moléculas de ácidos grasos libres y una molécula de glicerol utilizados como precursores esenciales para la síntesis de lípidos y membranas, también como mediadores en procesos de señalización celular o como sustratos energéticos [167]. La lipólisis es estimulada en los períodos de estrés metabólico durante el ayuno o el ejercicio prolongado. El exceso de ácidos grasos circulantes se relaciona con el deterioro de la acción de la insulina [169]. Es por esto que el aumento en la lipólisis se asocia con la obesidad, y con el desarrollo de resistencia a la insulina, la diabetes tipo 2, la hipertensión y la aterosclerosis [169]. La movilización de los ácidos grasos desde las reservas de triglicéridos en el tejido adiposo requiere de las enzimas lipolíticas como la lipasa de triglicéridos (ATGL), la lipasa sensible a hormonas (HSL) y la lipasa de monoglicéridos (MGL) [170]. La ATGL (codificada por el gen *Pnpla2*) es una lipasa principalmente responsable de la hidrólisis de los triglicéridos en el tejido adiposo, para generar diglicéridos y ácidos grasos de cadena larga, su expresión es inducida por PPAR $\alpha$ , glucocorticoides y el ayuno [171, 172]. La HSL (codificada por el gen *Lipe*) es una lipasa intracelular capaz de hidrolizar triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos y ésteres de colesterol [173]. La MGL (codificada por el gen *Mgl1*) es una serina hidrolasa de 33 kDa, que cataliza la hidrólisis de monoglicéridos, incluida la liberación de ácido araquidónico y glicerol [174].

### **1.5. Compuestos bioactivos en el tratamiento de la obesidad y enfermedades metabólicas asociadas**

La nutrición adecuada no solo debe proporcionar nutrientes para cumplir con los requerimientos del metabolismo, también debe disminuir la promoción de muchas enfermedades y sus factores de riesgo asociados, incluida la obesidad, contribuyendo a mejorar la salud humana [175]. Gracias a la nutrigenómica, los conocimientos nutricionales actuales comienzan a reflejar un cambio fundamental en la comprensión de la regulación por la dieta a nivel genético, y su impacto en la salud, lo que resulta en nuevas estrategias dietéticas [176]. En consecuencia, la industria alimentaria y farmacéutica está desarrollando en el mercado alimentos basados en los extractos de plantas o compuestos bioactivos con el fin de complementar de forma saludable una dieta balanceada [177]. Además, debido a la baja tasa de éxito de los medicamentos para el tratamiento de la obesidad, la industria farmacéutica está ampliando el estudio del papel de los fitoquímicos de los alimentos y de algunos extractos de plantas para desarrollar nuevos medicamentos en el tratamiento de la obesidad y muchos científicos centran sus trabajos en los efectos de los fitoquímicos sobre los procesos de adipogénesis y lipogénesis [178].

A lo largo de los siglos, los seres humanos han encontrado en la naturaleza, la forma de satisfacer sus necesidades de producción de alimentos, ropa, fragancias, y, no menos importante, medicamentos [179]. Las plantas han formado la base de sistemas de medicinas tradicionales que aún están en uso y que la industria farmacéutica ha comercializado como medicamentos [179]. Los registros más antiguos del uso terapéutico de los compuestos bioactivos se encontraron representados en tabletas de arcilla en escritura cuneiforme de Mesopotamia (2600 a. C.) donde se evidencia el uso del aceite de *Commiphora* (mirra), *Glycyrrhiza glabra* (regaliz), *Cupressus sempervirens* (ciprés), y *Papaver somniferum* (amapola), los cuales todavía están en uso hoy en día para el tratamiento de dolencias que van desde la tos y resfriados a infecciones parasitarias e inflamación [179]. El papiro Ebers de medicina egipcia data aproximadamente de 2900 a. C., donde se encuentra el registro farmacéutico egipcio de más de 700 medicamentos [180]. El médico griego Dioscorides (100 a. C.) registró la colección tratado con hierbas medicinales [179, 180]. "Deja que la comida sea tu medicina y la medicina sea tu comida", esta frase fue citada por Hipócrates de Cos, (460-370 a.C.) hace 2.500 años, él ya sabía que la alimentación tiene una influencia decisiva en nuestra salud [181]. El médico, filósofo y poeta persa, Avicenna en el siglo VIII contribuyó a las ciencias de la farmacia y la medicina a través de trabajos como el *Canon Medicinæ* [179].

### ***La medicina tradicional china***

La medicina tradicional China tiene registros milenarios donde se documenta el uso de plantas medicinales *Wu Shi Er Bing Fang* (1100 a. C.) contiene 52 recetas, *Shennong Herbal* (~ 100 a. C.) 365 recetas y *Tang Herbal* (659 a. C.) 850 recetas. La medicina tradicional china, con una historia de aproximadamente tres mil años, ha formado un sistema de diagnóstico de enfermedades y su tratamiento utilizando extractos de plantas medicinales [182]. Durante la dinastía Han, (206 a. C) el primer libro herbario chino, el "*Shennong Bencao Jing*", enumera el uso de 365 plantas medicinales [182]. En este se incluía plantas como *ma-Huang*, el arbusto que introdujo la efedrina en la medicina moderna [180]. El tratamiento de las enfermedades por la medicina tradicional china basado en el empleo de plantas y extractos vegetales dio origen al término chino de medicina herbal [183]. En el siglo VII, en la dinastía Tang se elabora el popular tratado de las hierbas naturales medicinales "*Treatise on the Nature of Medicinal Herbs*" [180]. En occidente el concepto de medicina herbal se conoce generalmente como fitoterapia [184]. El concepto de fitoterapia lo propuso el médico francés Henri Leclerc, (1870-1955), quien publicó en 1922 la primera edición del "*Précis de phytothérapie*" ("Manual de fitoterapia") [184–186]. La fitoterapia se define como la ciencia que estudia la utilización de los productos de origen vegetal con finalidad terapéutica, ya sea para prevenir, para atenuar o para curar un estado patológico [185]. El impacto positivo de la medicina tradicional china en el tratamiento de diversas enfermedades ha contribuido al desarrollo de la fisiología, la farmacología y la clínica moderna [180]. Hoy en día, el avance en el conocimiento de las propiedades de los fitoquímicos presentes en las plantas, ha creado un renacimiento en la investigación de la nutrición y la salud humana con el desarrollo de nuevos productos o medicamentos [180, 187]. Un

ejemplo del impacto positivo de la medicina tradicional china es el Premio Nobel de Medicina concedido en 2015 a la doctora Tu Youyou, de la Academia de Medicina Tradicional China, por sus aplicaciones en el tratamiento de la malaria [188]. El equipo científico de la doctora Youyou demostró la actividad antimalárica en humanos de la artemisinina, un extracto aislado de la planta *Artemisia annua* [188]. Este descubrimiento de los efectos positivos en el tratamiento de la malaria ha salvado millones de vidas en todo el mundo [188].

Los compuestos bioactivos son sustancias químicas que se encuentran en plantas y ciertos alimentos que influyen en los mecanismos fisiológicos y en la actividad celular [189]. Estos compuestos naturales han sido evaluados por su potencial actividad biológica, y su interés sigue en aumento, ya que poseen efectos beneficiosos para la salud humana [190]. Históricamente se ha considerado la utilización de extractos vegetales de plantas como fuentes naturales de agentes antimicrobianos para el tratamiento de llagas, forúnculos, heridas, control de la diarrea y la conservación de alimentos [191–194]. Estos extractos vegetales también son considerados como nutricionalmente seguros y fácilmente degradables [195]. La medicina tradicional china ha usado los aceites esenciales extraídos directamente de la corteza, flor, fruta, hoja, semilla o raíz de una planta o árbol. Por lo general, se obtienen a través del proceso de destilación, que separa el aceite esencial de los otros compuestos [196]. Los aceites esenciales son aceites altamente concentrados que tienen un fuerte aroma, y a veces se les llaman aceites aromáticos volátiles debido a su alta concentración de compuestos aromáticos [197]. Estos aceites actúan como un mecanismo que protege a las plantas de los insectos y les permiten adaptarse a su entorno, como están compuestos de moléculas muy pequeñas, pueden penetrar en sus células, de aquí su efecto terapéutico a nivel celular y los humanos podrían beneficiarse de este efecto terapéutico [198]. Los aceites esenciales pueden tener beneficios antibacterianos o antimicóticos, muchos aceites de manera tópica pueden ayudar a tratar afecciones de la piel, como quemaduras o cortes y raspaduras. Otros pueden ayudar a estimular el sistema inmunitario, ayudar con el insomnio y ayudar con la digestión [199].

Los compuestos bioactivos presentes de manera natural en los alimentos pueden producir modificaciones epigenéticas, incluida la transferencia de microARN a nuestra dieta y por tanto regula la expresión de genes en humanos [200]. Dentro de los principales compuestos bioactivos en la dieta con potencial capacidad antioxidante están algunas vitaminas (E, C y A), minerales (Se), compuestos fenólicos, flavonoides, carotenoides, antocianinas, y otros compuestos bioactivos minoritarios capaces de neutralizar los radicales libres [201, 202]. De esta manera los compuestos bioactivos proporcionan beneficios para la salud más allá de la nutrición básica [200]. Cabe resaltar que la mayor ingesta de los compuestos bioactivos, pueden aumentar la diversidad microbiana intestinal, mejorar la función endotelial y mejorar la función cognitiva [200, 203]. También se ha descrito el papel de los compuestos bioactivos en la prevención de numerosas enfermedades como ECV, enfermedad coronaria, infarto cerebral, hipertensión arterial, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma, diferentes tipos de cáncer como gastrointestinal, próstata, mama, enfermedades

neurodegenerativas, inflamatorias, oculares (degeneración macular asociada a la edad, cataratas), obesidad, diabetes y osteoporosis [204].

El estrés oxidativo es causado cuando hay una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno y radicales libres [201] activando una cascada de reacciones que dañan las proteínas, lípidos y particularmente al ADN, estas reacciones comprometen la función y viabilidad celular [201]. Frente al efecto nocivo del estrés oxidativo, se han descrito muchos beneficios para la salud del papel antioxidante de los compuestos bioactivos [202] a través de diferentes mecanismos como el secuestro de radicales libres [205], la inhibición de la producción de peróxido de hidrógeno [206], la activación endógena de procesos fisiológicos de defensa como catalasa, superóxido dismutasa y quelación de metales [207, 208]. Otros mecanismos biológicos de la acción antioxidante son la modulación de la expresión genética [209], la activación de sistemas enzimáticos para la detoxificación de cancerígenos de fase I y II [210, 211], la inducción de muerte celular (apoptosis y supresión de la mitosis) [212], la protección del ADN [213], la modulación del perfil lipídico [214, 215], la estimulación del sistema inmunitario [216], el efecto antiinflamatorio [217] y la actividad antimicrobiana [218].

### 1.5.1. Ejemplos concretos de compuestos bioactivos: Eugenol y cinamaldehído

#### *Eugenol*

El eugenol, que se encuentra principalmente en los cogollos de las flores secas de árbol *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) [219]. Los botones florales se recogen en la fase de maduración antes de la floración, se secan hasta que se ponen marrones y son usados para diferentes preparaciones culinarias y usados también, tradicionalmente durante siglos, por sus propiedades medicinales [219]. Después de moler los clavos, se obtiene el aceite esencial por destilación [219]. El aceite esencial del clavo es un líquido oleoso de color amarillo pálido, contiene aproximadamente un 80% de eugenol, es un compuesto fenólico muy volátil que le aporta el olor y el sabor característico al clavo de olor [220]. El valor ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*), o capacidad de absorción de radicales libres de oxígeno, mide el potencial que tiene una muestra para disminuir una cantidad determinada de radicales de peróxido, ya que tienen una menor reactividad que el radical hidroxilo y por ello, su vida media es mayor [221]. Si una muestra analizada, tiene un valor ORAC alto, mayor será su capacidad antioxidante [221]. El valor ORAC se expresa en micromoles de Equivalentes Trolox (ET) por cada 100 gramos de muestra analizada [221]. Se ha determinado que el valor ORAC del clavo de olor es de 290.283 unidades [221]. La actividad antioxidante del eugenol ha sido probada *in vitro* por la capacidad de absorción de radicales de oxígeno, y la disminución de radicales hidroxilo (OH<sup>•</sup>), aniones superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) [222]. Se ha descrito que el eugenol es usado como conservante alimentario por sus propiedades antioxidantes comparables con el butil hidroxitolueno (BHT), un compuesto sintético comúnmente utilizado como conservante alimentario [223]. El eugenol tiene también acción antimicrobiana [220], y es útil en el tratamiento de dermatitis y afecciones de la piel [224]. Tiene propiedades antimicrobianas con un mayor control frente a la *Escherichia coli* y ejerce también su capacidad antimicrobiana

sobre *Staphylococcus aureus* que provoca infecciones en la piel como el acné, y *Pseudomonas aeruginosa* que causa neumonía [225]. El eugenol es ampliamente aceptado como una solución confiable para aliviar el dolor de dientes y es un antiséptico usado contra las infecciones orales [226, 227]. Así mismo, en el 2006 se demostró que el eugenol tenía un efecto anestésico similar a la benzocaína, un anestésico tópico comúnmente utilizado por los dentistas antes de la inserción de la aguja [228]. También, se han demostrado sus propiedades antivirales [229], antiinflamatorias [230] y anticancerígenas [231]. Varios estudios han demostrado su efecto antifúngico [232, 233]. En el 2015 se realizó un estudio para ver el efecto del eugenol frente a otros tratamientos antifúngicos contra el hongo *Candida albicans* y se observó que el eugenol puede ser eficaz como la nistatina, un medicamento comúnmente recetado para tratar las infecciones por candidiasis [234]. Por otra parte también es usado en la fabricación de numerosos productos cosméticos [235].

El eugenol puede disminuir la presión arterial mediante su interacción con los canales de calcio celulares [220], así como de reducir los niveles de glucosa en sangre gracias a un incremento de la sensibilidad a la insulina [220]. En un estudio en animales con dietas ricas en grasa (HFD) se observó que la administración de eugenol por vía oral, disminuyó significativamente los niveles de glucosa en plasma en un 31% y los niveles de insulina en un 63%, en comparación con el grupo control alimentado con dieta rica en grasa [236]. Así mismo se observó que el eugenol disminuyó la hiperglucemia a través de la inhibición de la gluconeogénesis hepática [236]. La administración de eugenol a ratas diabéticas demostró mejores niveles de las enzimas claves del metabolismo de la glucosa y mejorando el peso corporal, por esta razón tiene efectos positivos en el control de la diabetes [237]. El Eugenol ha mostrado tener efectos beneficiosos al disminuir el % de la hemoglobina glicosilada (HbA1c), normalizando los niveles de alanina transaminasa (ALT), aspartato transaminasa (AST), fosfatasa alcalina, creatina fosfocinasa (CPK) y gamma-glutamyl transpeptidasa (GGT), las tasas de bilirrubina total, creatinina, urea y ácido úrico [238]. El eugenol ha sido descrito como un antidiabético por reducir la resistencia a la insulina y disminuir los niveles de glucosa en sangre [238]. De esta manera, la suplementación dietética con el extracto de clavo que contiene eugenol podría modificar beneficiosamente el metabolismo de la glucosa y los lípidos y contribuir a la prevención de la hiperglucemia y el síndrome metabólico [239]. Por esta razón las investigaciones del tratamiento oral con eugenol han demostrado que podría ser un prometedor agente terapéutico para prevenir la diabetes tipo 2 [236].

### ***Cinamaldehído***

La canela se considera una de las especias más antiguas utilizadas en la historia de la humanidad. Durante miles de años ha sido utilizada para tratar muchos síntomas y dolencias, ya sea en forma de extracto, licor, té o hierba, la canela ha proporcionado alivio a las personas durante siglos [240]. El aceite esencial de la canela (cinamaldehído) se obtiene de la destilación de la corteza de la planta *Cinnamomum zeylanicum* [241]. Este aceite es un líquido amarillo pálido y viscoso que se compone aproximadamente de un 90% de cinamaldehído que es el responsable del sabor y del

olor característico de la canela [241]. Se ha determinado que el valor ORAC de la Canela en polvo es de 131.420 unidades [221]. Muchos estudios en animales y humanos han descrito la capacidad antioxidante y múltiples efectos beneficiosos del aceite de canela [242], como agente antimicrobiano contra bacterias resistentes [243, 244], acción inmunomoduladora en trastornos inflamatorios [240, 245, 246] anticancerígeno natural, útil en la prevención y/o tratamiento del cáncer [247], cardioprotector en la enfermedad cardíaca crónica aumentando el óxido nítrico o mejorando la agregación antiplaquetaria en la circulación sanguínea [248].

En estudios *in vitro*, el cinamaldehído previene la diferenciación y la adipogénesis vía PPAR $\gamma$  en adipocitos 3T3-L1 [249], se ha descrito un cierto efecto anticancerígeno por la inhibición del crecimiento neoplásico cuando se usa en altas concentraciones [250].

En un modelo animal de roedores se ha descrito que el aceite de canela puede ser usado de manera segura en el tratamiento de la diabetes tipo 2 como antidiabético natural [251]. Se ha descrito que mejora la absorción de la glucosa al aumentar la acción de la insulina [252], mejora la vía de señalización de la insulina en el músculo esquelético [253]. En un modelo animal de diabetes tipo 2 se administró el aceite de canela a dosis de 25, 50 y 100 mg/kg durante 35 días y se observó una disminución en las concentraciones séricas de la glucosa, los niveles plasmáticos de péptido C, los triglicéridos, el colesterol total, el colesterol LDL, mientras que los niveles de colesterol HDL aumentaron y se mejoró la resistencia a la insulina [254, 255]. También, se mejoró la función en los islotes pancreáticos de las células B [255].

Un estudio con animales identificó el efecto anti-hiperglucémico y anti-obesidad del tratamiento con cinamaldehído al encontrar una reducción significativa en la ingesta de alimentos, una reducción significativa en la ganancia acumulada de peso corporal y un aumento en la expresión del gen del receptor de insulina; también se encontró una mejor tolerancia a la glucosa [256]. Particularmente, en el tejido adiposo se observó una regulación positiva de genes relacionados con la oxidación de ácidos grasos [256]. La administración oral con aceite de canela aumentó significativamente la expresión de la proteína UCP1 en el tejido adiposo subcutáneo y redujo el peso corporal en ratones, también se observó un efecto de marronización en adipocitos subcutáneos [257]. Y a nivel hepático se observó que la suplementación oral con extracto de canela en ratas, tiene un efecto hepatoprotector frente a la peroxidación de los lípidos y el daño hepático [258].

Los estudios realizados en humanos demuestran que la suplementación de canela sería capaz de mejorar significativamente el control de la glucosa en sangre de pacientes con diabetes tipo 2 [259–261], mejorando los niveles de hemoglobina glicosilada (HbA1c) [262], también reduce la presión arterial sistólica y mejora la composición corporal en pacientes con síndrome metabólico [263–269]. Los anteriores resultados sugieren que la complementación de la alimentación con un extracto natural de canela puede reducir los factores de riesgo asociados con la diabetes y las enfermedades cardiovasculares [263].





# 2

## OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

**Efesios 1:7** *"Dios es tan rico en gracia y bondad que compró nuestra libertad con la sangre de su Hijo y perdonó nuestros pecados."*



## 2. Objetivos y Planteamiento Experimental

Durante las últimas décadas, el sobrepeso y la obesidad se han convertido en un problema alarmante de salud pública en los países que han adoptado un estilo de vida occidental, que incluye tanto un estilo de vida sedentario como el consumo excesivo de alimentos ricos en energía y pobres en micronutrientes [270, 271]. El aumento en la prevalencia de la obesidad causa numerosas alteraciones metabólicas y comorbilidades tales como resistencia a la insulina, diabetes tipo 2, dislipidemia e hipertensión [272, 273].

La investigación científica busca constantemente nuevas moléculas que puedan usarse como biomoléculas funcionales para el control de la obesidad y sus comorbilidades [274, 275]. Los compuestos bioactivos de los alimentos y los aceites esenciales que se encuentran en plantas aromáticas han recibido gran interés en los últimos años porque se ha observado que tienen efectos beneficiosos para la salud humana [177, 276, 277].

El clavo de olor y la canela se han utilizado tradicionalmente por sus propiedades para tratar numerosas condiciones de salud y como especias en la industria de alimentos [278]. De hecho, se han atribuido diferentes propiedades a la canela como propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antidiabéticas [240, 269, 278–280] (véase el apartado 1.5.1).

El cinamaldehído es el compuesto mayoritario del aceite esencial de la canela, y se ha demostrado que tiene efectos antiadipogénicos [249], antihiper glucemiantes y antiobesidad en ratones [256, 281]. El eugenol (EU), es el compuesto mayoritario del aceite esencial del clavo de olor, sus efectos antidiabéticos se han descrito ampliamente en la literatura [220, 236–238].

Por tanto nuestra **hipótesis** es que el cinamaldehído y el eugenol y quizá su combinación podrían afectar a los mecanismos moleculares implicados en la adipogénesis, por ejemplo afectando los niveles de expresión de genes claves del metabolismo lipídico. Consideramos la posibilidad de que la administración de forma conjunta de estos dos compuestos, uno con acciones descritas más antiadipogénicas (CNA) y el otro con una acción más antidiabética (EU), podrían tener un efecto sinérgico en el control de la obesidad.

**Así, el objetivo general de esta tesis ha sido estudiar el efecto de la administración del cinamaldehído y el eugenol *in vitro* e *in vivo*, de forma individual para caracterizar los mecanismos moleculares de sus efectos individuales en el control de la adiposidad y de forma conjunta para estudiar un posible efecto sinérgico de estos dos compuestos.**

Para ello, nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

Objetivo 1. Caracterización *in vitro* del efecto del eugenol y cinamaldehído y su combinación en la expresión de genes claves implicados en el metabolismo lipídico en el adipocitos maduro y durante la adipogénesis.

**Objetivo 2.** Estudiar en animales adultos la capacidad del eugenol y el cinamaldehído para contrarrestar el desarrollo de obesidad ante una dieta obesogénica.

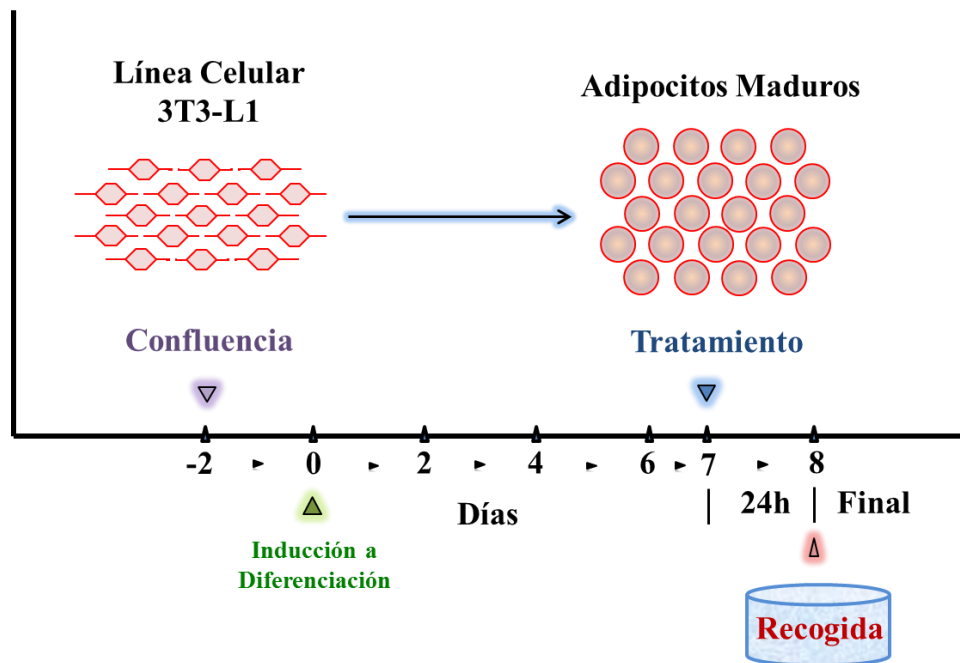
La presente tesis ha sido desarrollada en el grupo de investigación “Nutrigenómica y Obesidad” en el Laboratorio de Biología Molecular, Nutrición y Biotecnología (LBNB) de la Universidad de las Islas Baleares, perteneciente al Centro de Investigación Biomédica en Red Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERObn), dentro del programa de doctorado de Nutrigenómica y Nutrición Personalizada, bajo la supervisión del Prof. Dr. Andreu Palou y la Dra. Juana Sánchez. Para la realización de la presente tesis, el doctorando, D. Alberto Ángel ha sido beneficiario de una comisión de estudios de la Universidad Industrial de Santander, Colombia y una beca de la Fundación Carolina-España. La investigación llevada a cabo para la realización de la presente tesis forma parte del proyecto de investigación “AGL2015-67019-P, Agencia Estatal de Investigación, MINECO/FEDER, EU”.

**Objetivo 1. Caracterización *in vitro* del efecto del eugenol y el cinamaldehído y de la combinación de ambos en la expresión de genes clave implicados en el metabolismo lipídico en el adipocitos maduro y durante la adipogénesis.**

**Tarea 1.1.** Análisis *in vitro* del efecto dosis/respuesta de los bioactivos (eugenol, cinamaldehído, y la combinación de ambos) en el metabolismo lipídico en adipocitos maduros.

Se realizó el cultivo de la línea celular 3T3-L1 y en la etapa de adipocito maduro, se trataron con diferentes concentraciones de EU, CNA y la combinación de ambos EU+CNA. Las concentraciones testadas fueron (10, 50, 100, 200, 400  $\mu$ M) de EU, CNA y EU+CNA. Las células control recibieron tratamiento con vehículo. El esquema del diseño experimental se presenta en la Figura 2.1. Se realizó un test de viabilidad (*Reliablue<sup>TM</sup> Cell Viability Reagent*) y la determinación del contenido lipídico por Tinción *Oil-Red*. Se recogieron las células después de los tratamientos, se aisló el ARNm y se estudiaron los niveles de expresión de genes de interés. En concreto se analizó la expresión de los genes lipogénicos (*Srebf1*, *Pparg* y *Fasn*), la expresión de genes relacionados con la movilización de los lípidos (*Pnpla2* y *Lipe*) y la oxidación de los ácidos grasos (*Cpt1b*) y la expresión del gen del receptor de insulina (*Insr*).

## Diseño Experimental Adipocitos Maduros

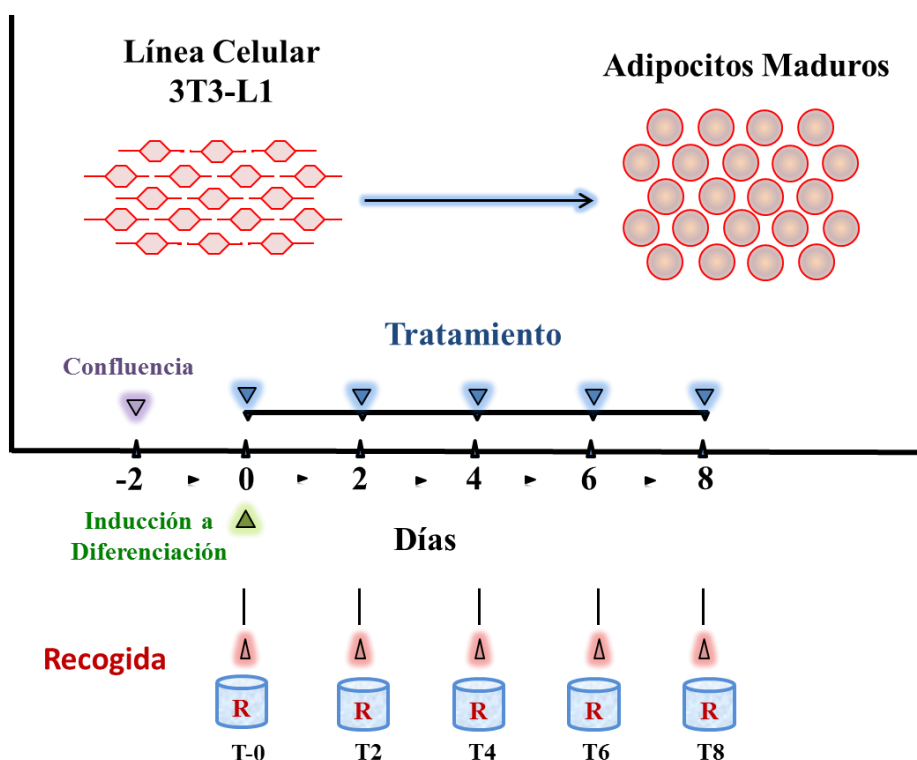


**Figura 2.1.** Esquema del diseño experimental en Adipocitos maduros descrito en la Tarea 1.1

Tarea 1.2. Análisis *in vitro* del efecto dosis/respuesta del eugenol, cinamaldehído y la combinación de ambos en el metabolismo lipídico durante la diferenciación de células 3T3-L1.

Se trataron preadipocitos de la línea 3T3-L1 durante todo el proceso de diferenciación con la dosis de 10  $\mu\text{M}$  de EU, CNA y EU+CNA. Las células control recibieron tratamiento con vehículo. Se recogieron muestras en diferentes tiempos. En concreto se recogieron células a punto inicial (T0), y a los 2, 4, 6, 8 días de diferenciación (T2, T4, T6 y T8 respectivamente). Además, se estudió el efecto dosis respuesta del tratamiento durante la diferenciación con de EU, CNA y EU+CNA. Las dosis testadas fueron 10, 50 y 100  $\mu\text{M}$  de EU, CNA y EU+CNA y aunque el tratamiento se realizó durante toda la diferenciación se recogieron muestras solo a tiempo final (T8). El esquema del diseño experimental se presenta en la Figura 2.2. Se realizó un test de viabilidad (*Reliablue<sup>TM</sup> Cell Viability Reagent*) y la determinación del contenido lipídico por Tinción *Oil-Red*. Se recogieron las células, en los puntos indicados anteriormente y se aisló el ARNm.

## Diseño Experimental Durante la Diferenciación



**Figura 2.2.** Esquema del diseño experimental del tratamiento durante la diferenciación de células 3T3-L1 descrito en la Tarea 1.2. (R= Recogida).

Tarea 1.3. En ambos estudios se realizó el análisis de la expresión de los genes lipogénicos (*Srebf1*, *Pparg* y *Fasn*), la expresión de genes relacionados con la movilización de los lípidos (*Pnpla2* y *Lipe*) y la oxidación de los ácidos grasos (*Cpt1b*) y la expresión del gen del receptor de insulina (*Insr*).

Los resultados obtenidos en el objetivo 1 se presentan en el **capítulo 1**.

**Objetivo 2. Estudiar en ratas *Wistar* macho adultas la capacidad del eugenol y el cinamaldehído para contrarrestar el desarrollo de obesidad ante una dieta obesogénica.**

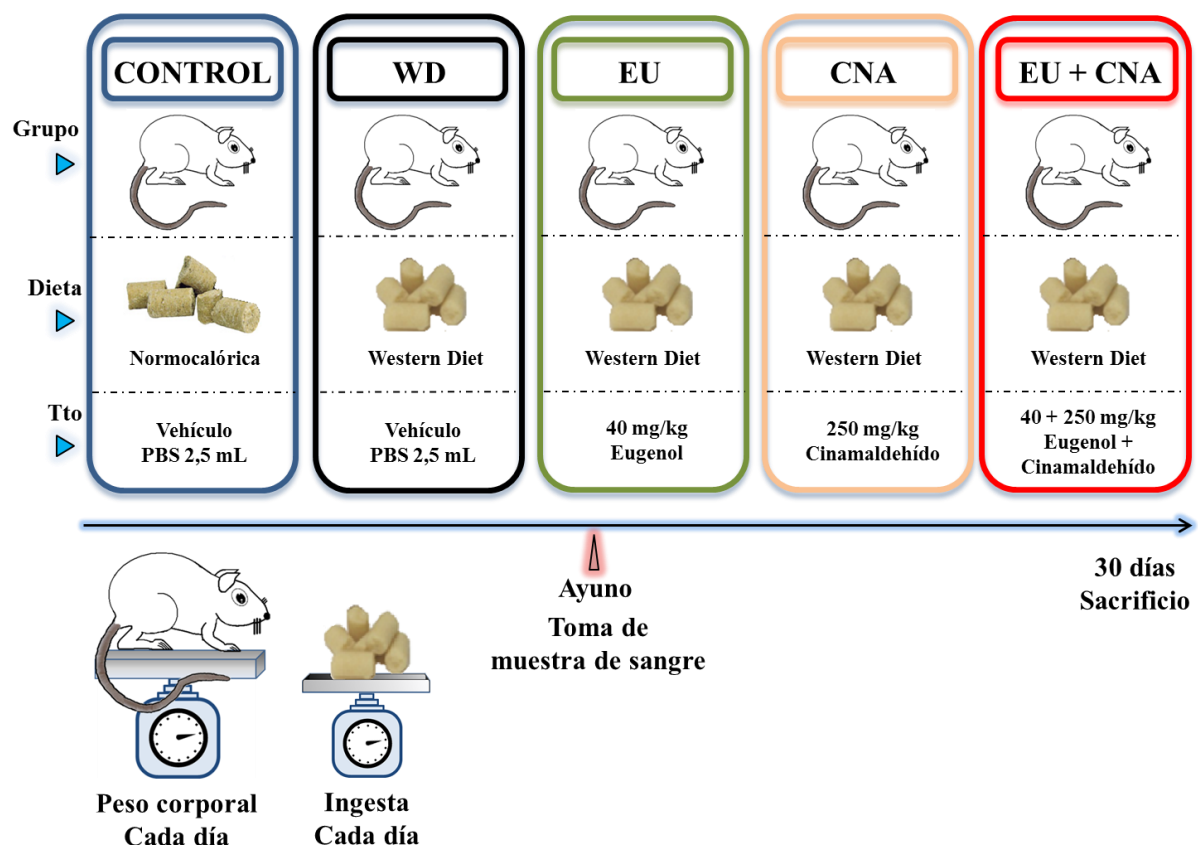
Tarea 2.1. Estudiar el efecto de la administración oral eugenol, cinamaldehído y la combinación de ambos en ratas *Wistar* macho de 4 meses de edad y alimentados con una dieta obesogénica.

Ratas *Wistar* macho de 4 meses de edad fueron distribuidas en cinco grupos experimentales:

- CONTROL, ratas *Wistar* machos de 4 meses de edad alimentadas con una dieta estándar, (n=5). Estas ratas recibieron PBS como vehículo.
- WD, ratas *Wistar* macho de 4 meses de edad alimentadas con dieta obesogénica comercial (*western diet*), rica en grasas y azúcares simples (n=5). Estas ratas recibieron PBS como vehículo.

- WD+EU, ratas *Wistar* macho de 4 meses de edad alimentadas con una dieta obesogénica comercial y que recibieron diariamente vía oral por sonda 40mg/kg/día de eugenol (n=5).
- WD+CNA, ratas *Wistar* macho de 4 meses de edad alimentadas con una dieta obesogénica comercial y que recibieron diariamente vía oral por sonda 250mg/kg/día de cinamaldehído (n=6).
- WD+EU+CNA, ratas *Wistar* macho de 4 meses de edad alimentadas con una dieta obesogénica comercial y que recibieron diariamente vía oral por sonda 40 y +250mg/kg/día de eugenol y cinamaldehído, respectivamente (n=4).

Este tratamiento se realizó durante 30 días. El esquema del diseño experimental se presenta en la Figura 2.3. Se analizó diariamente la evolución del peso y la ingesta de alimento. Se tomaron medidas de la grasa corporal al inicio y al final del estudio. En el día 15 de experimentación se extrajeron muestras de sangre de la vena safena de los animales en condiciones de ayuno. Al final del experimento, en el día 30, las ratas se sometieron a eutanasia por decapitación con guillotina, se obtuvo sangre troncal y se recogieron los tejidos de interés (hipotálamo, tejido adiposo inguinal, mesentérico, retroperitoneal, epididimal, hígado y tejido adiposo marrón).



**Figura 2.3.** Esquema del diseño experimental descrito en la Tarea 2.1. Estudio del efecto de la administración oral eugenol, cinamaldehído y la combinación de ambos en ratas *Wistar* macho de 4 meses de edad y alimentados con una dieta obesogénica. (WD= *Western diet*, EU= eugenol, CNA= cinamaldehído, Tto= Tratamiento).

### Tarea 2.2. Análisis de parámetros sanguíneos de interés.

Se realizaron medidas bioquímicas para estudiar el estado metabólico de estos animales. En concreto, se analizaron los niveles circulantes de glucosa, triglicéridos y ácidos grasos libres de los diferentes grupos experimentales en condiciones de alimentación *ad libitum* y tras un ayuno de 12 horas, y los niveles circulantes de colesterol medidos en condiciones de alimentación *ad libitum*. Además analizamos los niveles circulantes de hormonas claves implicadas en el balance energético (leptina, insulina y ghrelina) en condiciones de alimentación *ad libitum* y tras un ayuno de 12 horas. Finalmente, para comprobar si había daño hepático por efecto de los diferentes tratamientos, se determinaron los niveles de fosfatasa alcalina, aspartato aminotransferasa (AST) y alanina transaminasa (ALT).

### Tarea 2.3. Análisis morfométrico del tejido adiposo blanco retroperitoneal (rpTAB) e inguinal (IngTAB).

Se ha medido el diámetro de los adipocitos en cortes histológicos de rpTAB e IngTAB, para inferir el tamaño de los adipocitos.

### Tarea 2.4. Análisis la expresión génica de genes implicados en el balance energético en tejidos claves.

Se analizaron los niveles de ARNm de *Lepr*, *Ghsr*, *Socs3*, *Stat3*, *Npy* y *Pomc* en el hipotálamo. En el hígado, se determinó la expresión de genes relacionados con la captación de ácidos grasos (*Cd36*), lipogénesis (*Srebf1*, *Fasn*, *Scd1*), oxidación de ácidos grasos (*Ppara*, *Fgf21*, *Cpt1a*, *Pdk4*), metabolismo de la glucosa (*Gck*) y señalización de leptina e insulina (*Insr*, *Irs1* y *Lepr*). En el tejido adiposo blanco retroperitoneal se analizó la expresión de genes relacionados con la captación de ácidos grasos (*Lpl*, *Cd36*), captación y metabolismo de glucosa (*Slc24a*, *Hk2*), lipogénesis (*Srebf1*, *Pparg*, *Fasn*), leptina, lipólisis y oxidación de ácidos grasos (*Pnpla2*, *Cpt1b*), fisiología de las gotas lipídicas (*Cidea*) y señalización de insulina (*Insr*).

### Tarea 2.5. Análisis de los niveles proteicos de UCP1 en tejido adiposo marrón. Se analizó por *western blot* los niveles de UCP1 en tejido adiposo marrón.

Los resultados obtenidos en el objetivo 2 se presentan en el **capítulo 2**.



# 3

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Hebreos 1:3** *“Él es el resplandor glorioso de Dios, la imagen misma de lo que Dios es y el que sostiene todas las cosas con su palabra poderosa. Después de limpiarnos de nuestros pecados, se ha sentado en el cielo, a la derecha del trono de Dios.”*



### 3. Materiales y Métodos

#### 3.1. Cultivo *in vitro* de la línea celular 3T3-L1

Para estudiar el efecto *in vitro* del tratamiento con eugenol (EU), cinamaldehído (CNA) y (EU+CNA) sobre la adipogénesis y el metabolismo lipídico, se cultivaron células 3T3-L1 en pase 11. Para ello se siguieron las recomendaciones de la casa comercial (*ZenBio, Inc, Research Triangle Park, NC*). Estas células 3T3-L1 son una línea celular de fibroblastos embrionarios de ratón comprometida a diferenciarse en adipocitos. Se cultivaron entre 4.000–5.000 células/cm<sup>2</sup> en placas de 24 pocillos con 500 µL de medio 3T3-L1 Preadipocyte Medium (*ZenBio, Inc*). El cultivo celular se mantuvo a 37 °C y 10% de CO<sub>2</sub>. Después de la siembra de la placa las células se verificaron diariamente hasta la confluencia completa (día -2). Tras 2 días de expansión clonar (día 0), se indujo la diferenciación durante dos días usando un medio compuesto de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium), 5 µg/mL de insulina, 10% de suero fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomycin, 5 mL de piruvato de sodio, 0,5 µmol/L de dexametasona y 0,5 µmol/L de isobutilmetilxantina. Además a partir de día 0 se matuvo el cultivo a 37°C y 8% de CO<sub>2</sub>. Día 2, se cambió a un medio de mantenimiento, que consistía en un medio compuesto de DMEM, 5 µg/mL de insulina, 10% de suero fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomycin, 5 mL de piruvato de sodio. Durante todo el cultivo se cambió de medio cada dos días.

Reactivos:

- DMEM – D5796 (Dulbecco's Modified Eagle's medium) (*Sigma*)
- Penicillin-Streptomycin (*Sigma*)
- Insulin human (*Sigma*)
- Dexamethasone (*Sigma*)
- 3-Isobutyl-1-methylxanthine (*Sigma*)
- FBS (*Fetal Bovine Serum*) (*GIBCO*)
- Sodium pyruvate (*Sigma*)
- 3T3-L1 Preadipocyte Medium (*ZenBio, Inc*)

#### 3.1.1. Tratamientos experimentales *In vitro*

En el caso de adipocitos maduros se trataron durante 24 horas con diferentes concentraciones (10, 50, 100, 200, 400 µM) de EU, CNA y EU+CNA. En el estudio de los efectos durante la diferenciación se recogieron células a diferentes tiempos (T2, 4, 6 y 8) de células control o células tratadas con 10 µM de EU, CNA y EU+CNA y a tiempo final (T8) células control y tratadas con 10, 50 y 100 µM de EU, CNA y EU+CNA desde día 0 de diferenciación. En el caso del grupo control, se utilizó el mismo volumen de medio de cultivo DMEM.

Reactivos:

- *Eugenol ReagentPlus®*, 99% (*Sigma*)
- *Trans-Cinnamaldehyde*, 99% (*Sigma*)
- DMEM – D5796 (Dulbecco's Modified Eagle's medium) (*Sigma*)

### 3.1.2. Tinción *oil red* en cultivos celulares

Para determinar el efecto de los diferentes tratamientos sobre la acumulación de los lípidos en las células 3T3-L1, se realizó la coloración *oil-red*. Este colorante tiñe específicamente los triglicéridos en la célula con una coloración rojiza. Las células tratadas previamente con las diferentes dosis de eugenol (EU), cinamaldehído (CNA) y el tratamiento combinado (EU+CNA), fueron lavadas dos veces con 500  $\mu$ L por pocillo de solución salina tamponada con fosfato (PBS celular), se fijaron con 500  $\mu$ L de formaldehído al 10% durante 10 min. Se descartó el formaldehído y se agregó 500  $\mu$ L de formalina fresca y se incubó por 1 h. Se retiró la formalina con una pipeta. Se realizaron dos lavados con 500  $\mu$ L de agua MilliQ. Se incubaron las células con 500  $\mu$ L de isopropanol al 60% durante 5 min. Se descartó el isopropanol y se secó cada pocillo con ayuda de un secador de pelo. Se añadió 1 mL de solución de trabajo *oil-red* durante 10 min. Se descartó la solución de trabajo y se realizaron cuatro lavados con 500  $\mu$ L de agua MilliQ. Se descartó el agua y se colocó 250  $\mu$ L de agua MilliQ para poder tomar las fotografías en el microscopio. Después de realizar las fotografías, se descartó el agua y se colocó 1 mL de isopropanol al 100% durante 10 min con agitación suave. Se pipeteo el isopropanol varias veces arriba y abajo para asegurar que todo el *oil-red* estuviera en la solución. El contenido de cada pocillo se transfirió a un tubo eppendorf de 1,5 mL y después a una placa de ELISA donde se midió la densidad óptica a 500 nm utilizando 100% de isopropanol como blanco.

Reactivos:

- *Oil-red* Stock: 0,35 g de *oil-red* en 100 mL de Isopropanol. Agitar durante toda la noche, luego filtrar con un filtro de 0,2  $\mu$ m y almacenar a temperatura ambiente.
- Solución de trabajo *oil-red*. 6 mL de la solución Stock *oil-red* con 4 mL de agua doblemente destilada.
- Formalina al 10% (*Merck*)
- Isopropanol al 100% (*Merck*)
- Isopropanol al 60% 6 mL de isopropanol al 100% con 4 mL de agua doblemente destilada.

### 3.1.3. Determinación de la viabilidad en cultivos celulares

Para determinar la viabilidad celular, se usó el *Reliablue<sup>TM</sup> Cell Viability Reagent ATCC®*. Este es un reactivo que se adiciona al cultivo celular para la evaluación de la viabilidad celular y el metabolismo en las células vivas. Las células viables reducen inicialmente el reactivo azul oscuro no fluorescente en un producto rojo altamente fluorescente que se puede cuantificar con un lector de placas. Las células no viables o sólo el medio de cultivo celular no reducen el reactivo, por lo que no generan cambios de color. Existe una fuerte relación lineal entre la señal colorimétrica y el número de células viables presentes. Debido a que no se requiere lisis celular, después de realizar un ensayo con el reactivo *Reliablue<sup>TM</sup>* las células se pueden usar para otras aplicaciones posteriores.

Para ver la viabilidad celular en relación al efecto de diferentes dosis del tratamiento de EU, CNA y el tratamiento combinado (EU+CNA), en el caso de adipocitos maduros se trataron durante 24 horas con diferentes concentraciones (10, 50, 100, 200, 400  $\mu\text{M}$ ) de EU, CNA y EU+CNA. En el estudio de los efectos durante la diferenciación se recogieron células a tiempo final de células tratadas con 10, 50 y 100  $\mu\text{M}$  de EU, CNA y EU+CNA durante toda la diferenciación. Se sembraron células en una placa de 96 pocillos siguiendo el protocolo explicado en el apartado 3.1. Para realizar el test de viabilidad, en una cabina de bioseguridad, se agregaron 10  $\mu\text{L}$  del reactivo *Reliablue*<sup>TM</sup> a cada pocillo con una pipeta multicanal de 8 canales. Se realizó una agitación suavemente para asegurar una dispersión pareja del reactivo. Se devolvió la placa a la incubadora de cultivo celular. Se registró la absorbancia usando un espectrofotómetro para placas de *ELISA (Sunrise de TECAN)*. El reactivo es visualmente azul oscuro y el control positivo indica muerte celular. Como control positivo se utilizó pocillos de células tratadas con el detergente *Triton X-100* para inducir la muerte celular. También se usó un control negativo, correspondientes a células tratadas sólo con el vehículo. También se realizó una prueba para descartar la interacción entre los compuestos utilizados como tratamiento y el reactivo *Reliablue*<sup>TM</sup>. Las lecturas más altas sugieren baja citotoxicidad, mientras que las bajas lecturas sugieren alta citotoxicidad.

Reactivos:

- Línea celular adipocitos 3T3-L1 (*ZenBio, Inc*)
- Placas para cultivo celular de 96 pocillos (*Costar*<sup>TM</sup>)
- Pipeta multicanal 8 canales, 50-300  $\mu\text{L}$  (*biopette plus*)
- Kit *Reliablue*<sup>TM</sup> *Cell Viability Reagent (ATCC®)*

### 3.2. Experimentación Animal

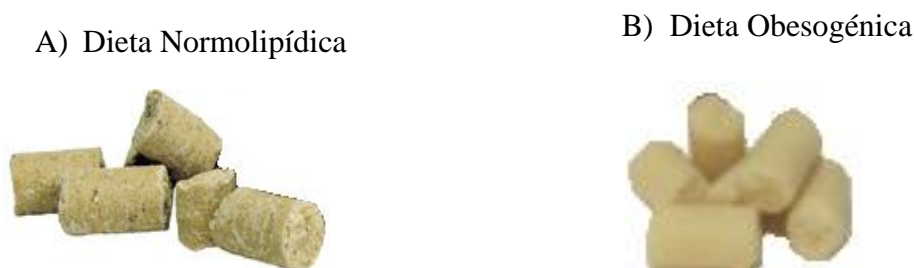
La presente tesis doctoral cuenta con la aprobación del Comité de Bioética de la Investigación de la Universidad de las Islas Baleares (Número de Resolución 7916, Octubre 2015). Además se siguió el protocolo y las recomendaciones generales para el uso y cuidado de animales de laboratorio.

Para los experimentos con animales se utilizaron machos de ratas albinas *Wistar* de 4 meses. Durante el periodo de experimentación los animales se mantuvieron en el estabulario de la Universidad de las Islas Baleares (UIB) con un ciclo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad y aclimatados a una temperatura constante de 22 °C. Los animales estuvieron con acceso libre a agua, bajo condiciones de alimentación *ad libitum* o ayuno, dependiendo el día de experimentación. Se separaron en cinco grupos de experimentación, el grupo control se alimentó con una dieta comercial estándar y los otros cuatro grupos se alimentaron con una dieta obesogénica comercial. Diariamente se registraron el peso corporal y la ingesta de alimentos.

#### 3.2.1. Composición de la dieta

Los animales del grupo control se alimentaron con una dieta normolipídica comercial estándar (Pienso A04, *Panlab*). La composición de esta dieta era: 3,3 kcal/g, con 73% de las calorías procedentes de carbohidratos, 8% de grasa y 19% de proteínas.

En el caso de los animales alimentados con una dieta obesogénica, se usó para la alimentación una dieta comercial, rica en grasas y azúcar, en concreto la dieta *western diet* D12079B de *Research Diets*. La composición de esta dieta era: 4,7 kcal/g, con 43% de las calorías procedentes de carbohidratos, 41% de grasa y 17% de proteínas.



**Figura 3.1.** Imagen de las dietas usadas en el experimento. A). Dieta normolipídica comercial estándar (Pienso A04, Panlab). B. Dieta comercial obesogénica, (*western diet* D12079B, *Research Diets*). Fuente: <https://www.bio-serv.com/product/S3823P.html> <https://www.bio-serv.com/product/HFPellets.html>.

Tipo de dieta	Dietas	
	Normolipídica	Obesogénica
Casa comercial	Panlab	Research Diets
Referencia	Pienso A04	<i>Western Diet</i> D12079B
Descripción	8% Kcal de grasa	41% de grasa
% Carbohidratos (g/100g)	60,5	50
% Lípidos (g/100g)	2,9	21
% Proteínas (g/100g)	15,4	20
% Otros (Fibra, agua, minerales)	21,2	9
% (Kcal/100kcal) Carbohidratos	73	43
% (Kcal/100kcal) Lípidos	8	40
% (Kcal/100kcal) Proteínas	19	17
% Ácidos grasos Saturados	21,2	62,4
% Ácidos grasos Monoinsaturados	24,8	30,7
% Ácidos grasos Polinsaturados	54	6,9
Kcal/g totales	3,3 kcal/g	4,7 kcal/g

**Tabla 3.1.** Ficha técnica de la composición nutricional de las dietas usadas en el experimento. Dieta normolipídica comercial estándar (Pienso A04, Panlab) y dieta comercial obesogénica (*western diet*, D12079B, *Research Diets*).

### 3.2.2. Tratamientos experimentales *In vivo*

Los animales fueron separados en cinco grupos: El primero es el grupo CONTROL alimentado con una dieta estándar y con un tratamiento vehículo vía oral por sonda. El segundo es el grupo WD: *western diet*, alimentado con una dieta obesogénica y con un tratamiento vehículo vía oral por sonda. El tercer grupo EU: alimentado con una dieta WD y con un tratamiento vía oral por sonda de 40mg/kg/día de eugenol (*Sigma-Aldrich*). El cuarto grupo CNA: alimentado con una dieta WD y con un tratamiento vía

oral por sonda de 250mg/kg/día de cinamaldehído (*Sigma-Aldrich*). El quinto grupo WD+EU+CNA: alimentado con una dieta WD y con un tratamiento vía oral por sonda de 40+250mg/kg/día de eugenol y cinamaldehído (*Sigma-Aldrich*), respectivamente.

Grupo	Dieta	Tratamiento
CONTROL	Normocalórica	Vehículo (PBS 2,5 mL)
WD	<i>Western Diet</i>	Vehículo (PBS 2,5 mL)
EU	<i>Western Diet</i>	40mg/kg/día de eugenol
CNA	<i>Western Diet</i>	250mg/kg/día de cinamaldehído
EU+CNA	<i>Western Diet</i>	40+250mg/kg/día de eugenol y cinamaldehído Respectivamente.

**Tabla 3.2.** Distribución de los animales por grupos de experimentación con sus respectivas dietas y sus respectivos tratamientos.

### 3.2.3. Composición corporal

Durante todo el experimento, se realizó un registro del peso corporal diario. Periódicamente y sin necesidad de anestesia, también se determinó la composición corporal usando la tecnología de resonancia magnética nuclear (RMN). Para estas resonancias se usó el *EchoMRI700™* (*Echo Medical Systems*), que mide directamente de la grasa corporal total, la masa magra o libre de grasa y el agua corporal total en animales vivos.



**Figura 3.2.** Imagen del Modelo *EchoMRI700™* (*Echo Medical Systems*) usado para determinar la composición corporal usando la tecnología de resonancia magnética cuantitativa en animales vivos. Fuente: [http://www.sunpointworld.com/pro\\_con\\_print.php?sn=90](http://www.sunpointworld.com/pro_con_print.php?sn=90).

### 3.2.4. Extracción de sangre en ayuno

En el día 15 de experimentación se extrajeron muestras de sangre de la vena safena de los animales en condiciones de ayuno. Para ello se inmovilizaba al animal, se eliminó el pelo de la zona y, tras desinfectar con etanol y aplicar vaselina, se realizaba la punción en la vena safena con una aguja estéril y se recolectaba la sangre con una pipeta con punta heparinizada o directamente en un tubo tipo *ependorf* heparinizado. La sangre se

guardó por 1 h a 4°C y después se centrifugó a 1000g durante 10 min para obtener el suero que finalmente se guardó a -20°C hasta su análisis.

### 3.2.5. Sacrificio y toma de muestras

Al final del experimento en el día 30 y durante las primeras horas del ciclo de luz, las ratas se sometieron a eutanasia por decapitación con guillotina. Se obtuvo sangre troncal y después se centrifugó a 1000g durante 10 min para obtener el suero que finalmente se guardó a -20°C hasta su análisis. Además, se recogieron los tejidos de interés (hipotálamo, tejido adiposo inguinal, mesentérico, retroperitoneal, epididimal, hígado y tejido adiposo marrón), posteriormente se almacenaron a -80°C hasta su respectivo análisis.

### 3.3. Análisis morfológico del tejido adiposo blanco

Se recogieron trozos de diferentes tejidos durante el sacrificio de los animales para el análisis morfológico. Para preservar la integridad, las muestras de tejido se fijaron inmediatamente por inmersión en paraformaldehído al 4% preparado en tampón fosfato 0,1 M *pH*: 7,4. Las muestras se fijaron en bloques de parafina para proporcionar suficiente soporte externo durante los cortes. El agua del tejido se eliminó por deshidratación con series de etanol: etanol al 50% por 30 min, etanol al 75% por 30 min, etanol al 96% durante 45 min a temperatura ambiente y luego, durante la noche a 4 °C; y por último, tres veces durante 60 min con etanol absoluto. Luego, la parafina se fundió primero en un horno, a 60 °C durante la noche, las muestras de tejido se aclararon en xileno (dos veces por 45 min) y finalmente se incluyeron en parafina en botellas de plástico para obtener las secciones de tejido. A los tejidos fijados en parafina se realizaron cortes de 5 µm de espesor usando un micrótomo y se montó en un portaobjetos *Super-Frost/Plus*. Se realizó el análisis morfológico en muestras de tejido adiposo retroperitoneal y tejido adiposo inguinal. Se adquirieron imágenes con un microscopio *Zeiss Axioskop 2* equipado con una cámara digital *AxioCam ICc3* y el software *AxioVision 40 V 4.6.3.0*. Para el estudio morfológico, se contó el número de los de adipocitos y se resaltó el perímetro de cada uno.

Reactivos:

- 4% de Paraformaldehído (*Sigma*)
- Tampón de fosfato 0,1 M *pH*: 7,4, tampón de fosfato 0,2 M (3,25 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (*Panreac*); 11,24 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (*Panreac*) disueltos en 1 litro de agua destilada, *pH* ajustado al 7,4 diluido en agua destilada 1: 1.
- Etanol 50%: 92 ml de agua destilada por cada 100 ml de etanol al 96% (*Panreac*)
- Etanol 75%: 28 ml de agua destilada por cada 100 ml de etanol al 96% (*Panreac*)
- Etanol 96% (*Panreac*)
- Etanol absoluto (*Panreac*)
- Xileno (*Panreac*)
- Parafina (*Sigma*)
- Software *AxioVision 40V 4.6.3.0* (*Carl Zeiss S.A.*)



### 3.4. Extracción de ARN

La extracción de ARN de cultivos celulares, hígado, tejido adiposo retroperitoneal, tejido adiposo marrón e hipotálamo del experimento *in vivo*, se realizó mediante el método de extracción por *TriPure (Roche)* o usando el Kit de extracción *E.Z.N.A® Total RNA Kit 1*, siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

#### 3.4.1. Aislamiento de ARN mediante E.Z.N.A® Total RNA Kit 1

Para la extracción de ARN de muestras de los cultivos celulares, hígado y tejido adiposo retroperitoneal del experimento *in vivo* se utilizó el kit de extracción *E.Z.N.A® Total RNA Kit 1 (Omega Bio-Tek)*. Se pesaron entre 0,100-0,150 g de tejido adiposo y 0,015-0,020 g de hígado. Las muestras se homogenizaron en 700 µL de *TRK lysis buffer*, con la ayuda de un homogenizador de aspas (*modelo VDI 12, VWR*), y se hizo una centrifugación a 13000 g durante 5 min a temperatura ambiente, para eliminar la grasa y restos celulares. Al sobrenadante resultante de la centrifugación se le añadió 700 µL de etanol al 70% y se agitó con la pipeta y se mezcló con vórtex. Esta mezcla se introdujo en las columnas del kit, y se centrifugó a 10000 g durante 1 min a temperatura ambiente. Después se lavaron con 250 µL de *RNA Wash Buffer I*, y nuevamente se centrifugó a 10000 g durante 1 min a temperatura ambiente. Las columnas, se trataron con 35 µL de solución de *DNAasa I*, y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron las columnas con 250 µL de *RNA Wash Buffer I*, proporcionado por el Kit, y se centrifugó a 10000 g durante 1 min a temperatura ambiente. A continuación se realizaron dos lavados con 500 µL de *RNA Wash Buffer II*, y se centrifugó a 10000 g durante 1 min a temperatura ambiente. Finalmente se centrifugó las columnas con los tubos colectores vacíos a 20000 g durante 2 min, y una vez secas las columnas se añadieron 30 µL de H<sub>2</sub>O libre de ARNAsas, y se centrifugó las columnas a 20000 g durante 2 min para recuperar el ARN.

Reactivos:

- *E.Z.N.A.™ Total RNA Kit 1 (Omega Bio-Tek)*
- *Kit de RNase-free DNaseI (Omega Bio-Tek)*- H<sub>2</sub>O libre de ARNAsas (*Sigma*)
- Etanol al 96%

#### 3.4.2. Aislamiento de ARN utilizando TriPure

Los hipotálamos se homogenizaron en 1 ml de *TriPure* en hielo mediante el uso de un homogenizador de aspas (*modelo VDI 12, VWR*). Se hizo una precentrifugación a 12000 g durante 5 min a 4°C, para eliminar la grasa y restos celulares. Al sobrenadante obtenido se añadió 200 µL de cloroformo, se agitó durante 15 s y se incubó en frío durante 15 min. Seguidamente, las muestras se centrifugaron a 12000 g durante 15 min a 4°C y se recogió la fase acuosa que contenía el ARN. Para precipitar el ARN se añadió 500 µL de isopropanol y se incubó durante toda la noche a -20° C. Posteriormente se centrifugaron las muestras a 12000 g durante 10 min a 4°C para obtener el precipitado de ARN. El ARN precipitado se lavó con 1 ml de etanol al 75%. Las muestras se agitaron con vórtex hasta despegar el precipitado, y se centrifugó a 7500 g durante 5

min a 4°C. Finalmente, se eliminó completamente el etanol y se resuspendió el precipitado de ARN con el volumen adecuado de agua libre de ARNasas.

Reactivos:

- H<sub>2</sub>O libre de ARNasas (*Sigma*)
- Cloroformo (*Sigma*)
- Isopropanol (*Sigma*)
- TriPure (*Roche*)
- Etanol absoluto (*Panreac*)
- Etanol al 75%

### 3.4.3. Cuantificación del ARN

El ARN extraído se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm utilizando el espectrofotómetro *NanoDrop ND-1000*, que determina la concentración de ARN usando 2 µL de muestra con gran reproducibilidad y precisión. Este espectrofotómetro determina el ratio 260/280 que indica la pureza del ARN determinando el grado de contaminación por proteínas; concretamente, un ratio cercano a 2,0 es un indicador de ARN puro, no obstante un ratio mayor a 2,0 indica contaminación por ADN. El ratio 260/230 indica el grado de contaminación por solventes orgánicos, un ratio entre 2,0 y 2,2, es un indicador de la pureza del ARN.

## 3.5. Análisis de RT-PCR a tiempo real

Con el fin de determinar el nivel de expresión de los genes de estudio, primero se realizó una retrotranscripción del ARN de las muestras de interés a ADN copia (ADNc), posteriormente realizamos la amplificación y cuantificación.

### 3.5.1. Retrotranscripción

El objetivo de la retrotranscripción es la generación de una cadena de ácido desoxirribonucleico (ADN) de doble cadena a partir de un ácido ribonucleico (ARN) de cadena simple. 250 ng de ARN total en un volumen de 5 µL de agua libre de ARNasas se desnaturalizaron a 65°C durante 10 min en un termociclador (*Thermal Cycler 2720, Applied Biosystems*). Posteriormente se añadieron 7,5 µL de RT-mix que contenía para cada tubo de reacción: 1,25 µL de *Buffer 10x*, 1,25 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 2 µL de dNTPs 2,5 mM, 0,5 µL de hexámeros sintetizados al azar, 0,5 µL de inhibidores de ARNasas 20 U/µL, 0,5 µL de transcriptasa reversa (*MuLV RT, murine leukemia virus reverse transcriptase*) 50 U/µL y 1,5 µL de agua libre de ARNasas. Las condiciones de la reacción de retrotranscripción fueron: 15 min a 20°C, 30 min a 42°C, un paso final de 5 min a 95°C y se mantuvo a 4°C.

Reactivos:

- *Buffer 10x* (*Promega*)
- H<sub>2</sub>O libre de ARNasas (*Sigma*)
- Inhibidores de ARNasas 20 U/µL (*Applied Biosystems*)
- MgCl<sub>2</sub> 25 mM (*Promega*)

- Hexámeros (*Random hexamers* 50  $\mu$ M) (*Applied Biosystems*)
- Solución de dATP 100 mM (*Invitrogen*)
- Solución de dCTP 100 mM (*Invitrogen*)
- Solución de dGTP 100 mM (*Invitrogen*)
- Solución de dTTP 100 mM (*Invitrogen*)
- Transcriptasa reversa (*MuLV RT, murine leukine virus retrotranscriptase*) 50 U/ $\mu$ L (*Applied Biosystems*)

### 3.5.2. PCR a tiempo real

La PCR a tiempo real se usó para medir los niveles de expresión de un conjunto de genes en muestras de los cultivos celulares, en el hígado, tejido adiposo retroperitoneal y en el hipotálamo. La expresión relativa de cada ARNm de interés se normalizó en función de la expresión de un gen de referencia de expresión estable (*housekeeping*) que se determinó para cada tejido y condición experimental. Se utilizaron 2  $\mu$ L del producto de RT (dilución 1/10). A la muestra se le añadieron 9  $\mu$ L de PCR-mix que contiene: 3,1  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O libre de ARNasas, 0,45  $\mu$ L de cada *Primer* (a una concentración de 5  $\mu$ M) y 5  $\mu$ L de un mix comercial *Power Syber Green PCR Master Mix*. En las Tablas 3.3 y 3.4 se detallan el listado de cebadores usados en el experimento *in vitro* (diseñados para ratón, Tabla 3.3) y en el experimento *in vivo* (diseñados para rata, Tabla 3.4).

Cebadores usados en muestras del modelo <i>in vitro</i>		
Símbolo	Nombre genérico	Cebadores forward (F) y reverse (R)
<i>Cpt1b</i>	Carnitina palmítoiltransferase lb, músculo / <i>Carnitinepalmitoyltransferasa lb, muscle</i>	F: AAGGGTAGAGTGGGCAGAGG R: GCAGGAGATAAGGGTGAAAGA
<i>Fasn</i>	Ácido graso sintasa/ <i>Fatty Acid Synthase</i>	F: TTCGGTGTATCCTGTGTCC R: TGGGCTTGTCTGCTCTAAC
<i>Insr</i>	Receptor de insulina/ <i>Insulin Receptor</i>	F: TGGAGAGGTGTGCCCTGGTA R: ATCTTCGGGTCTGGTCTTGAAC
<i>Lipe</i>	Lipasa sensible a hormonas/ <i>Lipase Hormone Sensitive (HSL)</i>	F: TCACGCTACATAAAGGCTGCT R: CCACCCGTAAAGAGGGAAC
<i>Pnpla2</i>	Triglicérido lipase adiposa (ATGL)/ <i>Patatin-Like Phospholipase Domain Containing 22</i>	F: TGTGGCCTCATTCTCCTAC R: AGCCCTGTTTGACATCTCT
<i>Pparg</i>	Receptor gamma activado por el proliferador peroxisomal/ <i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma</i>	F: AGACCACTCGCATTCTTTG R: TCGCACTTGGTATTCTTGG
<i>Srebf1c</i>	Factor de transcripción de unión al elemento regulador de esteroides 1/ <i>Sterol Regulatory Element Binding Transcription Factor 1</i>	F: CAGCGGTTTTGAACGACA R: GCCAGAGAAGCAGAAGAGAAG

**Tabla 3.3.** Secuencia de cebadores usados en PCR a tiempo real para el experimento *in vitro*.

Cebadores usados en muestras del modelo <i>in vivo</i>		
Símbolo	Nombre genérico	Cebadores forward (F) y reverse (R)
<i>Cd36</i>	Molécula CD36 (receptor de la trombospondina)/ <i>CD36. (Molecule Thrombospondin Receptor)</i>	F:GTGGCAAAGAACAGCAGCAA R:CCAACAGACAGTGAAGGCTCA
<i>Cidea</i>	Efector tipo A subunidad $\alpha$ de fragmentación de ADN inductor de muerte celular/ <i>Cell Death-inducing DNA Fragmentation, <math>\alpha</math> Subunit-like Effector A</i>	F:TCAGACCCTAAGAGACAACACA R: CATTGAGACAGCCGAGGA
<i>Cpt1a</i>	Carnitinapalmitoiltransferasa 1a, hígado/ <i>Carnitine Palmitoyltransferase 1a, liver</i>	F:CGAGAAGGGAGGACAGAGAC R:GGACACCACATAGAGGCAGAA
<i>Cpt1b</i>	Carnitina palmítoltransferasa 1b, músculo / <i>Carnitinepalmitoyltransferasa 1b, muscle</i>	F: GCAAACCTGGACCGAGAAGAG R: CCTTGAAGAAGCGACCTTTG
<i>Fasn</i>	Ácido graso sintasa/ <i>Fatty Acid Synthase</i>	F: CGGCGAGTCTATGCCACTAT R: ACACAGGGACCGAGTAAT
<i>Gck</i>	Glucocinasa/ <i>Glucokinase</i>	F: CAACTGCGAAATCACCTTCA R: AGCATTGTGGTGTGTGGAG
<i>Hk2</i>	Hexocinasa 2/ <i>Hexokinase 2</i>	F: CAGCCTAGACCAGAGCATCC R: CGCATCTCTCCATGTAGCA
<i>Insr</i>	Receptor de insulina/ <i>Insulin Receptor</i>	F: CTCCTGGGATTCATGCTGTT R: GTCCGGCGTTCATCAGAG
<i>Irs1</i>	Sustrato 1 del receptor de la insulina/ <i>Insulin Receptor Substrate 1</i>	F: GCAACCGCAAAGGAAATG R: ACCACCGCTCTCAACAGG
<i>Lep</i>	Leptina/ <i>Leptin</i>	F: TCACACACGCAGTCGGTAT R: AGGTCTCGCAGTTCTCCAG
<i>Lepr</i>	Receptor de la leptina/ <i>Leptin Receptor</i>	F: AGCCAAACAAAAGCACCATT R: TCCTGAGCCATCCAGTCTCT
<i>Lpl</i>	Lipoproteína lipasa/ <i>Lipoprotein Lipase</i>	F: TATGGCACAGTGGCTGAAAG R: TCTGACCAGCGGAAGTAGGAG
<i>Npy</i>	Neuropéptido Y/ <i>Neuropeptide Y</i>	F: TGGACTGACCCTCGCTCTAT R: GTGTCTCAGGGCTGGATCTC
<i>Pdk4</i>	Piruvato deshidrogenasa quinasa, isozima 4/ <i>Pyruvate Dehydrogenase Kinase, Isozyme 4</i>	F: TCCTTCACACCTTCACCACA R: AAAGAGGCGGTCAGTAATCC
<i>Pnpla2</i>	Triglicérido lipasa adiposa (ATGL)/ <i>Patatin-like Phospholipase Domain Containing 2</i>	F: TGTGGCCTCATTCTCTCTAC R: AGCCCTGTTTGACATCTCT
<i>Pomc</i>	Proopiomelanocortina/ <i>Proopiomelanocortin</i>	F: CCTGTGAAGGTGTACCCCAATGC R: CACGTTCTTGATGATGGCGTTC
<i>Ppara</i>	Receptor $\alpha$ activado por el proliferador peroxisomal/ <i>Peroxisome Proliferator Activated Receptor <math>\alpha</math></i>	F: TGTCGAATATGTGGGGACAA R: AAACGGATTGCATTGTGTGA
<i>Pparg</i>	Receptor $\gamma$ activado por el proliferador peroxisomal/ <i>Peroxisome Proliferator-activated Receptor <math>\gamma</math></i>	F: GATCCTCCTGTTGACCCAGA R: TCAAAGGAATGGGAGTGGTC
<i>Scd1</i>	Esteroil-CoenzimaA desaturasa 1/ <i>Stearoyl-Coenzyme A Desaturase 1</i>	F: ATCCCCCTCCAAGGTCTA R: CGGGCCCATTCATATACATC
<i>Slc2a4</i>	Transportador 4 de glucosa (GLUT4)/ <i>Solute Carrier Family 2 Facilitated Glucose Transporter, Member 4</i>	F: GGCATGCGTTTCCAGTATGT R: GCCCTCAGTCATTCTCATC
<i>Socs3</i>	Supresor de la señalización de citoquinas 3/ <i>Suppressor of Cytokine Signaling 3</i>	F: ACTGAGCCGACCTCTCTCTCT R: CCCCTCTGACCCTTCTTTG
<i>Srebf1</i>	Factor de transcripción de unión al elemento regulador de esteroides 1/ <i>Sterol Regulatory Element Binding Transcription Factor 1</i>	F: CCCACCCCTTACACACC R: GCCTGCGGTCTTCATTGT
<i>Stat3</i>	Transductor de señal y activador de la transcripción 3/ <i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (Acute-phase Response Factor)</i>	F: GCTGACCAATAACCCCAAGA R: ACACCCTGAGTAGTTCACACCA
<i>Ucp1</i>	Proteína desacopladora 1/ <i>Uncoupling protein 1 (mitochondrial, Proton Carrier) (Ucp1),</i>	F: ACACCTGCCTCTCTCGGAAA R: TAGGCTGCCCAATGAACACT
<i>Fgf21</i>	Factor de crecimiento de fibroblastos 21/ <i>Fibroblast Growth Factor 21</i>	F: ACAGATGACGACCAGGACAC R: AGGCTTTGACACCCAGGATT

**Tabla 3.4.** Secuencia de cebadores usados en PCR a tiempo real para el experimento *in vivo*.

La reacción de amplificación se realizó en un termociclador (*StepOnePlus™*) y consistió en una desnaturalización de 10 min a 95°C (estas condiciones son específicas para la activación de la polimerasa comercial), posteriormente siguieron 40 ciclos de temperaturas: 15 s a 95°C (desnaturalización) y 1 min a 60°C (alineamiento y elongación), por último una curva final de desnaturalización para verificar la pureza de los productos obtenidos que consistió en: 15 s a 95°C, 1 min a 60 °C y 15 s a 95°C.

Al final de cada ciclo de amplificación se detectó la fluorescencia y se determinó el ciclo en el que el incremento de fluorescencia empieza a ser exponencial, lo que se conoce como ciclo umbral (*Ct* del inglés *cycle threshold*), con el programa específico del instrumento (*StepOne v 2.2.2*). La expresión relativa se calculó con el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Además se consideró el 100% la expresión génica del grupo control, y los demás se expresaron en función de dicha expresión.

Reactivos:

- H<sub>2</sub>O libre de ARNasas (*Sigma*)
- *Power Syber Green PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*)
- Forward and reverse *Primers* (*Sigma*)

### 3.6. Western blot

El *western blot* es un método semicuantitativo para identificar proteínas específicas a partir de una mezcla más compleja de estudio. Se emplea una electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (*PAGE*) en presencia de dodecilsulfato sódico (*SDS*) para hacer una separación de las proteínas en función de su peso molecular. Posteriormente las proteínas son transferidas a una membrana adsorbente donde es detectada la proteína en estudio utilizando anticuerpos específicos para dicha proteína. La membrana es escaneada y se realiza una cuantificación de las bandas.

#### 3.6.1. Preparación de las muestras

Se homogenizaron muestras de tejido adiposo marrón con un homogeneizador (*modelo VDI 12, VWR*) en hielo y en una dilución 1:5 (w:v), empleando *buffer de lisis lx RIPA* (*radioimmunoprecipitation assay buffer*) más inhibidor de proteasas y fosfatasa (*Thermo Fisher, Rockford, USA*). Después de la homogenización se hizo una centrifugación a 7500 x g durante 2 min y a 4°C, el sobrenadante resultante se utilizó para medir la concentración de proteínas.

El contenido total de proteínas se cuantificó con el kit comercial *Pierce BCA protein assay* (*Thermo scientific*) usando Bovine Serum Albumin *BSA* en concentración de 2 mg/mL como estándar. Se añadieron 25 µL de las muestras y el patrón en una placa de *ELISA* (96 pocillos) más 200 µL de *WR* (*Working reagent*) incluido en el kit. La placa se cubrió para protegerla de la luz exterior y se incubó durante 30 min a 37°C. Finalmente se leyó la absorbancia a 562 nm en un espectrofotómetro para placas de *ELISA* (*Sunrise de TECAN*).

Las muestras se prepararon diluyendo 10 µL de la muestra y 90 µL de *RIPA* en un volumen final de 100 µL. Para la electroforesis, se tomó el volumen de muestra

necesario para cargar 5 µg de proteína, Se añadió 3 µL de tampón de carga *Laemmli Sample buffer*, por cada 10 µg de proteína total, las muestras se calentaron 3 min en agua en ebullición para desnaturalizar las proteínas.

Reactivos:

- *Halt<sup>TM</sup> Protease & Phosphatase Inhibitor Cocktail 100x* (Thermo Fisher Scientific)
- RIPA Lysis buffer 1x: 50 mM Tris-HCL (Sigma) buffer pH:7,4, 150 mM NaCl (Panreac), ácido desoxicólico 0,25% (Panreac), NP40 1% (Sigma) y EDTA 1 mM (Merck)
- *Pierce BSA Protein assay kit* (Thermo scientific)
- Albúmina estándar (2 mg/mL) (Thermo scientific)
- Tampón de carga (*Laemmli sample buffer*): Tris-HCL 0.5 mM (Sigma) pH:6,8, SDS 5% (Sigma), glycerol 10% (Sigma), β-mercaptoetanol 5% (Sigma) y azul bromofenol 1% (Panreac)

### 3.6.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)

Para separar las proteínas de acuerdo a su movilidad electroforética, se usaron geles de poliacrilamida *Criterion<sup>TM</sup>TGX<sup>TM</sup>* Pre-cast de 4-15% (Bio-Rad), usando tris-glicina como *buffer* de electroforesis. Se cargaron los pre-cast con 13 µL de muestra y 3 µL del marcador de peso molecular bicolor (*Bio-Rad*). Las condiciones de la electroforesis fueron 120 V, 90 min.

Reactivos:

- Gel de poliacrilamida Precast 4-15 % *Criterion<sup>TM</sup>TGX<sup>TM</sup>*, Bio-Rad
- Tris-glicina 0,5x pH=8.3: Tris-Base 0,025 M (Sigma), glicina 0,195 M (Sigma) y SDS 0,02% (Sigma)
- Marcador de peso molecular bicolor (*Precision Plus Protein<sup>TM</sup> Standard, Dual color*) (Bio-Rad)

### 3.6.3. Electrotransferencia

Una vez hecha la electroforesis se hizo una transferencia de las proteínas fraccionadas hacia una membrana de nitrocelulosa de 0,2 µm, para ello se utilizó el sistema de transferencia turbo *Trans-blot* (Bio-Rad), el proceso consiste en humedecer los papeles de transferencia en la solución *Trans-blot Turbo Transfer buffer*, colocarlos en el fondo del cassette electrodo (ánodo). A continuación la membrana de transferencia también se humedeció con la misma solución y se colocó sobre la parte superior de la pila humedecida de papeles dentro del cassette, después el gel se colocó sobre la membrana. Finalmente se colocaron sobre el gel los papeles de transferencia humedecidos en solución *Trans-blot Turbo Transfer buffer*. Se colocó el cassette (cátodo) para cerrar el sistema de transferencia y se insertó dentro del equipo. Las condiciones de electrotransferencia fueron: 7 min a 2.5 A constantes hasta 25 V.

Reactivos:

- 0,2 µm *nitrocellulose membrane* (Bio-Rad)

- *Trans-Blot® Turbo™ Transfer buffer solution (Bio-Rad)*

#### 3.6.4. Inmunodetección

La membrana fue bloqueada con una solución de bloqueo (*Odyssey®*) en TBS 1x (1:1) durante 12 horas a temperatura ambiente. Después del bloqueo, la membrana fue lavada con TBS con Tween-20 al 0,1% durante 60 s y posteriormente incubada 1 h a temperatura ambiente en agitación constante con anticuerpo primario específico para UCP1 en el tejido adiposo marrón (anti-UCP1). Después de la incubación la membrana fue lavada 4 veces durante 5 min cada vez a temperatura ambiente con TBS con Tween-20 al 0,1% en agitación constante. Después la membrana fue incubada 30 min a temperatura ambiente con agitación constante y con protección de la luz exterior con anticuerpo secundario conjugado con un fluoróforo (*IRDye® 800 CW Goal AntiRabbit IgG, Li-cor Ref: 926-32211*). El anticuerpo secundario se preparó según la especie huésped del anticuerpo primario.

Para la detección las membranas fueron lavadas 4 veces durante 5 min cada vez en TBS con Tween-20 al 0.1% a temperatura ambiente en agitación constante. Se realizó un último lavado con TBS durante 5 min.

Reactivos:

- *Odyssey® Blocking Buffer Solution (LI-COR Biosciences)*
- TBS 10x wash buffer, pH: 7,4: 500 ml de Tris-Cl 1M (*Sigma*), pH: 7,4 y 300 ml de NaCl 5M (*Panreac*) y arrasar hasta 1 L con agua destilada.
- TBS 1 con Tween-20 al 0,1%: TBS 10 diluido 1:10 con agua destilada y 1 g de Tween-20 (*Sigma*)
- Anticuerpo primario policlonal de conejo anti UCP1 de rata (*Genetex, Ref: 10983-Rabbit*) diluido 1:1000 en TBS 1x con 0,1% de BSA (*Sigma*), 0,1% de ácido sódico (*Sigma*) y 0,1% de Tween-20 (*Sigma*)
- Anticuerpo primario policlonal de conejo anti HSP90 de rata (*Cell Signaling Technology, Inc. Ref: 4877-Rabbit*), diluido 1:1000 en TBS 1x con 0,1% de BSA (*Sigma*), 0,1% de ácido sódico (*Sigma*) y 0,1% de Tween-20 (*Sigma*)
- Anticuerpo secundario anti anticuerpos de conejo (Canal de detección infrarroja: 800) (*LI-COR Biosciences*), diluido 1:20000 en *Odyssey® Blocking Buffer* y TBS 1x con 0,1% de BSA (*Sigma*), 0,1% de ácido sódico (*Sigma*) y 0,1% de Tween-20 (*Sigma*)
- Anticuerpo secundario anti anticuerpos de ratón (Canal de detección infrarroja: 680) (*LI-COR Biosciences*), diluido 1:20000 en *Odyssey® Blocking Buffer* y TBS 1x con 0,1% de BSA (*Sigma*), 0,1% de ácido sódico (*Sigma*) y 0,1% de Tween-20 (*Sigma*).

#### 3.6.5. Escaneado y cuantificación

Las membranas fueron escaneadas en un escáner *Odyssey®* con sistema de imagen infrarroja (*LI-COR Biosciences*) en los canales de detección apropiados respecto al anticuerpo escaneado (canal verde en 700 nm cuando se utilizó el anticuerpo secundario anti-anticuerpos de ratón y canal rojo en 800 nm cuando se utilizó el anticuerpo secundario anti-anticuerpos de conejo). Para la cuantificación de las bandas se utilizó el *Odyssey® software V 3.0 (LI-COR Biosciences)*.

### 3.7. Determinación de parámetros séricos por técnicas inmunológicas

#### 3.7.1. Determinación de la concentración de leptina

Para la determinación de los niveles circulantes de leptina, se utilizó el kit comercial de inmunoensayo enzimático, *Quantikine ELISA Mouse/Rat Leptin Immunoassay (R&D Systems, USA & Canadá)*. La técnica empleada se basa en el principio de un *ELISA* tipo sándwich, donde un anticuerpo policlonal anti leptina se encuentra adherido en los pocillos de la placa. En cada pocillo de las placas incluidas en el kit que estaban recubiertas con un anticuerpo policlonal anti leptina, se introducían 50  $\mu\text{L}$  de suero (previamente diluido) y los diferentes puntos del patrón de concentración conocida, y se incubaba 2 h a temperatura ambiente. Después de una serie de lavados (cuatro lavados con el tampón de lavado), se añadieron 100  $\mu\text{L}$  del anticuerpo anti leptina conjugado a una peroxidasa de rábano *horseradish peroxidase (HRP)*, y nuevamente se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. Se hicieron 5 lavados con 400  $\mu\text{L}$  de *Wash Buffer*, suministrado por el kit para eliminar el anticuerpo excedente y se añadió 100  $\mu\text{L}$  de solución sustrato del conjugado anti-leptina, y se incubó por 2 h a temperatura ambiente. Pasadas las 2 h de incubación, se realizaron 5 lavados con 400  $\mu\text{L}$  de *Wash Buffer*, suministrado por el kit. Se añadió 100  $\mu\text{L}$  de *Substrate Solution*, Se incubó por 30 min a temperatura ambiente, protegiendo la placa de la luz. Finalmente se añadió 100  $\mu\text{L}$  de *Stop Solution* para detener la reacción y se leyó la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro para placas de *ELISA (Sunrise de TECAN)*. La intensidad del color registrado es proporcional a la cantidad de leptina presente en las muestras.

Reactivos:

- *Quantikine ELISA Mouse/Rat Leptin (R&D Systems, USA & Canada)*

#### 3.7.2. Determinación de la concentración de insulina

Los niveles de insulina en suero se determinaron con el kit comercial *Rat Insulin ELISA de Mercodia*. Este kit se basa en el principio de un inmunoensayo enzimático (*ELISA*) directo tipo sándwich, donde la incubación de los anticuerpos monoclonales anti-insulina unidos a los pocillos de la placa y los anticuerpos monoclonales anti-insulina conjugados con peroxidasa, reaccionan con la insulina presente en las muestras.

Se añadió a cada pocillo 10  $\mu\text{L}$  de suero o de patrón de concentración conocida y 100  $\mu\text{L}$  de *enzyme conjugate IX*, previamente preparado a partir del *enzyme conjugate IIX* proporcionado por el kit. Se incubó en agitación durante 2 h a temperatura ambiente. Pasadas las 2 h se lavó 6 veces con *Wash Buffer IX* para eliminar el exceso de anticuerpo marcado con enzimas marcadas. Se añadió 200  $\mu\text{L}$  del sustrato específico *3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (Substrate TMB)* y se incubó por 15 min a temperatura ambiente. Esta reacción generó un producto coloreado que se cuantificó por espectrofotometría. Se añadió 50  $\mu\text{L}$  *Stop solution* para detener la reacción, proporcionada por el kit, y finalmente se leyó la absorbancia a 450 nm, en un espectrofotómetro para placas de *ELISA Sunrise de TECAN*. La cantidad de producto



coloreado que se produjo es directamente proporcional a la cantidad de insulina que hay en la muestra. Paralelamente se realizó una curva patrón.

Reactivos:

- *Rat Insulin ELISA (Merckodia)*

### 3.7.3. Determinación de la concentración de ghrelina

Los niveles séricos de Ghrelina se determinaron mediante el kit comercial *Ghrelin (Rat, Mouse) EIA Enzyme Immunoassay Kit Phoenix Pharmaceuticals, Inc.* Este kit está diseñado para medir la concentración de un péptido específico basado en el principio del inmunoensayo enzimático "competitivo". Este inmunoensayo utiliza una enzima como marcador del antígeno sin marcar y la muestra se mide por su capacidad para competir con un antígeno marcado en el inmunoensayo. En cada pocillo de la placa incluida en el kit se encuentra adherido un anticuerpo secundario, cuyos sitios de enlace no específicos están bloqueados. El anticuerpo secundario se puede unir al fragmento Fc del anticuerpo primario y el fragmento Fab está ligado competitivamente por ambos péptidos, ya sea el péptido biotinilado o el péptido de la muestra desconocida. El péptido biotinilado interactúa con la enzima conjugada con *Streptavidin-HRP peroxidasa* que cataliza la solución de sustrato. La intensidad del color amarillo resultante es directamente proporcional a la cantidad de complejo de péptido biotinilado con la *peroxidasa*, pero inversamente proporcional a la cantidad del péptido de la muestra desconocida. Esto se debe a la competencia entre el péptido biotinilado y el péptido diana para unirse al anticuerpo primario. Se realizó una curva estándar trazando la medida del aumento de la concentración como una función de las diversas concentraciones de péptido estándar conocidas. La concentración del péptido desconocido en las muestras se puede determinar a través de la extrapolación basada en la curva estándar.

Se agregaron 50 µL de las diluciones de la curva estándar y la muestra. Se incubó a temperatura ambiente 20-23 °C durante 2 h. Se agregó 100 µL en cada pocillo de la solución de la enzima conjugada con *Streptavidin-HRP*. Se incubó a temperatura ambiente 20-23 °C durante 1 hora. Se lavaron todos los pocillos de la inmunoplatea 4 veces con 350 µL *assay buffer IX*. Se agregó 100 µL de la solución de sustrato *TMB* en cada pocillo. Se incubó a temperatura ambiente 20-23 °C durante 1 hora. Se terminó la reacción con 100 µL por pocillo de *2N HCl*. Se leyó la absorbancia a 450 nm y se tuvo en cuenta la curva estándar para realizar los cálculos de la concentración de ghrelina.

Reactivos:

- *Ghrelin (Rat, Mouse) EIA Enzyme Immunoassay Kit (Phoenix Pharmaceuticals, Inc)*

## 3.8. Determinación de parámetros séricos por técnicas enzimáticas

### 3.8.1. Determinación de triglicéridos circulantes

La determinación de los triglicéridos en suero se realizó con el kit comercial *Serum Triglyceride Determination Kit (Sigma-Aldrich)*, basado en la hidrólisis enzimática de la

*lipoproteína lipasa* sobre los triglicéridos presentes en la muestra, produciéndose glicerol y ácidos grasos. El glicerol producido sufre una serie de reacciones enzimáticas (fosforilación, oxidación y peroxidación), primero es fosforilado formando *glicerol-1-fosfato (G-1-P)*, dicha reacción es catalizada por la *glicerol quinasa (GK)*. Después *G-1-P* es oxidado por acción de la *glicerol fosfato oxidasa (GPO)* resultando en la formación de *dihidroxi-acetona fosfato (DAP)* produciendo *peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)*. Finalmente se produce la catálisis de *H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>* que produce quimioluminiscencia con absorbancia a 540 nm.

En placas de *ELISA* (96 pocillos) se pipeteaban 240 µL del reactivo *Free Glycerol*, incluido en el kit. Se añadieron 3 µL de suero o de los puntos de la curva patrón de concentración conocida, y se incubó durante 5 min a 37°C agitando suavemente la placa. Se realizó una lectura de la absorbancia inicial a 540 nm en un espectrofotómetro para placas de *ELISA (Sunrise de TECAN)* determinándose así la concentración de glicerol en el suero. Se añadieron 60 µL de *Triglyceride Reagent*, proporcionado por el kit. Se agitó una vez más y se volvió a incubar por 5 min a 37°C. Finalmente se realizó una lectura de la absorbancia final a 540 nm. Para determinar la concentración de triglicéridos reales, se calculó mediante la resta entre triglicéridos totales y el glicerol.

Reactivos:

- *Serum Triglyceride Determination kit (Sigma-Aldrich)*

### 3.8.2. Determinación de ácidos grasos libres circulantes NEFAs

La determinación en suero de los niveles de ácidos grasos no esterificados (*NEFA, non esterfled fatty acids*) se realizó con el test colorimétrico enzimático *NEFA-HR2 (WAKO-Chemicals)*. El fundamento del test colorimétrico para la cuantificación de los *NEFA* en suero consiste en que los *NEFAs* de la muestra son convertidos a *Acyl-CoA*, *adenosín monofosfato (AMP)* y *ácido pirofosfórico (PPi)* por la acción de la *Acyl-CoA sintetasa (ACS, Acyl-coenzyme A synthetase 1)*, bajo la presencia de *coenzima A (CoA)* y *trifosfato de adenosina (ATP)*. El *Acyl-CoA* resultante de la reacción es oxidado por la acción de la *Acyl-CoA oxidasa (ACOD)*, generando peróxido de hidrógeno, en presencia de una *peroxidasa (POD)*, que permite la condensación oxidativa de *3-metil-N-etil-N (β-hidroxietil)-Anilina (MEHA)* con *4-aminoantipirina (4-AA)*. Formándose un producto de color azul púrpura que se puede medir colorimétricamente a 550 nm.

En placas de *ELISA* (96 pocillos) se pipetearon 7 µL de la muestra en placas de *ELISA* (96 pocillos), posteriormente se añadió 150 µL del reactivo 1 (reconstituido previamente con la solución A (*buffer fosfato* 50 mmol/L, *pH* 7,0 y *ácida sódica* 0,05%) y la solución *color A* (0,53 U/mL *ACS*, 0,31 mmol/L *CoA*, 4,3 mmol/L *ATP*, 1,5 mmol/L *4-AA*, 2,6 u/mL *AOD*, 0,062% *ácida sódica*, y *color A* 0,8%) incluidos en el kit), se agitó vigorosamente la muestra y se incubó por 5 min a 37°C. A continuación se añadieron 75 µL del reactivo 2 (reconstituido previamente con *solución B (MEHA)* y la solución *color B* (12U/mL *ACOD* y 14U/mL *POD*) incluidos en el kit), nuevamente se agitó vigorosamente y se dejó reposar durante 5 min a temperatura ambiente.

Finalmente se leyó la absorbancia a 550 nm en un espectrofotómetro para placas de ELISA (*Sunrise de TECAN*).

Reactivos:

- Kit calorimétrico enzimático *NEFA-HR2 (WAKO-Chemicals)*

### 3.8.3. Determinación de los niveles de colesterol

Los niveles de colesterol total se determinaron en muestras de suero usando el kit de *Química Clínica Aplicada S.A.* Este kit colorimétrico se fundamenta en la reacción de la *oxidasa / peroxidasa*. El colesterol esterificado con anticuerpo presente en muestras de plasma pasa por la acción de la enzima oxidasa, originando peróxido de hidrógeno que está sujeto a la acción de la *peroxidasa* generando un complejo coloreado que puede cuantificarse por espectrofotometría. Primero se dejaron a temperatura ambiente los reactivos y las muestras. Fue mezclado 200 µL del reactivo suministrado en el kit con 2 µL de muestra y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Después se midió la absorbancia a 500 nm usando un espectrofotómetro para placas de ELISA (*Sunrise de TECAN*).

Reactivos:

- Kit de *Colesterol oxidasa / peroxidasa (BioSystems.)*

### 3.8.4. Determinación de los niveles de fosfatasa alcalina

La fosfatasa alcalina es un enzima cuya elevación en la concentración sérica puede reflejar diversas enfermedades de daño hepático. Se fundamenta en el control de la liberación del ácido fosfórico y fenolftaleina por la acción de la fosfatasa alcalina sérica sobre el sustrato de monofosfato. En condiciones óptimas de la reacción en un medio básico, vira a una tonalidad rosa, esto permite la determinación de la actividad del enzima. El  $\Delta\text{Abs}/\text{min}$  es proporcional a la concentración de fosfatasa alcalina presente en la muestra.

Se atemperó los reactivos de trabajo a 37°C. Se mezcló 10 µL del sustrato A en 50 µL de agua desionizada. Se mezcló suavemente e incubó durante 5 min a 37°C. Se añadió 5 µL del reactivo estándar C ó de las muestras a analizar. Se mezcló e incubó por 20 min a 37°C. Se terminó la reacción con 250 µL del reactivo B para el revelado del color. Después se midió la absorbancia a 550 nm usando un espectrofotómetro (*Sunrise de TECAN*). La concentración de la Fosfatasa alcalina se determinó usando la siguiente ecuación:

$$\text{Fosfatasa alcalina (U/L)} = (\Delta\text{Abs}/\text{min}) \cdot ((V_t \cdot 10^6) / (\epsilon \cdot L \cdot V_s))$$

Donde  $V_t$ : Volumen total de la mezcla de la reacción.  $V_s$ : Volumen de la muestra.  $L$ : Paso de luz de la cubeta o placa de medición.  $\epsilon$ : Coeficiente de extinción molar de p-Nitrofenol en medio alcalino (405 nm: 18500).

Reactivos:

- Kit de *Fosfatasa Alcalina (Química Clínica Aplicada, S.A.)*

### 3.8.5. Determinación de los niveles de aspartato aminotransferasa (AST)

La actividad enzimática de la AST (aspartato aminotransferasa) refleja el daño hepático. La reacción se fundamenta en que AST, cataliza la reacción entre la L-aspartato y el ácido  $\alpha$ -cetoglútamico. El ácido oxalacético formado se reduce por el cofactor dinucleótido de nicotinamida NADH en presencia de la enzima malato deshidrogenasa MDH, produciéndose un cambio en la absorbancia (Abs) del medio. En condiciones óptimas de reacción, el  $\Delta$ Abs/min es proporcional a la concentración de enzima AST presente en la muestra.

Según el protocolo, se atemperó los reactivos de trabajo a 37°C y se mezcló 50  $\mu$ L del reactivo A con 10  $\mu$ L de la muestra. Se mezcló e incubó por 1 min. Se detuvo la reacción con 12,5  $\mu$ L del reactivo B. Las absorbancias se determinaron con el equipo Mithras LB 940, *Berthold Technologies*. La concentración de la AST se determinó usando la siguiente ecuación:

$$\text{AST (U/L)} = (\Delta\text{Abs/min}) \cdot ((V_t \cdot 10^6) / (\epsilon \cdot L \cdot V_s))$$

Donde  $V_t$ : Volumen total de la mezcla de la reacción.  $V_s$ : Volumen de la muestra.  $L$ : Paso de luz de la cubeta o placa de medición.  $\epsilon$ : Coeficiente de extinción molar de NADH (340 nm:  $6,31 \cdot 10^3$ ).

Reactivos:

- Kit de *Transaminasas GOT/AST (Química Clínica Aplicada, S.A.)*

### 3.8.6. Determinación de los niveles de alanina aminotransferasa ALT

La actividad enzimática de la ALT (alanina aminotransferasa), refleja específicamente cuando hay daño hepático. La reacción se fundamenta en que ALT, cataliza la reacción entre la L-Alanina y el Ac. Ceto-Glutárico. El Ac. Pirúvico formado se reduce por el cofactor NADH en presencia de la enzima lactato deshidrogenasa LDH, produciéndose un cambio en la absorbancia (Abs) del medio. En condiciones óptimas de reacción, la  $\Delta$ Abs/min es proporcional a la concentración de enzima ALT presente en la muestra.

Se atemperó los reactivos de trabajo a 37°C y se mezcló 50  $\mu$ L del reactivo A con 5  $\mu$ L de la muestra. Se mezcló e incubó por 1 min. Se detuvo la reacción con 12,5  $\mu$ L del reactivo B. Las absorbancias se determinaron con el equipo Mithras LB 940, *Berthold Technologies*. La concentración de la ALT se determinó usando la siguiente ecuación:

$$\text{ALT (U/L)} = (\Delta\text{Abs/min}) \cdot ((V_t \cdot 10^6) / (\epsilon \cdot L \cdot V_s))$$

Donde  $V_t$ : Volumen total de la mezcla de la reacción.  $V_s$ : Volumen de la muestra.  $L$ : Paso de luz de la cubeta o placa de medición.  $\epsilon$ : Coeficiente de extinción molar de NADH (340 nm:  $6,31 \cdot 10^3$ ).

Reactivos:

- Kit de *Transaminasas GPT/ALT (Química Clínica Aplicada, S.A.)*

### 3.8.7. Determinación de la concentración de glucosa

La determinación de la glucosa en sangre (glucemia) se realizó mediante el glucómetro *AccuChek Aviva system (Roche Diagnostics)*. Para ello, se colocaba una gota de sangre sobre la tira reactiva hasta cubrir completamente la ranura por capilaridad a un nivel suficiente para poder obtener una óptima lectura. La mayoría de los glucómetros actúan como un biosensor que se fundamenta en la reacción enzimática de la glucosa deshidrogenasa y ante la presencia de la coenzima *PQQ* (quinona de pirroloquinolina) que se encuentran en las tiras reactivas. Cuando la gota de sangre se introduce en la tira reactiva inicia la reacción enzimática que provoca la oxidación de la glucosa, convirtiendo la glucosa en gluconolactona. Esta reacción enzimática genera una liberación de electrones y es así como el glucómetro traduce esta corriente eléctrica en la cantidad de glucosa de la muestra de sangre. La medición obtenida varía dependiendo de la cantidad de glucosa y se lee en la pantalla del glucómetro en mg/dL.

Reactivos:

- *Accu-Chek Aviva system (Roche diagnostics)*
- Tiras reactivas *Accu-Chek Aviva system (Roche diagnostics)*

### 3.9. Determinación del índice HOMA-IR

La resistencia a la insulina se determinó mediante la evaluación del modelo homeostático de resistencia a la insulina (*HOMA-IR*). Los niveles de *HOMA-IR* se determinaron al conocer las concentraciones séricas de insulina y glucosa en condiciones de ayuno. La fórmula para la determinación del índice *HOMA-IR* es:

$$HOMA-IR: (Glucosa \text{ en ayuno (mmol/L)} \times Insulina \text{ en ayuno (mU/L)}) / (22,5)$$

### 3.10. Análisis estadístico

Todos los datos se presentan como media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). El análisis estadístico usado fue elegido según el objetivo experimental. Para estudiar las diferencias individuales entre grupos de experimentación con comparaciones múltiples, se aplicó el análisis de varianzas ANOVA de un factor seguido de la prueba post hoc DMS o ANOVA de medidas repetidas seguido de la prueba T para muestras pareadas, según el caso. Las comparaciones simples (dos grupos de experimentación) se realizaron mediante la prueba no paramétrica aplicada a dos muestras independientes de *U de Mann-Whitney*. El software utilizado para el análisis fue SPSS para *Windows*. En todos los casos el nivel de confianza fue del 95% ( $p < 0,05$ ), y se identificó en la gráfica cuando fue diferente.



# 4

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**1 Juan 5:13** *“Les escribo estas cosas a ustedes que creen en el nombre del Hijo de Dios, para que sepan que tienen vida eterna.”*





## 4.1. Capítulo 1

### **La administración conjunta de eugenol y cinamaldehído en adipocitos maduros 3T3-L1 produce un efecto hipolipemiante que podría estar mediado por la inhibición en la expresión de genes lipogénicos**

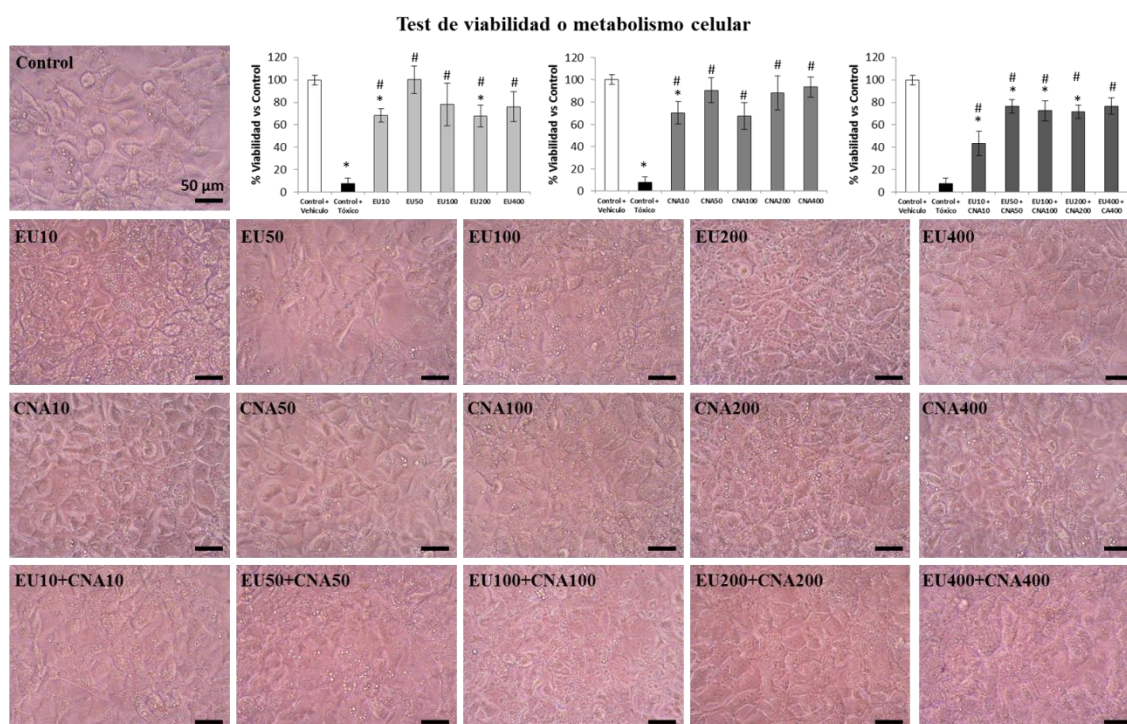
Se pretende analizar con este estudio el efecto del tratamiento con eugenol (EU), cinamaldehído (CNA) y su tratamiento combinado (EU+CNA) en células 3T3-L1 durante su diferenciación y en adipocitos maduros sobre la expresión de marcadores adipogénicos de genes implicados en el metabolismo lipídico. También, se ha analizado si el tratamiento ejerce algún efecto sobre la acumulación de triglicéridos durante la diferenciación de los preadipocitos y en adipocitos maduros. Para ello se cultivaron en placas de 24 pocillos las células 3T3-L1, que es una línea celular de fibroblastos embrionarios de ratón comprometida a diferenciarse en adipocitos. En el caso de adipocitos maduros se trataron durante 24 horas con diferentes concentraciones (10, 50, 100, 200, 400  $\mu$ M) de EU, CNA y EU+CNA. En el estudio de los efectos durante la diferenciación se recogieron células a diferentes tiempos (T0, T2, T4, T6 y T8) de células control o células tratadas con 10  $\mu$ M de EU, CNA y EU+CNA y a tiempo final (T8) células control y tratadas con 10, 50 y 100  $\mu$ M de EU, CNA y EU+CNA. En el caso del grupo control, se utilizó el mismo volumen de medio sin tratamiento. Se recogieron las células para la extracción de ARN. La expresión génica se evaluó por RT-PCR. En adipocitos maduros tratados durante 24 h, el tratamiento con EU (400  $\mu$ M) produce una disminución en los niveles ARNm de *Fasn* y *Lipe* y el tratamiento con CNA (400  $\mu$ M) disminuye los niveles del ARNm de *Fasn* y aumenta los niveles del ARNm de *Cpt1b* en comparación con el tratamiento control. Con el tratamiento EU+CNA se observa una inhibición dosis-respuesta en la expresión de los genes lipogénicos (*Srebf1*, *Pparg*, *Fasn*) y de *Lipe* y una inducción dosis-respuesta en la expresión de *Cpt1b*. El tratamiento EU+CNA, pero no los tratamientos individuales, resulta en un menor contenido lipídico respecto al grupo control. Además, el EU, CNA y su tratamiento combinado afectan la expresión de genes clave implicados en el metabolismo lipídico en adipocitos maduros, pero no afectan al proceso de diferenciación o adipogénesis. Por tanto, los resultados sugirieron un efecto antilipogénico de estos compuestos, sobretodo en el caso del tratamiento combinado.

#### 4.1.1. Resultados

##### *Efecto del tratamiento con eugenol (EU), cinamaldehído (CNA) y el tratamiento combinado (EU+CNA) en genes relacionados con el metabolismo lipídico en adipocitos maduros de la línea celular 3T3-L1.*

##### *Viabilidad celular*

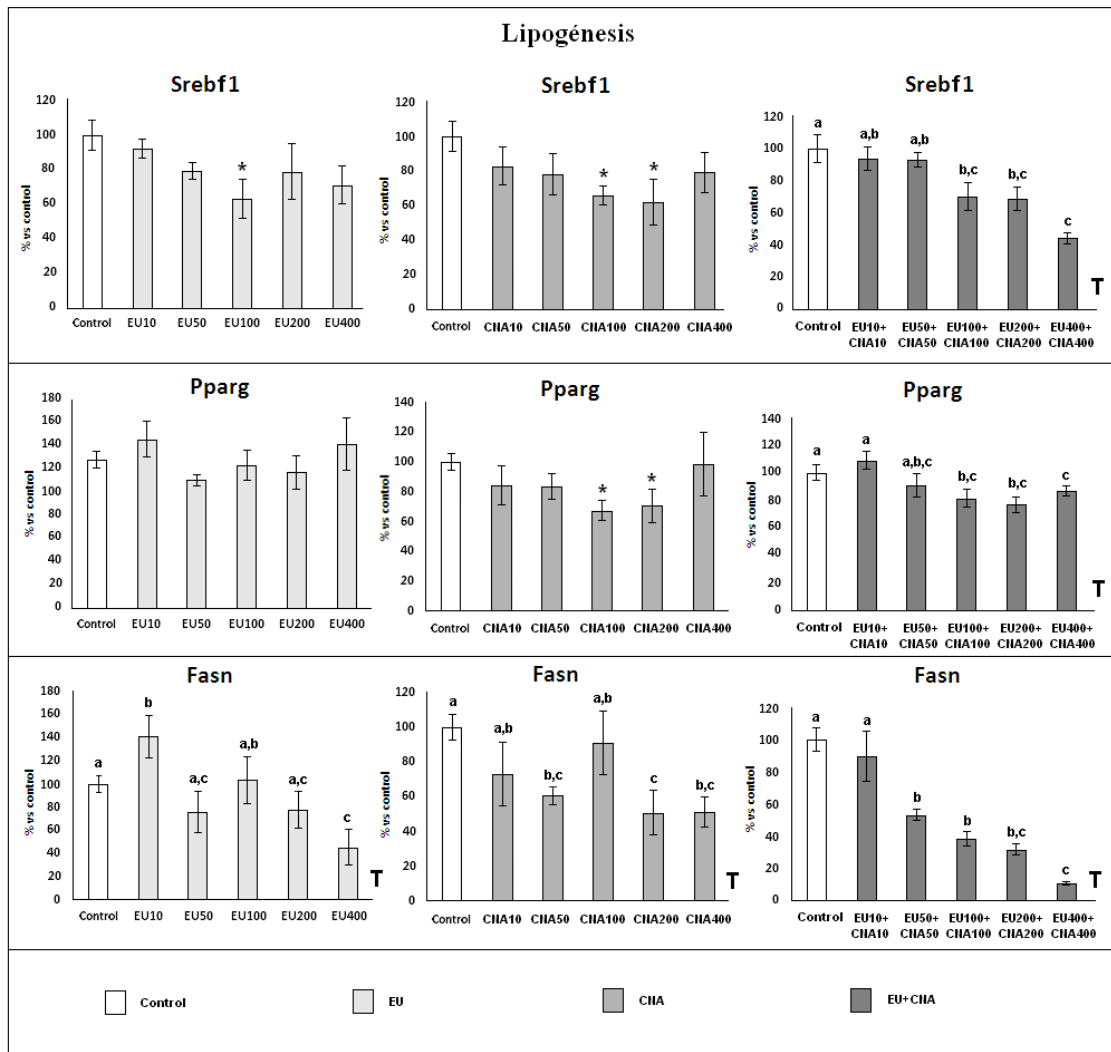
Adipocitos maduros de la línea celular 3T3-L1 fueron tratados durante 24 horas con diferentes concentraciones (10, 50, 100, 200, 400  $\mu\text{M}$ ) de EU, CNA y EU+CNA. En la Figura 4.1 se puede observar que estos tratamientos no comprometieron ni la morfología ni la supervivencia de las células, ya que el test de viabilidad realizado (*Reliablue<sup>TM</sup> Cell Viability Reagent*) reportó para los tratamientos unas lecturas comprendidas entre el control positivo y el control negativo. Ver apartado 3.1.3 para más detalles sobre *Reliablue<sup>TM</sup> Cell Viability Reagent*.



**Figura 4.1.** Resultados test viabilidad o metabolismo celular (*Reliablue<sup>TM</sup>*, ATCC) en adipocitos maduros 3T3-L1 tratados durante 24 h con 10, 50, 100, 200 y 400  $\mu\text{M}$  de eugenol (EU), cinamaldehído (CNA) y eugenol + cinamaldehído (EU+CNA). Las células control recibieron tratamiento con vehículo. Se usó Diaforasa/NAD<sup>+</sup>, un conocido citotóxico, como control de muerte celular. En las gráficas se representa la media en porcentaje  $\pm$  SEM (n=5) de la viabilidad o tasa metabólica en comparación con los valores del grupo de control. Estadística: \*  $p < 0,05$  versus control + vehículo, *U de Mann-Whitney*; #  $p < 0,05$  versus control + tóxico, *U de Mann-Whitney*. Se muestra para cada tratamiento una imagen representativa (fotografía original con una magnificación a 20X/400  $\mu\text{m}$ ; la línea negra dentro de cada fotografía representa 50  $\mu\text{m}$ ).

Expresión génica

La expresión de *Srebf1*, *Pparg* y *Fasn* se examinó para explorar el efecto del tratamiento de EU, CNA y EU+CNA sobre la lipogénesis (Figura 4.2).



**Figura 4.2.** Expresión de genes relacionados con la lipogénesis en adipocitos maduros 3T3-L1 tratados durante 24 h con 10, 50, 100, 200 y 400  $\mu$ M de eugenol (EU), cinamaldehído (CNA) y eugenol + cinamaldehído (EU+CNA). Las células control recibieron tratamiento con vehículo. Los datos son la media  $\pm$  SEM (n=6-9) en comparación con los valores del grupo de control (100%). Estadística: T,  $p < 0,05$ , efecto del tratamiento, ANOVA de un factor;  $a \neq b \neq c$ , DMS, prueba *post hoc*; \*  $p < 0,05$  versus control, *U de Mann-Whitney*.

Se observó claramente en los adipocitos maduros de la línea celular 3T3-L1 un efecto significativo dosis dependiente con los tratamientos de las combinaciones equimolares de EU+CNA en los niveles de expresión de *Srebf1*, *Pparg* y *Fasn* ( $p < 0,05$ , ANOVA de un factor). La expresión más baja se observa en respuesta al tratamiento con 400  $\mu$ M EU+CNA, aunque ya es evidente a 100  $\mu$ M, en el caso de *Srebf1* y *Pparg* y a 50  $\mu$ M para *Fasn*.

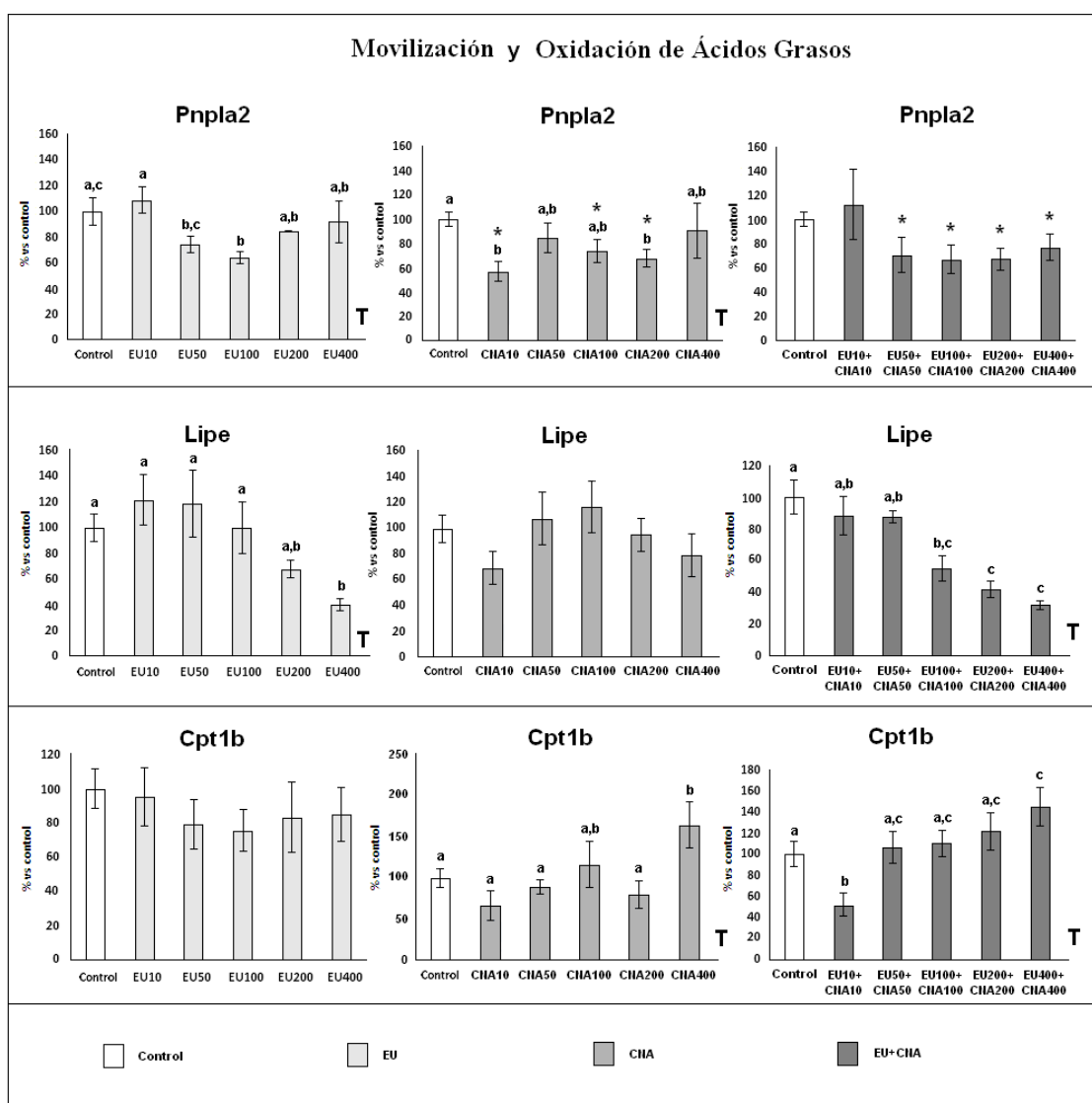
Al comparar las dosis individuales con el control, se encontraron niveles disminuidos del ARNm de *Srebf1* en células tratadas con 100  $\mu$ M de EU ( $p < 0,05$ , *U de Mann-Whitney*). Además, las células tratadas con CNA 100  $\mu$ M y CNA 200  $\mu$ M también presentaron niveles disminuidos de *Srebf1* y *Pparg* en comparación con las controles ( $p < 0,05$ , *U de Mann-Whitney*). Se observó un efecto dosis dependiente con los tratamientos con EU y CNA en los niveles de expresión del ARNm de *Fasn* ( $p < 0,05$ , ANOVA de un factor). En concreto, se encontraron niveles del ARNm de *Fasn* incrementados en células tratadas con EU 10  $\mu$ M en comparación con el control ( $p < 0,05$ , DMS, prueba *post hoc*). Este aumento se atenuó en las células tratadas con dosis más altas de EU, alcanzando niveles de expresión más bajos que en las controles, como en células tratadas con EU 400  $\mu$ M ( $p < 0,05$ , DMS, prueba *post hoc*). En el caso del tratamiento con CNA, se encontraron niveles disminuidos de ARNm de *Fasn* en células tratadas con CNA 50, 200 y 400  $\mu$ M respecto al células control ( $p < 0,05$ , DMS, prueba *post hoc*).

La expresión del ARNm de los genes relacionados con la movilización de los lípidos (*Pnpla2* y *Lipe*) y la oxidación de los ácidos grasos (*Cpt1b*) también se analizó (Figura 4.3).

Los niveles del ARNm de *Pnpla2*, que codifica para la proteína ATGL, y *Lipe* en adipocitos maduros fueron significativamente afectados por el tratamiento con EU de forma dosis dependientes ( $p < 0,05$ , ANOVA de un factor). Concretamente, las células tratadas con EU 50 o 100  $\mu$ M mostraron los menores niveles de expresión de *Pnpla2* ( $p < 0,05$ , DMS, prueba *post hoc*). Las células tratadas con EU a dosis de 200 y 400  $\mu$ M presentaron una disminución en la expresión de *Lipe* en comparación con las dosis más bajas de EU y el control ( $p < 0,05$ , DMS, prueba *post hoc*). La expresión de *Cpt1b* no fue alterada por el tratamiento con EU.

Con respecto al tratamiento con CNA, los niveles de ARNm de *Pnpla2* y *Cpt1b* en adipocitos maduros fueron significativamente afectados por el tratamiento de forma dosis dependiente ( $p < 0,05$ , ANOVA de un factor). La dosis más baja de CNA (10  $\mu$ M) produjo una disminución en la expresión del ARNm de *Pnpla2* y que se mantiene en niveles bajos con los tratamientos CNA 100 y 200  $\mu$ M ( $p < 0,05$ , *U de Mann-Whitney*). El tratamiento con CNA 400  $\mu$ M aumenta la expresión de *Cpt1b* a niveles más altos que los observados en todos los demás grupos ( $p < 0,05$ , DMS, prueba *post hoc*).

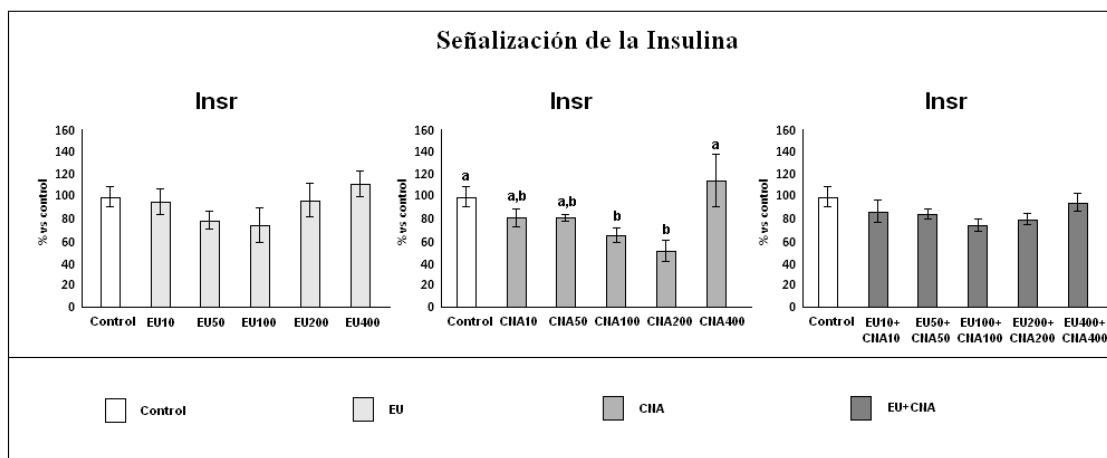
Las células tratadas con las combinaciones equimolares de EU y CNA (EU+CNA) presentaron una disminución significativa dependiente de la dosis en la expresión de *Lipe* y un aumento significativo dependiente de la dosis en la expresión de *Cpt1b* ( $p < 0,05$ , ANOVA de un factor). Al comparar frente al control se observó un efecto significativo de disminución en la expresión de *Pnpla2* en los tratamiento con dosis mayores de 50  $\mu$ M del tratamiento combinado ( $p < 0,05$ , *U de Mann-Whitney*).



**Figura 4.3.** Expresión de genes relacionados con la movilización y oxidación de ácidos grasos en adipocitos maduros 3T3-L1 tratados durante 24 h con 10, 50, 100, 200 y 400  $\mu$ M de eugenol (EU), cinamaldehído (CNA) y eugenol + cinamaldehído (EU+CNA). Las células control recibieron tratamiento con vehículo. Los datos son la media  $\pm$  SEM (n=6-9) en comparación con los valores del grupo de control (100%). Estadísticas: T,  $p < 0,05$ , efecto del tratamiento, ANOVA de un factor;  $a \neq b \neq c$ , DMS, prueba *post hoc*; \*  $p < 0,05$  versus control, *U de Mann-Whitney*.

También se ha medido la expresión del ARNm del gen del receptor de insulina (*Insr*). (Figura 4.4). Se observó una disminución dependiente de la dosis en la expresión de *Insr* en las células tratadas con CNA ( $p < 0,05$ , ANOVA de un factor). Los niveles del ARNm del *Insr* alcanzaron niveles estadísticamente significativos más bajos que el control con CNA 100 o 200  $\mu$ M. Sin embargo, en células tratadas con CNA 400  $\mu$ M los niveles del ARNm del *Insr* fueron mayores que con CNA 100 o 200  $\mu$ M y no diferentes al control ( $p < 0,05$ , DMS, prueba *post hoc*). La señalización de la insulina no se ve afectada ni con el tratamiento de EU, ni con el tratamiento combinado EU+CNA ya que no se observan cambios en los niveles del ARNm del *Insr* en comparación con el

control. Aunque curiosamente, se observó una respuesta gradual en forma de “U con el tratamiento con EU, CNA y EU+CNA sobre el nivel de expresión del ARNm del *Insr*.



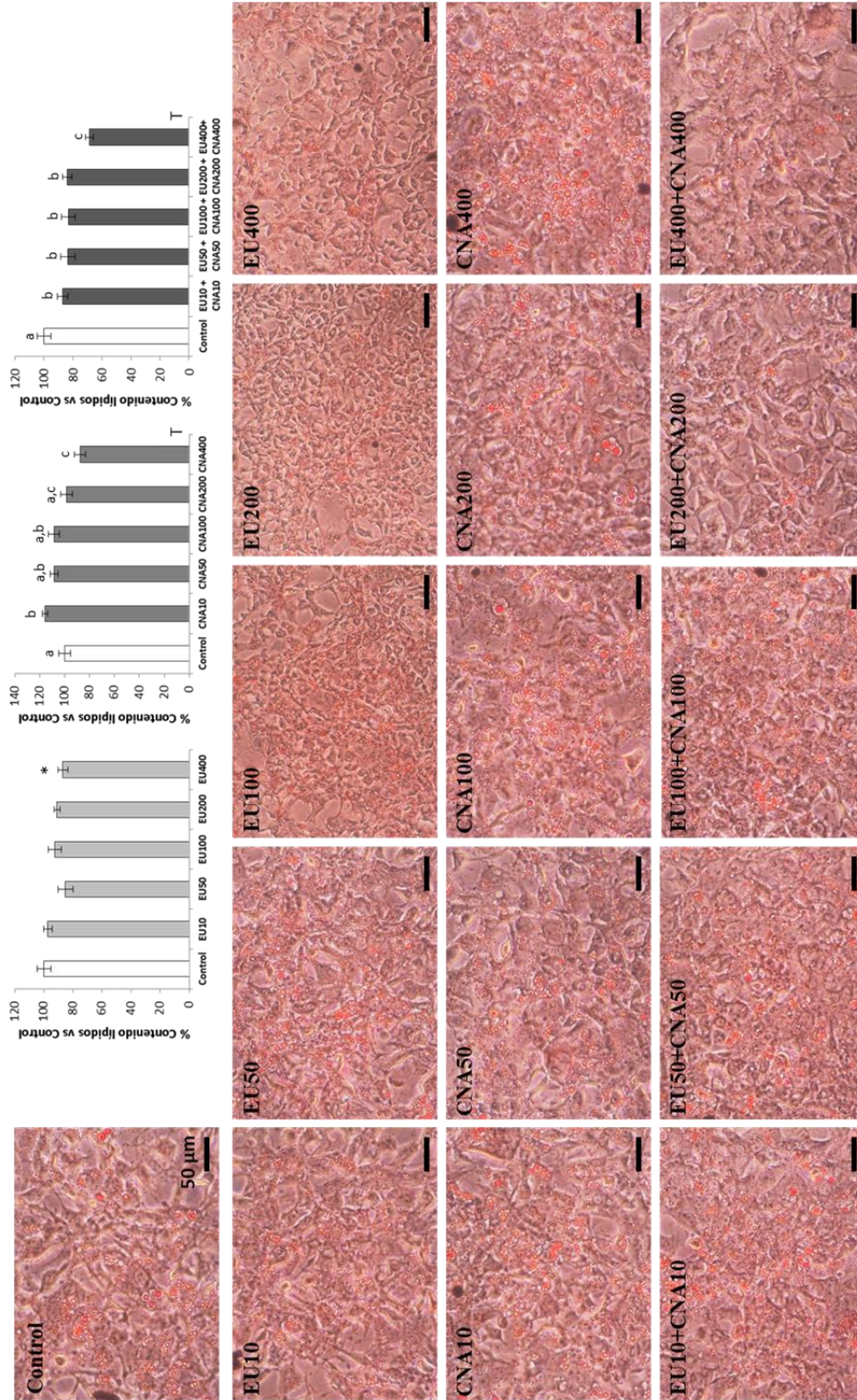
**Figura 4.4.** Expresión de genes relacionados con la señalización de la insulina en adipocitos maduros 3T3-L1 tratados durante 24 h con 10, 50, 100, 200 y 400  $\mu$ M de eugenol (EU), cinamaldehído (CNA) y eugenol + cinamaldehído (EU+CNA). Los datos son la media  $\pm$  SEM (n=6-9) en comparación con los valores del grupo de control (100%). Estadísticas:  $p < 0,05$ , ANOVA de un factor;  $a \neq b \neq c$ , DMS, prueba *post hoc*.

#### *Tinción Oil-Red para determinar el contenido lipídico*

Los resultados de la tinción con *Oil-Red* mostraron que cuando los adipocitos maduros son tratados con la dosis más alta de EU o CNA hay una disminución del contenido lipídico. Los resultados se presentan en la Figura 4.5. Esta disminución se observa tanto en las fotografías, con la desaparición de las gotas de lípidos del citoplasma, como con la cuantificación de la absorbancia a 500 nm, que permite inferir la cantidad de lípidos presentes. Cabe resaltar que el tratamiento combinado de EU+CNA produce una disminución del contenido lipídico, que se observa ya incluso con la menor dosis testada, sugiriendo un efecto hipolipídico de los dos compuestos.



Tinción Oil-Red

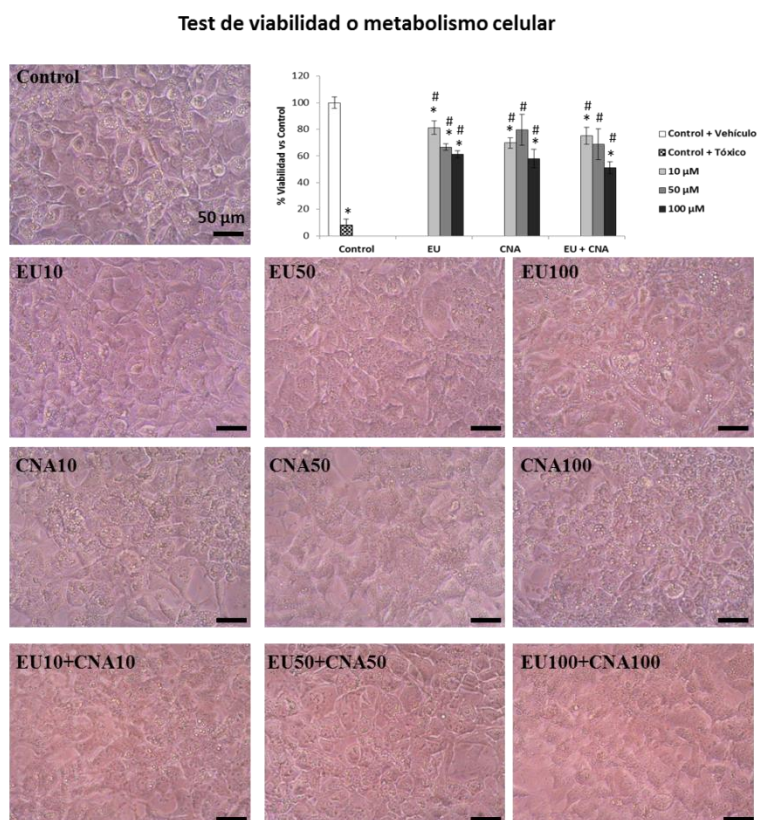


**Figura 4.5.** Resultados de la tinción *Oil-Red* en adipocitos maduros 3T3-L1 tratados durante 24h con 10, 50, 100, 200 y 400 μM de Eugenol (EU), Cinamaldehído (CNA) y Eugenol + Cinamaldehído (EU+CNA). Las células control recibieron tratamiento con vehículo. En las gráficas se representa la media en porcentaje ± SEM (n=5) del contenido lipídico en comparación con los valores del grupo de control. Estadística: T, p<0,05; efecto del tratamiento, ANOVA de 1 factor; a≠b≠c, DMS, prueba *post hoc*; \* p<0,05 *versus* control, *U de Mann-Whitney*. Se muestra para cada tratamiento una imagen representativa (fotografía original con una magnificación a 20X/400μm; la línea negra dentro de cada fotografía representa 50 μm).

**Efecto del tratamiento con eugenol (EU), cinamaldehído (CNA) y el tratamiento combinado (EU+CNA) en genes relacionados con el metabolismo lipídico durante la diferenciación en preadipocitos de la línea celular (3T3-L1).**

*Viabilidad celular*

Para estudiar el efecto durante la diferenciación de los adipocitos se trataron preadipocitos de la línea 3T3-L1 durante todo el proceso de diferenciación con la dosis de 10  $\mu\text{M}$  de EU, CNA y EU+CNA. Las células control recibieron tratamiento con vehículo. Se recogieron muestras en diferentes tiempos de la diferenciación (punto inicial (T0), y a los 2, 4, 6, 8 días de diferenciación (T2, T4, T6 y T8 respectivamente). Además, se trataron preadipocitos de la línea 3T3-L1 durante todo el proceso de diferenciación con diferentes dosis de EU, CNA y EU+CNA. Las dosis estudiadas fueron: 10, 50 y 100  $\mu\text{M}$ . Las células control recibieron tratamiento con vehículo. En este caso, aunque el tratamiento se realizó durante toda la diferenciación se recogieron muestras solo a tiempo final (T8). En la Figura 4.6 podemos observar que estos tratamientos no afectan ni la viabilidad ni producen efectos citotóxicos, como se puede observar en las fotografías obtenidas a tiempo final del tratamiento. Además, las lecturas del test viabilidad realizado (*Reliablue<sup>TM</sup> Cell Viability Reagent*) están comprendidas entre el control positivo y el control negativo (que indica efecto citotóxico).



**Figura 4.6.** Resultados del test viabilidad o metabolismo celular (*Reliablue<sup>TM</sup>*, ATCC) en adipocitos maduros 3T3-L1 tratados durante toda la diferenciación 10, 50, 100  $\mu\text{M}$  de eugenol (EU), cinamaldehído (CNA) y eugenol+cinamaldehído (EU+CNA). Las células control recibieron tratamiento con vehículo. Se usó Diaforasa/NAD+, un conocido citotóxico, como



control de muerte celular. En las gráficas se representa la media en porcentaje  $\pm$  SEM (n=4) de la viabilidad o tasa metabólica en comparación con los valores del grupo de control. Estadística: \*  $p < 0,05$  versus control + vehículo, *U de Mann-Whitney*; #  $p < 0,05$  versus control + tóxico, *U de Mann-Whitney*. Se muestra para cada tratamiento una imagen representativa (fotografía original con una magnificación a 20X/400  $\mu\text{m}$ ; la línea negra dentro de cada fotografía representa 50  $\mu\text{m}$ ).

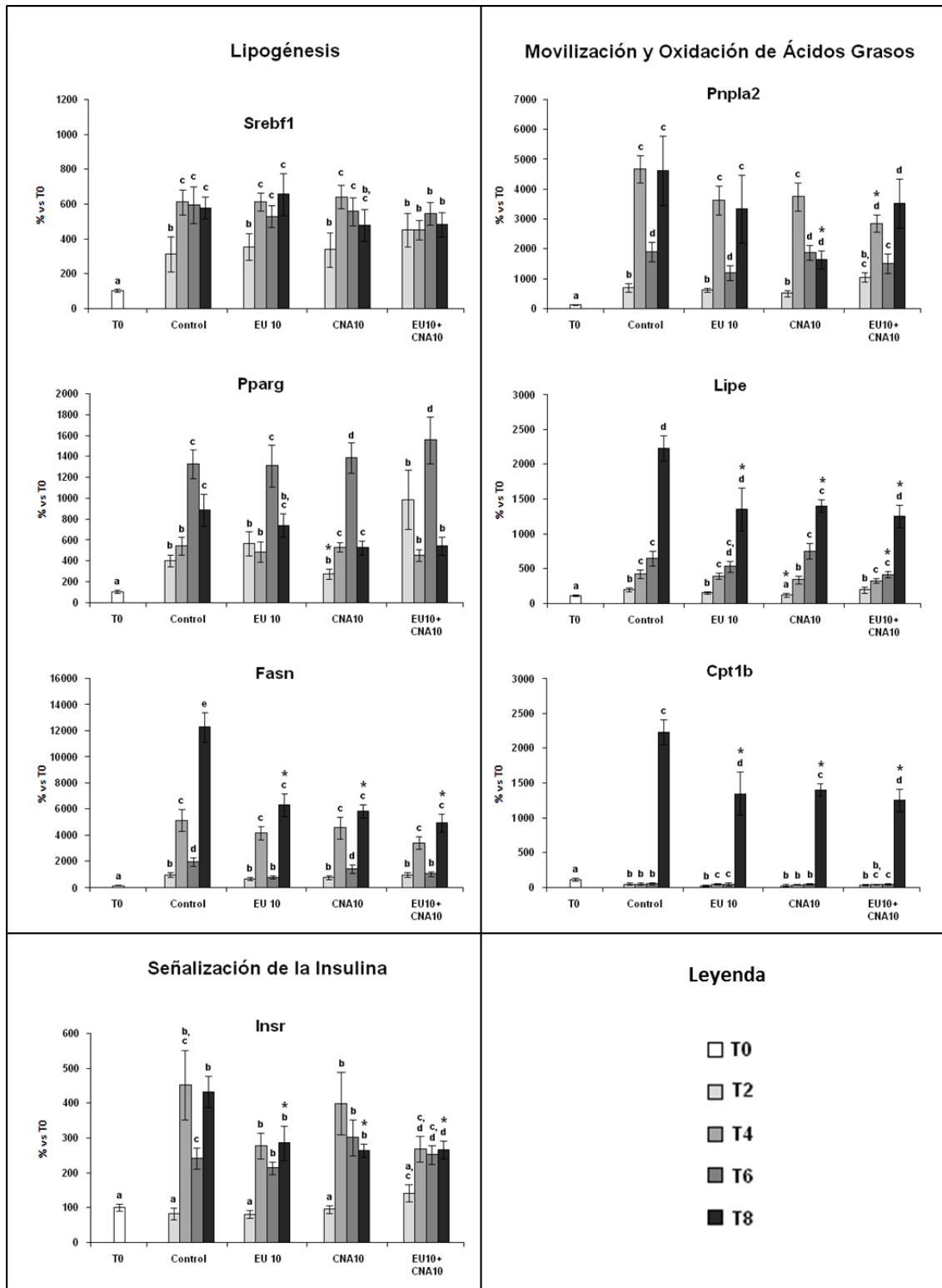
### *Expresión génica*

Se analizó la expresión génica de genes claves implicados en el metabolismo lipídico para determinar el efecto del tratamiento de EU, CNA y EU+CNA 10  $\mu\text{M}$  durante toda la diferenciación. Los resultados se presentan en la figura 4.7. Para ello se recogieron células en distintos tiempos durante la diferenciación (punto inicial (T0), y a los 2, 4, 6, 8 días de diferenciación (T2, T4, T6 y T8 respectivamente).

Como era de esperar, los niveles de expresión de genes lipogénicos (*Srebf1*, *Pparg* y *Fasn*) aumentan progresivamente a lo largo de la diferenciación en las células control ( $p < 0,05$ , ANOVA de un factor). Este aumento se observó ya desde el día 2 de diferenciación en el caso de *Srebf1*, *Pparg* y *Fasn*. Con los diferentes tratamiento (10  $\mu\text{M}$  EU, 10  $\mu\text{M}$  CNA y 10  $\mu\text{M}$  EU+CNA) durante la diferenciación se observó también un aumento progresivo en la expresión de *Srebf1*, *Pparg* y *Fasn* ( $p < 0,05$ , ANOVA de un factor).

Los niveles de expresión de *Pnpla2* y *Lipe* aumentan progresivamente conforme progresa la diferenciación de preadipocito a adipocito. Este aumento se observó tanto en las células tratadas con el vehículo y en el resto de tratamientos ( $p < 0,05$ , ANOVA de un factor). Curiosamente, los niveles de expresión del ARNm de la *Cpt1b* se mantienen a niveles basales hasta el final de la diferenciación, cuando se produce un gran incremento en los niveles de su mensajero ( $p < 0,05$ , ANOVA de un factor). Esto ocurre tanto en las células tratadas con el vehículo como en las células tratadas con los diferentes tratamientos.

Además, tanto en las células tratadas con el vehículo como en células tratadas con los diferentes tratamientos (10  $\mu\text{M}$  EU, 10  $\mu\text{M}$  CNA y 10  $\mu\text{M}$  EU+CNA), los niveles de expresión del *Insr* aumentan rápidamente del 2 al 4 día de diferenciación, manteniéndose altos el resto del periodo estudiado ( $p < 0,05$ , ANOVA de un factor).



**Figura 4.7.** Expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico en distintos tiempos durante la diferenciación de adipocitos 3T3-L1 (punto inicial (T0), y a los 2, 4, 6, 8 días de diferenciación (T2, T4, T6 y T8 respectivamente). Las células fueron tratadas durante toda la diferenciación (desde T0) con 10,  $\mu$ M de eugenol (EU), cinamaldehído (CNA) y eugenol+cinamaldehído (EU+CNA). Los datos son la media  $\pm$  SEM (n=6) en comparación con los valores del grupo de control a T0 (100%). Estadísticas: Para cada

tratamiento cuando existe un efecto diferenciación:  $a \neq b \neq c$ , DMS, prueba *post hoc*; \*  $p < 0,05$  versus control, *U de Mann-Whitney*.

Además, tratamos durante toda la diferenciación preadipocitos de la línea celular 3T3-L1 con 10, 50 y 100  $\mu\text{M}$  de EU, CNA y EU+CNA y analizamos la expresión génica, en este caso sólo al final de la diferenciación (adipocitos maduros (T8)). Los resultados se muestran en la Figura 4.8.

El tratamiento con la dosis más baja de EU (10  $\mu\text{M}$ ) no afectó a los niveles de expresión de *Srebf1* y *Pparg* comparado con el grupo control. Sin embargo con las dosis más altas (50 y 100  $\mu\text{M}$ ) produjeron una disminución en los niveles de *Srebf1* y *Pparg*. Con todas las dosis testadas, se encontró una disminución en la expresión del ARNm de *Fasn* a finales de la diferenciación (T8) ( $p < 0,05$ , *U de Mann-Whitney*). Si bien el efecto inhibitorio fue más fuerte en las concentración más altas de tratamiento. Esto indica que el tratamiento de EU podría tener un papel clave en la homeostasis lipídica disminuyendo la expresión de un enzima clave implicado en la síntesis de triglicéridos.

No se observaron diferencias respecto a las controles en la expresión del ARNm de *Srebf1* con el tratamiento CNA 10  $\mu\text{M}$ . Pero el tratamiento con CNA 10  $\mu\text{M}$  durante la diferenciación, inhibe la expresión de *Pparg* y *Fasn* a final de la diferenciación (T8) ( $p < 0,05$ , *U de Mann-Whitney*) respecto al grupo control. Los tratamientos con mayor concentración de CNA (50 y 100  $\mu\text{M}$ ) producen una inhibición en la expresión de los tres ARNm (*Srebf1*, *Pparg* y *Fasn*) con respecto a las células control ( $p < 0,05$ , *U de Mann-Whitney*).

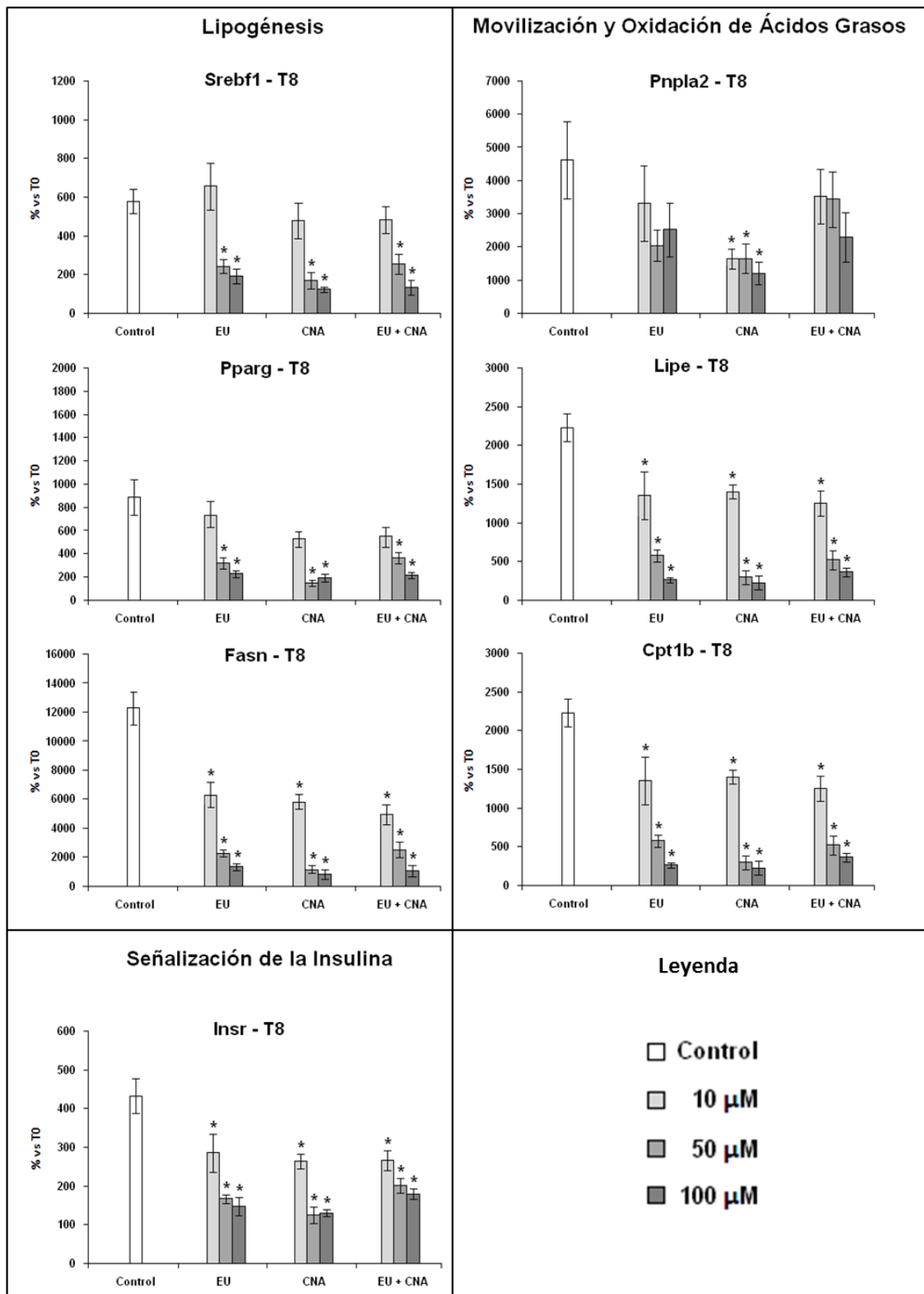
El tratamiento combinado EU+CNA 10  $\mu\text{M}$  no afecta la expresión de *Srebf1* y *Pparg* comparado con el grupo control, pero sí que se observa una menor expresión de estos genes con el tratamiento CNA 50 y 100  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ , *U de Mann-Whitney*). La dosis de 10  $\mu\text{M}$  de EU+CNA inhibe la expresión de *Fasn* al final de la diferenciación (T8) respecto a las controles ( $p < 0,05$ , *U de Mann-Whitney*). Esta disminución en la expresión del ARNm de *Fasn* también se observó en las células tratadas con CNA 50 y 100  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ , *U de Mann-Whitney*).

Con el tratamiento EU 10  $\mu\text{M}$  se encontraron niveles disminuidos del ARNm de *Cpt1b* y *Lipe* con respecto al tratamiento control al final de la diferenciación (T8) ( $p < 0,05$ , *U de Mann-Whitney*). Además, este efecto inhibitorio fue más fuerte en las concentraciones más altas de tratamiento. Sin embargo, no hubo cambios en los niveles de expresión de *Pnpla2* en ninguno de los tratamientos estudiados (EU 10, 50 y 100  $\mu\text{M}$ ).

Al final de la diferenciación (T8) las células tratadas con CNA 10, 50 y 100  $\mu\text{M}$ , presentaron menores niveles del ARNm *Pnpla2*, *Lipe* y *Cpt1b* respecto a las células control ( $p < 0,05$ , *U de Mann-Whitney*).

Las células tratadas con el tratamiento combinado EU+CNA presentaron un perfil de expresión de los genes implicados en la movilización de triglicéridos y oxidación de ácidos grasos, similar al del tratamiento individual de EU. Las dosis de 10, 50 y 100  $\mu\text{M}$  de EU+CNA disminuyen la expresión de *Lipe* y *Cpt1b* al final de la diferenciación (T8)

con respecto a las células control ( $p < 0,05$ , *U de Mann-Whitney*). No se observaron cambios en los niveles de expresión de *Pnpla2* en comparación con las células control con ninguna de las dosis estudiadas.



**Figura 4.8.** Expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico al final de la diferenciación en adipocitos tratados durante toda la diferenciación con 10, 50 y 100 μM de eugenol (EU), cinamaldehído (CNA) y el tratamiento combinado (EU+CNA). Los datos son la

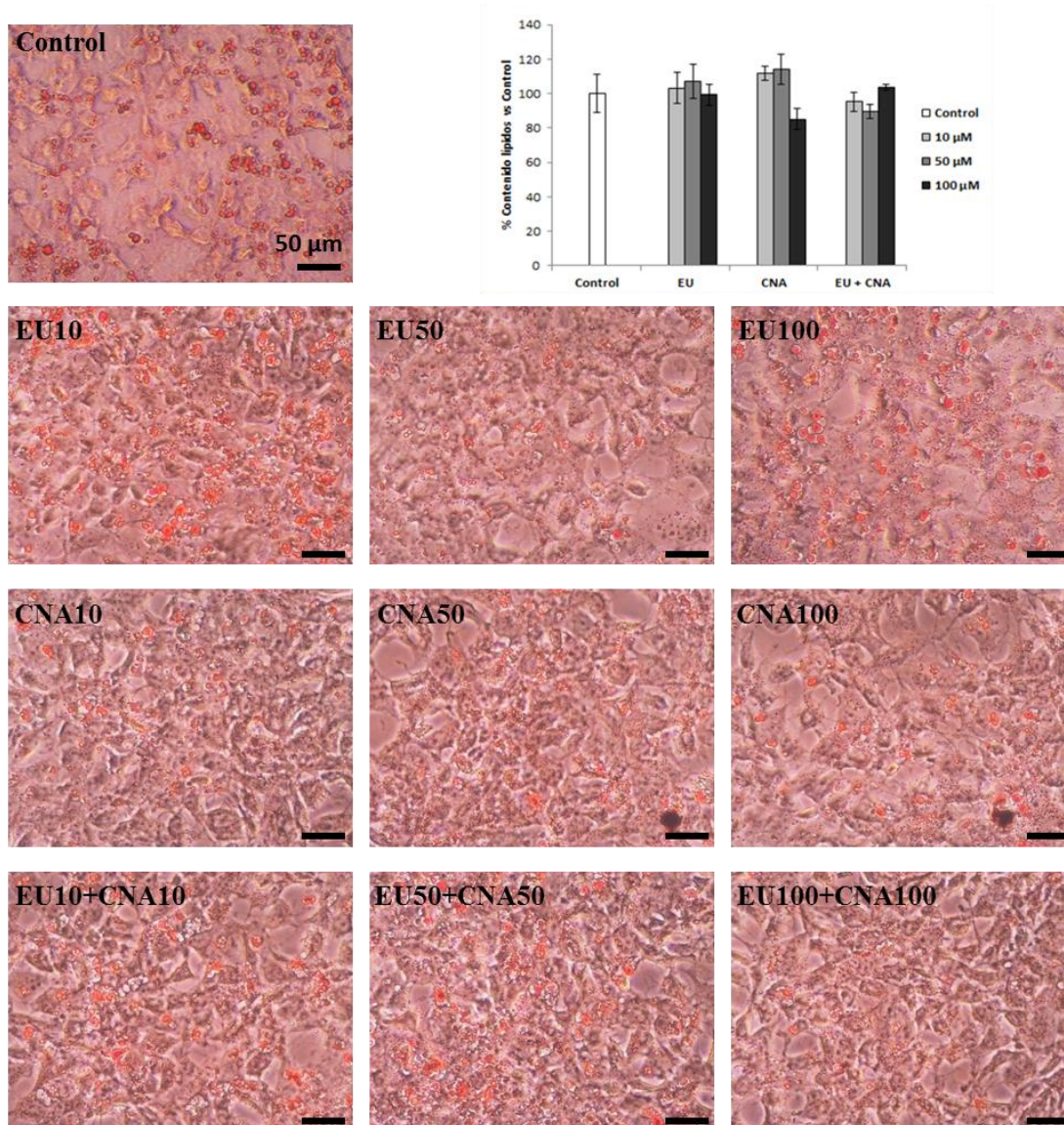
media  $\pm$  SEM (n=6) en comparación con los valores del grupo de control a T0 (100%). Estadísticas: \*  $p < 0,05$  versus control, *U de Mann-Whitney*.

Al final de la diferenciación (T8), en comparación con el grupo control, las células tratadas con EU, CNA y el tratamiento combinado EU+CNA 10, 50 y 100  $\mu\text{M}$  presentaron una disminución en los niveles de expresión del receptor de insulina.

#### *Tinción Oil-Red para determinar el contenido lipídico*

No se observaron diferencias en el contenido lipídico respecto al grupo control en el caso de los tratamientos individuales EU o CNA 10 y 50  $\mu\text{M}$ . Sin embargo, con los tratamientos combinados EU+CNA 10 y 50  $\mu\text{M}$  se observa una disminución en el contenido lipídico con respecto al control, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Los resultados se presentan en la Figura 4.9.

#### **Tinción Oil-Red**



**Figura 4.9.** Resultados de la tinción *Oil-Red* en adipocitos maduros 3T3-L1 tratados durante toda la diferenciación con 10, 50, 100  $\mu\text{M}$  de eugenol (EU), cinamaldehído (CNA) y eugenol +

cinamaldehído (EU+CNA). Las células control recibieron tratamiento con vehículo. En la gráfica se representa la media en porcentaje  $\pm$  SEM (n=4) del contenido lipídico en comparación con los valores del grupo de control. Se muestra para cada tratamiento una imagen representativa (fotografía original con una magnificación a 20X/400  $\mu$ m; la línea negra dentro de cada fotografía representa 50  $\mu$ m).

#### 4.1.2. Discusión

Este estudio tenía como objetivo examinar la influencia del tratamiento de los compuestos bioactivos EU, CNA y su combinación (EU+CNA) sobre la expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico, como ayuda en las estrategias para el control de la obesidad. Para ello se realizó un estudio *in vitro* usando adipocitos de la línea celular 3T3-L1 maduros y durante su diferenciación.

Los compuestos bioactivos EU y CNA están presentes en plantas aromáticas como el clavo de olor y la canela respectivamente [278, 280]. Estos compuestos se engloban junto a otros compuestos que se conocen como un grupo de sustancias naturales usadas por la industria alimentaria como especias con actividad antibacteriana [282, 283]. Además han recibido un gran interés en los últimos años debido a que se ha informado que pueden tener efectos sobre diversas condiciones de salud ya que poseen propiedades anticancerígenas, antimicrobiana, antioxidantes y antidiabéticas [220, 237, 240, 269, 284, 285]. Estudios *in vitro*, reportan de manera individual que el EU y CNA son de baja toxicidad y eficaces en la prevención de la adipogénesis [286].

En este estudio se puede observar que los compuestos bioactivos EU y CNA afectan la expresión de genes implicados en el metabolismo lipídico en adipocitos maduros de la línea celular 3T3-L1. Así, el tratamiento con EU (400  $\mu$ M) resulta en una disminución en la expresión del ARNm de *Fasn* y *Lipe* y el tratamiento con CNA (400  $\mu$ M) disminuye la expresión de *Fasn* y aumenta la expresión de *Cpt1b* en comparación con el tratamiento de control. En adipocitos maduros, el tratamiento combinado de EU y CNA presenta un efecto sinérgico en estos efectos ya que con el tratamiento EU+CNA se observa una inhibición dosis-respuesta en la expresión de los genes lipogénicos (*Srebf1*, *Pparg*, *Fasn*) y de *Lipe* y una inducción dosis-respuesta en la expresión de *Cpt1b*. Además, los resultados obtenidos en este estudio parecen indicar que los compuestos bioactivos EU, CNA y su tratamiento combinado afectan la expresión de genes clave implicados en el metabolismo lipídico en adipocitos maduros, pero no afectan al proceso de diferenciación o adipogénesis.

La expresión de *Pparg* en 3T3-L1 aumenta durante la diferenciación, produciéndose un gran aumento a finales de la diferenciación (especialmente en T6 y T8), relacionado con su función en el control de la proliferación y diferenciación celular para favorecer el anabolismo de lípidos. El gen *Pparg* se expresa principalmente en tejido adiposo donde estimula la adipogénesis y la lipogénesis. PPARG induce la captación de ácidos grasos, la diferenciación de pre-adipocitos a adipocitos maduros y activa la expresión de genes involucrados en lipogénesis y almacenamiento de triglicéridos [287–289]. *Pparg* se ha identificado como uno de los factores clave que inducen y controlan la diferenciación completa de los preadipocitos a los adipocitos maduros [290]. El SREBP1c es un

mediador transcripcional importante de los efectos de la insulina y, en particular, tiene efectos sobre el mantenimiento del estado de la sensibilidad a la insulina que caracteriza a los adipocitos maduros [291]. En adipocitos maduros observamos que por sí solos el tratamiento de EU y CNA no afectan la expresión de *Pparg* ni de *Srebf1*. Sin embargo el tratamiento combinado muestra un efecto sinérgico en la inhibición de la expresión tanto de *Pparg* como de *Srebf1*. Paralelamente a la disminución en la expresión de estos dos factores de transcripción relacionados con la adipogénesis y la lipogénesis, nuestros resultados muestran que el tratamiento individual de EU y CNA reduce significativamente la expresión de *Fasn*, y además el tratamiento combinado de EU+CNA muestra un efecto sinérgico al inhibir de manera importante la expresión de *Fasn* tras 24 h de tratamiento. FASN desempeña un papel central en la lipogénesis de novo en mamíferos y aves, está implicada en la síntesis de ácidos grasos. *In vitro* se ha descrito que *Fasn* se expresa tanto en preadipocitos como en adipocitos maduros de la línea celular 3T3-L1 [292, 293]. Cabe destacar, que si el tratamiento se realiza durante el proceso de diferenciación, la expresión de estos genes lipogénicos se ve disminuida en tanto en los tratamientos individuales como en el tratamiento combinado, pero solo al final de la diferenciación (T8). Estos resultados sugieren que tanto el EU como el CNA ejercerían sus efectos antilipogénicos en adipocitos ya maduros, o en estadios finales de maduración. Interesantemente, un estudio demostró que el extracto de las ramas de canela (*Cinnamomum Ramulus*) reduce la expresión de *Pparg*, *Srebf1* y *Fasn*, entre otros, en adipocitos 3T3-L1, a través de la activación de la señalización de insulina vía AMPK/PI3K y IRS-1 [294]. Las células 3T3-L1 aumentan su capacidad de unión a la insulina durante la diferenciación por el aumento en la síntesis de receptores de insulina [295]. Aunque en nuestro estudio no hemos estudiado directamente la vía de señalización de la insulina, hemos analizado los niveles de expresión del receptor de la insulina. Nuestros datos muestran que el tratamiento con dosis mayores a 50  $\mu\text{M}$  y menores de 400  $\mu\text{M}$  de CNA disminuye la expresión del *Insr* en adipocitos maduros. Durante la diferenciación con los tres tratamientos EU, CNA y EU+CNA disminuyen la expresión de *Insr* en el T8 al final de la diferenciación.

El CNA inhibe la expresión de *Pnpla2* (que codifica para proteína ATGL, con actividad triglicérido lipasa) en adipocitos maduros, tanto en el tratamiento durante 24 h como en el tratamiento durante la diferenciación. Cabe destacar que estos efectos no se observan en el tratamiento con EU, por lo que la disminución en los niveles del ARNm de *Pnpla2* observado en el tratamiento combinado es probablemente debida al efecto individual del CNA. Por tanto, el tratamiento con CNA parece atenuar la movilización de triglicéridos, debido a la inhibición de la transcripción de *Pnpla2*, que codifica para el primer enzima clave en la hidrólisis de los triglicéridos. Curiosamente, en células 3T3-L1 incubadas con medios de cultivo libre de insulina se ha descrito un aumento dependiente del tiempo en la expresión de *Pnpla2*; por el contrario la incubación en un medio suplementado con insulina previno este aumento y promueve la disminución en la expresión de *Pnpla2* [296]. En nuestro diseño experimental las células son tratadas con medio de cultivo que no es libre de suero y contiene insulina (5  $\mu\text{g/ml}$ ). Por lo que este efecto inhibitorio en la expresión de *Pnpla2* puede estar acentuado por la insulina



presente en el medio. La capacidad lipolítica de los adipocitos disminuye cuando hay obesidad. Esta capacidad lipolítica mediada por la movilización de las reservas de triglicéridos es coordinada por la ATGL y la HSL (codificada por el gen *Lipe*). La expresión de *Lipe* disminuye significativamente en los adipocitos de sujetos obesos [297]. Nuestros resultados muestran que los tratamientos con EU y CNA producen una disminución en la expresión de *Lipe* al final de la diferenciación como consecuencia del tratamiento durante toda la diferenciación. Curiosamente, cuando se tratan adipocitos maduros durante 24 h con EU y CNA se produce una inhibición en la expresión de *Lipe* solo a altas concentraciones. Sin embargo, la expresión de este gen disminuye con tratamiento combinado EU+CNA durante 24 h en adipocitos maduros a dosis más bajas. Por tanto, *in vitro* parece que existe una inhibición en la movilización de los triglicéridos almacenados, que estaría en contra del efecto antilipogénico que tienen estos compuestos. Tentativamente, podríamos pensar que se trata de un mecanismo compensatorio, al haber menos lipogénesis y acumulación de lípidos por el tratamiento, habría una disminución de la necesidad de movilizar lípidos, o las reservas existentes se agotarían antes, por lo que se inhibiría la expresión de estos genes, al no haber más reservas que movilizar. Los resultados de la tinción *Oil-Red*, apoyarían esta hipótesis.

El paso inicial en la regulación de la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos está mediado por la enzima CPT1 [298]. Los niveles de CPT1b permanecen basales durante la diferenciación celular. Pero al final de la diferenciación se produce un aumento en la expresión de *Cpt1b*. Esto ocurre tanto en las células tratadas con el vehículo como en las células tratadas con EU, CNA y EU+CNA 10  $\mu$ M. El tratamiento durante 24 h de EU no afecta la expresión de *Cpt1b* en adipocitos maduros, pero el CNA a dosis de 400  $\mu$ M y el tratamiento combinado de EU+CNA aumenta su expresión. No se conoce el mecanismo por el que se produce este efecto diferencial entre el EU y el CNA en la regulación de la expresión de *Cpt1b*. El aumento que se observa en el tratamiento combinado, se debe probablemente al efecto del CNA *per se*. Por tanto, ni el CNA ni el EU parece tener un efecto claro en la activación de la oxidación de ácidos grasos cuando se administra en adipocitos maduros. Además, si el tratamiento se realiza durante toda la diferenciación, tanto el EU como el CNA, como el tratamiento combinado, producen al final del periodo de diferenciación una inhibición en la expresión de *Cpt1b*.

#### 4.1.3. Conclusiones

El tratamiento con los compuestos bioactivos EU, CNA y EU+CNA en adipocitos maduros 3T3-L1 o durante su diferenciación actúan como un potente inhibidor dosis-dependiente en la expresión de los genes lipogénicos (*Srebf1*, *Pparg* y *Fasn*), sugiriendo un efecto antilipogénico de estos compuestos. Este efecto en la inhibición de genes clave implicados en la lipogénesis se produce en adipocitos maduros, pero no afectan al proceso de diferenciación o adipogénesis. El uso combinado de estos compuestos surge como una estrategia potencial de su efecto sinérgico en el control de la adiposidad.



## 4.2. Capítulo 2

**La administración de eugenol (EU), cinamaldehído (CNA) y el tratamiento combinado (EU+CNA) disminuye la ganancia de peso corporal en ratas alimentadas con una dieta obesogénica.**

En este estudio se pretendió analizar en ratas el efecto del tratamiento con EU, CNA y EU+CNA frente a la exposición de una dieta obesogénica en el control del balance energético. Para ello ratas albinas *Wistar* machos de 4 meses de edad fueron distribuidas en los siguientes grupos: CONTROL, alimentado con una dieta estándar; WD (*western diet*), alimentado con dieta obesogénica (rica en grasas y azúcares simples); WD+EU, alimentado con una dieta WD+40mg/kg/día de eugenol; WD+CNA, alimentado con una dieta WD + 250mg/kg/día de cinamaldehído; y WD+EU+CNA, alimentado con una dieta WD+40 y +250mg/kg/día de eugenol y cinamaldehído, respectivamente. Las dosis de tratamiento se ajusto tomando como base los experimentos en la bibliografía consultada previamente. Los tratamientos se administraron diariamente durante 30 días. A mitad del tratamiento (día 15) se extrajo una muestra de sangre en condiciones de ayuno. Al final del tratamiento (día 30) los animales de los diferentes grupos fueron sacrificados en condiciones de alimentación *ad libitum*. Se recogieron muestras de sangre y de tejidos que fueron guardados hasta su posterior análisis.

Tras el tratamiento, los animales del grupo WD+CNA y WD+EU+CNA presentaron una menor ingesta calórica, menor incremento de peso y porcentaje de grasa corporal comparado con el grupo WD. Los animales del grupo WD+EU, pese a tener una ingesta calórica similar al grupo WD, presentaron un menor peso corporal al final del tratamiento comparado con el grupo WD. Los animales que recibieron EU, CNA o su tratamiento combinado, presentaron en ayuno mayores niveles de ghrelina circulante. Además, los animales del grupo WD+CNA presentaron un menor tamaño de los adipocitos, medidos en el tejido adiposo blanco (TAB) retroperitoneal y menores niveles circulantes de insulina en condiciones de alimentación *ad libitum* y mayores niveles del ARNm del *InsR* en el TAB retroperitoneal, comparado con el grupo WD. Los animales del grupo WD+EU presentaron un incremento en los niveles de expresión hipotalámica del ARNm de *Lepr* comparado con el grupo WD. Finalmente, los animales alimentados con WD y que recibieron el tratamiento combinado EU+CNA presentan un aumento en la expresión hepática del ARNm de *Cd36*, *InsR* e *Irs1*.

Como conclusión, la administración EU, CNA, solos o en combinación previenen del aumento de peso y porcentaje de grasa corporal frente a una dieta obesogénica. Por tanto, ambos compuestos emergen como posibles bioactivos potenciales como terapia en el control de la obesidad y alteraciones asociadas. Si bien, los mecanismos moleculares no están totalmente esclarecidos.

#### 4.2.1. Resultados

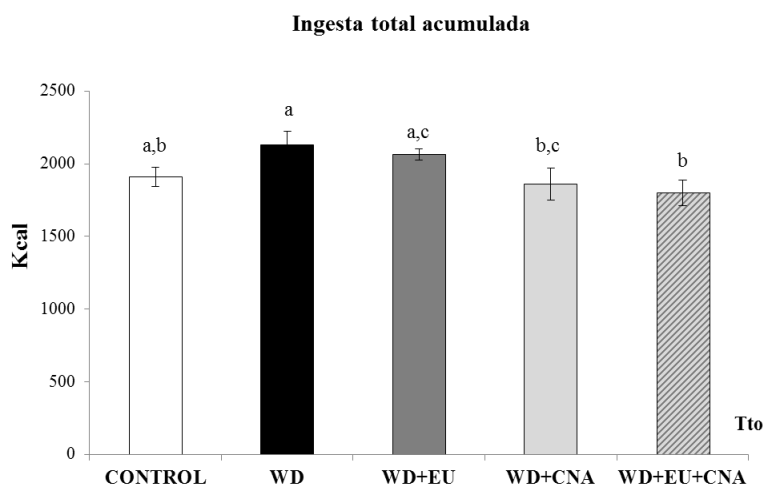
##### *Ingesta y parámetros biométricos*

El objetivo de este estudio ha sido examinar el efecto del tratamiento de dos compuestos bioactivos, el eugenol (EU) y el cinamaldehído (CNA) y su combinación (EU+CNA) en el control de la obesidad frente a una dieta obesogénica en ratas.

Para ello se realizó un estudio *in vivo* usando un modelo animal de dieta obesogénica. Las dietas obesogénicas están asociados con el aumento de peso corporal, aumento en los depósitos de grasa y el desarrollo de una marcada resistencia a la insulina [299], y resultan interesantes por su similitud con la obesidad dietética en humanos. En este estudio se han utilizado ratas albinas *Wistar* machos de 4 meses de edad mantenidas en condiciones de alimentación *ad libitum* y distribuidas en los siguientes grupos:

- CONTROL, alimentado con una dieta estándar; recibieron PBS como tratamiento vehículo.
- WD (*western diet*), alimentado con dieta obesogénica (rica en grasas y azúcares simples); recibieron PBS como tratamiento vehículo.
- WD+EU, alimentado con una WD+40mg/kg/día de eugenol.
- WD+CNA, alimentado con una dieta WD+250mg/kg/día de cinamaldehído.
- WD+EU+CNA, alimentado con una dieta WD+40 y +250mg/kg/día de eugenol y cinamaldehído, respectivamente.

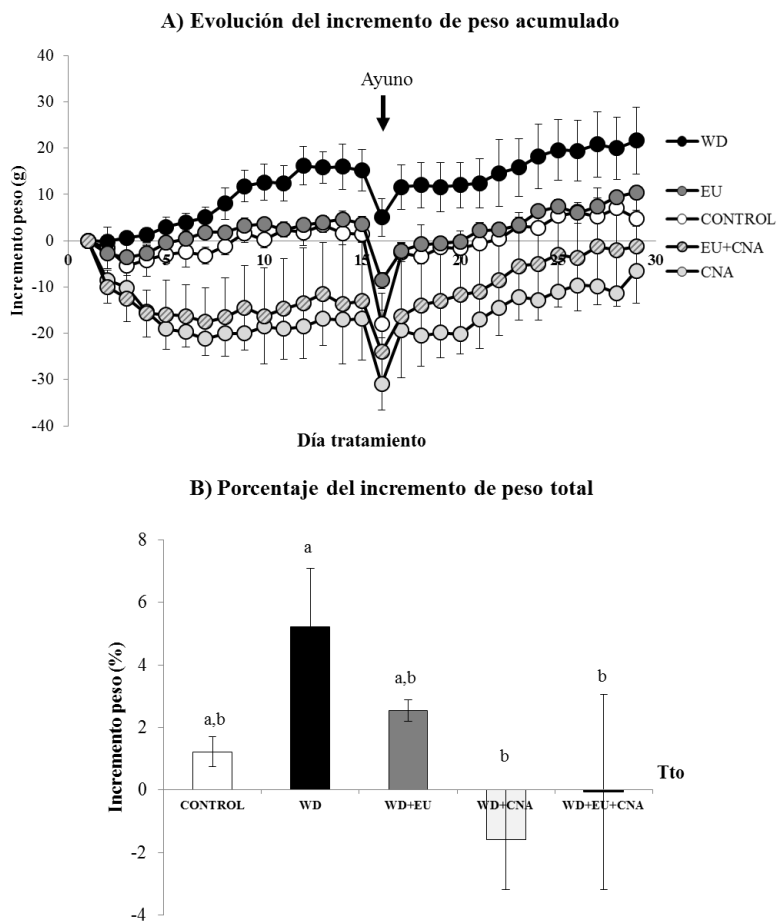
El tratamiento se realizó durante 30 días. Se midió la cantidad exacta del alimento consumido en condiciones de alimentación *ad libitum* durante todo el experimento (Figura 4.10). Los animales del grupo WD consumieron un total de 222 Kcal más que los animales CONTROL. Se observó que los animales alimentados con dieta WD y que recibieron los tratamientos de CNA y EU+CNA presentan una menor ingesta acumulada comparado con el grupo WD ( $p < 0,05$ , DMS, prueba *post hoc*).



**Figura 4.10.** Ingesta total acumulada. Cantidad de Kilocalorías totales consumidas por ratas *Wistar* durante 30 días en condiciones de alimentación *ad libitum* distribuidas en los siguientes grupos: CONTROL, alimentado con una dieta estándar; WD (*western diet*), alimentado con

dieta obesogénica; WD+EU: alimentado con una dieta WD+40mg/kg/día de eugenol; WD+CNA, alimentado con una dieta WD+250mg/kg/día de cinamaldehído; y WD+EU+CNA, alimentado con una dieta WD+40 y +250mg/kg/día de eugenol y cinamaldehído. Estadísticas: Los datos son la media  $\pm$  SEM. Tto, efecto tratamiento,  $p < 0,05$ , ANOVA de un Factor. ( $a \neq b \neq c$ ),  $p < 0,05$ , DMS, prueba *post hoc*.

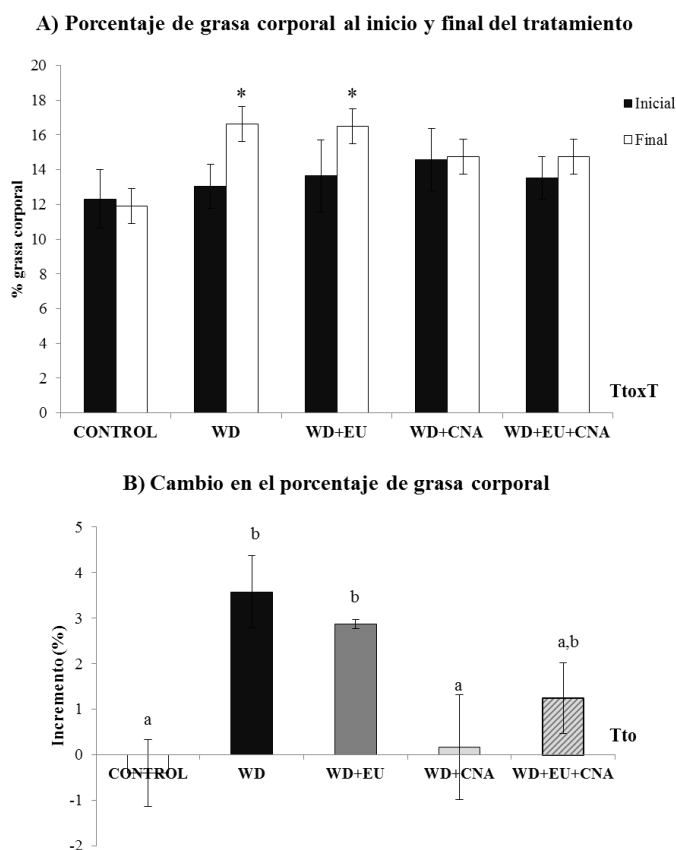
Estos cambios en la ingesta energética, podrían explicar los cambios observados en el peso corporal de estos animales. Se realizó un seguimiento diario del peso corporal, durante los 30 días de tratamiento y, como se observa en la Figura 4.11, los animales del grupo WD incrementaron el peso corporal con respecto al grupo CONTROL. Sin embargo, los animales del grupo WD+EU mantuvieron su peso muy similar a los del grupo control y los animales de los grupos WD+CNA y WD+EU+CNA experimentaron una reducción de peso corporal, incluso si los comparamos con el grupo CONTROL. De hecho, el porcentaje de incremento total de peso desde el inicio al final del tratamiento (Figura 4.11) muestra que los animales del grupo WD presentaron un mayor incremento de peso corporal comparado con los animales de los grupos WD+CNA y WD+EU+CNA ( $p < 0,05$ , DMS, prueba *post hoc*). Incluso, cabe destacar que los animales alimentados con dieta WD tratados con CNA y EU+CNA experimentaron una pérdida de peso corporal.



**Figura 4.11.** Evolución del incremento de peso acumulado en gramos (A) y porcentaje del incremento de peso total acumulado (B) durante el tratamiento de los animales distribuidos en los siguientes grupos: CONTROL, alimentado con una dieta estándar; WD (*western diet*),

alimentado con dieta obesogénica; WD+EU: alimentado con una dieta WD+40mg/kg/día de eugenol; WD+CNA, alimentado con una dieta WD+250mg/kg/día de cinamaldehído; y WD+EU+CNA, alimentado con una dieta WD+40 y +250mg/kg/día de eugenol y cinamaldehído. La flecha indica que los animales, a mitad del tratamiento, fueron expuestos a un ayuno de 12 horas para la extracción de sangre en condiciones de ayuno. Estadísticas: Los datos son la media  $\pm$  SEM. Tto, efecto tratamiento,  $p < 0,05$ , ANOVA de un Factor. ( $a \neq b$ ),  $p < 0,05$ , DMS, prueba *post hoc*.

Además, los animales WD y WD+EU incrementaron el porcentaje de grasa respecto a su valor inicial ( $p < 0,05$ , prueba T para muestras pareadas), mientras que no hubo cambios significativos en los grupos CONTROL, WD+CNA y WD+EU+CNA (Figura 4.12). Al finalizar el tratamiento, los animales del grupo WD y WD+EU presentaron un mayor incremento en el porcentaje de grasa corporal con respecto al grupo CONTROL ( $p < 0,05$ , DMS, prueba *post hoc*). Este mayor incremento se vio total o parcialmente atenuado en los grupos WD+CNA y WD+EU+CNA respectivamente. Al finalizar el tratamiento los animales del grupo CONTROL presentaron una pérdida del 0,40% en el porcentaje de grasa corporal respecto al valor inicial, el grupo WD presentó un aumento de 3,58% de grasa corporal, el grupo de animales WD+EU tuvo un incremento del 2,88% de grasa corporal, los animales del grupo WD+CNA presentaron un pequeño incremento en el porcentaje de grasa (0,17%) y el grupo tratado con WD+EU+CNA un presentaron un incremento del 1,25% de grasa corporal.



**Figura 4.12.** Porcentaje de grasa corporal medida al inicio y final de tratamiento (A) y cambio en el porcentaje de grasa corporal (B) de los animales distribuidos en los siguientes grupos: CONTROL, alimentado con una dieta estándar; WD (*western diet*), alimentado con dieta

obesogénica; WD+EU: alimentado con una dieta WD+40mg/kg/día de eugenol; WD+CNA, alimentado con una dieta WD+250mg/kg/día de cinamaldehído; y WD+EU+CNA, alimentado con una dieta WD+40 y +250mg/kg/día de eugenol y cinamaldehído. Estadísticas: Los datos son la media  $\pm$  SEM. A) Tto x T,  $p < 0,05$ , efecto interactivo tiempo por tratamiento, análisis de medidas repetidas. \*  $p < 0,05$ , para cada tratamiento valor final *versus* valor inicial, prueba T de muestras pareadas. B) Tto,  $p < 0,05$ , efecto tratamiento, ANOVA de un Factor. ( $a \neq b$ ),  $p < 0,05$ , DMS, prueba *post hoc*.

Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el peso de los diferentes depósitos de tejido adiposo blanco (TAB), ni en el peso del tejido adiposo marrón (TAM) (Tabla 4.1).

**Tabla 4.1.** Peso de los depósitos de tejido adiposo blanco y del tejido adiposo marrón y peso de los tejidos adiposos viscerales (suma de los tejidos adiposos mesentérico, retroperitoneal y epididimal).

Parámetros	CONTROL	WD	WD+EU	WD+CNA	WD+EU+CNA
<b>TAB Mesentérico (g)</b>	3,81 $\pm$ 0,94	5,54 $\pm$ 0,72	5,87 $\pm$ 1,27	5,13 $\pm$ 0,96	3,95 $\pm$ 0,57
<b>TAB Retroperitoneal (g)</b>	8,53 $\pm$ 1,98	11,29 $\pm$ 1,27	11,58 $\pm$ 2,07	12,34 $\pm$ 2,13	10,18 $\pm$ 1,16
<b>TAB Epididimal (g)</b>	6,69 $\pm$ 1,02	8,24 $\pm$ 1,26	9,75 $\pm$ 1,71	8,99 $\pm$ 1,73	8,51 $\pm$ 1,23
<b>TAB Inguinal (g)</b>	7,26 $\pm$ 1,52	9,70 $\pm$ 1,15	8,05 $\pm$ 1,80	8,25 $\pm$ 1,47	6,78 $\pm$ 0,88
<b>TAB Visceral (g)</b>	19,0 $\pm$ 3,9	25,1 $\pm$ 3,0	27,2 $\pm$ 5,0	26,5 $\pm$ 4,6	22,6 $\pm$ 2,3
<b>TAM (g)</b>	0,45 $\pm$ 0,02	0,57 $\pm$ 0,04	0,51 $\pm$ 0,10	0,52 $\pm$ 0,06	0,46 $\pm$ 0,05

Abreviaturas: WD, *western diet*; EU, eugenol; CNA, cinamaldehído; TAB, tejido adiposo blanco; TAM, tejido adiposo marrón. TAB visceral suma de los depósitos de TAB mesentérico, retroperitoneal y epididimal.

### Parámetros sanguíneos

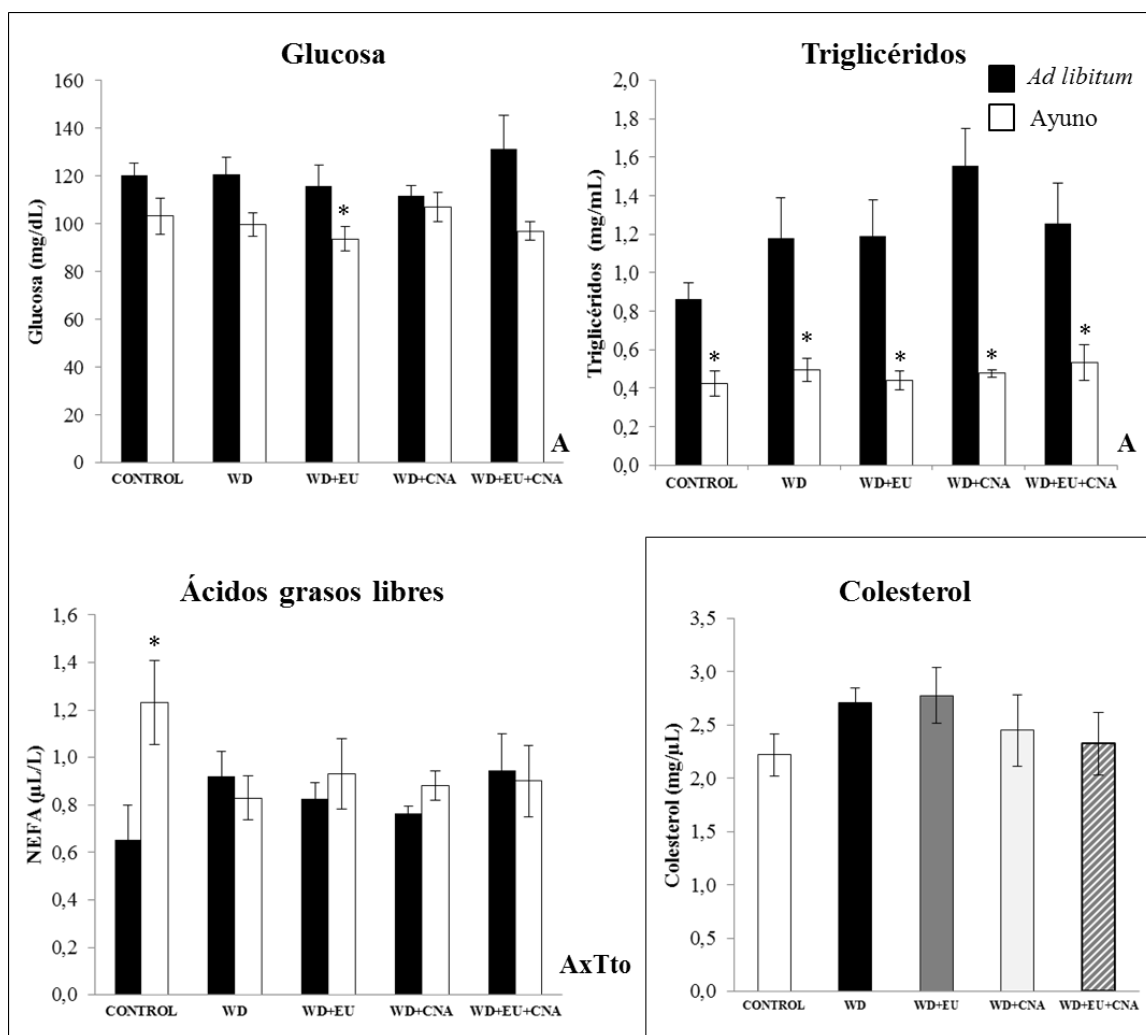
*Niveles circulantes de glucosa, triglicéridos, ácidos grasos libres y colesterol.*

Se analizaron los niveles circulantes de glucosa, triglicéridos y ácidos grasos libres de los diferentes grupos experimentales medidos en condiciones de alimentación *ad libitum* y tras un ayuno de 12 horas y los niveles circulantes de colesterol medidos en condiciones de alimentación *ad libitum*. Estos resultados se muestran en la Figura 4.13.

Los niveles circulantes de glucosa fueron menores en los animales en condición de ayuno comparado con la situación *ad libitum* ( $p < 0,05$ , efecto ayuno, ANOVA de medidas repetidas). Sin embargo, sólo los animales del grupo WD+EU presentaron menores niveles circulantes de glucosa en condiciones de ayuno comparado con los animales en condición de alimentación *ad libitum* ( $p < 0,05$ , prueba T para muestras pareadas).

En todos los grupos, los animales en condiciones de ayuno presentaron menores niveles circulantes de triglicéridos comparado con los animales en condiciones *ad libitum* ( $p < 0,05$ , efecto ayuno, ANOVA de medidas repetidas). No hubo diferencias en los niveles circulantes de triglicéridos entre los diferentes grupos experimentales. Los

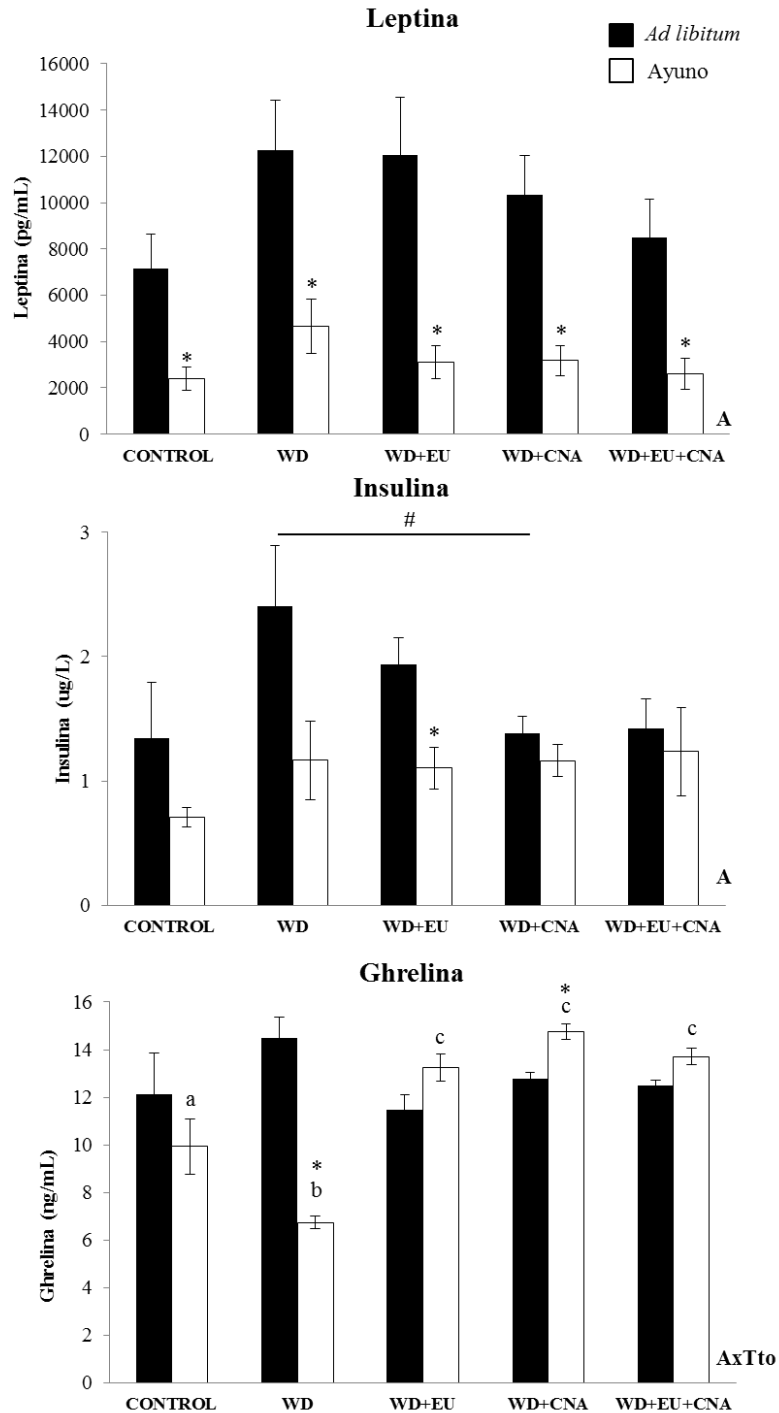
niveles circulantes de ácidos grasos libres en respuesta a la condición de ayuno fueron diferentes dependiendo del tratamiento ( $p < 0,05$ , efecto interactivo ayuno por tratamiento, ANOVA de medidas repetidas). Mientras que en los animales control se observó un aumento significativo en los niveles circulantes de ácidos grasos libres en respuesta al ayuno, este aumento no se observó en los otros grupos experimentales. Esta falta de respuesta al ayuno puede atribuirse al ingesta de la dieta WD. Los niveles circulantes de colesterol, medido en condiciones de alimentación *ad libitum*, fueron similares en todos los grupos experimentales.



**Figura 4.13.** Niveles circulantes de glucosa, triglicéridos, ácidos grasos libres y colesterol. Se midió los niveles circulantes de glucosa, triglicéridos y ácidos grasos libres en condiciones *ad libitum* (al final del tratamiento) o tras 12 horas de ayuno (a mitad del tratamiento) y de colesterol en condiciones de alimentación *ad libitum*, en ratas *Wistar* distribuidas en los siguientes grupos: CONTROL, alimentado con una dieta estándar; WD (*western diet*), alimentado con dieta obesogénica; WD+EU: alimentado con una dieta WD+40mg/kg/día de eugenol; WD+CNA, alimentado con una dieta WD+250mg/kg/día de cinamaldehído; y WD+EU+CNA, alimentado con una dieta WD+40 y +250mg/kg/día de eugenol y cinamaldehído. Estadísticas: Los datos son la media  $\pm$  SEM. A, efecto ayuno; AxTto, efecto interactivo ayuno por tratamiento;  $p < 0,05$ , ANOVA de medidas repetidas. \*, Ayuno *versus ad libitum*,  $p < 0,05$  prueba T para muestras pareadas.

Niveles de leptina, insulina y ghrelina

Los niveles circulantes de leptina, insulina y ghrelina de los diferentes grupos experimentales medidos en condiciones de alimentación *ad libitum* y tras un ayuno de 12 horas. Los resultados se presentan en la Figura 4.14.



**Figura 4.14.** Niveles circulantes de leptina, insulina y ghrelina. Se midieron los niveles circulantes de leptina, insulina y ghrelina en ratas *Wistar* en condiciones *ad libitum* (al final del tratamiento) o 12 horas de ayuno (a mitad del tratamiento), distribuidas en los siguientes grupos: CONTROL, alimentado con una dieta estándar; WD (*western diet*), alimentado con dieta

obesogénica; WD+EU: alimentado con una dieta WD+40mg/kg/día de eugenol; WD+CNA, alimentado con una dieta WD+250mg/kg/día de cinamaldehído; y WD+EU+CNA, alimentado con una dieta WD+40 y +250mg/kg/día de eugenol y cinamaldehído. Estadísticas: Los datos son la media  $\pm$  SEM. A, efecto ayuno; AxTto, efecto interactivo ayuno por tratamiento;  $p < 0,05$ , ANOVA de medidas repetidas. \*,  $p < 0,05$ , ayuno *versus ad libitum*, prueba T para muestras pareadas. #,  $p < 0,05$ , *versus* grupo WD, U de *Mann-Whitney*; (A $\neq$ B $\neq$ C)  $p < 0,05$  DMS, prueba *post hoc*.

Los niveles circulantes de leptina fueron menores cuando los animales se encontraban en condiciones de ayuno comparado con la condición de alimentación *ad libitum* en todos los grupos experimentales ( $p < 0,05$ , efecto ayuno, ANOVA de medidas repetidas). No hubo diferencias en los niveles circulantes de leptina entre los diferentes grupos experimentales.

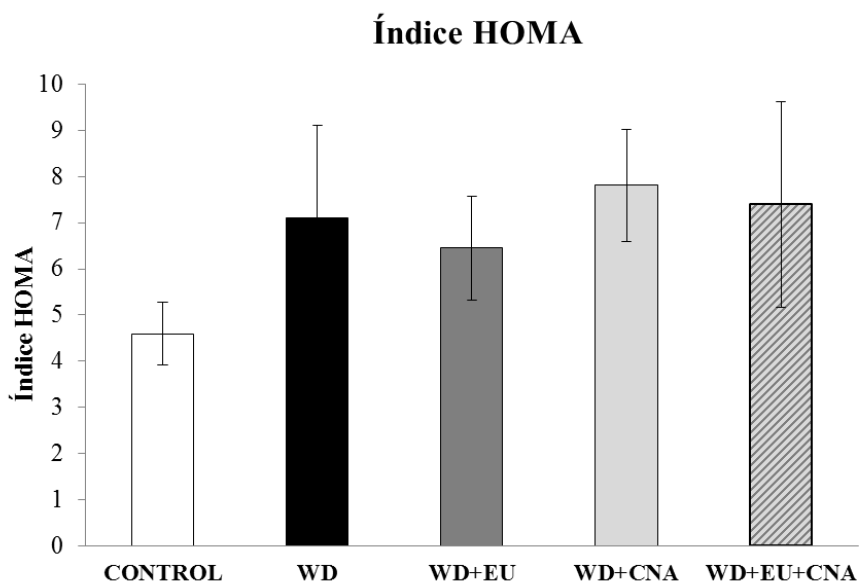
Los niveles circulantes de insulina también fueron menores en los animales en condición de ayuno comparado con la situación de alimentación *ad libitum* cuando se analizan los datos por ANOVA de medidas repetidas ( $p < 0,05$ , efecto ayuno, ANOVA de medidas repetidas). Sin embargo, sólo los animales del grupo WD+EU presentaron menores niveles circulantes de insulina en condiciones de ayuno comparado con los animales en condición de alimentación *ad libitum*, significativos cuando se realiza una comparación por pares ( $p < 0,05$ , prueba T para muestras pareadas). Cabe destacar que en condiciones de alimentación *ad libitum*, los animales del grupo WD+CNA presentan valores inferiores de insulina circulante que los animales del grupo WD ( $p < 0,05$ , U de *Mann-Whitney*).

Los niveles de ghrelina en respuesta a la condición de ayuno fueron diferentes dependiendo del tratamiento ( $p < 0,05$ , efecto interactivo ayuno por tratamiento, ANOVA de medidas repetidas). En condiciones de alimentación *ad libitum* no se observaron diferencias en los niveles circulantes de ghrelina entre los diferentes grupos experimentales. Sin embargo, si se comparan los niveles de ghrelina en situación de ayuno se observa que los animales del grupo WD presentaron los menores valores de ghrelina circulante, mientras que los grupos WD+EU, WD+CNA y WD+EU+CNA presentaron mayores niveles de ghrelina circulante que los animales del grupo CONTROL y WD ( $p < 0,05$ , DMS, prueba *post hoc*). Además, los animales del grupo WD en condiciones de ayuno presentaron menores niveles de ghrelina circulantes comparado con la condición de alimentación *ad libitum*, mientras que los animales del grupo WD+CNA presentaron mayores niveles de ghrelina circulante en condiciones de ayuno que en condiciones *ad libitum* ( $p < 0,05$ , prueba T para muestras pareadas).

### Índice HOMA

Usando el modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina se observa que los grupos que fueron alimentados con WD presentan mayores niveles de este índice comparado con el grupo control, aunque estas diferencias no resultaron ser estadísticamente significativas. Los resultados se presentan en la Figura 4.15.





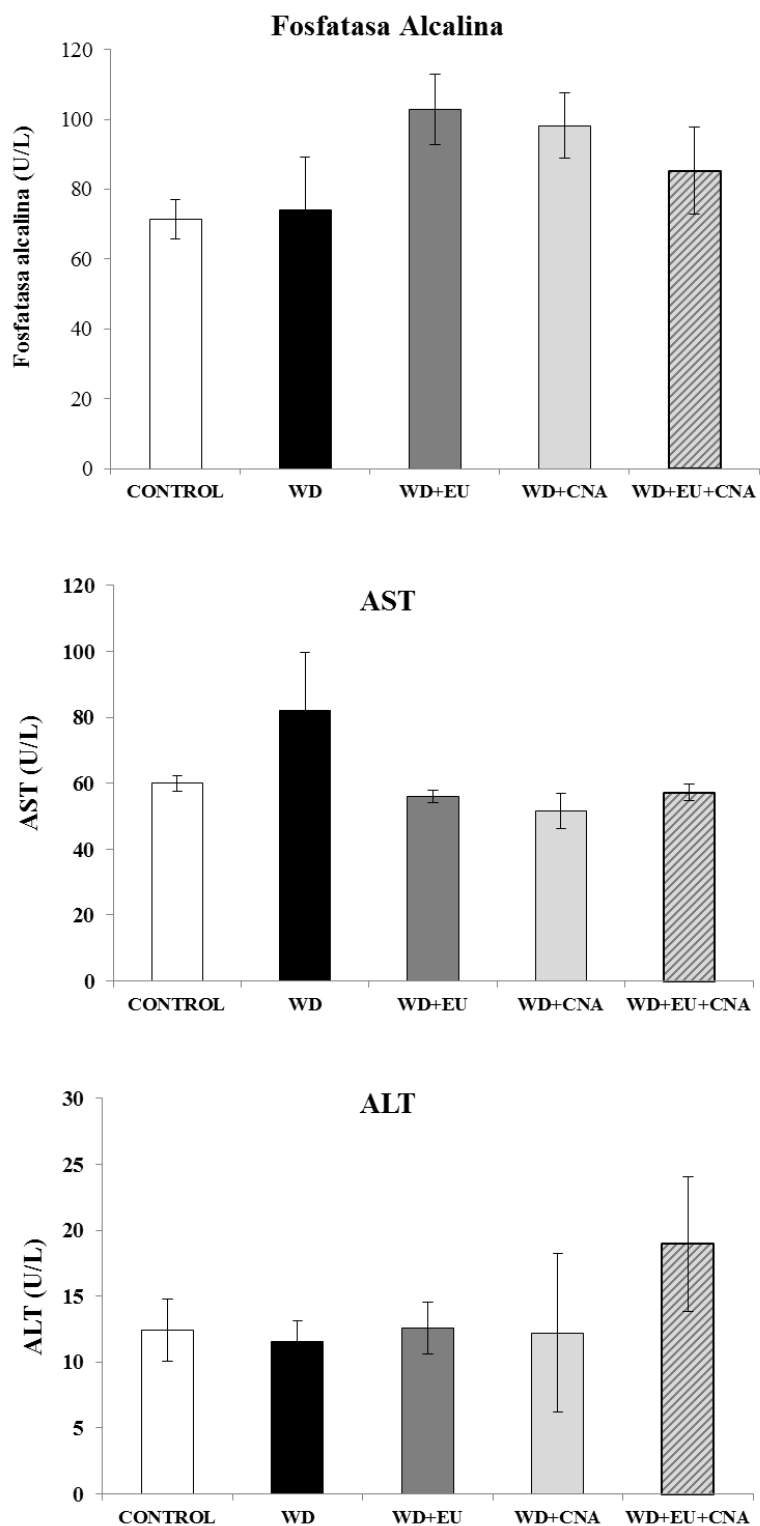
**Figura 4.15.** Índice HOMA a los 15 días de tratamiento en ratas *Wistar* distribuidas en los siguientes grupos: CONTROL, alimentado con una dieta estándar; WD (*western diet*), alimentado con dieta obesogénica; WD+EU: alimentado con una dieta WD+40mg/kg/día de eugenol; WD+CNA, alimentado con una dieta WD+250mg/kg/día de cinamaldehído; y WD+EU+CNA, alimentado con una dieta WD+40 y +250mg/kg/día de eugenol y cinamaldehído respectivamente.

#### *Niveles de fosfatasa alcalina, aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT)*

AST, ALT son enzimas hepáticas implicadas en el metabolismo de aminoácidos, cuyos niveles elevados en la sangre pueden indicar trastornos hepáticos. Niveles elevados de fosfatasa alcalina pueden estar también relacionados con trastornos hepáticos. Analizamos los niveles circulantes de estas tres enzimas en nuestros grupos experimentales, para comprobar si había daño hepático por efecto de los diferentes tratamientos. Los resultados se muestran en la Figura 4.16

No hubo cambios significativos en los niveles circulantes de fosfatasa alcalina entre los diferentes grupos experimentales. Sin embargo, los animales tratados con EU y CNA y presentaron una tendencia a mayores niveles circulantes de fosfatasa alcalina comparado con el grupo control y WD, aunque estos resultados no fueron estadísticamente significativos. Tampoco hubo diferencias entre los grupos en cuanto a los niveles circulantes de AST y ALT. Los animales del grupo WD+EU+CNA presentaron niveles más elevados de ALT que el grupo CONTROL y WD, aunque existe una gran variabilidad en este parámetro y los resultados no fueron estadísticamente significativos. Además, los animales del grupo WD presentaron mayores niveles de AST comparado con los niveles de los animales control y este aumento no se observó en los animales alimentados con WD que recibieron EU, CNA o su tratamiento combinado, aunque estos resultados tampoco fueron estadísticamente

significativos. Esto puede indicar que no se evidencia daño hepático por efecto de los tratamientos.



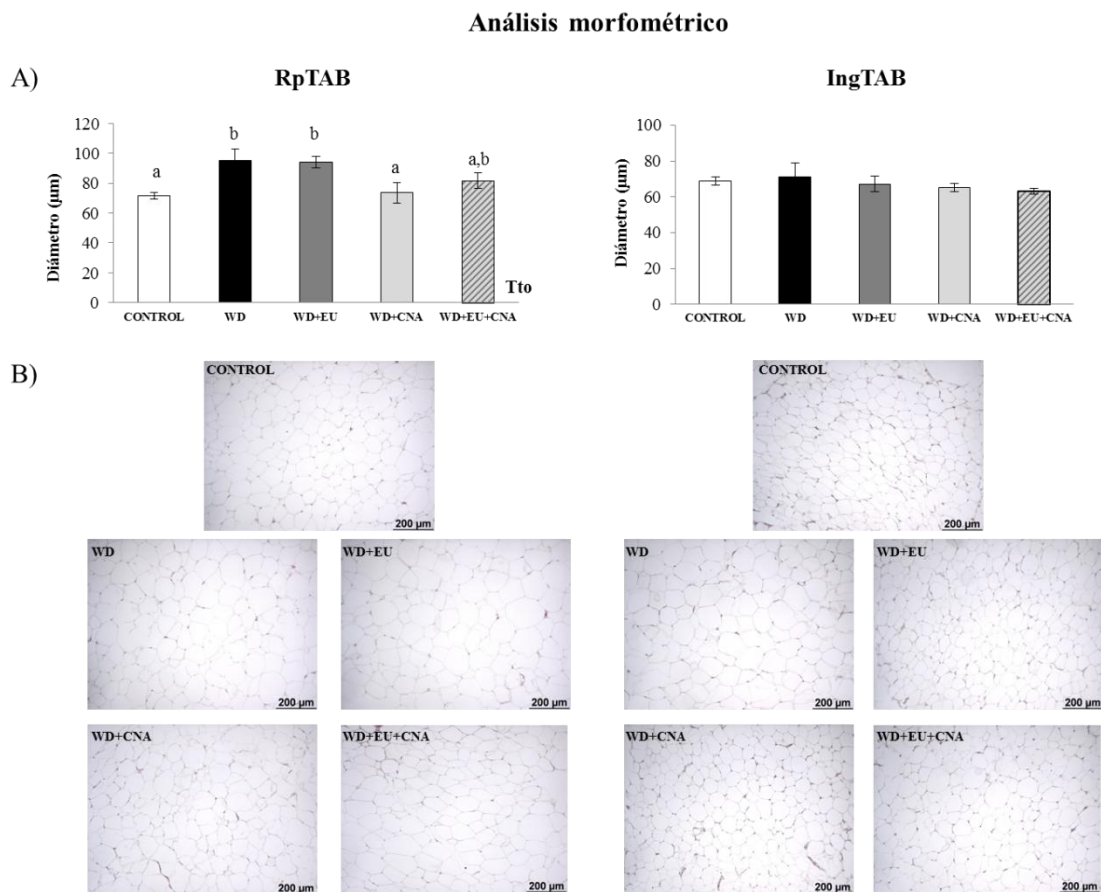
**Figura 4.16.** Niveles circulantes de fosfatasa alcalina, aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT) en ratas *Wistar* en condiciones *ad libitum*, distribuidas en los siguientes grupos: CONTROL, alimentado con una dieta estándar; WD (*western diet*), alimentado con dieta obesogénica; WD+EU: alimentado con una dieta WD+40mg/kg/día de eugenol; WD+CNA, alimentado con una dieta WD+250mg/kg/día de cinamaldehído; y

WD+EU+CNA, alimentado con una dieta WD+40 y +250mg/kg/día de eugenol y cinamaldehído.

**Análisis morfométrico del tejido adiposo blanco retroperitoneal (rpTAB) e inguinal (IngTAB)**

Se ha realizado un análisis morfométrico del rpTAB e IngTAB, en los que se ha medido el diámetro de los adipocitos en cortes histológicos, para inferir el tamaño de los adipocitos. Los resultados se muestran en la Figura 4.17

En el rpTAB los animales del grupo WD y WD+EU presentan adipocitos de mayor tamaño (diámetro) que los animales CONTROL. Este aumento en el tamaño de los adipocitos se ve total o parcialmente atenuado en los animales que recibieron tratamiento con CNA o el tratamiento combinado, respectivamente ( $p < 0,05$ , DMS, prueba *post hoc*). Cabe señalar que en un animal el grupo WD+CNA se encontraron adipocitos multiloculares (4-5 adipocitos moleculares por campo). Con respecto al análisis realizado en el IngTAB, no se evidenciaron cambios en el tamaño de los adipocitos entre los diferentes grupos experimentales.



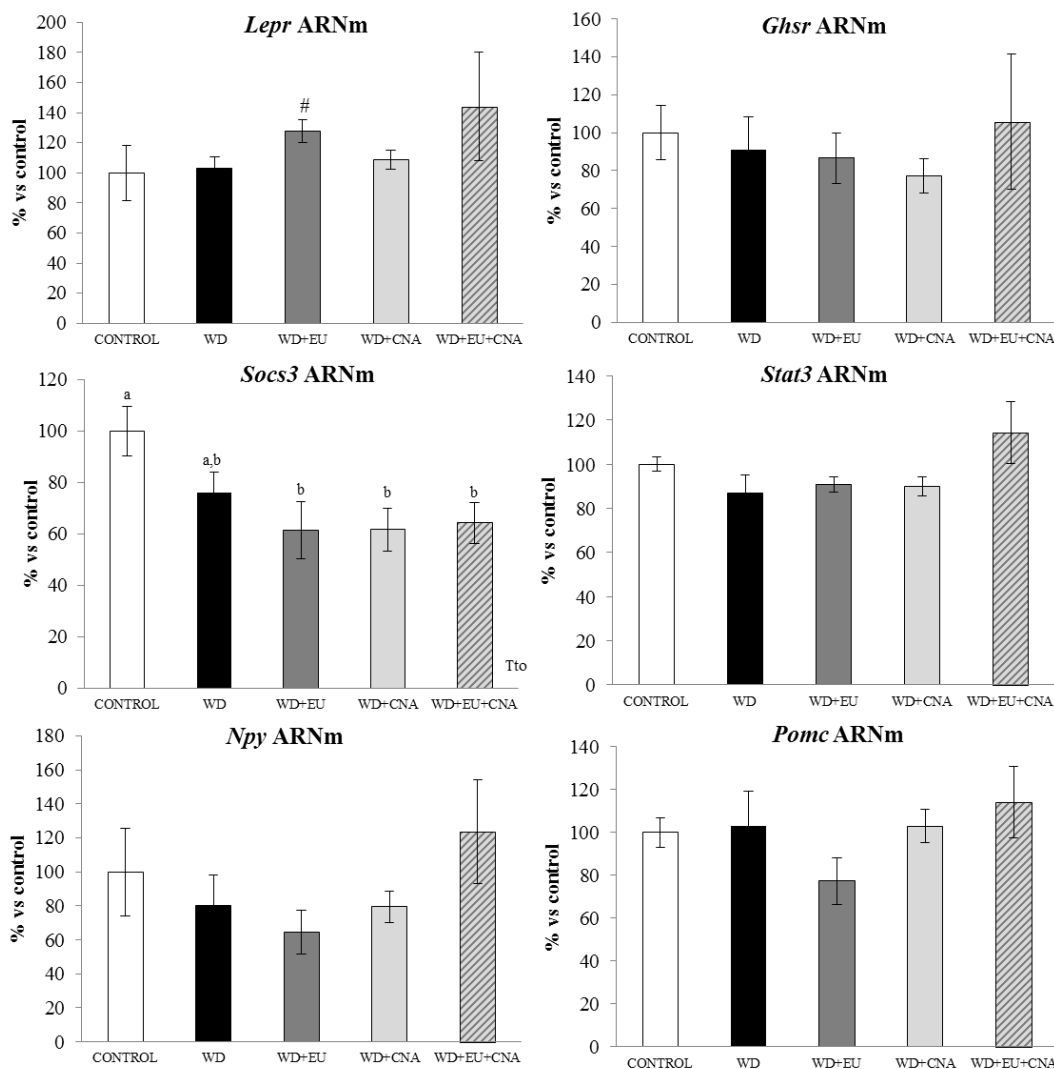
**Figura 4.17.** A) Análisis del diámetro de los adipocitos del tejido adiposo blanco retroperitoneal (rpTAB) e inguinal (IngTAB), realizado en ratas *Wistar* distribuidas en los siguientes grupos: CONTROL, alimentado con una dieta estándar; WD (*western diet*), alimentado con dieta obesogénica; WD+EU: alimentado con una dieta WD+40mg/kg/día de eugenol; WD+CNA, alimentado con una dieta WD+250mg/kg/día de cinamaldehído; y WD+EU+CNA, alimentado con una dieta WD+40 y +250mg/kg/día de eugenol y cinamaldehído. Estadística: Tto, efecto

tratamiento,  $p < 0,05$ , ANOVA de un Factor.  $a \neq b$ ; DMS, Post Hoc. B) Imágenes representativas de cortes histológicos de rpTAB e IngTAB.

### Expresión de genes relacionados con el balance energético en tejidos claves

Se analizaron los niveles de ARNm de *Lepr*, *Ghsr*, *Socs3*, *Stat3*, *Npy* y *Pomc* en el hipotálamo (Figura 4.18). No se observaron cambios en los niveles de expresión de *Ghsr*, *Stat3*, *Npy* y *Pomc* entre los diferentes grupos. Sin embargo, la expresión hipotalámica de *Socs3* disminuyó en los animales de los grupos WD+EU, WD+CNA y WD+EU+CNA con respecto al grupo CONTROL ( $p < 0,05$  DMS, prueba *post hoc*). Interesantemente, los animales del grupo WD+EU presentaron mayores niveles de expresión del receptor de leptina, *Lepr*, con respecto al grupo WD ( $p < 0,05$ , U de Mann-Whitney).

#### Expresión hipotalámica de genes relacionados con el balance energético



**Figura 4.18.** Expresión de genes relacionados con el metabolismo energético en el hipotálamo de ratas *Wistar* sacrificadas en condiciones de alimentación *ad libitum* distribuidas en los siguientes grupos: control, alimentado con una dieta estándar; WD (*western diet*), alimentado con dieta obesogénica; WD+EU: alimentado con una dieta WD+40mg/kg/día de eugenol; WD+CNA, alimentado con una dieta WD+250mg/kg/día de cinamaldehído; y WD+EU+CNA,

alimentado con una dieta WD+40 y +250mg/kg/día de eugenol y cinamaldehído. Los genes analizados fueron: *Ghsr*, *Lepr*, *Socs3*, *Stat3*, *Npy* y *Pomc*. Estadísticas: Los datos son la media  $\pm$  SEM. Tto, efecto tratamiento,  $p < 0,05$ , ANOVA de un factor. ( $a \neq b$ )  $p < 0,05$ , DMS, prueba *post hoc*. #, *versus* grupo WD,  $p < 0,05$ , U de *Mann-Whitney*.

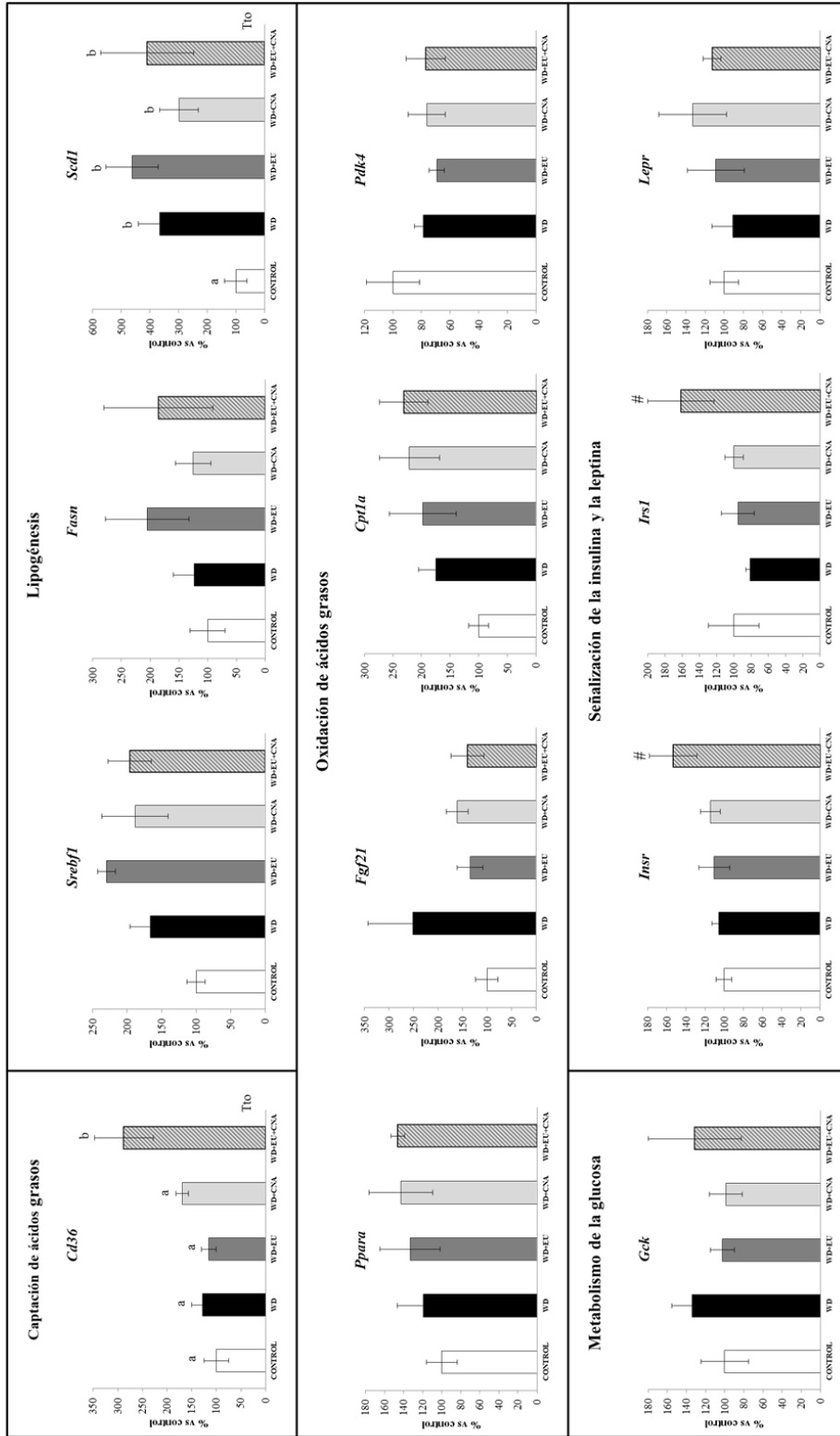
*Se analizó también la expresión de genes relacionados con el metabolismo energético en el hígado. Los resultados se presentan en la Figura 4.19.*

Los animales del grupo WD+EU+CNA mostraron un aumento en los niveles de expresión hepática del gen *Cd36*, que participa en la captación de ácidos grasos, comparado con el resto de los grupos ( $p < 0,05$ , DMS, prueba *post hoc*). Por otra parte, todos los grupos que recibieron una dieta WD, con o sin tratamiento, mostraron un aumento en los niveles de expresión del ARNm de los genes lipogénicos *Srebf1* y *Scd1* en el hígado, en comparación con los animales del grupo CONTROL, aunque esta diferencia fue estadísticamente significativa solo en el caso del *Scd1* ( $p < 0,05$ , efecto tratamiento, ANOVA de un factor). No se observaron cambios entre los diferentes grupos en la expresión hepática de *Fasn* (lipogénico) ni en los genes relacionados con la oxidación de ácidos grasos, *Ppara*, *Fgf21*, *Cpt1a* y *Pdk4*, captación y metabolismo de glucosa (*Gck*) ni en la expresión del receptor de leptina (*Lepr*). Aunque, cuando ese analizan en conjunto, no se observan cambios en los niveles de expresión hepática de los genes relacionados con la señalización de insulina entre los diferentes grupos, los animales del grupo WD+EU+CNA presentan mayores niveles del ARNm de *Insr* ( $p = 0,016$ , U de *Mann-Whitney*) e *Irs1* ( $p = 0,063$ , U de *Mann-Whitney*)

*Por último, también se analizó la expresión de genes relacionados con el metabolismo energético en el tejido adiposo blanco retroperitoneal. Los resultados se presentan en la Figura 4.20.*

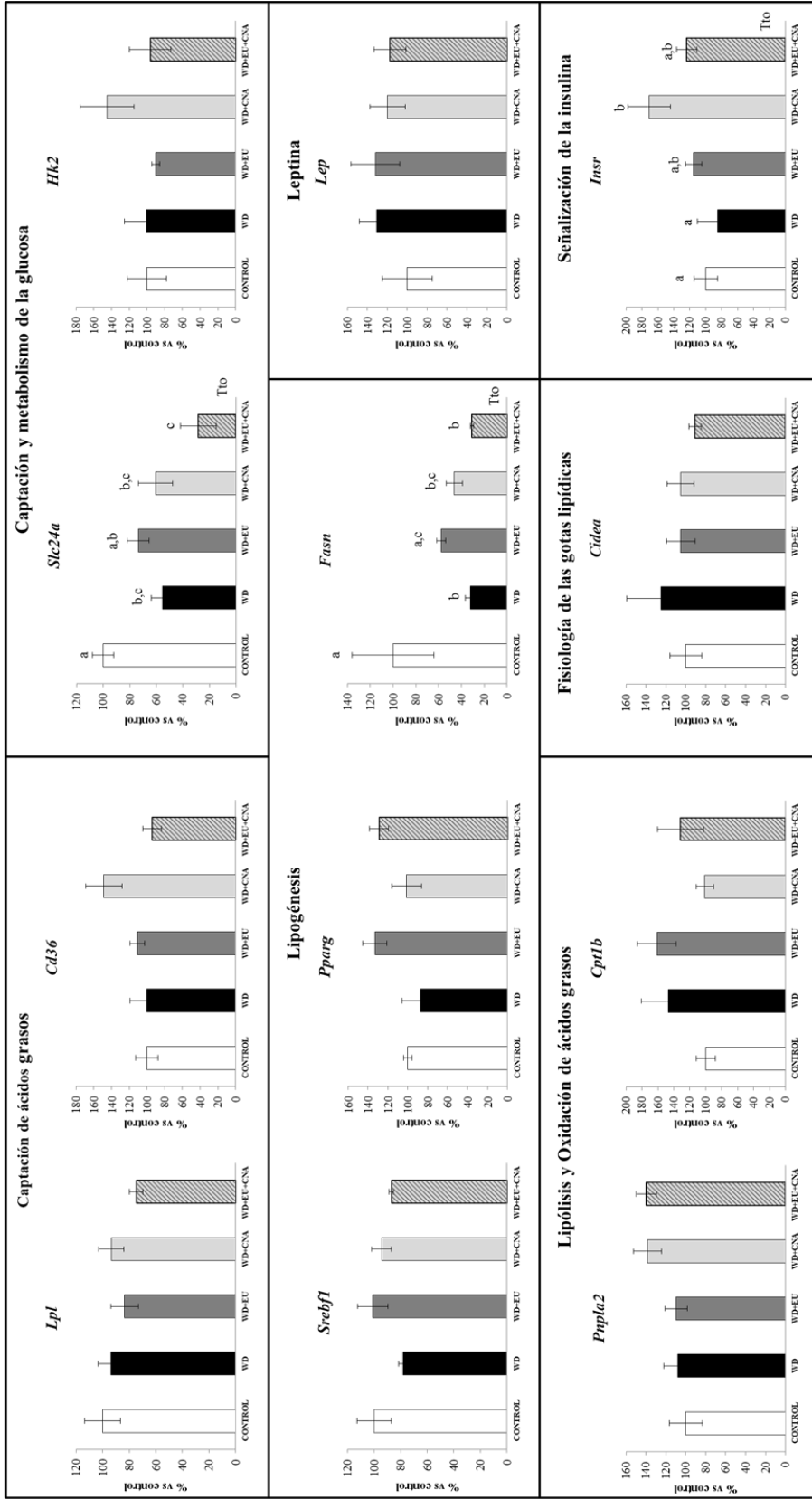
Los animales de los grupos WD, WD+CNA y WD+EU+CNA mostraron una menor expresión del gen que codifica para GLUT4, *Slc2a4*, comparado con los animales del grupo CONTROL ( $p < 0,05$ , DMS, prueba *post hoc*). Los animales del grupo WD+CNA mostraron una mayor expresión del ARNm del *Insr* comparado con los animales WD y los animales del grupo CONTROL ( $p < 0,05$ , DMS, prueba *post hoc*). Los animales del grupo WD, WD+CNA, WD+EU+CNA presentaron menores niveles de expresión del ARNm de *Fasn* comparado con los animales del grupo CONTROL ( $p < 0,05$ , DMS, prueba *post hoc*). Los animales del grupo WD+EU presentaron una menor inhibición en la expresión del ARNm de *Fasn*. De hecho, el grupo WD+EU tiene niveles incrementados del ARNm de *Fasn* comparado con el grupo WD ( $p < 0,05$ , DMS, prueba *post hoc*). En los genes relacionados con la captación de ácidos grasos (*Lpl* y *Cd36*), lipogénesis (*Pparg* y *Srebf1*), lipólisis (*Pnpla2*), oxidación de ácidos grasos (*Cpt1b*), metabolismo de la glucosa (*Hk2*) y la leptina (*Lep*), no se observaron cambios significativos entre los diferentes grupos experimentales. Tampoco hubo diferencias en la expresión de *Cidea*, marcador de marronización, entre los diferentes grupos experimentales.

Expresión hepática de genes relacionados con el metabolismo energético



**Figura 4.19.** Expresión de genes relacionados con el metabolismo energético (captación de ácidos grasos, lipogénesis, oxidación de ácidos grasos, metabolismo de la glucosa y señalización de leptina e insulina) en el hígado de ratas Wistar sacrificadas en condiciones de alimentación *ad libitum* distribuidas en los siguientes grupos: CONTROL, alimentado con una dieta estándar; WD (*western diet*), alimentado con una dieta obesogénica; WD+EU: alimentado con una dieta WD+40mg/kg/día de eugenol; WD+CNA, alimentado con una dieta WD+250mg/kg/día de cinamaldehído; y WD+EU+CNA, alimentado con una dieta WD+ 40 + 250mg/kg/día de eugenol y cinamaldehído. Los genes analizados fueron: *Cd36*, *Srebp1*, *Fasn*, *Scd1*, *Ppara*, *Fg21*, *Cpt1a*, *Pdk4*, *Gck*, *Insr*, *Irs1* y *Lepr*, . Estadísticas: Los datos son la media  $\pm$  SEM. Tto, efecto tratamiento,  $p < 0,05$ , ANOVA de un factor. (a#b)  $p < 0,05$ , DMS, prueba *post hoc*. #, *versus* grupo WD,  $p < 0,05$ , U de *Mann-Whitney*.

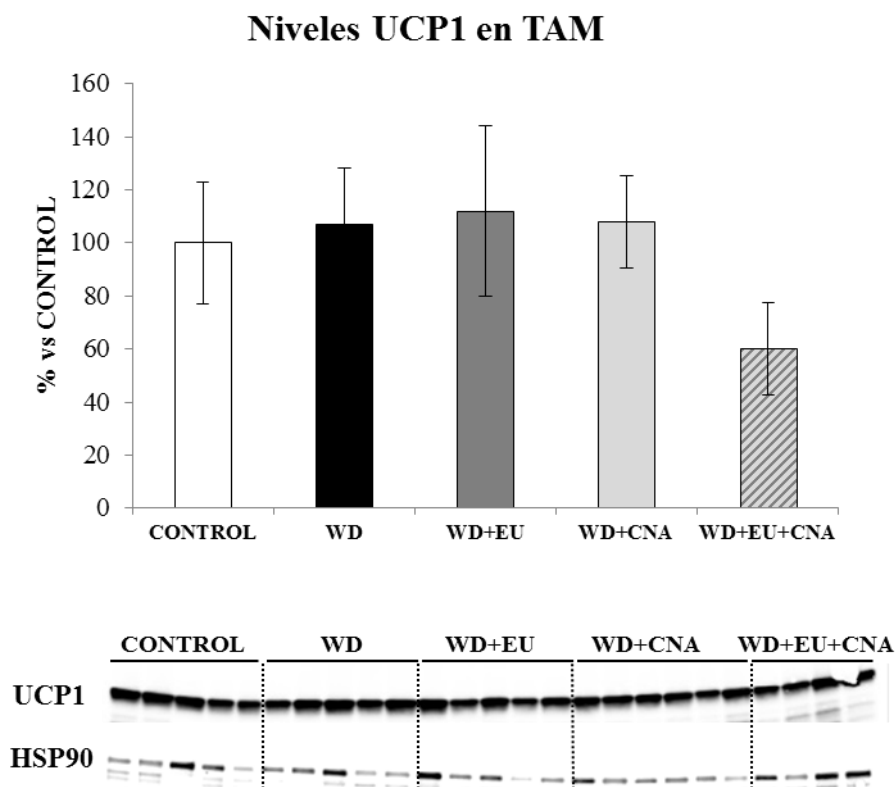
Expresión en TAB retroperitoneal de genes relacionados con el metabolismo energético



**Figura 4.20.** Expresión de genes relacionados con el metabolismo energético (captación y metabolismo de glucosa, lipogénesis, leptina, lipólisis y oxidación de ácidos grasos, fisiología de las gotas lipídicas y señalización de insulina) en el rpTAB de ratas Wistar sacrificadas en condiciones de alimentación *ad libitum* distribuidas en los siguientes grupos: CONTROL, alimentado con una dieta estándar; WD (*western diet*), alimentado con una dieta obesogénica; WD+EU: alimentado con una dieta WD+40mg/kg/día de eugenol; WD+CNA, alimentado con una dieta WD+250mg/kg/día de cinamaldehído; y WD+EU+CNA, alimentado con una dieta WD+ 40 y +250mg/kg/día de eugenol y cinamaldehído. Los genes analizados fueron: *Lpl*, *Cd36*, *Slc24a4*, *Hk2*, *Srebf1*, *Pparg*, *Fasn*, *Lep*, *Papla2*, *Cpt1b*, *Cidea* e *Insr*. Estadísticas: Los datos son la media ± SEM. Tto, efecto tratamiento, p<0,05, ANOVA de un factor. (a≠b) p<0,05 DMS, prueba post hoc. #, versus grupo WD, p<0,05, U de Mann-Whitney.

### **Análisis de los niveles proteicos de UCP1 en tejido adiposo marrón**

Realizamos un *western blot* para cuantificar los niveles de UCP1 en tejido adiposo marrón. Los resultados se muestran en la Figura 4.21. Se observó que no hay cambios significativos en los niveles de UCP1 entre los diferentes grupos. Por tanto, estos resultados parecen indicar que ni la dieta WD ni ninguno de los tratamientos produjo una activación de la termogénesis.



**Figura 4.21.** Niveles de la proteína UCP1 medidos en el tejidos adiposo marrón (TAM) de ratas *Wistar* sacrificadas en condiciones de alimentación *ad libitum* distribuidas en los siguientes grupos: CONTROL, alimentado con una dieta estándar; WD (*western diet*), alimentado con dieta obesogénica; WD+EU: alimentado con una dieta WD+40mg/kg/día de eugenol; WD+CNA, alimentado con una dieta WD+250mg/kg/día de cinamaldehído; y WD+EU+CNA, alimentado con una dieta WD+40 y +250mg/kg/día de eugenol y cinamaldehído. En la parte inferior se presenta la cuantificación por *western blot* de los niveles de UCP1 y HSP90 en tejido adiposo marrón.

#### **4.2.2. Discusión**

La obesidad y la diabetes mellitus afectan a más de un tercio de la población mundial actual y, si la tendencia continúa, para 2030 se estima que el 38% de la población adulta mundial tendrá sobrepeso y otro 20% será obeso [300]; la prevalencia de la diabetes se espera que sea el doble, de 2,8% en 2000 a 4,4% en 2030 con la mayor proporción de este aumento en los países de bajos a medianos ingresos de Asia, África y América del Sur [301].

En un intento de mejorar los resultados de los tratamientos de la obesidad y al mismo tiempo mejorar el bienestar general, hay una tendencia emergente en todo el mundo



para que los pacientes usen medicamentos complementarios y alternativos [302]. Los medicamentos complementarios y alternativos han generado gran interés por la académica y la industrial debido a su alta prevalencia de uso. El Centro Nacional para la Medicina Complementaria y Alternativa de Los Estados Unidos define CAM (*Complementary and Alternative Medicine*) como "un grupo de sistemas médicos y de asistencia sanitaria, prácticas y productos que actualmente no se consideran parte de la medicina convencional", y promueve el uso de la medicina complementaria con la terapia convencional [302].

Se han atribuido diferentes propiedades saludables a especias como, por ejemplo, la canela ya que se ha descrito que poseen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, y/o antidiabéticas [240, 269]. El cinnamaldehído (CNA), es uno de los compuestos mayoritarios de la canela. Su administración produce efectos antihiperlipidémicos y anti-obesidad en ratones [256, 281] y en cultivos *in vitro* se ha observado un efecto antiadipogénico [249]. El eugenol (EU), es un compuesto mayoritario que se puede extraer del clavo de olor. Sus efectos antidiabéticos, han sido descritos ampliamente en la bibliografía, mejorando la hiperglicemia vía inhibición de la gluconeogénesis hepática [236, 237]. Por tanto, compuestos bioactivos como el EU y el CNA emergen como posibles adyuvantes en el control o tratamiento de la diabetes y la obesidad [303, 304].

Ante una dieta WD los animales ganaron más peso corporal y presentaron un incremento en el porcentaje de grasa corporal respecto a los animales alimentados con una dieta estándar, probablemente debido a la mayor ingesta energética observada en estos animales. Estos efectos se previnieron si junto a la dieta WD se administra, CNA y el tratamiento combinado de ambos compuestos. La administración de EU junto a la dieta WD, aunque no afecta a la ingesta energética de los animales si lo comparamos con los animales del grupo WD, presentan un menor incremento de peso corporal aunque no un menor incremento en el porcentaje de grasa corporal tras 30 días. La administración de CNA a animales alimentados con dieta WD, previene el incremento en el peso y el porcentaje de grasa asociado a la ingesta de la dieta obesogénica. Además, el tamaño de los adipocitos en el tejido adiposo blanco retroperitoneal es menor que en animales WD, y similar a los adipocitos de los animales del grupo control.

Curiosamente, el CNA parece ejercer un cierto efecto anorexigénico, ya que los animales tratados con CNA presentan una menor ingesta energética, comparada con los animales del grupo WD, que podría explicar la menor ganancia de peso. Otros estudios han mostrado que en ratones el tratamiento agudo con CNA reduce la ingesta [256] y también existe una reducción en la ingesta acumulada en ratones alimentados 12 semanas con una dieta rica en grasa y después tratados durante 8 semanas con CNA (40mg/kg/día) [305]. Cabe destacar que no se han observado cambios a nivel hipotalámico en la expresión del *Npy* (vía oxerigénica), ni en la expresión del *Pomc* (vía anorexigénica).

Además, en estudios realizados en ratones se ha observado que el tratamiento con CNA reduce la ganancia de peso corporal [256, 305], reduce el tamaño de los adipocitos

[305], mejora la tolerancia a la glucosa [256], y la sensibilidad a la insulina [305]. De forma similar, en nuestro estudio observamos que la administración de CNA a ratas alimentadas con una dieta WD existe un efecto hipoinsulinémico que podría indicar una mejora metabólica en estos animales con respecto a los animales del grupo WD. Estudios en los que se han usado extractos de canela, que contiene como compuesto bioactivo mayoritario el CNA, un aumento en los niveles de proteínas implicadas en la señalización de la insulina [252, 306]. En animales también se ha descrito un efecto directo del CNA con cambios en los niveles de expresión de proteínas implicadas en la señalización [281], que podría explicar el efecto del CNA mejorando la sensibilidad a la insulina en ratones [281]. Aunque en nuestro estudio no hemos analizado los valores de las proteínas implicadas en la señalización de la insulina, los animales WD+CNA presentan un incremento en la expresión del ARNm de *InsR* en el tejido adiposo blanco retroperitoneal, que podría relacionarse con una cierta mejora en la sensibilidad a la insulina en este tejido.

Aunque se ha descrito extensamente en la bibliografía el efecto de EU en la mejora de la glucemia en animales diabéticos [237, 238, 303], en nuestro modelo, animales alimentados con una dieta WD y tratados con EU, no hemos observado cambios en la glucemia. Esta diferencia puede deberse a que los estudios citados se han realizado en ratas diabéticas y, en nuestro caso todos los animales tienen niveles glucémicos similares a las ratas control.

Los animales del grupo WD+EU presentaron un menor incremento en el peso corporal que los animales del grupo WD, pese a tener una ingesta calórica similar. Hemos analizado los niveles de la proteína UCP1 en el TAM, para determinar si este menor incremento en el peso pueda deberse a un aumento en la termogénesis. La capacidad termogénica del TAM depende de la actividad de la de la proteína UCP1, que se encuentra en el interior de membrana mitocondrial. La expresión de *Ucp1* es sensible a los estímulos externos como la exposición al frío o la sobrealimentación crónica que inducen termogénesis. Curiosamente no se han observado diferencias en los niveles de UCP1 en animales que recibieron los diferentes tratamiento, por lo que el menor aumento en el peso corporal de los animales del grupo WD+EU no puede explicarse por una mayor activación en la termogénesis. Creemos que quizás el tratamiento con EU haya podido afectar a la absorción intestinal, si bien, no hemos realizado ninguna medición, como por ejemplo análisis de la composición de las heces, para confirmar esta hipótesis.

La proteína CD36 se encarga de la captación de ácidos grasos en el hígado facilitando la captación y el transporte intracelular de los ácidos grasos de cadena larga. El aumento de la expresión de la proteína hepática *CD36* en respuesta a una dieta rica en grasa es suficiente para aumentar el almacenamiento de triglicéridos hepáticos [307, 308]. En contradicción a lo que pensábamos, el tratamiento combinado EU+CNA produce un aumento significativo en la expresión del ARNm de *Cd36*, sugiriendo un aumento en la captación de ácidos grasos y la acumulación de los triglicéridos en el hígado. Si bien, no se observan cambios en la expresión de genes hepáticos lipogénicos, en los animales que recibieron los diferentes tratamientos, ni tampoco en genes relacionados con la

oxidación de ácidos grasos, lo que sugiere que en nuestro caso los tratamientos administrados junto a la dieta WD no han modificado la expresión de genes implicados en el metabolismo de lípidos a nivel hepático. Cabe destacar que los animales tratados con CNA y EU no hay diferencias en los niveles de los marcadores bioquímicos de transaminasa, sugiriendo que estos tratamientos no han producido, aparentemente, ningún efecto hepatotóxico. De forma análoga, se ha descrito que en ratas diabéticas la administración de 80mg/kg/día durante un periodo de 30 días, una dosis doble a la usada en el presente estudio, restablece los niveles de AST, ALT y ALP, mostrando el efecto protector en la función hepática de este compuesto [238]. Además, en ratas con diabetes inducida por estreptomycin y tratadas con CNA 20 mg/kg de peso corporal durante 45 días se restablecieron los valores circulantes de AST, ALT y ALP [309].

### 4.2.3. Conclusiones

La administración de EU y CNA previene del aumento de peso corporal frente a una dieta obesogénica. Además el CNA reduce la ingesta, el tamaño de los adipocitos y mejora los niveles circulantes de insulina. Por tanto, ambos compuestos emergen como posibles compuestos bioactivos en el control de la obesidad y alteraciones asociadas. Sin embargo la combinación de EU y CNA no produce efectos sinérgicos, tal como observamos en el experimento *in vitro* (capítulo 4.1). Este hecho puede deberse a diferencia en las dosis utilizadas, ya que en el experimento *in vitro* se utilizaron mezclas equimolares de ambos compuestos, a diferencia de la combinación de dosis *in vivo*. Además, no pueden descartarse otros mecanismos asociados a la interacción global de los compuestos en el organismo y que no se limitan a un tejido en particular.



A decorative horizontal band at the bottom of the page features a blue geometric pattern of overlapping triangles and polygons, transitioning from light blue on the left to a darker blue on the right. The number '5' is positioned on the right side of this band.

# 5

## RECAPITULACIÓN

**Efesios 4:23-24** *“Ustedes deben cambiar completamente su manera de pensar, y ser honestos y santos de verdad, como corresponde a personas que Dios ha vuelto a crear, para ser como él.”*



## 5. Recapitulación

Los experimentos y la metodología de la presente tesis doctoral fueron diseñados para identificar el efecto del tratamiento de los compuestos bioactivos eugenol (EU), cinamaldehído (CNA) y su tratamiento combinado (EU+CNA) sobre la expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico, como posible ayuda en el diseño de estrategias para el control de la obesidad. Nuestros resultados aportan datos novedosos sobre la capacidad hipolipemiente de los tratamiento con EU, CNA y EU+CNA en la línea celular 3T3-L1 durante la diferenciación y adipocitos maduros. Además, la administración de estos bioactivos disminuyo la ganancia de peso corporal en ratas alimentadas con una dieta obesogénica.

En primer lugar analizamos *in vitro* el efecto del EU, CNA y su tratamiento combinado en células 3T3-L1 durante su diferenciación y en adipocitos maduros sobre la expresión de marcadores adipogénicos de genes implicados en el metabolismo lipídico. La línea celular 3T3-L1 es un modelo bien establecido en estudios de señalización ya que se ha demostrado que presentan las características propias de adipocitos. Los resultados obtenidos en este estudio sugirieron que los compuestos bioactivos EU, CNA y su tratamiento combinado EU+CNA tienen un efecto antilipogénico, sobretudo en el caso del tratamiento en adipocitos maduros pero no afectan al proceso de diferenciación o adipogénesis.

Los resultados *in vitro* en adipocitos maduros tratados durante 24 horas con diferentes concentraciones de EU, CNA y EU+CNA muestran un efecto dosis/respuesta sobre la expresión de genes implicados en el metabolismo lipídico (Capítulo 1). Los tratamientos con dosis altas de EU y CNA por separado, ejercen un efecto positivo disminuyendo la acumulación de triglicéridos, ya que los resultados de la tinción con *Oil-Red* (Figura 4.5) mostraron que estos tratamientos disminuye el contenido lipídico. Pero resaltamos que el tratamiento combinado de EU+CNA produce una disminución del contenido lipídico que se observa ya incluso con la menor dosis, esto nos permite sugerir que los dos compuestos administrados conjuntamente tienen un efecto hipolipemiente. Estos cambios en el contenido lipídico podrían ser explicados por los cambios en la expresión de genes clave, ya que, también fue evidente el efecto de los tratamientos sobre la expresión de marcadores adipogénicos y/o de genes implicados en el metabolismo lipídico (Figura 4.2, 4.3 y 4.4).

La expresión de *Pparg* aumenta durante la diferenciación (Figura 4.7), produciéndose un gran aumento a finales de la diferenciación (especialmente en T6 y T8). Recordemos que tanto *Pparg* como *Srebf1* son factores clave que inducen y controlan la diferenciación completa de los preadipocitos a los adipocitos maduros y de esta manera regulan la adipogénesis y la lipogénesis [290]. En adipocitos maduros observamos que, por sí solos, el tratamiento de EU y CNA no afectan la expresión de *Pparg* ni de *Srebf1*. Sin embargo el tratamiento combinado muestra un efecto sinérgico en la inhibición de la expresión tanto de *Pparg* como de *Srebf1*. Paralelamente a la disminución en la expresión de estos dos factores de transcripción relacionados con la adipogénesis y la lipogénesis, nuestros resultados muestran que el tratamiento individual de EU y CNA

reduce significativamente la expresión de *Fasn*; y además el tratamiento combinado de EU+CNA muestra un efecto sinérgico al inhibir de manera importante, y a menor dosis, la expresión de *Fasn* tras 24 h de tratamiento.

Se ha descrito *in vitro* que *Fasn* se expresa tanto en preadipocitos como en adipocitos maduros de la línea celular 3T3-L1 desempeñando un papel central en la lipogénesis [292, 293]. Cabe destacar, que si el tratamiento se realiza durante el proceso de diferenciación, la expresión de estos genes lipogénicos se ve disminuida tanto en los tratamientos individuales como en el tratamiento combinado, pero solo al final de la diferenciación (T8). Estos resultados sugieren que tanto el EU como el CNA ejercen sus efectos antilipogénicos en adipocitos ya maduros, o en estadios finales de maduración (Figura 4.8). Interesantemente, un estudio demostró que el extracto de las ramas de canela (*Cinnamomum Ramulus*) reduce la expresión de *Pparg*, *Srebf1* y *Fasn*, entre otros, en adipocitos 3T3-L1, a través de la activación de la señalización de insulina vía AMPK/PI3K y IRS-1 [294]. Las células 3T3-L1 aumentan su capacidad de unión a la insulina durante la diferenciación por el aumento en la síntesis de receptores de insulina [295]. Nuestros datos muestran que el tratamiento con dosis mayores a 50  $\mu$ M y menores de 400  $\mu$ M de CNA disminuye la expresión del *Insr* en adipocitos maduros (Figura 4.8). Durante la diferenciación con los tres tratamientos EU, CNA y EU+CNA disminuyen la expresión de *Insr* en el T8 al final de la diferenciación.

También hemos observado cambios en la expresión de genes relacionados con la movilización y la oxidación de ácidos grasos. CNA a dosis de 400  $\mu$ M y el tratamiento combinado de EU+CNA aumentaron la expresión *Cpt1b* (que codifica para CPT1b implicada en la oxidación de ácidos grasos) en adipocitos maduros. En el caso del tratamiento combinado, el aumento que se observa, se debe probablemente al efecto del CNA *per se*. Por tanto, ni el CNA ni el EU parece tener un efecto claro en la activación de la oxidación de ácidos grasos cuando se administra en adipocitos maduros (Figura 4.7). Por otro lado, el CNA inhibe la expresión de *Pnpla2* (que codifica para proteína ATGL, con actividad triglicérido lipasa) en adipocitos maduros (Figura 4.7 y 4.8). Cabe destacar que estos efectos no se observan en el tratamiento con EU, por lo que la disminución en los niveles del ARNm de *Pnpla2* observado en el tratamiento combinado es probablemente debida al efecto individual del CNA. Por tanto, el tratamiento con CNA parece atenuar la movilización de triglicéridos, debido a la inhibición de la transcripción de *Pnpla2*, que codifica para el primer enzima clave en la hidrólisis de los triglicéridos (Figura 4.8). Curiosamente, en células 3T3-L1 incubadas con medios de cultivo libre de insulina se ha descrito un aumento dependiente del tiempo en la expresión de *Pnpla2*; por el contrario la incubación en un medio suplementado con insulina previno este aumento y promueve la disminución en la expresión de *Pnpla2* [296]. En nuestro diseño experimental las células son tratadas con medio de cultivo que no es libre de suero y contiene insulina (5 $\mu$ g/ml) (Ver 3. Materiales y Métodos. 3.1 Cultivo *in vitro* de la línea celular 3T3-L1). Por lo que este efecto inhibitorio en la expresión de *Pnpla2* puede estar acentuado por la insulina presente en el medio.



La capacidad lipolítica de los adipocitos disminuye cuando hay obesidad, esta capacidad lipolítica mediada por la movilización de las reservas de triglicéridos es coordinada por la ATGL y la HSL (codificada por el gen *Lipe*). La expresión de *Lipe* disminuye significativamente en los adipocitos de sujetos obesos [297]. Nuestros resultados muestran que los tratamientos con EU y CNA producen una disminución en la expresión de *Lipe* al final de la diferenciación como consecuencia del tratamiento durante toda la diferenciación (Figura 4.8). Curiosamente, cuando se tratan adipocitos maduros se produce una inhibición en la expresión de *Lipe* solo a altas concentraciones con el tratamiento de EU. Sin embargo, la expresión de este gen sí que disminuye con tratamiento combinado EU+CNA durante 24 h en adipocitos maduros a dosis más bajas (Figura 4.7). Por tanto, *in vitro* parece que existe una inhibición en la movilización de los triglicéridos almacenados, que estaría en contra del efecto antilipogénico que tienen estos compuestos. Podríamos pensar que se trata de un mecanismo compensatorio, al haber menos lipogénesis y acumulación de lípidos por el tratamiento, habría una disminución de la necesidad de movilizar lípidos, o las reservas existentes se agotarían antes, por lo que se inhibiría la expresión de estos genes, al no haber más reservas que movilizar. Los resultados de la tinción *Oil-Red*, apoyarían esta hipótesis (Figura 4.5).

Quisimos ver también el efecto de la administración de EU, CNA y EU+CNA en un estudio *in vivo* en ratas albinas *Wistar* machos de 4 meses de edad para analizar el efecto de estos tratamientos frente a la exposición de una dieta obesogénica en el control del balance energético (Capítulo 2). La administración oral de EU, CNA y el tratamiento combinado EU+CNA disminuye la ganancia de peso corporal (Figura 4.11).

Tras el tratamiento, los animales del grupo WD+CNA y WD+EU+CNA presentaron una menor ingesta calórica (Figura 4.10), esto podrían explicar los cambios observados en el peso corporal de estos animales. Sin embargo, no se han observado cambios a nivel hipotalámico en la expresión del neuropéptido orexigénico *Npy*, ni en la expresión del neuropéptido anorexigénico *Pomc*. Además, los animales tratados con CNA y EU+CNA presentaron un menor incremento en porcentaje de grasa corporal comparado con el grupo WD (Figura 4.12). Así como, un menor tamaño de los adipocitos del rpTAB (Figura 4.17).

La administración de CNA a ratas alimentadas con una dieta WD produce un efecto hipoinsulinémico que podría indicar una mejora metabólica en estos animales con respecto a los animales del grupo WD. Aunque en nuestro estudio no hemos analizado los valores de las proteínas implicadas en la señalización de la insulina, los animales WD+CNA presentan un incremento en la expresión del ARNm de *Insr* en el tejido rpTAB, que podría relacionarse con una cierta mejora en la sensibilidad a la insulina en este tejido.

Los animales del grupo WD+EU, pese a tener una ingesta calórica similar al grupo WD, presentaron un menor peso corporal al final del tratamiento comparado con el grupo WD. No se han observado diferencias en los niveles de UCP1 en estos animales, por lo que el menor aumento en el peso corporal de los animales del grupo WD+EU no puede explicarse por una mayor activación en la termogénesis. Los animales del grupo

WD+EU presentaron una menor inhibición en la expresión del ARNm de *Fasn*. De hecho, el grupo WD+EU tiene niveles incrementados del ARNm de *Fasn* comparado con el grupo WD (Figura 4.20).

Aunque se ha descrito que existe una mejora en la glucemia en animales diabéticos tratados con EU [237, 238, 303], en nuestro modelo no hemos observado cambios en la glucemia. Esta diferencia podría deberse a que los efectos hipoglucemiantes del EU se observan en animales que presentan una alteración en los niveles de glucosa; los estudios citados se han realizado en ratas diabéticas. En nuestro estudio los animales no presentan alteración en los niveles glucémicos, y por tanto no veríamos el efecto de mejora que sí se observa en animales diabéticos.

Para concluir, el tratamiento combinado de compuestos bioactivos EU+CNA actúa como un potente inhibidor dosis-dependiente en la expresión de los genes lipogénicos (*Srebf1*, *Pparg* y *Fasn*) y un activador de la expresión de *Cpt1b* en adipocitos maduros *in vitro*. Esto sugiriendo un efecto antilipogénico de estos compuestos porque este efecto en la inhibición de genes clave implicados en la lipogénesis se produce en adipocitos maduros, pero no afectan al proceso de diferenciación o adipogénesis. Si bien, no se han observado cambios en la expresión de estos genes *in vivo*, en animales tratados con EU, CNA y su combinación EU+CNA.

Aunque *in vitro* se ha observado un claro ejemplo sinérgico hipolipemiante de ambos compuestos, este efecto no se observa *in vivo*. Posiblemente por que las dosis de los dos experimentos (*in vitro* e *in vivo*) no son extrapolables. El tratamiento combinado en animales presenta efectos muy similares a los observados en animales tratados sólo con CNA, por lo que deducimos que los efectos observados del tratamiento combinado se deben principalmente a los efectos del CNA.

El CNA parece ejercer un cierto efecto anorexigénico que podría explicar la menor ganancia de peso y grasa corporal. Además, la administración de CNA a ratas alimentadas con una dieta WD produce un efecto hipoinsulinémico y una mejora en la sensibilidad a la insulina en el rpTAB. Los animales del grupo WD+EU, pese a tener una ingesta calórica similar al grupo WD, presentaron un menor peso corporal al final del tratamiento comparado con el grupo WD.

Estos resultados permiten concluir que el tratamiento con EU, CNA y EU+CNA previene del aumento de peso corporal frente a una dieta obesogénica. Además el CNA reduce la ingesta de alimentos, el tamaño de los adipocitos y mejora los niveles circulantes de insulina. Los anteriores resultados aportan un mayor conocimiento sobre estos biocompuestos como ayuda en las estrategias para el control de la obesidad. Por tanto, ambos compuestos emergen como posibles compuestos bioactivos potenciales como terapia en el control de la obesidad y alteraciones asociadas.



# 6

## CONCLUSIONES

**Colosenses 2:6-7** *“Ustedes han aceptado a Jesucristo como su dueño y Señor. Por eso, deben vivir como a él le agrada. Tal como se les enseñó, confíen cada vez más en él, y vivan obedeciendo sus enseñanzas para ser cada vez mejores, y den siempre gracias a Dios.”*



## 6. Conclusiones

1. El tratamiento combinado de cinamaldehído y eugenol revela un efecto sinérgico de ambos bioactivos en la inhibición dosis-respuesta de la expresión de los genes lipogénicos (*Srebf1*, *Pparg*, *Fasn*), sugiriendo un efecto antilipogénico *in vitro* de estos compuestos.
2. El tratamiento *in vitro* con eugenol (400  $\mu$ M) disminuye la expresión del ARNm de *Fasn* (gen lipogénico) y *Lipe* (gen relacionado con la movilización de lípidos) y el tratamiento con CNA (400  $\mu$ M) que disminuye la expresión de *Fasn* (gen lipogénico) y aumenta la expresión de *Cpt1b* (gen relacionado con la oxidación de ácidos grasos) en comparación con el tratamiento de control.
3. Los compuestos bioactivos cinamaldehído, eugenol y su tratamiento combinado afectan la expresión de genes clave implicados en el metabolismo lipídico en adipocitos maduros de la línea celular 3T3-L1, pero no afectan al proceso de diferenciación o adipogénesis.
4. La administración de cinamaldehído (250 mg/kg/día) a animales alimentados con dieta *western diet*, previene del incremento en el peso y el porcentaje de grasa asociado a la ingesta de la dieta obesogénica. Además, el tamaño de los adipocitos en el tejido adiposo blanco retroperitoneal es menor que en animales *western diet*, y similar a los adipocitos de los animales del grupo control.
5. El cinamaldehído parece ejercer un cierto efecto anorexigénico, ya que los animales tratados con cinamaldehído presentan una menor ingesta energética, comparada con los animales del grupo *western diet*, que podría explicar la menor ganancia de peso.
6. La administración de cinamaldehído a ratas alimentadas con una dieta *western diet* mejora los niveles circulantes de insulina, lo que podría indicar una mejora metabólica en estos animales con respecto a los animales del grupo *western diet*.
7. Los animales alimentados con una dieta *western diet* y tratados con eugenol (40mg/kg/día) presentaron un menor incremento en el peso corporal que los animales del grupo *western diet*, pese a tener una ingesta calórica similar. El menor aumento en el peso corporal de los animales del grupo tratado con eugenol no puede explicarse por una mayor activación en la termogénesis.
8. Los efecto sinérgico del EU+CNA que se observa *in vitro* no se reproduce en el estudio *in vivo* con la dosis estudiada (combinación no equimolar).
9. Ambos compuestos, cinamaldehído y eugenol emergen como posibles compuestos bioactivos en el control de la obesidad y alteraciones asociadas.





# 7

## REFERENCIAS

**Filipenses 4:8** *“Por último, hermanos, piensen en todo lo verdadero, en todo lo que es digno de respeto, en todo lo recto, en todo lo puro, en todo lo agradable, en todo lo que tiene buena fama. Piensen en toda clase de virtudes, en todo lo que merece alabanza.”*





## 7. Referencias

- [1] Abarca-GA, L., Abdeen, Z.A., Abdul Hamid, Z., Abu-Rmeileh, N.M., et al., Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128,9 million children, adolescents, and adults. *Www.thelancet.com* 2017, 390.
- [2] Ells, L.J., Demaio, A., Farpour-Lambert, N., Diet, genes, and obesity. *BMJ* 2018, 360, k7.
- [3] Goodarzi, M.O., Genetics of obesity: what genetic association studies have taught us about the biology of obesity and its complications. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2018, 6, 223–236.
- [4] Rippe, J., Crossley, S., Ringer, R., Obesity as a chronic disease: Modern medical and lifestyle management. *J. Am. Diet. Assoc.* 1998, 98, S9–S15.
- [5] Wang, Y.C., McPherson, K., Marsh, T., Gortmaker, S.L., et al., Health and economic burden of the projected obesity trends in the USA and the UK. *Lancet* 2011, 378, 815–825.
- [6] Pan, A., Hu, F.B., Effects of carbohydrates on satiety: differences between liquid and solid food. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 2011, 14, 385–390.
- [7] Te Morenga, L., Mallard, S., Mann, J., Dietary sugars and body weight: systematic review and meta-analyses of randomised controlled trials and cohort studies. *BMJ* 2012, 346, e7492.
- [8] Rössner, S., Obesity: The disease of the twenty-first century. *Int. J. Obes.* 2002, 26, S2–S4.
- [9] King, D., The future challenge of obesity. *Lancet* 2011, 378, 743–744.
- [10] OECD, Obesity Update 2017. *Organ. Econ. Co-Operation Dev.* 2017.
- [11] Blundell, J., Baker, J., Boyland, E., Blaak, E., et al., Variations in the Prevalence of Obesity among European Countries, and a Consideration of Possible Causes. *Obes. Facts* 2017, 10, 25–37.
- [12] WHO, Adolescent obesity and related behaviours : trends and inequalities in the WHO region 2002-2014. *Www.euro.who.int* 2017.
- [13] Gale, S., Castracane, V., Mantzoros, C., Energy homeostasis, obesity and eating disorders: recent advances in endocrinology. *J Nutr* 2004, 134, 295–298.
- [14] Karastergiou, K., Mohamed-Ali, V., The autocrine and paracrine roles of adipokines. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2010, 318, 69–78.
- [15] Falcão-Pires, I., Castro-Chaves, P., Miranda-Silva, D., Lourenço, A.P., et al.,

- Physiological, pathological and potential therapeutic roles of adipokines. *Drug Discov. Today* 2012, 17, 880–9.
- [16] Greenberg, A., Obin, M., Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. *Am J Clin Nutr* 2006, 83, 461–465.
- [17] Coelho, M., Oliveira, T., Fernandes, R., Biochemistry of adipose tissue: An endocrine organ. *Arch. Med. Sci.* 2013, 9, 191–200.
- [18] Chapman, N.M., Chi, H., Dietary Fat Inflames CD4+T Cell Memory in Obesity. *Cell Metab.* 2017, 25, 490–492.
- [19] Lochner, M., Berod, L., Sparwasser, T., Fatty acid metabolism in the regulation of T cell function. *Trends Immunol.* 2015, 36, 81–91.
- [20] Mauro, C., Smith, J., Cucchi, D., Coe, D., et al., Obesity-Induced Metabolic Stress Leads to Biased Effector Memory CD4+T Cell Differentiation via PI3K p110 $\delta$ -Akt-Mediated Signals. *Cell Metab.* 2017, 25, 593–609.
- [21] Botchlett, R., Woo, S., Liu, M., Pei, Y., et al., Nutritional approaches for managing obesity-associated metabolic diseases. *J. Endocrinol.* 2017, 233, R145–R171.
- [22] Izaola, O., de Luis, D., Sajoux, I., Domingo, J., et al., Inflamación y obesidad (Lipoinflamación). *Nutr. Hosp.* 2015, 31, 2352–2358.
- [23] Green, W.D., Beck, M.A., Obesity altered T cell metabolism and the response to infection. *Curr. Opin. Immunol.* 2017, 46, 1–7.
- [24] Chen, L., Chen, R., Wang, H., Liang, F., Mechanisms Linking Inflammation to Insulin Resistance. *Int. J. Endocrinol.* 2015, 2015, 1–9.
- [25] Ellulu, M., Patimah, I., Khaza'ai, H., Rahmat, A., et al., Atherosclerotic cardiovascular disease: a review of initiators and protective factors. *Inflammopharmacology* 2016, 24, 1–10.
- [26] Lovren, F., Teoh, H., Verma, S., Obesity and Atherosclerosis: Mechanistic Insights. *Can. J. Cardiol.* 2015, 31, 177–183.
- [27] Buttar, H., Li, T., Ravi, N., Prevention of cardiovascular diseases: Role of exercise, dietary interventions, obesity and smoking cessation. *Exp Clin Cardiol* 2005, 10, 229–249.
- [28] Bastien, M., Poirier, P., Lemieux, I., Després, J.-P., Overview of Epidemiology and Contribution of Obesity to Cardiovascular Disease. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 2014, 56, 369–381.
- [29] Blokhin, I.O., Lentz, S.R., Mechanisms of thrombosis in obesity. *Curr. Opin. Hematol.* 2013, 20, 437–44.

- [30] Xi, B., He, D., Hu, Y., Zhou, D., Prevalence of metabolic syndrome and its influencing factors among the Chinese adults: The China Health and Nutrition Survey in 2009. *Prev Med* 2013, 57, 867–871.
- [31] Vincent, H., Taylor, A., Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int. J. Obes.* 2006, 30, 400–418.
- [32] Yusuf, S., Hawken, S., Ounpuu, S., Dans, T., et al., Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case control study. *Lancet* 2004, 364, 937–952.
- [33] de la Iglesia, R., Loria-Kohen, V., Zulet, M., Martinez, J., et al., Dietary strategies implicated in the prevention and treatment of metabolic syndrome. *Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17, 1–21.
- [34] Reilly, J., Methven, E., McDowell, Z., Hacking, B., et al., Health consequences of obesity. *Arch. Dis. Child.* 2003, 88, 748–752.
- [35] Palou, A., Serra, F., Bonet, M.L., Picó, C., Obesity: molecular bases of a multifactorial problem. *Eur. J. Nutr.* 2000, 39, 127–44.
- [36] López, J., Genética en la obesidad. *Endocrinol. Y Nutr.* 2004, 12, S96–S101.
- [37] Arroyo, P., La alimentación en la evolución del hombre : su relación con el riesgo de enfermedades crónico degenerativas. *Bol Med Hosp Infant Mex* 2008, 65, 1–10.
- [38] Reynés, B., Palou, M., Palou, A., Gene expression modulation of lipid and central energetic metabolism related genes by high-fat diet intake in the main homeostatic tissues. *Food Funct.* 2017, 8, 629–650.
- [39] Willyard, C., Heritability: The family roots of obesity. *Nature* 2014, 508, S58–S60.
- [40] Herrera, B., Lindgren, C., The Genetics of Obesity. *Curr Diab Rep* 2010, 10, 498–505.
- [41] Hegele, R., Monogenic forms of insulin resistance: Apertures that expose the common metabolic syndrome. *Trends Endocrinol. Metab.* 2003, 14, 371–377.
- [42] McKusick, V., Mendelian Inheritance in Man and Its Online Version, OMIM. *Am. J. Hum. Genet.* 2007, 80, 588–604.
- [43] Calva, A., González, I., Bujaidar, E., Espinosa, E., en el desarrollo de la obesidad Review of the main genes involved in the development of obesity. *Rev Mex C Farm* 2011, 42, 26–38.
- [44] Clement, K., Vaisse, C., Lahlou, N., Cabrol, S., et al., A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* 1998, 392, 398–401.

- [45] Farooqi, I., Matarese, G., Lord, G., Keogh, J., et al., Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J. Clin. Invest.* 2002, *110*, 1093–1103.
- [46] Doulla, M., McIntyre, A.D., Hegele, R.A., Gallego, P.H., A novel MC4R mutation associated with childhood-onset obesity: A case report. *Paediatr. Child Health* 2014, *19*, 515–8.
- [47] Bradfield, J., Taal, H., Timpson, N., A genome-wide association meta-analysis identifies new childhood obesity loci. *Nat. Genet* 2012, *44*, 526–531.
- [48] Speliotes, E., Willer, C., Berndt, S., Monda, K., et al., Association analyses of 249,796 individuals reveal eighteen new loci associated with body mass index. *Nat. Genet.* 2010, *42*, 937–948.
- [49] Thorleifsson, G., Walters, G., Gudbjartsson, D., Steinthorsdottir, V., et al., Genome-wide association yields new sequence variants at seven loci that associate with measures of obesity. *Nat. Genet.* 2009, *41*, 18–24.
- [50] Willer, C., Speliotes, E., Loos, R., Li, S., et al., Six new loci associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation. *Nat. Genet.* 2009, *41*, 25.
- [51] Frayling, T., Timpson, N., Weedon, M., Freathy, R., et al., A Common Variant in the FTO Gene Is Associated with Body Mass Index and Predisposes to Childhood and Adult Obesity. *Science (80)*. 2007, *316*, 889–894.
- [52] Karra, E., O'Daly, O., Choudhury, A., Yousseif, A., et al., A link between FTO, ghrelin, and impaired brain food-cue responsivity. *J. Clin. Invest.* 2013, *123*, 3539–3551.
- [53] Switonski, M., Mankowska, M., Salamon, S., Family of melanocortin receptor (MCR) genes in mammals—mutations, polymorphisms and phenotypic effects. *J. Appl. Genet.* 2013, *54*, 461–472.
- [54] Choquet, H., Meyre, D., Genetics of Obesity: What have we Learned? *Curr. Genomics* 2011, *12*, 169–179.
- [55] Lauria, F., Siani, A., Picó, C., Ahrens, W., et al., A common variant and the transcript levels of MC4R gene are associated with adiposity in children: The IDEFICS study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2016, *101*, 4229–4236.
- [56] Varela, G., Ávila, J., Ruiz, E., Energy Balance, a new paradigm and methodological issues: the ANIBES study in Spain. *Nutr. Hosp.* 2015, *31*, 101–112.
- [57] Hill, J., Wyatt, H., Peters, J., Energy Balance and Obesity. *Circulation* 2013, *126*, 126–132.
- [58] Rivera, J., Hernández, M., Aguilar, C., Vadillo, F., et al., Obesidad en México:

- recomendaciones para una política de Estado. *Univ. Nac. Autónoma México* 2012, 1–536.
- [59] Piernas, C., Barquera, S., Popkin, B., Current patterns of water and beverage consumption among Mexican children and adolescents aged 1–18 years: analysis of the Mexican National Health and Nutrition Survey 2012. *Public Health Nutr.* 2014, *17*, 2166–2175.
- [60] Barquera, S., Campos, I., Rivera, J., Mexico attempts to tackle obesity: The process, results, push backs and future challenges. *Obes. Rev.* 2013, *14*, 69–78.
- [61] Freire, W., Belmont, P., Mendieta, M., Saenz, K., Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. *ENSANUT* 2012, 1–772.
- [62] Church, T., Thomas, D., Tudor-Locke, C., Katzmarzyk, P., et al., Trends over 5 decades in U.S. occupation-related physical activity and their associations with obesity. *PLoS One* 2011, *6*, 1–7.
- [63] Borodulin, K., Harald, K., Jousilahti, P., Laatikainen, T., et al., Time trends in physical activity from 1982 to 2012 in Finland. *Scand. J. Med. Sci. Sport.* 2016, *26*, 93–100.
- [64] Smith, A., Obesity and Sedentary Lifestyles. *Cardiovasc. Dis. Women* 2012, *39*, 224–228.
- [65] Wiklund, P., The role of physical activity and exercise in obesity and weight management: Time for critical appraisal. *J. Sport Heal. Sci.* 2016, *5*, 151–154.
- [66] Vickers, M., Developmental programming of the metabolic syndrome - critical windows for intervention. *World J. Diabetes* 2011, *2*, 137–148.
- [67] Sedaghat, K., Zahediasl, S., Ghasemi, A., Intrauterine programming. *Iran. J. Basic Med. Sci.* 2015, *18*, 212–220.
- [68] Martins, V., Toledo Florêncio, T., Grillo, L., Franco, M., et al., Long-lasting effects of undernutrition. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2011, *8*, 1817–1846.
- [69] Barker, D., The fetal and infant origins of adult disease. *Bmj* 1990, *301*, 1111.
- [70] Boo, H., Harding, J., The developmental origins of adult disease (Barker) hypothesis. *Aust. New Zeal. J. Obstet. Gynaecol.* 2006, *46*, 4–14.
- [71] Calkins, K., Devaskar, S., Fetal Origins of Adult Disease. *Curr Probl Pediatr Adolesc Heal. Care* 2011, *41*, 158–176.
- [72] Desai, M., Beall, M., Ross, M., Developmental origins of obesity: Programmed Adipogenesis. *Curr Diab Rep* 2013, *13*, 27–33.
- [73] Alfaradhi, M., Ozanne, S., Developmental programming in response to maternal overnutrition. *Front. Genet.* 2011, *2*, 1–13.

- [74] Rinaudo, P., Wang, E., Fetal Programming and Metabolic Syndrome. *Annu Rev Physiol* 2012, 74, 107–130.
- [75] Hay, W., Recent observations on the regulation of fetal metabolism by glucose. *J. Physiol.* 2006, 572, 17–24.
- [76] Wallace, J., Bourke, D., Aitken, R., Milne, J., et al., Placental glucose transport in growth-restricted pregnancies induced by overnourishing adolescent sheep. *J. Physiol.* 2002, 547, 85–94.
- [77] Picó, C., Palou, A., Perinatal programming of obesity: an introduction to the topic. *Front. Physiol.* 2013, 4, 1–3.
- [78] Picó, C., Palou, M., Priego, T., Sánchez, J., et al., Metabolic programming of obesity by energy restriction during the perinatal period: Different outcomes depending on gender and period, type and severity of restriction. *Front. Physiol.* 2012, 3 NOV, 1–14.
- [79] Palou, M., Priego, T., Sanchez, J., Palou, A., et al., Sexual dimorphism in the lasting effects of moderate caloric restriction during gestation on energy homeostasis in rats is related with fetal programming of insulin and leptin resistance. *Nutr. Metab. (Lond)*. 2010, 7, 69.
- [80] Palou, M., Konieczna, J., Torrens, J., Sánchez, J., et al., Impaired insulin and leptin sensitivity in the offspring of moderate caloric-restricted dams during gestation is early programmed. *J. Nutr. Biochem.* 2012, 23, 1627–1639.
- [81] García, A., Palou, M., Priego, T., Sánchez, J., et al., Moderate caloric restriction during gestation results in lower arcuate nucleus NPY- and  $\alpha$ MSH-neurons and impairs hypothalamic response to fed/fasting conditions in weaned rats. *Diabetes, Obes. Metab.* 2010, 12, 403–413.
- [82] Palou, M., Konieczna, J., Torrens, J.M., Sanchez, J., et al., Impaired insulin and leptin sensitivity in the offspring of moderate caloric-restricted dams during gestation is early programmed. *J Nutr Biochem* 2012.
- [83] Konieczna, J., Sánchez, J., Palou, M., Picó, C., et al., Blood cell transcriptomic-based early biomarkers of adverse programming effects of gestational calorie restriction and their reversibility by leptin supplementation. *Sci. Rep.* 2015, 5.
- [84] Konieczna, J., Palou, M., Sánchez, J., Picó, C., et al., Leptin intake in suckling rats restores altered T3 levels and markers of adipose tissue sympathetic drive and function caused by gestational calorie restriction. *Int. J. Obes.* 2015, 39, 959–966.
- [85] Szostaczuk, N., Priego, T., Palou, M., Palou, A., et al., Oral leptin supplementation throughout lactation in rats prevents later metabolic alterations caused by gestational calorie restriction. *Int. J. Obes.* 2017, 41, 360–371.
- [86] Murakami, E., Shionoya, T., Komenoi, S., Suzuki, Y., et al., Cloning and

- characterization of novel testis-Specific diacylglycerol kinase  $\eta$  splice varMurakami, Eri, Takao Shionoya, Suguru Komenoi, Yuji Suzuki, and Fumio Sakane. 2016. "Cloning and Characterization of Novel Testis-Specific Diacylglycerol Kinase  $\eta$  Spli. *PLoS One* 2016, *11*.
- [87] Sánchez, J., Oliver, P., Miralles, O., Ceresi, E., et al., Leptin orally supplied to neonate rats is directly uptaken by the immature stomach and may regulate short-term feeding. *Endocrinology* 2005, *146*, 2575–2582.
- [88] Picó, C., Oliver, P., Sánchez, J., Miralles, O., et al., The intake of physiological doses of leptin during lactation in rats prevents obesity in later life. *Int. J. Obes.* 2007, *31*, 1199–1209.
- [89] Sánchez, J., Priego, T., Palou, M., Tobaruela, A., et al., Oral supplementation with physiological doses of leptin during lactation in rats improves insulin sensitivity and affects food preferences later in life. *Endocrinology* 2008, *149*, 733–740.
- [90] Priego, T., Sánchez, J., Palou, A., Picó, C., Leptin intake during the suckling period improves the metabolic response of adipose tissue to a high-fat diet. *Int. J. Obes.* 2010, *34*, 809–819.
- [91] Palou, A., Picó, C., Leptin intake during lactation prevents obesity and affects food intake and food preferences in later life. *Appetite* 2009, *52*, 249–252.
- [92] Palou, M., Priego, T., Sánchez, J., Torrens, J., et al., Moderate caloric restriction in lactating rats protects offspring against obesity and insulin resistance in later life. *Endocrinology* 2010, *151*, 1030–1041.
- [93] Torrens, J., Konieczna, J., Palou, M., Sánchez, J., et al., Early biomarkers identified in a rat model of a healthier phenotype based on early postnatal dietary intervention may predict the response to an obesogenic environment in adulthood. *J. Nutr. Biochem.* 2014, *25*, 208–218.
- [94] Prior, L., Armitage, J., Neonatal overfeeding leads to developmental programming of adult obesity: You are what you ate. *J. Physiol.* 2009, *587*, 2419.
- [95] Choi, S., Friso, S., Epigenetics: A New Bridge between Nutrition and Health. *Adv Nutr* 2010, *1*, 8–16.
- [96] Martin, M., Ozanne, S., Early life programming of obesity. *Dev. Period Med.* 2013, *XVII*, 7–12.
- [97] Plagemann, A., Harder, T., Brunn, M., Harder, A., et al., Hypothalamic proopiomelanocortin promoter methylation becomes altered by early overfeeding: An epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome. *J. Physiol.* 2009, *587*, 4963–4976.
- [98] Levin, B., Metabolic imprinting: critical impact of the perinatal environment on the regulation of energy homeostasis. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 2006,

361, 1107–1121.

- [99] Pomar, C., Van Nes, R., Sánchez, J., Picó, C., et al., Maternal consumption of a cafeteria diet during lactation in rats leads the offspring to a thin-outside-fat-inside phenotype. *Int. J. Obes.* 2017, *41*, 1279–1287.
- [100] Castro, H., Pomar, C., Picó, C., Sánchez, J., et al., Cafeteria diet overfeeding in young male rats impairs the adaptive response to fed/fasted conditions and increases adiposity independent of body weight. *Int. J. Obes.* 2015, *39*, 430–437.
- [101] Camp, H.S., Ren, D., Leff, T., Adipogenesis and fat cell function in obesity and diabetes. *Trends Mol. Med.* 2002, *8*, 442–447.
- [102] Giralt, M., Villarroya, F., White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions? *Endocrinology* 2013, *154*, 2992–3000.
- [103] Cannon, B., Nedergaard, J.A.N., Brown Adipose Tissue : Function and Physiological Significance. *Physiol. Rev.* 2004, *84*, 277–337.
- [104] Rosen, E.D., Walkey, C.J., Puigserver, P., Spiegelman, B.M., Transcriptional regulation of adipogenesis Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev.* 2000, *14*, 1293–1307.
- [105] Luo, L., Liu, M., Adipose tissue in control of metabolism. *J. Endocrinol.* 2016, *231*, R77–R99.
- [106] Moseti, D., Regassa, A., Kim, W., Molecular regulation of adipogenesis and potential anti-adipogenic bioactive molecules. *Int. J. Mol. Sci.* 2016, *17*, 1–24.
- [107] Stumvoll, M., Häring, H., The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 Pro12Ala polymorphism. *Diabetes* 2002, *51*, 2341–7.
- [108] Lefterova, M., Lazar, M., New developments in adipogenesis. *Trends Endocrinol. Metab.* 2009, *20*, 107–114.
- [109] Carobbio, S., Pellegrinelli, V., Vidal-Puig, A., Adipose Tissue Function and Expandability as Determinants of Lipotoxicity and the Metabolic Syndrome, in: *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2017, pp. 161–196.
- [110] Lopez-Mejia, I., Castillo-Armengol, J., Lagarrigue, S., Fajas, L., Role of cell cycle regulators in adipose tissue and whole body energy homeostasis. *Cell. Mol. Life Sci.* 2017, 1–13.
- [111] Lim, S., Kaldis, P., Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development* 2013, *140*, 3079–3093.
- [112] Zilfou, J., Lowe, S., Tumor suppressive functions of p53. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2009, *1*, 1–12.
- [113] Bertoli, C., Skotheim, J., Bruin, R., Control of cell cycle transcription during G1



- and S phases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2013, *14*, 518–528.
- [114] Malumbres, M., Barbacid, M., Cell cycle, CDKs and cancer: A changing paradigm. *Nat. Rev. Cancer* 2009, *9*, 153–166.
- [115] Chen, P., Riley, D., Chen, Y., Lee, W., Retinoblastoma protein positively regulates terminal adipocyte differentiation through direct interaction with C / EBPs. *Genes Dev.* 1996, *10*, 2794–2804.
- [116] Goupille, O., Penglong, T., Kadri, Z., Granger-Locatelli, M., et al., The LXCXE Retinoblastoma Protein-Binding Motif of FOG-2 Regulates Adipogenesis. *Cell Rep.* 2017, *21*, 3524–3535.
- [117] Wabitsch, M., Brenner, R., Melzner, I., Braun, M., et al., Characterization of a human preadipocyte cell strain with high capacity for adipose differentiation. *Int. J. Obes.* 2001, *25*, 8–15.
- [118] Puigserver, P., Nadal-Ginard, B., Palou, A., Expression and interaction of C/EBPalpha adipogenic transcription factor and retinoblastoma protein in adipocytes during differentiation. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1994, *18*, 113.
- [119] Puigserver, P., Vázquez, F., Bonet, M.L., Picó, C., et al., *In vitro* and *in vivo* induction of brown adipocyte uncoupling protein (thermogenin) by retinoic acid. *Biochem. J.* 1996, *317* ( Pt 3), 827–33.
- [120] Moreno-Navarrete, J.M., Petrov, P., Serrano, M., Ortega, F., et al., Decreased RB1 mRNA, protein, and activity reflect obesity-induced altered adipogenic capacity in human adipose tissue. *Diabetes* 2013, *62*, 1923–31.
- [121] Couillard, C., Mauriège, P., Imbeault, P., Prud'homme, D., et al., Hyperleptinemia is more closely associated with adipose cell hypertrophy than with adipose tissue hyperplasia. *Int. J. Obes.* 2000, *24*, 782–788.
- [122] Blaak, E., Gender differences in fat metabolism. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 2001, *4*, 499–502.
- [123] Spalding, K., Arner, E., Westermark, P., Bernard, S., et al., Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 2008, *453*, 783–787.
- [124] Sarantopoulos, C., Banyard, D., Ziegler, M., Sun, B., et al., Elucidating the Preadipocyte and Its Role in Adipocyte Formation: a Comprehensive Review. *Stem Cell Rev. Reports* 2017, *0*, 1–16.
- [125] Rodeheffer, M.S., Birsoy, K., Friedman, J.M., Identification of White Adipocyte Progenitor Cells *In Vivo*. *Cell* 2008, *135*, 240–249.
- [126] Vegiopoulos, A., Rohm, M., Herzig, S., Adipose tissue: between the extremes. *EMBO J.* 2017, *36*, 1999–2017.
- [127] Moreno-Indias, I., Tinahones, F.J., Impaired adipose tissue expandability and

- lipogenic capacities as ones of the main causes of metabolic disorders. *J. Diabetes Res.* 2015, 1–12.
- [128] Blüher, M., Adipose tissue dysfunction contributes to obesity related metabolic diseases. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2013, 27, 163–177.
- [129] Hoffstedt, J., Arner, E., Wahrenberg, H., Andersson, D.P., et al., Regional impact of adipose tissue morphology on the metabolic profile in morbid obesity. *Diabetologia* 2010, 53, 2496–2503.
- [130] Klöting, N., Fasshauer, M., Dietrich, A., Kovacs, P., et al., Insulin-sensitive obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010, 1, 506–515.
- [131] Haczeyni, F., Bell-Anderson, K.S., Farrell, G.C., Causes and mechanisms of adipocyte enlargement and adipose expansion. *Obes. Rev.* 2017, 1–15.
- [132] Guilherme, A., Virbasius, J. V, Vishwajeet, P., Czech, M.P., Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat. Rev. Mol. ...* 2008, 9, 367–377.
- [133] Kim, J.I., Huh, J.Y., Sohn, J.H., Choe, S.S., et al., Lipid-Overloaded Enlarged Adipocytes Provoke Insulin Resistance Independent of Inflammation. *Mol. Cell. Biol.* 2015, 35, 1686–1699.
- [134] Unger, R.H., Scherer, P.E., Gluttony, sloth and the metabolic syndrome: A roadmap to lipotoxicity. *Trends Endocrinol. Metab.* 2010, 21, 345–352.
- [135] Donnelly, K.L., Smith, C.I., Schwarzenberg, S.J., Jessurun, J., et al., Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J. Clin. Invest.* 2005, 115, 1343–1351.
- [136] Kolovou, G., Anagnostopoulou, K., Cokkinos, D., Pathophysiology of dyslipidaemia in the metabolic syndrome. *Postgrad. Med. J.* 2005, 81, 358–366.
- [137] Wang, T., Liu, M., Portincasa, P., Wang, D., New insights into the molecular mechanism of intestinal fatty acid absorption. *Eur J Clin Invest.* 2013, 43, 1203–1223.
- [138] Mahmood, H., Intestinal Lipid Absorption and Lipoprotein Formation. *Curr Opin Lipidol.* 2014, 25, 200–206.
- [139] Wang, D.Q.-H., Cohen, D.E., Carey, M.C., Biliary lipids and cholesterol gallstone disease. *J. Lipid Res.* 2009, 50, S406–S411.
- [140] Pan, X., Hussain, M., Gut triglyceride production. *Biochim Biophys Acta* 2012, 1825, 727–735.
- [141] Rogers, M.A., Liu, J., Song, B.L., Li, B.L., et al., Acyl-CoA:cholesterol acyltransferases (ACATs/SOATs): Enzymes with multiple sterols as substrates and as activators. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2015, 151, 102–107.

- [142] Cianflone, K., Paglialunga, S., Regulation of fatty acid transport and storage: influence of acylation-stimulating protein. *Scand. J. Food Nutr.* 2006, *50*, 92–98.
- [143] Franssen, R., Visser, M., Kuivenhoven, J., Kastelein, J., et al., Role of lipoprotein lipase in triglyceride metabolism: potential therapeutic target. *Future Lipidol.* 2008, *3*, 385–397.
- [144] Sukonina, V., Lookene, A., Olivecrona, T., Olivecrona, G., Angiotensin-like protein 4 converts lipoprotein lipase to inactive monomers and modulates lipase activity in adipose tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2006, *103*, 17450–17455.
- [145] Chatterjee, C., Sparks, D., Hepatic lipase, high density lipoproteins, and hypertriglyceridemia. *Am. J. Pathol.* 2011, *178*, 1429–1433.
- [146] Soutar, A., Regulation of the LDL receptor in familial hypercholesterolemia. *Clin. Lipidol.* 2009, *4*, 755–765.
- [147] Harmel, A., Berra, K., Impact of the new National Cholesterol Education Program (NCEP) guidelines on patient management. *J Am Acad Nurse Pr.* 2003, *15*, 350–360.
- [148] O'Donnella, C., Elosua, R., Cardiovascular Risk Factors. Insights From Framingham Heart Study. *Rev Esp Cardiol* 2008, *61*, 299–310.
- [149] Riches, K., Porter, K.E., Lipoprotein(a): Cellular effects and molecular mechanisms. *Cholesterol* 2012, 1–11.
- [150] Ariyo, A., Thach, C., Tracy, R., Lp(a) Lipoprotein, Vascular Disease, and Mortality in the Elderly. *N. Engl. J. Med.* 2003, *349*, 2108–2115.
- [151] Hoover, J., Huang, M., Lipoprotein(a) metabolism: Potential sites for therapeutic targets. *Metabolism.* 2013, *62*, 479–491.
- [152] Carmena, R., Duriez, P., Fruchart, J., Atherogenic Lipoprotein Particles in Atherosclerosis. *Circulation* 2004, *109*, III-2-III-7.
- [153] Gordon, S., Hofmann, S., Askew, D., Davidson, W., High density lipoprotein: it's not just about lipid transport anymore. *Trends Endocrinol Metab* 2011, *22*, 9–15.
- [154] Brace, R., Sorrenson, B., Sviridov, D., McCormick, S., A gel-based method for purification of apolipoprotein A-I from small volumes of plasma. *J. Lipid Res.* 2010, *51*, 3370–3376.
- [155] Rousset, X., Vaisman, B., Amar, M., Sethi, A., et al., Lecithin:Cholesterol Acyltransferase: From Biochemistry to Role in Cardiovascular Disease. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2006, *15*, 1–26.
- [156] Yazdanyar, A., Yeang, C., Jiang, X., Role of phospholipid transfer protein in high-density lipoprotein-mediated reverse cholesterol transport. *Curr.*

- Atheroscler. Rep.* 2011, 13, 242–248.
- [157] Reshef, L., Olswang, Y., Cassuto, H., Blum, B., et al., Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 30413–30416.
- [158] Kuriyama, H., Liang, G., Engelking, L., Horton, J., et al., Compensatory increase in fatty acid synthesis in adipose tissue of mice with conditional deficiency of SCAP in liver. *Cell Metab.* 2005, 1, 41–51.
- [159] Yahagi, N., Shimano, H., Hasty, A.H., Matsuzaka, T., et al., Absence of sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1) ameliorates fatty livers but not obesity or insulin resistance in Lepob/Lepob mice. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 19353–19357.
- [160] Jensen, A., Semenkovich, C., Fatty acid synthase and liver triglyceride metabolism: housekeeper or messenger? *Biochim Biophys Acta* 2012, 1821, 747–753.
- [161] Goldberg, I.J., Eckel, R.H., Abumrad, N.A., Regulation of fatty acid uptake into tissues: lipoprotein lipase- and CD36-mediated pathways. *J. Lipid Res.* 2009, 50, S86–S90.
- [162] Zhao, W., Hu, S., Yu, K., Wang, H., et al., Lipoprotein lipase, tissue expression and effects on genes related to fatty acid synthesis in goat mammary epithelial cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2014, 15, 22757–22771.
- [163] Townsend, K., Tseng, Y., Brown Fat Fuel Utilization and Thermogenesis. *Trends Endocrinol Metab* 2014, 25, 168–177.
- [164] Ricart, D., Cejudo, P., Peinado, J., López, M., et al., Changes in lipoprotein lipase modulate tissue energy supply during stress. *J. Appl. Physiol.* 2005, 99, 1343–1351.
- [165] Botion, L., The influence of fasting/refeeding on the lipoprotein lipase activity of adipose tissue and muscle. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 2001, 34, 1411–1414.
- [166] Ferland, A., Chteau-Degat, M., Hernandez, T., Eckel, R., Tissue-specific responses of lipoprotein lipase to dietary macronutrient composition as a predictor of weight gain over 4 years. *Obesity* 2012, 20, 1006–1011.
- [167] Duncan, R.E., Ahmadian, M., Jaworski, K., Sarkadi-Nagy, E., et al., Regulation of lipolysis in adipocytes. *Annu Rev Nutr* 2007, 27, 79–101.
- [168] Bolsoni, A., Alonso, M., Lipolysis and lipases in white adipose tissue – An update. *Arch. Endocrinol. Metab.* 2015, 59, 335–342.
- [169] Morigny, P., Houssier, M., Mouisel, E., Langin, D., Adipocyte lipolysis and insulin resistance. *Biochimie* 2016, 125, 259–266.
- [170] Young, S., Zechner, R., Biochemistry and pathophysiology of intravascular and

- intracellular lipolysis. *Genes Dev.* 2013, 27, 459–484.
- [171] Zimmermann, R., Haemmerle, G., Schoiswohl, G., Birner-gruenberger, R., et al., Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science (80)*. 2004, 306, 1383–1386.
- [172] Grace, S., Meeks, M., Chen, Y., Cornwell, M., et al., Adipose Triglyceride Lipase (ATGL) Expression Is Associated with Adiposity and Tumor Stromal Proliferation in Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Anticancer Res.* 2017, 37, 699–704.
- [173] Kraemer, F., Shen, W., Hormone-sensitive lipase: control of intracellular tri-(di)acylglycerol and cholesteryl ester hydrolysis. *J. Lipid Res.* 2002, 43, 1585–1594.
- [174] Fowler, C., Monoacylglycerol lipase - A target for drug development? *Br. J. Pharmacol.* 2012, 166, 1568–1585.
- [175] Ohlhorst, S., Russell, R., Bier, D., Klurfeld, D., et al., Nutrition research to affect food and a healthy lifespan. *Adv Nutr* 2013, 4, 579–584.
- [176] Fenech, M., El-Sohemy, A., Cahill, L., Ferguson, L., et al., Nutrigenetics and nutrigenomics: Viewpoints on the current status and applications in nutrition research and practice. *J. Nutrigenet. Nutrigenomics* 2011, 4, 69–89.
- [177] Cencic, A., Chingwaru, W., The role of functional foods, nutraceuticals, and food supplements in intestinal health. *Nutrients* 2010, 2, 611–625.
- [178] Tung, Y., Hsieh, P., Pan, M., Ho, C., Cellular models for the evaluation of the antiobesity effect of selected phytochemicals from food and herbs. *J. Food Drug Anal.* 2017, 25, 100–110.
- [179] Cragg, G., Newman, D., Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. *Pure Appl. Chem.* 2005, 77, 7–24.
- [180] Dias, D., Urban, S., Roessner, U., A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. *Metabolites* 2012, 2, 303–336.
- [181] Smith, R., Let food be thy medicine. *Bmj* 2004, 324, 1185.
- [182] Pan, S., Zhou, S., Gao, S., Yu, Z., et al., New Perspectives on How to Discover Drugs from Herbal Medicines : CAM's Outstanding Contribution to Modern Therapeutics. *Evidence-Based Complement. Altern.* 2013, 2013, 1–25.
- [183] Normile, D., The New Face of Traditional Chinese Medicine. *Science (80)*. 2003, 299, 188–190.
- [184] Avello, M., Cisternas, I., Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile. *Rev. Med. Chil.* 2010, 138, 1288–1293.
- [185] Ramalingum, N., Mahomoodally, M.F., The therapeutic potential of medicinal

- foods. *Adv. Pharmacol. Sci.* 2014, 2014.
- [186] Mohamed, I., Shuid, A., Borhanuddin, B., Fozi, N., The Application of Phytomedicine in Modern Drug Development. *Internet J. Herb. Plant Med.* 2012, 1, 1–9.
- [187] Misra, L., Traditional Phytomedicinal Systems, Scientific Validations and Current Popularity as Nutraceuticals. *Int. J. Tradit. Nat. Med.* 2013, 2, 27–75.
- [188] Su, X.-Z., Miller, L.H., The discovery of artemisinin and the Nobel Prize in Physiology or Medicine. *Sci. China Life Sci.* 2015, 58, 1175–1179.
- [189] Biesalski, H., Dragsted, L., Elmadfa, I., Grossklaus, R., et al., Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. *Nutrition* 2009, 25, 1202–1205.
- [190] Mishra, B.B., Tiwari, V.K., Natural products: An evolving role in future drug discovery. *Eur. J. Med. Chem.* 2011, 46, 4769–4807.
- [191] Nasar-Abbas, S.M., Halkman, A.K., Antimicrobial effect of water extract of sumac (*Rhus coriaria* L.) on the growth of some food borne bacteria including pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* 2004, 97, 63–69.
- [192] Hara-Kudo, Y., Kobayashi, I. A., Sugita-Konishi, Y., Kondo, K., Antibacterial activity of plants used in cooking for aroma and taste. *J. Food Prot.* 2004, 67, 2820–4.
- [193] Mathabe, M.C., Nikolova, R. V., Lall, N., Nyazema, N.Z., Antibacterial activities of medicinal plants used for the treatment of diarrhoea in Limpopo Province, South Africa. *J. Ethnopharmacol.* 2006, 105, 286–293.
- [194] Mostafa, A.A., Al-Askar, A.A., Almaary, K.S., Dawoud, T.M., et al., Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. *Saudi J. Biol. Sci.* 2016, 0–5.
- [195] Ogueke, C., Ogbulie, J., Okoli, I., And, C., et al., Antibacterial Activities And Toxicological Potentials Of Crude Ethanolic Extracts Of *Euphorbia hirta*. *J. Am. Sci.* 2007, 3.
- [196] Voon, H., Bhat, R., Rusul, G., Flower extracts and their essential oils as potential antimicrobial agents for food uses and pharmaceutical applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2012, 11, 34–55.
- [197] Bilia, A., Guccione, C., Isacchi, B., Righeschi, C., et al., Essential oils loaded in nanosystems: A developing strategy for a successful therapeutic approach. *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* 2014, 2014.
- [198] Ito, K., Akahoshi, Y., Ito, M., Kaneko, S., Sedative effects of inhaled essential oil components of traditional fragrance *Pogostemon cablin* leaves and their structure-activity relationships. *J. Tradit. Complement. Med.* 2016, 6, 140–145.

- [199] Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M., Ignacimuthu, S., *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complement. Altern. Med.* 2006, 6, 1–8.
- [200] Weaver, C., Bioactive Foods and Ingredients for Health. *Adv. Nutr. An Int. Rev. J.* 2014, 5, 306S–311S.
- [201] Halliwell, B., Free radicals and antioxidants: Updating a personal view. *Nutr. Rev.* 2012, 70, 257–265.
- [202] Rydlewski, A., Rodrigues De Moraes, D., Rotta, E., Claus, T., et al., Bioactive compounds, antioxidant capacity, and fatty acids in different parts of four unexplored fruits. *J. Food Qual.* 2017, 2017, 1–10.
- [203] Pham-Huy, L., He, H., Pham-Huy, C., Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int. J. Biomed. Sci.* 2008, 4, 89–96.
- [204] Holst, B., Williamson, G., Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2008, 19, 73–82.
- [205] Denardin, C., Hirsch, G., Da Rocha, R., Vizzotto, M., et al., Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits. *J. Food Drug Anal.* 2015, 23, 387–398.
- [206] Serrano, J., Cassanye, A., Martín-Gari, M., Granado-Serrano, A., et al., Effect of Dietary Bioactive Compounds on Mitochondrial and Metabolic Flexibility. *Diseases* 2016, 4, 14.
- [207] Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S., et al., Oxidative Stress and Antioxidant Defense. 2012, 9–19.
- [208] Poljšak, B., Fink, R., The protective role of antioxidants in the defence against ROS/RNS-mediated environmental pollution. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014, 2014.
- [209] Ferguson, L., Nutritional modulation of gene expression: Might this be of benefit to individuals with Crohn’s disease? *Front. Immunol.* 2015, 6, 1–12.
- [210] Xu, C., Li, C., Kong, A., Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch. Pharm. Res.* 2005, 28, 249–268.
- [211] Hodges, R., Minich, D., Modulation of Metabolic Detoxification Pathways Using Foods and Food-Derived Components: A Scientific Review with Clinical Application. *J. Nutr. Metab.* 2015, 2015.
- [212] Elmore, S., Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.* 2007, 35, 495–516.
- [213] Jiang, Y., Han, W., Shen, T., Wang, M., Antioxidant activity and protection from DNA damage by water extract from pine (*Pinus densiflora*) bark. *Prev. Nutr.*

*Food Sci.* 2012, *17*, 116–121.

- [214] Meriga, B., Parim, B., Chunduri, V., Naik, R., et al., Antiobesity potential of Piperonal: Promising modulation of body composition, lipid profiles and obesogenic marker expression in HFD-induced obese rats. *Nutr. Metab.* 2017, *14*, 1–14.
- [215] Navarro-González, I., Pérez-Sánchez, H., Martín-Pozuelo, G., García-Alonso, J., et al., The inhibitory effects of bioactive compounds of Tomato juice binding to hepatic HMGCR: *In vivo* study and molecular modelling. *PLoS One* 2014, *9*, 1–11.
- [216] Chi, C., Giri, S., Jun, J., Kim, H., et al., Immunomodulatory Effects of a Bioactive Compound Isolated from *Dryopteris crassirhizoma* on the Grass Carp *Ctenopharyngodon idella*. *J. Immunol. Res.* 2016, 2016.
- [217] Torres-Rêgo, M., Alves, A., Oliveira, M., Lima, M., et al., Anti-inflammatory activity of aqueous extract and bioactive compounds identified from the fruits of *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae). *BMC Complement. Altern. Med.* 2016, *16*, 1–10.
- [218] Denny, A., Buttriss, J., Plant foods and health: focus on plant bioactives, 2005.
- [219] Cortés, D., Souza, C. de, Oliveira, W., Clove (*Syzygium aromaticum*): A precious spice. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2014, *4*, 90–96.
- [220] Nagababu, E., Rifkind, J., Boindala, S., Nakka, L., Assessment of Antioxidant Activity of Eugenol *In Vitro* and *In Vivo*, in: *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, NIH Public Access, 2010, pp. 165–180.
- [221] Haytowitz, D., Bhagwat, S., USDA Database for the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods, Release 2. *US Dep. Agric.* 2010, 1–48.
- [222] Gülçin, I., Elmastaş, M., Aboul-Enein, H.Y., Antioxidant activity of clove oil - A powerful antioxidant source. *Arab. J. Chem.* 2012, *5*, 489–499.
- [223] Hu, Q., Gerhard, H., Upadhyaya, I., Venkitanarayanan, K., et al., Antimicrobial eugenol nanoemulsion prepared by gum arabic and lecithin and evaluation of drying technologies. *Int. J. Biol. Macromol.* 2016, *87*, 130–140.
- [224] Działo, M., Mierziak, J., Korzun, U., Preisner, M., et al., The potential of plant phenolics in prevention and therapy of skin disorders. *Int. J. Mol. Sci.* 2016, *17*, 1–41.
- [225] Pérez, D., McLandsborough, L., Weiss, J., Inhibition and inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 colony biofilms by micellar-encapsulated eugenol and carvacrol. *J. Food Prot.* 2006, *69*, 2947–2954.
- [226] Chung, G., Im, S., Kim, Y., Jung, S., et al., Activation of transient receptor potential ankyrin 1 by eugenol. *Neuroscience* 2014, *261*, 153–160.



- [227] Li, H., Lee, B., Kim, J., Jung, S., et al., Eugenol inhibits ATP-induced P2X currents in trigeminal ganglion neurons. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* 2008, *12*, 315–321.
- [228] Alqareer, A., Alyahya, A., Andersson, L., The effect of clove and benzocaine versus placebo as topical anesthetics. *J. Dent.* 2006, *34*, 747–750.
- [229] Kurokawa, M., Hozumi, T., Tsurita, M., Kadota, S., et al., Biological characterization of eugenin as an anti-herpes simplex virus type 1 compound *in vitro* and *in vivo*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2001, *297*, 372–9.
- [230] Huang, X., Liu, Y., Lu, Y., Ma, C., Anti-inflammatory effects of eugenol on lipopolysaccharide-induced inflammatory reaction in acute lung injury via regulating inflammation and redox status. *Int. Immunopharmacol.* 2015, *26*, 265–271.
- [231] Pereira Bezerra, D., Gadelha Militão, G., Castro De Moraes, M., Pergentino De Sousa, D., The dual antioxidant/prooxidant effect of eugenol and its action in cancer development and treatment. *Nutrients* 2017, *9*, 1–15.
- [232] Wang, C., Zhang, J., Chen, H., Fan, Y., et al., Antifungal activity of eugenol against *Botrytis cinerea*. *Trop. Plant Pathol.* 2010, *35*, 137–143.
- [233] Ghosh, R., Nadiminty, N., Fitzpatrick, J., Alworth, W., et al., Eugenol causes melanoma growth suppression through inhibition of E2F1 transcriptional activity. *J. Biol. Chem.* 2005, *280*, 5812–5819.
- [234] Chami, N., Bennis, S., Chami, F., Aboussekhra, A., et al., Study of anticandidal activity of carvacrol and eugenol *in vitro* and *in vivo*. *Oral Microbiol. Immunol.* 2005, *20*, 106–111.
- [235] Buckley, D., Fragrance ingredient labelling in products on sale in the U.K. *Br. J. Dermatol.* 2007, *157*, 295–300.
- [236] Jeong, K.J., Kim, D.Y., Quan, H.Y., Jo, H.K., et al., Effects of eugenol on hepatic glucose production and AMPK signaling pathway in hepatocytes and C57BL/6J mice. *Fitoterapia* 2014, *93*, 150–162.
- [237] Srinivasan, S., Sathish, G., Jayanthi, M., Muthukumar, J., et al., Ameliorating effect of eugenol on hyperglycemia by attenuating the key enzymes of glucose metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol. Cell. Biochem.* 2014, *385*, 159–168.
- [238] Mnafigui, K., Kaanich, F., Derbali, A., Hamden, K., et al., Inhibition of key enzymes related to diabetes and hypertension by Eugenol *in vitro* and in alloxan-induced diabetic rats. *Arch. Physiol. Biochem.* 2013, *119*, 225–233.
- [239] Sanae, F., Kamiyama, O., Ikeda-Obatake, K., Higashi, Y., et al., Effects of eugenol-reduced clove extract on glycogen phosphorylase b and the development of diabetes in db/db mice. *Food Funct.* 2014, *5*, 214–9.

- [240] Rao, P., Gan, S., Cinnamon: A multifaceted medicinal plant. *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* 2014, 2014, 1–12.
- [241] Wong, Y., Ahmad-Mudzaqqir, M., Wan-Nurdiyana, W., Extraction of essential oil from cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*). *Orient. J. Chem.* 2014, 30, 37–47.
- [242] Lee, K., Shibamoto, T., Determination of antioxidant potential of volatile extracts isolated from various herbs and spices. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 4947–4952.
- [243] Ciftci, M., Simsek, U., Yuce, A., Yilmaz, O., et al., Effects of dietary antibiotic and cinnamon oil supplementation on antioxidant enzyme activities, cholesterol levels and fatty acid compositions of serum and meat in broiler chickens. *Acta Vet. Brno* 2010, 79, 33–40.
- [244] Naveed, R., Hussain, I., Tawab, A., Tariq, M., et al., Antimicrobial activity of the bioactive components of essential oils from Pakistani spices against *Salmonella* and other multi-drug resistant bacteria. *BMC Complement. Altern. Med.* 2013, 13, 1.
- [245] Lee, B., Kim, Y., Cho, D., Sohn, N., et al., Immunomodulatory effect of water extract of cinnamon on anti-CD3-induced cytokine responses and p38, JNK, ERK1/2, and STAT4 activation. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 2011, 33, 714–722.
- [246] Gunawardena, D., Karunaweera, N., Lee, S., van Der Kooy, F., et al., Anti-inflammatory activity of cinnamon (*C. zeylanicum* and *C. cassia*) extracts – identification of E-cinnamaldehyde and o-methoxy cinnamaldehyde as the most potent bioactive compounds. *Food Funct.* 2015, 6, 910–919.
- [247] Lu, J., Zhang, K., Nam, S., Anderson, R., et al., Novel angiogenesis inhibitory activity in cinnamon extract blocks VEGFR2 kinase and downstream signaling. *Carcinogenesis* 2010, 31, 481–488.
- [248] Song, F., Li, H., Sun, J., Wang, S., Protective effects of cinnamic acid and cinnamic aldehyde on isoproterenol-induced acute myocardial ischemia in rats. *J. Ethnopharmacol.* 2013, 150, 125–130.
- [249] Huang, B., Yuan, H., Kim, D., Quan, H., et al., Cinnamaldehyde prevents adipocyte differentiation and adipogenesis via regulation of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) and AMP-activated protein kinase (AMPK) pathways. *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59, 3666–3673.
- [250] Tamura, Y., Iwasaki, Y., Narukawa, M., Watanabe, T., Ingestion of Cinnamaldehyde, a TRPA1 Agonist, Reduces Visceral Fats in Mice Fed a High-Fat and High-Sucrose Diet. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*. 2012, 58, 9–13.
- [251] Cheng, D., Kuhn, P., Poulev, A., Rojo, L., et al., *In vivo* and *in vitro* antidiabetic effects of aqueous cinnamon extract and cinnamon polyphenol-enhanced food

- matrix. *Food Chem.* 2012, *135*, 2994–3002.
- [252] Cao, H., Graves, D., Anderson, R., Cinnamon extract regulates glucose transporter and insulin-signaling gene expression in mouse adipocytes. *Phytomedicine* 2010, *17*, 1027–1032.
- [253] Qin, B., Nagasaki, M., Ren, M., Bajotto, G., et al., Cinnamon extract (traditional herb) potentiates *in vivo* insulin-regulated glucose utilization via enhancing insulin signaling in rats. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2003, *62*, 139–148.
- [254] Kannappan, S., Jayaraman, T., Rajasekar, P., Ravichandran, M., et al., Cinnamon bark extract improves glucose metabolism and lipid profile in the fructose-fed rat. *Singapore Med J* 2006, *47*, 858–863.
- [255] Ping, H., Zhang, G., Ren, G., Antidiabetic effects of cinnamon oil in diabetic KK-Ay mice. *Food Chem. Toxicol.* 2010, *48*, 2344–2349.
- [256] Camacho, S., Michlig, S., Bezençon, C., Meylan, J., et al., Anti-obesity and anti-hyperglycemic effects of cinnamaldehyde via altered ghrelin secretion and functional impact on food intake and gastric emptying. *Sci. Rep.* 2015, *5*, 1–10.
- [257] Kwan, H., Wu, J., Su, T., Chao, X., et al., Cinnamon induces browning in subcutaneous adipocytes. *Sci. Rep.* 2017, *7*, 1–12.
- [258] Moselhy, S., Ali, H.K., Hepatoprotective effect of cinnamon extracts against carbon tetrachloride induced oxidative stress and liver injury in rats. *Biol. Res.* 2009, *42*, 93–98.
- [259] Khan, A., Safdar, M., Ali Khan, M., Khattak, K., et al., Cinnamon Improves Glucose and Lipids of People with Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 2003, *26*, 3215–3218.
- [260] Mang, B., Wolters, M., Schmitt, B., Kelb, K., et al., Effects of a cinnamon extract on plasma glucose, HbA<sub>1c</sub>, and serum lipids in diabetes mellitus type 2. *Eur. J. Clin. Invest.* 2006, *36*, 340–344.
- [261] Lu, T., Sheng, H., Wu, J., Cheng, Y., et al., Cinnamon extract improves fasting blood glucose and glycosylated hemoglobin level in Chinese patients with type 2 diabetes. *Nutr. Res.* 2012, *32*, 408–412.
- [262] Akilen, R., Tsiami, A., Devendra, D., Robinson, N., Cinnamon in glycaemic control: Systematic review and meta analysis. *Clin. Nutr.* 2012, *31*, 609–615.
- [263] Ziegenfuss, T., Hofheins, J., Mendel, R., Landis, J., et al., Effects of a Water-Soluble Cinnamon Extract on Body Composition and Features of the Metabolic Syndrome in Pre-Diabetic Men and Women. *J. Int. Soc. Sports Nutr.* 2006, *3*, 45.
- [264] Blevins, S., Leyva, M., Brown, J., Wright, J., et al., Effect of Cinnamon on Glucose and Lipid level in non insulin dependent type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2007, *30*, 2236–2237.

- [265] Tang, M., Larson-Meyer, D., Liebman, M., Effect of cinnamon and turmeric on urinary oxalate excretion, plasma lipids, and plasma glucose in healthy subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 2008, 87, 1262–1267.
- [266] Roussel, A., Hininger, I., Benaraba, R., Ziegenfuss, T., et al., Antioxidant effects of a cinnamon extract in people with impaired fasting glucose that are overweight or obese. *J. Am. Coll. Nutr.* 2009, 28, 16–21.
- [267] Crawford, P., Effectiveness of Cinnamon for Lowering Hemoglobin A1C in Patients with Type 2 Diabetes: A Randomized, Controlled Trial. *J. Am. Board Fam. Med.* 2009, 22, 507–512.
- [268] Akilen, R., Tsiami, A., Devendra, D., Robinson, N., Glycated haemoglobin and blood pressure-lowering effect of cinnamon in multi-ethnic Type 2 diabetic patients in the UK: A randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial. *Diabet. Med.* 2010, 27, 1159–1167.
- [269] Allen, R.W., Schwartzman, E., Baker, W.L., Coleman, C.I., et al., Cinnamon Use in Type 2 Diabetes: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. *Ann. Fam. Med.* 2013, 11, 452–459.
- [270] Bouret, S.G., Nutritional programming of hypothalamic development : critical periods and windows of opportunity. *Int. J. Obes. Suppl.* 2012, 2, S19–S24.
- [271] Ramírez, D., Ángel, A., Genómica Nutricional como control de la enfermedad cardiovascular en el futuro próximo. *Acta Bioquímica Clínica Latinoam.* 2014, 48, 375–381.
- [272] Mokdad, A.H., Ford, E.S., Bowman, B.A., Dietz, W.H., et al., Prevalence of Obesity, Diabetes, and Obesity-Related Health Risk Factors, 2001. *Jama* 2003, 289, 76–79.
- [273] Allender, S., Rayner, M., The burden of overweight and obesity-related ill health in the UK. *Obes. Rev.* 2007, 8, 467–473.
- [274] Grassi, D., Desideri, G., Giosia, P.D., Feo, M.D., et al., Tea, flavonoids, and cardiovascular health: Endothelial protection. *Am. J. Clin. Nutr.* 2013, 98, 1660–1666.
- [275] Babu, P.V.A., Liu, D., Gilbert, E.R., Recent advances in understanding the anti-diabetic actions of dietary flavonoids. *J. Nutr. Biochem.* 2013, 24, 1777–1789.
- [276] Vauzour, D., Vafeiadou, K., Rodriguez-Mateos, A., Rendeiro, C., et al., The neuroprotective potential of flavonoids: A multiplicity of effects. *Genes Nutr.* 2008, 3, 115–126.
- [277] Hippenstiel, F., Abdel-Wareth, a. a. a., Kehraus, S., Südekum, K.H., Effects of selected herbs and essential oils, and their active components on feed intake and performance of broilers—a review. *Arch.Geflügelk* 2011, 75, 226–234.

- [278] Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., Biological effects of essential oils - A review. *Food Chem. Toxicol.* 2008, *46*, 446–475.
- [279] Raut, J.S., Karuppayil, S.M., A status review on the medicinal properties of essential oils. *Ind. Crops Prod.* 2014, *62*, 250–264.
- [280] Ali, S.M., Khan, A.A., Ahmed, I., Musaddiq, M., et al., Antimicrobial activities of Eugenol and Cinnamaldehyde against the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2005, *4*, 1–7.
- [281] Li, J., Liu, T., Wang, L., Guo, X., et al., Antihyperglycemic and antihyperlipidemic action of cinnamaldehyde in C57blks/j Db/db mice. *J. Tradit. Chinese Med.* 2012, *32*, 446–452.
- [282] Mith, H., Duré, R., Delcenserie, V., Zhiri, A., et al., Antimicrobial activities of commercial essential oils and their components against food-borne pathogens and food spoilage bacteria. *Food Sci. Nutr.* 2014, *2*, 403–416.
- [283] Nabavi, S., Di Lorenzo, A., Izadi, M., Sobarzo-Sánchez, E., et al., Antibacterial effects of cinnamon: From farm to food, cosmetic and pharmaceutical industries. *Nutrients* 2015, *7*, 7729–7748.
- [284] Jaganathan, S.K., Mazumdar, A., Mondhe, D., Mandal, M., Apoptotic effect of eugenol in human colon cancer cell lines. *Cell Biol. Int.* 2011, *35*, 607–615.
- [285] Lee, S., Siaw, J., Kang, H., Stimulatory Effects of Cinnamon Extract (*Cinnamomum cassia*) during the Initiation Stage of 3T3-L1 Adipocyte Differentiation. *Foods* 2016, *5*, 1–9.
- [286] Absalan, A., Mesbah-namin, S.A., Tiraihi, T., Taheri, T., The effects of cinnamaldehyde and eugenol on human adipose-derived mesenchymal stem cells viability , growth and differentiation : a cheminformatics and *in vitro* study. *Avicenna J Phytomed* 2016, *6*, 643–657.
- [287] Kersten, S., Seydoux, J., Peters, J.M., Gonzalez, F.J., et al., Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J. Clin. Invest.* 1999, *103*, 1489–1498.
- [288] Rosen, E.D., Sarraf, P., Troy, A.E., Bradwin, G., et al., PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue *in vivo* and *in vitro*. *Mol Cell* 1999, *4*, 611–617.
- [289] Fajas, L., Schoonjans, K., Gelman, L., Kim, J.B., et al., Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression by adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1: implications for adipocyte differentiation and metabolism. *Mol. Cell. Biol.* 1999, *19*, 5495–503.
- [290] Abranches, M., Esteves De Oliveira, F., Bressan, J., Peroxisome proliferator-activated receptor : effects on nutritional homeostasis, obesity and diabetes

- mellitus. *Nutr Hosp* 2011, 26, 271–279.
- [291] Lay, S., Lefrère, I., Trautwein, C., Dugail, I., et al., Insulin and sterol-regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) regulation of gene expression in 3T3-L1 adipocytes: Identification of CCAAT/enhancer-binding protein  $\beta$  as an SREBP-1c target. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 35625–35634.
- [292] Moustaid, N., Sul, H., Regulation of expression of the fatty acid synthase gene in 3T3-L1 cells by differentiation and triiodothyronine. *J. Biol. Chem.* 1991, 266, 18550–18554.
- [293] Weiss, G., Rosen, O., Rubin, C., Regulation of Fatty Acid Synthetase Concentration and Activity during Adipocyte Differentiation. *J. Biol. Chem.* 1980, 255, 4751–4757.
- [294] Han, Y., Jung, H., Bae, H., Kang, J., et al., The extract of *Cinnamomum cassia* twigs inhibits adipocyte differentiation via activation of the insulin signaling pathway in 3T3-L1 preadipocytes. *Pharm. Biol.* 2013, 51, 961–967.
- [295] Reed, B., Lane, M., Insulin receptor synthesis and turnover in differentiating 3T3-L1 preadipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1980, 77, 285–289.
- [296] Kershaw, E., Hamm, J., Verhagen, L., Peroni, O., et al., Adipose triglyceride lipase: Function, regulation by insulin, and comparison with adiponutrin. *Diabetes* 2006, 55, 148–157.
- [297] Large, V., Reynisdottir, S., Langin, D., Fredby, K., et al., Decreased expression and function of adipocyte hormone-sensitive lipase in subcutaneous fat cells of obese subjects 1. *J. Lipid Res.* 1999, 40, 2059–2066.
- [298] Brown, N.F., Hill, J.K., Esser, V., Kirkland, J.L., et al., Mouse white adipocytes and 3T3-L1 cells display an anomalous pattern of carnitine palmitoyltransferase (CPT) I isoform expression during differentiation. Inter-tissue and inter-species expression of CPT I and CPT II enzymes. *Biochem. J.* 1997, 327, 225–231.
- [299] Teodoro, J., Varela, A., Rolo, A., Palmeira, C., High-fat and obesogenic diets: Current and future strategies to fight obesity and diabetes. *Genes Nutr.* 2014, 9.
- [300] Kelly, T., Yang, W., Chen, C., Reynolds, K., et al., Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *Int. J. Obes.* 2008, 32, 1431–1437.
- [301] Wild, S., Roglic, G., Green, A., R, S., et al., Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004, 27, 1047–1053.
- [302] Barnes, P., Powell-Griner, E., McFann, K., Nahin, R., Complementary and alternative medicine use among adults: United States, 2002. *Semin. Integr. Med.* 2004, 2, 54–71.
- [303] Singh, P., Jayaramaiah, R., Agawane, S., Vannuruswamy, G., et al., Potential dual role of eugenol in inhibiting advanced glycation end products in diabetes:

- Proteomic and mechanistic insights. *Sci. Rep.* 2016, 6, 1–13.
- [304] Yuan, H., Huang, B., Chung, S., Protective effect of cinnamaldehyde on streptozotocin-induced damage in rat pancreatic  $\beta$ -cells. *Food Sci. Biotechnol.* 2011, 20, 1271–1276.
- [305] Zuo, J., Zhao, D., Yu, N., Fang, X., et al., Cinnamaldehyde Ameliorates Diet-Induced Obesity in Mice by Inducing Browning of White Adipose Tissue. *Cell. Physiol. Biochem.* 2017, 100029, 1514–1525.
- [306] Cao, H., Polansky, M., Anderson, R., Cinnamon extract and polyphenols affect the expression of tripartite motif 1, insulin receptor, and glucose transporter 4 in mouse 3T3-L1 adipocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 2007, 459, 214–222.
- [307] Koonen, D., Jacobs, R., Febbraio, M., Young, M., et al., Increased hepatic CD36 expression contributes to dyslipidemia associated with diet-induced obesity. *Diabetes* 2007, 56, 2863–2871.
- [308] Wilson, C., Tran, J., Erion, D., Vera, N., et al., Hepatocyte-specific disruption of CD36 attenuates fatty liver and improves insulin sensitivity in HFD-fed mice. *Endocrinology* 2016, 157, 570–585.
- [309] Subash Babu, P., Prabuseenivasan, S., Ignacimuthu, S., Cinnamaldehyde—A potential antidiabetic agent. *Phytomedicine* 2007, 14, 15–22.

