



Universidad de Jaén

Escuela de Doctorado

TESIS DOCTORAL



**ACTIVIDADES AMINOPEPTIDASAS EN LOS
EJES HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-HÍGADO E
HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-TESTÍCULOS.
ESTUDIO DEL EFECTO DE DISTINTAS
DIETAS ALTAS EN GRASA**

**PRESENTADA POR:
GERMÁN DOMÍNGUEZ VÍAS**

**DIRIGIDA POR:
Dra. M^a ISABEL PRIETO GÓMEZ
Dra. ANA BELÉN SEGARRA ROBLES**

JAÉN, 2020

ISBN



Universidad de Jaén

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
ÁREA DE FISIOLÓGÍA

**ACTIVIDADES AMINOPEPTIDASAS EN LOS EJES HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-
HÍGADO E HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-TESTÍCULOS. ESTUDIO DEL EFECTO DE
DISTINTAS DIETAS ALTAS EN GRASA**

TESIS DOCTORAL

**Germán Domínguez Vías
Jaén 2020**

**D^a M^a ISABEL PRIETO GÓMEZ, CATEDRÁTICA DEL ÁREA DE FISIOLÓGÍA DEL
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD DE JAÉN**

CERTIFICA:

Que los trabajos efectuados en la elaboración de la Tesis Doctoral por compendio titulada **“Actividades aminopeptidasas en los ejes hipotálamo-hipófisis-hígado e hipotálamo-hipófisis-testículos. Estudio del efecto de distintas dietas altas en grasa”**, presentada por **D. Germán Domínguez Vías**, han sido realizados bajo mi supervisión y dirección, reuniendo las condiciones académicas necesarias para su presentación para optar al grado de Doctor.

Y para que conste donde proceda, firmo la presente en

Jaén, a ____ de _____ de 2020

Fdo. M^a Isabel Prieto Gómez

**D^a ANA BELÉN SEGARRA ROBLES, DOCTORA EN BIOLOGÍA Y PROFESORA
SUSTITUTA INTERINA DEL ÁREA DE FISIOLÓGÍA DEL DEPARTAMENTO DE
CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD DE JAÉN**

CERTIFICA:

Que los trabajos efectuados en la elaboración de la Tesis Doctoral por compendio titulada “**Actividades aminopeptidasas en los ejes hipotálamo-hipófisis-hígado e hipotálamo-hipófisis-testículos. Estudio del efecto de distintas dietas altas en grasa**”, presentada por **D. Germán Domínguez Vías**, han sido realizados bajo mi supervisión y dirección, reuniendo las condiciones académicas necesarias para su presentación para optar al grado de Doctor.

Y para que conste donde proceda, firmo la presente en

Jaén, a ____ de _____ de 2020

Fdo. Ana Belén Segarra Robles

La realización de esta Tesis Doctoral ha dado lugar a la publicación de los siguientes resultados relevantes:

- **Domínguez-Vías G**, Segarra AB, Ramírez-Sánchez M, Prieto I. The Role of High Fat Diets and Liver Peptidase Activity in the Development of Obesity and Insulin Resistance in Wistar Rats. *Nutrients*. 2020;12(3). pii: E636. doi: 10.3390/nu12030636.

- Segarra AB, Martínez-Cañamero M, **Domínguez-Vías G**, Hidalgo M, Ramírez-Sánchez M, Prieto I. Extra virgin olive oil and blood pressure: a new approach to the treatment of cardiovascular disease. In: Caballero-George, Catherina C. *Natural products and cardiovascular health*. Boca Raton: CRC Press. Taylor & Francis Group. 2018. Pp. 161-172.

- **Domínguez-Vías G**, Segarra AB, Martínez-Cañamero M, Ramírez-Sánchez M, Prieto I. Influence of a Virgin Olive Oil versus Butter Plus Cholesterol-Enriched Diet on Testicular Enzymatic Activities in Adult Male Rats. *Int J Mol Sci*. 2017;18(8). pii: E1701. doi: 10.3390/ijms18081701.

¡Tekeli-li! ¡Tekeli-li!

**Y entonces nos precipitamos en brazos de la catarata
en la que se abrió un abismo para recibirnos.**

Edgar Allan Poe

<< Las aventuras de Arthur Gordon Pym >>

Agradecimientos

Sin lugar a dudas, Jaén es una ciudad referente en mi vida académica y profesional. De entre todas las universidades por las que he pasado, sean nacionales o internacional, nunca me he sentido tan a gusto como en la universidad de Jaén. Probablemente la huella que marcó mi gran cariño por esta ciudad tenga su origen en un área curricular del departamento de CC. Experimentales. Está claro, me refiero al área de fisiología, un lugar que me une por trabajo y por amistad. Conservo aun intacto, y con especial cariño, mis primeros apuntes redactados a mano de las asignaturas del área de fisiología. Auténticas clases magistrales impartidas, sobre todo, por los profesores Manuel Ramírez Sánchez e Isabel Prieto Gómez. Todo mi agradecimiento a todo ese personal de fisiología que tanto me dio y que tanto se involucró conmigo. Le quiero dedicar un recuerdo especial a la profesora Garbiñe Arechaga Maza, que por infortunios del destino nos dejó muy pronto, y a quién le estaré eternamente agradecido. Tuve la oportunidad de conocerla, de ponerme en sus manos en el laboratorio y de conseguir mis dos primeras publicaciones *JCR*, junto con nuevas oportunidades académicas que siguieron a continuación.

El profesor Manuel “Manolo” Ramírez cada año que pasa más me sorprende, más lo admiro, y más estima le tengo. Tengo claro que, en todo lo que respecta, es una persona muy coherente a quién en ningún momento le he visto recurrir a un <<deus ex machina>>; esa expresión poética de Aristóteles en todo caso me la reservo para mí, todavía me queda mucho por aprender para solucionar asuntos sin dar giros de trama.

Mis directoras de tesis, más que jefas son amigas y compañeras. La profesora Ana Belén Segarra, además de hacer buenos panes en plena pandemia de Covid-19, ha sido una parte crucial de este trabajo. Sin su ayuda, tanto formativa como investigadora, no se hubiese desarrollado con éxito. Luego está “la jefa” del trabajo, la que más paciencia ha tenido conmigo, la profesora Isabel Prieto. Siempre se ha leído que durante la realización de una tesis doctoral existe una correlación positiva entre el odio del doctorando con su director/a. En mi caso soy el <<outlier o valor atípico>> de esa estadística. Junto con la amabilidad y cariño que la caracteriza, desde siempre, además de hacerse querer, siempre ha estado ahí para ayudar en todos los asuntos profesionales y personales, doble trabajo junto con la de <<orquestrar>> esta tesis doctoral.

También quiero hacer mención de mi compañera Inmaculada Banegas, profesora del área de fisiología, que con cariño me hace recordar cuando entramos juntos por primera vez en la licenciatura de Biología. Ya ha pasado bastante de aquello, y he de decir que, en términos enológicos, hemos adquirido un buqué de calidad durante nuestro proceso de envejecimiento.

Acabo con la profesora RoseMary “Rosa” Wangensteen. Muy agradecido con ella porque, sinceramente, me lo pasaba genial en el laboratorio con todas sus ocurrencias. Aprendí el Western-Blotting gracias a ella, mientras me hablaba con elocuencia de *Galactus*, el devorador de mundos, y de cómo calibrar una balanza con garrafas de 5 litros de agua (más que calibrar, parecía una prueba de la *Jungla de Cristal III*). He de confesar que me enseñó bastante bien esa técnica, parece que el azar quiso que años después me empachara de ella y de sus continuas modificaciones según la proteína que tocara estudiar.

Como veréis, todos formásteis parte del inicio de un libro, que se interrumpió con nuevos capítulos en las universidades de Cádiz y de Granada, pero del que, muy contento, se vuelven a retomar unas páginas muy emocionantes con este paso tan importante. Tengo clara una cosa, que este momento de vuelta con todos vosotros es una parte de disfrute, porque: - << he vuesto a casa, aunque sea por un instante >> -.

Por último, a mis padres (mamá y papá), os quiero. Gracias de nuevo por todo vuestro apoyo. Además, haré mención de mis agapornis (Cuki y Pollo; Pollo y Cuki), que también son de la familia y arden en deseos de picar este ejemplar. No sé quiénes han aguantado más a quien.

ABREVIATURAS

AlaAP / Ala-AP: Alanil aminopeptidasa

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

Ang I: Angiotensina I

Ang II: Angiotensina II

Ang III: Angiotensina III

Ang IV: Angiotensina IV

AP: Aminopeptidasa

ArgAP / Arg-AP: Arginil aminopeptidasa

AspAP / Asp-AP: Aspartil aminopeptidasa

Bch: Dieta enriquecida en mantequilla y colesterol

BSA: Albúmina de suero bovino

cHP: ciclo His-Pro o histidil-prolina diketopiperazina

CysAP / Cys-AP: Cistinil aminopeptidasa

DPP4: Dipeptidil-Aminodipeptidasa 4

E: Dieta estándar

EDTA: Ácido tetracético de etilendiamina

ENK: Encefalina

EVOO: Dieta enriquecida con aceite de oliva virgen extra

FSH: Hormona estimuladora del folículo

GGT: γ -glutamyl-transferasa

GLP-1: péptido similar al glucagón 1 (glucagon like peptide-1)

GluAP / Glu-AP: Glutamyl aminopeptidasa

GnRH: Hormona liberadora de gonadotropina

GTT: Prueba de tolerancia a la glucosa

HFD: Dietas altas en grasa

HHH: eje Hipotálamo-Hipófisis-Hígado

HHT: eje Hipotálamo-Hipófisis-Testículo

HNF4 α : Factor nuclear de hepatocitos 4- α

HOMA2-RI: Modelo de homeostasis de resistencia a la insulina

IL-1 β : Interleuquina 1 beta

IL-2: Interleucina 2

iNOS: Isoforma inducible de la NOS

ip: inyección intraperitoneal

IRAP: Aminopeptidasa regulada por insulina

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

LeuAP / Leu-AP: Leucil aminopeptidasa

LH: Hormona luteinizante

MUFA: Ácido graso monoinsaturado

NAFL: Hígado graso no alcohólico

NAFLD: Enfermedad del hígado graso no alcohólico

NASH: Esteatohepatitis no alcohólica

NIH: National Institute of Health

NO: Óxido Nítrico

NOS: Óxido Nítrico Sintasa

NOx: Óxidos de nitrógeno

NPY: Neuropeptido Y

PAS: Presión arterial sistólica

pGluAP / pGlu-AP: Piroglutamil aminopeptidasa

PIP: Prolil Iminopectidasa

PMSF: Fluoruro de metil sulfonilo de fenilo

PUFA-AGPI ω -3: Ácidos grasos poliinsaturados omega-3

RAS: Sistema Renina-Angiotensina

RI: Resistencia a la insulina

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SAFA: Ácido graso saturado

SHBG: Globulina fijadora de hormonas sexuales

SM: Síndrome Metabólico

TNF α : factor de necrosis tumoral alfa

TRH: Hormona liberadora de tirotrópina

TyrAP / Tyr-AP: Tiroxil aminopeptidasa

VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad

[ÍNDICE]

Tabla de contenido

1. RESUMEN	15
2. INTRODUCCIÓN	18
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	31
4. DISEÑO EXPERIMENTAL Y MÉTODOS	34
5. RESUMEN GLOBAL DE LOS RESULTADOS	42
5.1. Cambios en la ingesta de alimento y el peso corporal	43
5.1.1. Peso corporal.....	43
5.1.2. Ingestas de alimento y energía	43
5.2. Presión arterial sistólica (PAS)	43
5.3. Análisis de los parámetros bioquímicos: cambios plasmáticos en el perfil glicémico, lipídico y en factores hormonales (insulina y GLP-1)	44
5.3.1. Prueba de tolerancia a la glucosa (GTT), cambios en el control glucémico y relación con la insulina.....	44
5.3.2. Perfil de lípidos en plasma	45
5.4. Determinación de NOx en plasma	46
5.5. Aminopeptidasas relacionadas con el control de la glucemia (DPP4).....	46
5.5.1. Hipotálamo.....	46
5.5.2. Hipófisis	47
5.6. Piroglutamil-aminopeptidasa y Tirosil-aminopeptidasa	47
5.6.1. Hipotálamo.....	47
5.6.2. Hipófisis	48
5.7. Aminopeptidasas relacionadas con el Sistema Renina-Angiotensina (RAS) en el eje Hipotálamo-Hipófisis.....	48
5.7.1. Hipotálamo.....	48
5.7.2. Hipófisis	48
5.8. Actividad Prolil-Iminopeptidasa (PIP).....	50
5.8.1. Hipotálamo.....	50
5.8.2. Hipófisis	51
5.9. Aminopeptidasas relacionadas con el control de la glucemia (DPP4) en hígado	51

5.10. Aminopeptidasas hepáticas reguladoras de la ingesta de alimento (pGlu-AP y Tyr-AP)...	52
5.11. Aminopeptidasas relacionadas con la regulación del Sistema Renina-Angiotensina (RAS) local del hígado	52
5.12. Aminopeptidasas hepáticas relacionadas con marcadores de estrés oxidativo (GGT) y marcadores funcionales (Leu-AP y PIP)	53
5.13. Expresión de la isoforma inducible del óxido nítrico sintasa (iNOS)	55
5.14. Aminopeptidasas implicadas en la fertilidad	56
5.15. Aminopeptidasas relacionadas con la regulación del Sistema Renina-Angiotensina (RAS) local del testículo.....	56
5.16. Gamma-Glutamil-Transferasa (GGT) como marcador funcional de estrés oxidativo en testículo.....	56
6. DISCUSIÓN	58
6.1. Ingesta de alimento, incremento de peso corporal, regulación de la glucemia y de los valores de Presión Arterial Sistólica	59
6.2. Aminopeptidasas en el eje Hipotálamo-Hipófisis	61
6.3. Aminopeptidasas en el hígado.....	63
6.4. Aminopeptidasas en los testículos.....	65
7. CONCLUSIONES.....	69
8. BIBLIOGRAFÍA.....	72
9. ANEXOS (PUBLICACIONES).....	87
<i>Anexo I: Domínguez-Vías et al. Nutrients. 2020;12(3). pii: E636</i>	<i>88</i>
<i>Anexo II: Domínguez-Vías et al. Int J Mol Sci. 2017;18(8). pii: E1701</i>	<i>105</i>
<i>Anexo III: Natural products and cardiovascular health</i>	<i>116</i>

[1. RESUMEN]

Las dietas altas en grasas se asocian con un elevado riesgo de desórdenes metabólicos, lo que provoca trastornos como el sobrepeso, la resistencia a la insulina, la hipertensión, la esteatosis hepática y la disfunción reproductiva entre otros. Sin embargo, se ha sugerido que una alta ingesta de dietas ricas en ácidos grasos monoinsaturados y antioxidantes puede influir positivamente en el metabolismo energético y en la función reproductora. Por el contrario, las dietas altas en grasa cuya composición esté constituida mayoritariamente por ácidos grasos saturados y colesterol se asocian con alteraciones endocrinas primarias (glándulas endocrinas periféricas), secundarias (hipófisis) o terciarias (hipotálamo) que afectarían a la normal regulación de muchas funciones fisiológicas.

En este trabajo proponemos, como **hipótesis de partida**, que la ingesta de una dieta enriquecida con aceite de oliva virgen extra (EVOO) podría actuar como factor protector frente a las alteraciones metabólicas y reproductoras, a diferencia de una dieta enriquecida en mantequilla y colesterol, cuya ingesta propiciaría la aparición de dichas alteraciones. Se propone que distintos componentes del EVOO modularían sistemas enzimáticos, entre ellos el Sistema Renina-Angiotensina (RAS), enzimas implicados en la regulación del estrés oxidativo, el control de la ingesta de alimento y la glucemia.

El **objetivo principal** del presente trabajo se dirigió al análisis de los efectos, tanto de la cantidad como de la calidad de la grasa de la dieta, sobre un modelo animal (ratas Wistar) al que se le administraron dietas altas en grasa enriquecidas con distintas fuentes lipídicas al 20% (EVOO y mantequilla más colesterol), en comparación con una dieta control. Se han estudiado distintas variables fisiológicas (incremento de peso corporal, ingesta de alimento y agua, valores de presión arterial sistólica (PAS), regulación de la glucemia, indicadores de estrés oxidativo y distintas hormonas en plasma), así como los cambios sobre actividades peptidasas implicadas en dichos procesos. Como **objetivo secundario** se planteó profundizar en los mecanismos fisiológicos que nos permitan mejorar nuestros conocimientos sobre el efecto de la ingesta de EVOO, uno de los principales componentes de la dieta mediterránea, sobre la salud.

Los **resultados** obtenidos al final de periodo experimental indicaron un aumento en la concentración de triglicéridos plasmáticos, colesterol total, LDL y VLDL exclusivamente en el plasma de los animales que recibieron la dieta con mantequilla y colesterol. De igual manera, la dieta suplementada con EVOO no supuso un aumento en los valores finales de peso corporal, a diferencia de la mantequilla. Resultados similares se obtuvieron para los valores de PAS. Aunque la dieta con EVOO aumentó el tiempo necesario para volver a los

valores basales tras la inyección de una sobrecarga de glucosa intraperitoneal, la relación insulina/glucosa en ayunas y el índice HOMA2-% B fueron mejores en estos animales.

No se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas para las actividades aminopeptidasas en el hipotálamo, aunque sí que se obtuvieron cambios significativos en la hipófisis de los animales que recibieron la dieta con mantequilla y colesterol.

En las muestras hepáticas, la dieta enriquecida con EVOO aumentó la actividad de las aminopeptidasas relacionadas con el metabolismo de la glucosa (DPP4, angiotensinasas e IRAP). Sin embargo, la dieta enriquecida con mantequilla y colesterol aumentó las actividades implicadas en el control de la ingesta de alimentos (Tyr-AP), las que se consideran marcadores de daño hepático (Leu-AP y GGT), la expresión de iNOS y la concentración de NOx en plasma, resultados todos indicativos del daño hepático causado por la dieta alta en grasas saturadas y colesterol.

En los testículos, la dieta enriquecida en mantequilla y colesterol aumentó significativamente las actividades Glutamil-AP (Glu-AP) y γ -Glutamil-Transferasa (GGT). Además, se establecieron correlaciones significativas y positivas entre estas actividades y los triglicéridos y el colesterol total en plasma, apoyando el papel negativo de las dietas ricas en grasas saturadas sobre la fisiología de los testículos. Por el contrario, la dieta rica en EVOO aumentó la actividad DPP4, lo que respalda el beneficio de la grasa monoinsaturada y los polifenoles sobre la función testicular.

Tomados en su conjunto, estos resultados apoyarían los efectos beneficiosos de la dieta mediterránea, donde la ingesta de EVOO contribuiría a regular el metabolismo energético y el peso corporal, así como la glucemia, los niveles de estrés oxidativo y la función reproductora. Dichos efectos estarían mediados, al menos en parte, por cambios en distintas actividades aminopeptidasas que, a su vez, reflejarían modificaciones en las concentraciones de los péptidos bioactivos a los que metabolizan.

[2. INTRODUCCIÓN]

Las dietas altas en grasas (HFD) se relacionan con el desarrollo de obesidad y varias patologías tales como la hipertensión, la aterosclerosis, la diabetes y la infertilidad (Shalaby et al., 2004). La obesidad se considera actualmente una enfermedad crónica grave, caracterizada por una acumulación excesiva de tejido adiposo de suficiente magnitud como para causar consecuencias adversas para la salud. La obesidad puede ser causada por un desequilibrio entre la ingesta de energía y el gasto energético sostenido en el tiempo (Guyenet & Schwartz, 2012). La prevalencia de obesidad en adultos ha aumentado alarmantemente en las últimas décadas tanto en los países desarrollados como en los que están en vías de desarrollo, y forma parte del conjunto de condiciones encuadradas en el Síndrome Metabólico (SM), así como entre los factores que incrementan el riesgo de desarrollar varias patologías relacionadas, como diabetes tipo 2, dislipidemia, hipertensión, accidente cerebrovascular, enfermedad cardíaca y cáncer (Pi-Sunyer, 2002; Eckel et al., 2005). Varios estudios han documentado la relación entre la ingesta de dietas altas en grasa y la obesidad (Hariri & Thibault, 2010). Por otro lado, la eficacia de las estrategias actuales para el tratamiento de la obesidad y otras enfermedades relacionadas aún no es del todo satisfactoria, y se están considerando nuevos enfoques. Estudios previos han sugerido que un aumento en el grado de saturación de los ácidos grasos en la dieta provoca un aumento en las concentraciones de colesterol total en el plasma y de los valores de presión arterial sistólica (Segarra et al., 2008), y que estas alteraciones podrían estar relacionadas con cambios en los Sistemas Renina Angiotensina (RAS) sistémico o locales.

En la activación del RAS, la angiotensina II (Ang II) se consideraba hasta hace relativamente poco el péptido principal del sistema que participa en los mecanismos homeostáticos que regulan la presión sanguínea, la concentración de electrolitos y el equilibrio hídrico. Sin embargo, algunos de sus derivados metabólicos, como la angiotensina III (Ang III), la angiotensina IV (Ang IV) y la angiotensina 2-10 (Ang 2-10), han demostrado tener también importantes funciones fisiológicas (Barret et al., 2004) (figura 1). Los principales péptidos activos del RAS (AngII y AngIII) se unen a los receptores AT1 y AT2 con una afinidad similar (de Gasparo et al., 1994; García-Sáinz et al., 1997). Por el contrario, la capacidad de la Ang IV para unirse a los receptores AT1 y AT2 es muy baja (de Gasparo et al., 1994), pero muestra una alta capacidad para la unión al receptor AT4, descrito también como la Aminopeptidasa Regulada por Insulina (IRAP) (Chai et al., 2004). La unión de la Ang IV al receptor AT4 (figura 1) parece jugar un importante papel en la regulación del flujo sanguíneo local (Coleman et al., 1998).

Los distintos RAS locales podrían verse afectados por los cambios en el grado de saturación de la grasa que se consume con la dieta. Dentro de estos sistemas locales, los péptidos de angiotensina son metabolizados por varias enzimas del tipo de las Aminopeptidasas (angiotensinasas), y resultados previos de nuestro grupo de investigación han demostrado que las actividades de dichas peptidasas son afectadas por el tipo de ácidos grasos consumidos con la dieta (Segarra et al., 2008; 2011; Villarejo et al., 2015).

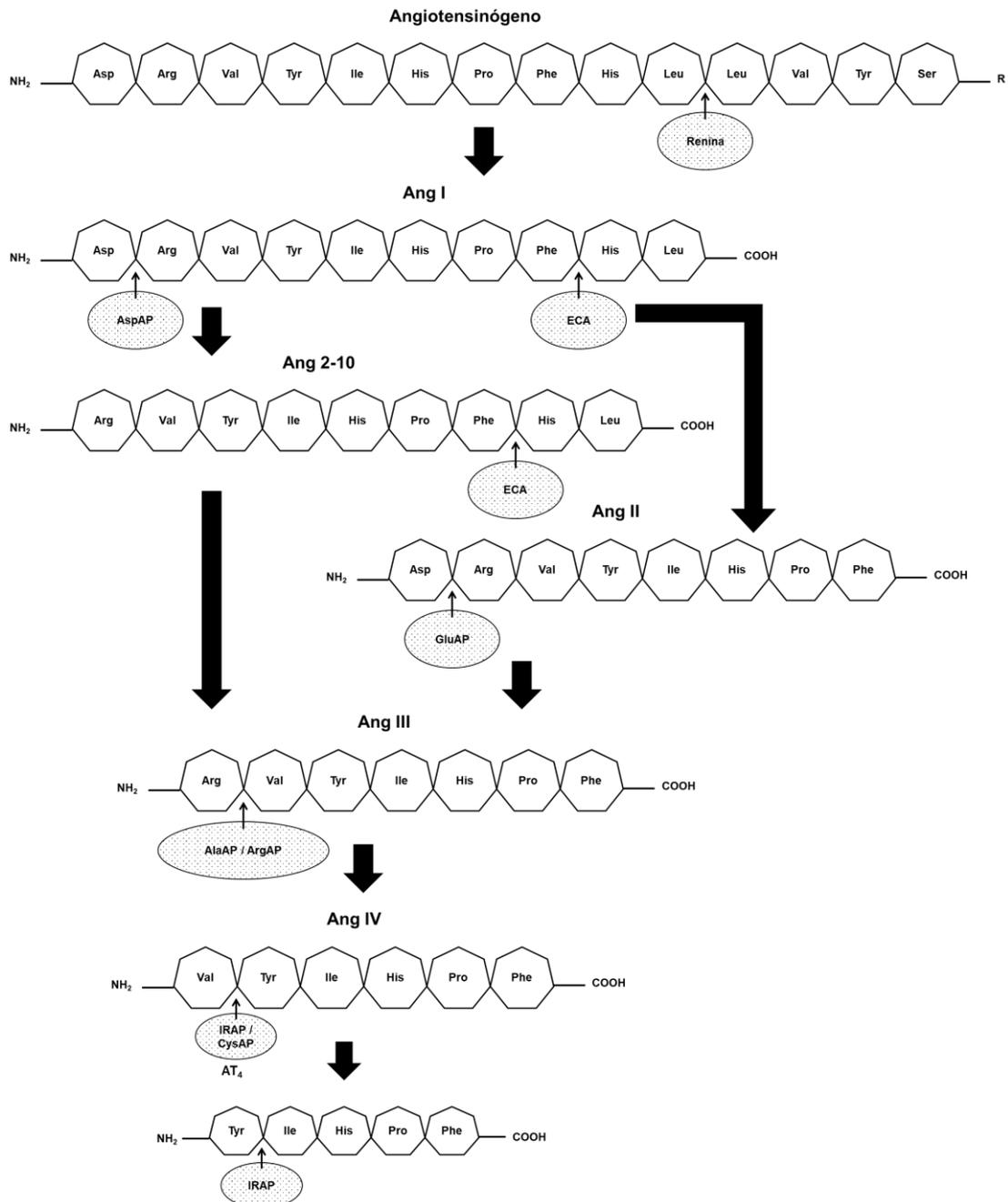


Figura 1. Activación de la vía clásica del Sistema Renina-Angiotensina (RAS). AlaAP: alanil-aminopeptidasa; Ang I: angiotensina I; Ang II: angiotensina II; Ang III: angiotensina III; Ang IV: angiotensina IV; ArgAP: arginil-aminopeptidasa; AspAP: aspartil-aminopeptidasa; ECA: enzima convertidora de la angiotensina; GluAP: glutamil-aminopeptidasa; IRAP / CysAP: aminopeptidasa regulada por insulina / cistinil-aminopeptidasa.

Las respuestas en los RAS a las dietas altas en grasas saturadas podrían relacionarse con trastornos endocrinos primarios (en las glándulas endocrinas periféricas), secundarios (en la hipófisis) o terciarios (en el hipotálamo) que afectarían al desarrollo normal de las funciones fisiológicas (Rohrbasser et al., 2016), como (a) el crecimiento y el desarrollo, (b) el metabolismo energético, (c) la distribución del tejido muscular y el adiposo, (d) el desarrollo sexual, (e) el equilibrio de líquidos y electrolitos, y (f) las respuestas inflamatorias e inmunitaria (figura 2).

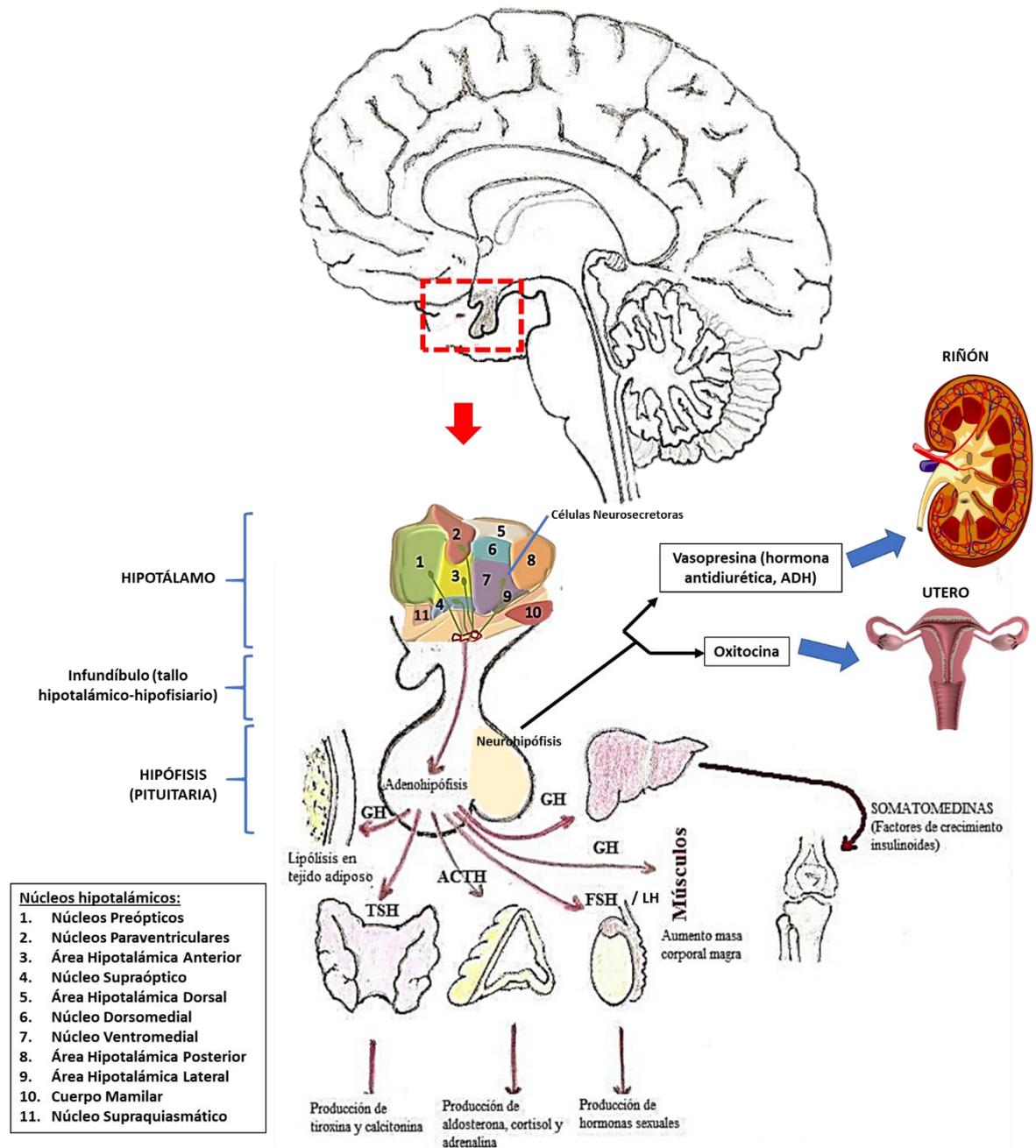


Figura 2. Esquema del sistema neuroendocrino a través del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas endocrinas, siendo altamente sensible a condiciones metabólicas adversas como la obesidad y la diabetes. El hipotálamo y la hipófisis controlan la secreción de hormonas a partir de otras glándulas endocrinas. La glándula hipófisis cuenta con dos componentes, un lóbulo posterior (neurohipófisis), o componente neural, y

un lóbulo anterior (adenohipófisis), o componente glandular. La adenohipófisis sintetiza la hormona adrenocorticotropa (ACTH), hormona estimulante del tiroides (TSH), hormona del crecimiento (GH), hormonas gonadotrópicas (hormona estimulante del folículo [FSH] y hormona luteinizante [LH]) y prolactina (LTH). La neurohipófisis acumula (vía hipotalámica) y secreta las hormonas vasopresina (ADH) y oxitocina. Fuente: Imágenes libres de derecho etiquetada para su reutilización (<https://bit.ly/33nU8XL>; <https://bit.ly/2yrpamn>; <https://bit.ly/3c0E40C>).

Diferentes trabajos recogen resultados sobre cambios en las actividades aminopeptidasa (AP) en diversas alteraciones hepáticas e insulinémicas como, por ejemplo, aquellas vinculadas a problemas de esteatosis hepática (Cynis et al., 2013; Zhang et al., 2008) y deposición de lípidos ectópicos en el hígado y la grasa marrón (Zhang et al., 2008), inflamación adiposa crónica renal (Wolke et al., 2017), sobrepeso (Härdtner et al., 2013), hiperinsulinemia (Härdtner et al., 2013) y resistencia a la insulina (Härdtner et al., 2013).

Hay resultados que demuestran que la hipercolesterolemia y los altos niveles plasmáticos de triglicéridos están asociados con una menor calidad del semen y con efectos adversos sobre la función testicular que pueden conducir a la infertilidad masculina (Padron et al., 1989). Las ratas hipercolesterolémicas tienen una marcada disminución en el índice de fertilidad, el peso testicular, el recuento de células espermáticas y los porcentajes de movilidad y viabilidad espermáticas; asociadas con un aumento significativo de las anomalías de las células espermáticas (Shalaby et al., 2004). Las dietas ricas en ácidos grasos saturados y colesterol modifican la morfología testicular, con menor altura del epitelio seminífero, diámetro y proliferación celular (Campos-Silva et al., 2015), junto con una alteración en la barrera hemato-testicular y una deposición de lípidos en los túbulos seminíferos (Morgan et al., 2014). Además, un 20% de suplementación de grasa en la dieta durante la maduración sexual reduce notablemente la producción diaria de esperma durante la edad adulta en ratas Wistar (Reame et al., 2014). La aparición de estas comorbilidades debidas a la grasa de la dieta también podría afectar a las actividades AP que influyen en la activación del eje RAS, así como a otras peptidasas con funciones metabólicas y protectoras frente a los daños por estrés oxidativo.

Por otro lado, también se ha sugerido que varias de las actividades AP implicadas en el metabolismo de las angiotensinas en los tejidos renal y cardiovascular de rata, pueden ser modificadas dependiendo de la cantidad y del tipo de grasa en la dieta (Domínguez-Vías et al., 2008). Entre ellas se encuentran las actividades alanil-AP (Ala-AP; EC 3.4.11.2), glutamil-AP (Glu-AP o aminopeptidasa A; EC 3.4.11.7), AP regulada por insulina o cistinil-

AP (IRAP / Cys-AP; 3.4.11.3) y aspartil-AP (Asp-AP; EC 3.4.11.21), todas ellas relacionadas directa o indirectamente con el metabolismo de la Ang II, y con un importante papel en el desarrollo de los trastornos cardiovasculares y renales. La disfunción testicular también parece estar asociada a alteraciones del RAS local y a la composición en ácidos grasos de la dieta (Arechaga et al., 2002; Prieto et al., 2002; Segarra et al., 2013). Se ha establecido claramente en los testículos un sistema RAS local que puede participar en las funciones reproductivas masculinas (Prieto et al., 2002; Segarra et al., 2013; Alves-Pereira et al., 2014). Se ha sugerido que la actividad metabolizadora de Ang II (Glu-AP) puede verse influida, durante el desarrollo temprano de los ratones, por la composición de ácidos grasos en la dieta y por el contenido de colesterol (Arechaga et al., 2002). Esta suposición se basa en varios estudios independientes (Martínez et al., 1998; Arechaga et al., 2001; Ramírez et al., 2008). La composición de ácidos grasos en la dieta modifica los niveles de esteroides sexuales e influye en la fertilidad de los mamíferos. Sin embargo, los resultados aún no son concluyentes, y los mecanismos involucrados no se conocen en profundidad (Hurtado de Catalfo et al., 2009).

Por otro lado, el péptido similar al glucagón 1 (glucagon like peptide-1; GLP-1) es una hormona incretina con acción antidiabética gracias a su capacidad para estimular la secreción de insulina (Nauck et al., 1986a; Nauck et al., 1986b), aumentar la neogénesis de las células β e inhibir su apoptosis (Lovshin & Drucker, 2009), disminuir la secreción de glucagón (Hare et al., 2010), retrasar el vaciado gástrico e inducir la saciedad (Lovshin & Drucker, 2009; Hare et al., 2010), lo que sugiere que la alteración de la secreción y/o actividad de GLP-1 puede estar involucrada en la patogénesis de la obesidad (Lugari et al., 2004). En pacientes prediabéticos tratados solo de forma puntual con aceite de oliva virgen, se ha observado que la mejora de la glucemia postprandial y el perfil lipídico está relacionada con un aumento de GLP-1 y una disminución de la actividad dipeptidil-peptidasa 4 (DPP4 / CD26; EC 3.4.14.5), el enzima encargado de la inactivación de este péptido (Carnevale et al., 2017; 2018). Otros estudios realizados en pacientes respaldan la idea de que ciertos componentes presentes en las grasas de la dieta (Violi et al., 2015), en especial del EVOO, parecen ser responsables del aumento en la liberación del GLP-1 (Ceriello et al., 2014; Mandøe et al., 2015). Uno de los objetivos de este trabajo fue establecer, mediante un modelo crónico, cómo la calidad de la grasa de la dieta actúa sobre la DPP4, y por tanto sobre el GLP-1 y la regulación glicémica. Estos resultados podrían ser relevantes para la prevención de enfermedades crónicas, o su posterior tratamiento con GLP-1 o inhibidores de la DPP4.

Otro aspecto novedoso, del que poco se conoce, es la implicación de un grupo de AP en el control anorexígeno (saciedad) y hedónico (placer) implicados en la regulación de la homeostasis de la energía y la pérdida de peso. Entre estas actividades estarían la piroglutamil-AP (pGlu-AP; EC 3.4.11.8), que hidroliza la TRH en el hígado convirtiéndola en el dipéptido hipoglucemiante y antihiperlipidémico ciclo His-Pro (cHP) (Scharfmann et al., 1990; Prasad et al., 2015; Jung et al., 2016) (figura 3), o histidil-prolina diketopiperazina, lo que convierte el hígado en un potencial tejido diana para el restablecimiento de la glucemia y el nivel de insulina en sangre (Härdtner et al., 2013). Además, la actividad pGlu-AP también es conocida por degradar péptidos como la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), la neurotensina y la bombesina (Mendez et al., 1990; Ramírez et al., 2001). Resultados previos sugieren que el tipo de grasa utilizada en la dieta puede influir en la actividad local de pGlu-AP y modificar sus funciones biológicas (Arechaga et al., 2002; Ramírez et al., 2008; Härdtner et al., 2013). Además, también hay estudios que indican la implicación de los opioides en el control hedónico y metabólico de la alimentación y el desarrollo de la obesidad inducida por la dieta (Nauck et al., 1986a). Del mismo modo, se ha demostrado que la concentración de encefalinas (ENK) cambia en el hígado y en el plasma durante los trastornos hepáticos (Nauck et al., 1986b; Lovshin & Drucker, 2009), y después de una comida rica en grasas, desencadenando una mayor propensión a comer en exceso (Hare et al., 2010) y un aumento de la presión arterial sistólica (Mentlein et al., 1993). Las ENK se inactivan mediante enzimas específicas como la Tiroxil-AP (Tyr-AP; MEROPS ID S09.074) (Lugari et al., 2004). Por lo tanto, la actividad hepática de la Tyr-AP podría tener un papel crucial para evaluar el potencial de degradación de las ENK y como marcador biológico de cambios en el control hedónico asociado a la obesidad.

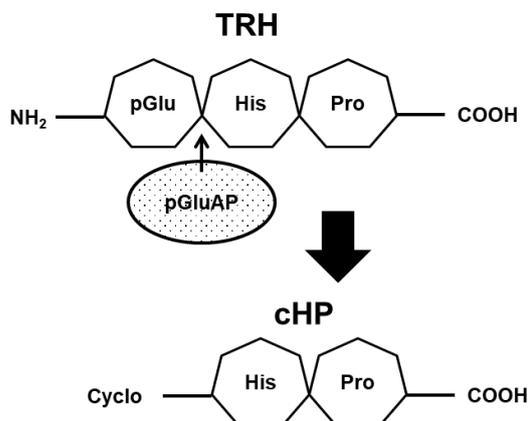


Figura 3. Acción metabólica de la actividad piroGlutamil-aminopeptidasa (pGluAP) sobre su sustrato hormona liberadora de tirotrópina (TRH), dando lugar al dipéptido histidil-prolina diketopiperazina, conocido como ciclo-His-Pro (cHP).

Por último, los lípidos se han asociado estrechamente con la generación intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Valko et al., 2007) como sustratos para el ataque

oxidativo y como fuente de generación de radicales libres. Las dietas altas en grasa y los cambios en el perfil de lípidos en plasma son desencadenantes del estrés oxidativo, provocando un aumento significativo de la actividad gamma-glutamyl transferasa (GGT; EC 2.3.2.2) (Abbas & Sakr, 2013). Por el contrario, el óxido nítrico (NO) ejerce un efecto protector en la prevención de las enfermedades hepáticas y la hepatotoxicidad generada como consecuencia de la ingesta de dietas altas en grasa (Taylor et al., 1998; Li & Billiar, 1999; Pan et al., 2015). La isoforma inducible hepática de la NO (iNOS) funcionaría como una respuesta adaptativa para minimizar la lesión inflamatoria provocada por el aumento en los niveles de estrés oxidativo (Taylor et al., 1998; Chen et al., 2003; Pan et al., 2015).

En este estudio nos planteamos el análisis de estos marcadores de estrés oxidativo GGT, NOx (NO₂ y NO₃) e i-NOS, junto con la leucil-AP (Leu-AP, EC 3.4.11.1) y un posible nuevo marcador funcional de carácter ubicuo, la Prolil-iminopeptidasa (PIP, EC 3.4.11.5) (Walter, et al., 1980; Juillerat-Jeanneret & Gerber-Lemaire, 2009), que ayudarían a detectar y prevenir los efectos de la peroxidación lipídica, fundamentalmente por su posible aplicación al tratamiento de enfermedades fibrogénicas. Las AP específicas de prolilo (prolina) incluyen la PIP, DPP4, DPP8, DPP9 y la proteasa alfa de activación de fibroblastos (FAP-alfa) / seprasa, capaces de liberar dipéptidos X-Pro del extremo amino de distintos péptidos (figura 4). Los inhibidores de la DPP4, así como del resto de familias dipeptidil peptidasas y otras enzimas hidrolizadoras de residuos prolilo, se utilizan actualmente en clínica para el tratamiento de la diabetes tipo 2, y son inhibidores selectivos de la proteína de activación de fibroblastos (Van der Veken et al., 2007; Tsai et al., 2010).

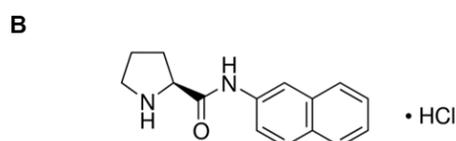
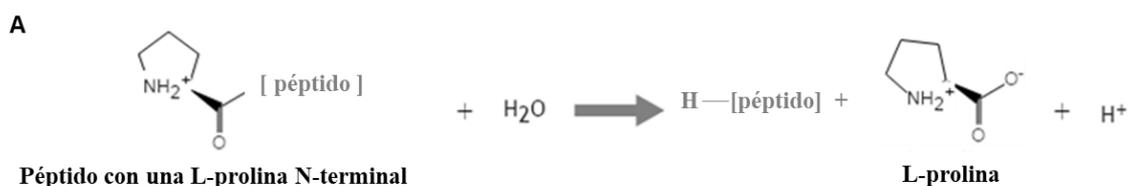


Figura 4. (A) Prolil Iminopeptidasa (PIP) actúa sobre la prolina para liberar la prolina N-terminal. (B) En nuestro estudio, la actividad de PIP se determinó en un ensayo fluorométrico utilizando Pro-NNap como sustrato.

Junto con el conocido papel de la DPP4 como regulador metabólico, esta enzima también es conocida como una proteasa específica de prolina que modula la bioactividad de varias quimiocinas, siendo por tanto una proteína multifuncional involucrada en la activación de las células T por coestimulación a través de su asociación con adenosina

desaminasa (ADA) y otras más (Wagner et al., 2016). En concreto, la DPP4 y proteínas con estructuras homólogas similares a DPP4 desempeñan papeles importantes en el sistema inmune (Wagner et al., 2016) que implican inactividad (DPP2), proliferación (DPP8 / DPP9), presentación de antígenos (DPP9), coestimulación (DPP4), activación de células T (DPP4), transducción de señales (DPP4, DPP8 y DPP9), diferenciación (DPP4, DPP8) y remodelación de tejidos (DPP4, FAP-alfa). Por lo tanto, los enzimas de la familia DPP4 están involucrados en muchos procesos fisiopatológicos y, por lo tanto, se han propuesto para posibles biomarcadores, o incluso objetivos farmacológicos, en distintos tipos de cáncer (DPP4 y FAP), daño hepático y enfermedades inflamatorias (DPP4, DPP8 / DPP9) (Chowdhury et al., 2013; Wagner et al., 2016).

Por lo tanto, una mejor comprensión del efecto de la cantidad y calidad de la grasa de la dieta sobre estos mecanismos moleculares es extraordinariamente relevante para prevenir trastornos asociados, como la obesidad, infertilidad y otras patologías relacionadas con el Síndrome Metabólico, lo que contribuiría a aplicar tratamientos dietéticos más selectivos.

Gustafsson et al. (1981) propusieron una teoría de interacción en el eje hipotálamo-hipófisis-hígado (HHH) para el control hormonal hepático, en particular de esteroides y fármacos (figura 5). Postularon la existencia de un factor hipotalámico, producido en la región supraóptica y área hipotalámica anterior, denominado “feminostatina”, capaz de inhibir la secreción hipofisaria de un “factor feminizante o de feminización (FF)” en las ratas macho. En las hembras, la liberación de FF por la hipófisis produciría un tipo de metabolismo hepático característico.

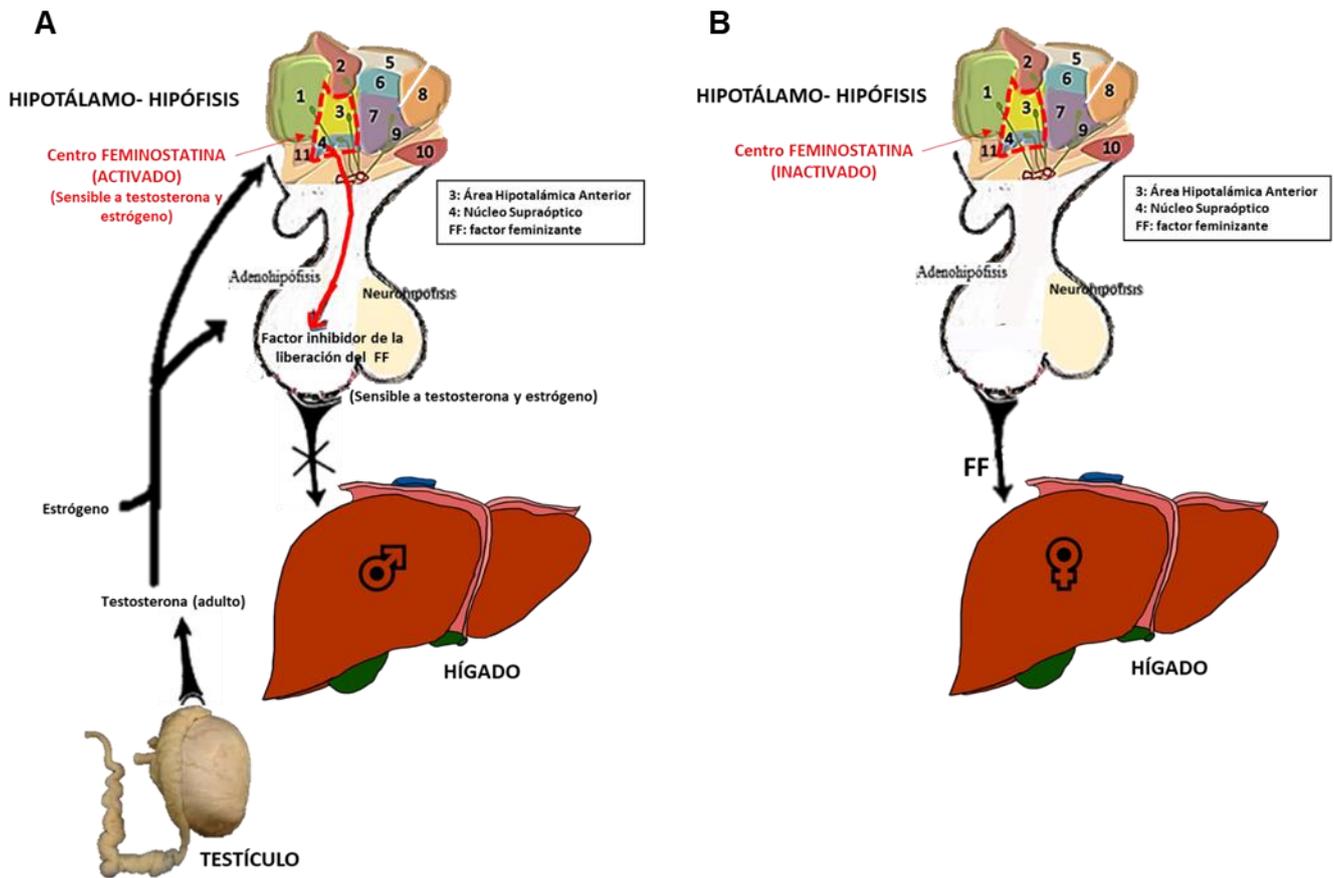


Figura 5. En el hombre adulto (A), el centro activado de la feminostatina produce el factor inhibidor del factor feminizante (FF), que actúa sobre la hipófisis para evitar la liberación FF. La falta de FF en el torrente sanguíneo de las ratas macho conduce a un tipo masculino de metabolismo de esteroides y fármacos en el hígado. En la hembra adulta (B) el centro de feminostatina está inactivo; por lo tanto, FF se libera de la hipófisis y actúa directamente sobre el hígado para producir un metabolismo de tipo femenino. La acción de los andrógenos y los estrógenos en el período adulto se explica en el modelo propuesto hipotetizando que los efectos de estos esteroides están mediados por el eje hipotálamo-hipofisario. Fuente: Ilustración propia.

De la misma forma, los autores también sugerían que el hígado de la rata macho es más vulnerable a la acción hepatocarcinogénica de ciertas drogas, trazando un paralelismo con diferencias sexuales similares en la incidencia de cáncer de hígado en humanos. Por tanto, el eje HHH es un sistema de control central endocrino de gran importancia en la regulación del metabolismo esteroideo hepático, y la generación de toxicidad en el hígado desencadena aspectos claves para la regulación del eje hipotálamo-hipofisario y del propio metabolismo del hígado (Gustafsson et al., 1981).

Por otro lado, el diagnóstico de la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) está asociada con la aparición de Síndrome Metabólico, incluyendo obesidad, diabetes mellitus y dislipidemia. La NAFLD debe diferenciarse en hígado graso no

alcohólico (NAFL) y esteatohepatitis no alcohólica (NASH). Si bien NAFL se define por la presencia de esteatosis hepática sin lesión hepatocelular, NASH incluye lesión de los hepatocitos. La NAFLD es un espectro de daño hepático que progresa desde la acumulación de lípidos dentro de los hepatocitos, la inflamación, hasta la cicatrización y la cirrosis.

Está bien documentado que los hombres con Síndrome Metabólico (SM) tienen una mayor prevalencia de hipogonadismo (Muraleedharan & Jones, 2010; Stål, 2015; Pivonello et al., 2019). Sin embargo, la naturaleza bidireccional de la relación entre alteraciones de las gónadas (hipogonadismo) y el NAFLD es compleja y multifactorial (figura 6).

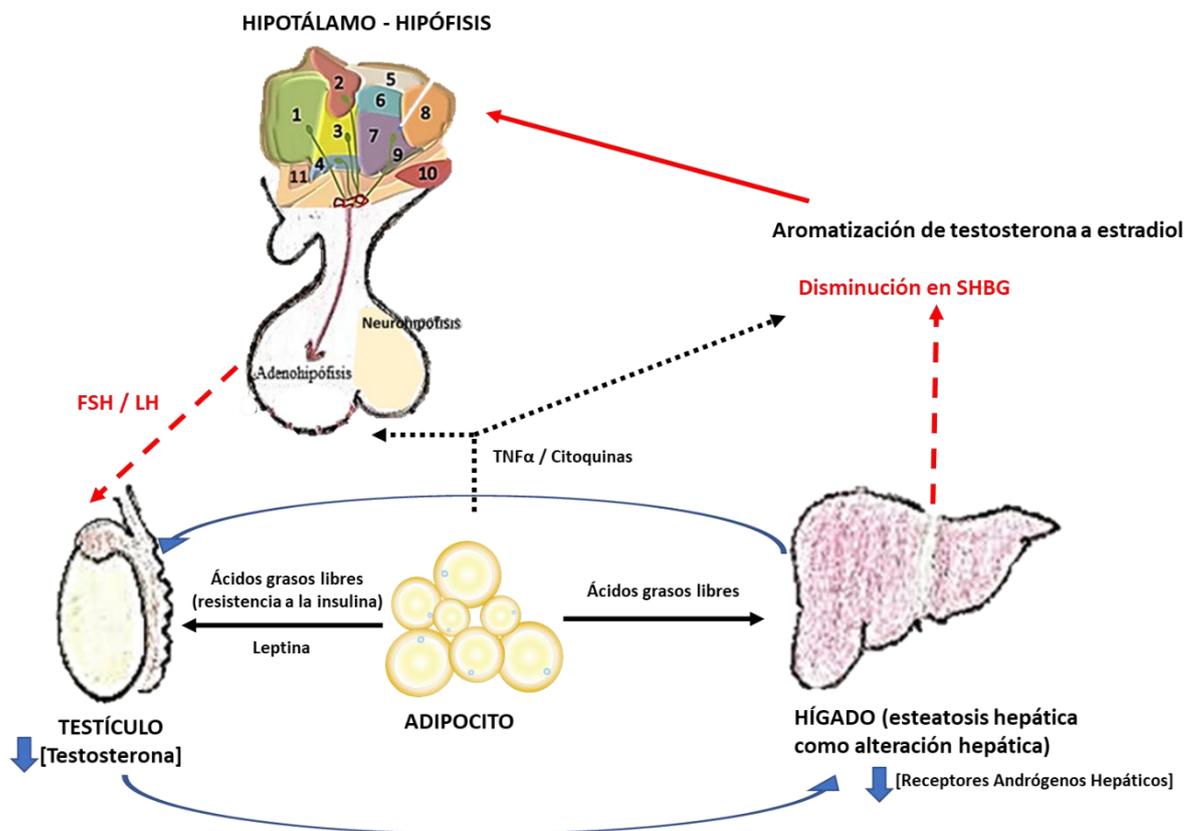


Figura 6. Mecanismo propuesto de la relación bidireccional entre hipogonadismo y enfermedad del hígado graso no alcohólico. El tejido adiposo puede desempeñar un papel central en la relación bidireccional entre el hipogonadismo y la enfermedad del hígado graso no alcohólico. El aumento de la secreción de ácidos grasos libres da como resultado resistencia a la insulina y, posteriormente, disminuye la producción de testosterona (Segarra et al., 2008). La leptina también puede ser directamente tóxica para los testículos. La regulación a la baja de la producción de testosterona puede conducir a una activación reducida de los receptores de andrógenos en los hepatocitos, aumentando aún más la esteatosis hepática. La producción de ácidos grasos libres de los adipocitos también puede tener un efecto esteatogénico directo sobre el hígado. Los tejidos adiposos también pueden aumentar la producción de citoquinas, lo que lleva a una regulación

descendente central del eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónadas (HHG) y promueve la conversión periférica de testosterona a estrógeno. Fuente: Ilustración propia con imágenes libres de derecho etiquetada para su reutilización. SHBG: globulina fijadora de hormonas sexuales; FSH: hormona estimuladora del folículo; LH: hormona luteinizante; TNF α : factor de necrosis tumoral alfa.

Una hipótesis señala que la obesidad es el impulsor predominante del hipogonadismo en pacientes con NAFLD / SM (Lonardo et al., 2016; Benedict & Zhang, 2017). El exceso de leptina, una adipocina, en hombres obesos inhibe directamente la androgénesis de las células de Leydig. Tanto el tejido adiposo subcutáneo como el visceral pueden afectar directamente a la liberación de gonadotropina por parte de la hipófisis, ya sea por una mayor secreción de citocinas, como TNF- α o IL-2, o por una mayor conversión de andrógenos circulantes en estrógenos, lo que contribuye aún más a la retroalimentación negativa. La aromatasa se expresa en los tejidos adiposos, y los pacientes obesos pueden tener una mayor expresión de esta enzima. Además, la globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG), una de las principales proteínas de transporte de testosterona, disminuye en pacientes obesos, lo que contribuye a niveles bajos de testosterona total (Hammond, 2016; Castellano-Castillo et al., 2019). Otra idea es que el aumento del tejido adiposo visceral, que se debe en parte a la deficiencia de testosterona, aumenta la exposición hepática a los ácidos grasos libres, lo que puede empeorar la resistencia a la insulina hepática y la resistencia a la insulina sistémica (Segarra et al., 2008; Castellano-Castillo et al., 2019). La función de las células de Leydig también puede verse afectada directamente en hombres con resistencia a la insulina (Pitteloud et al., 2005). Existe cierta evidencia de que el tratamiento con testosterona puede disminuir la adiposidad visceral y mejorar la sensibilidad a la insulina (Muraleedharan & Jones, 2010). Se han realizado varios estudios que sugieren que la deficiencia de andrógenos y los bajos niveles de SHBG en pacientes con Síndrome Metabólico pueden asociarse independientemente con esteatosis hepática.

Por otro lado, los niveles bajos de SHBG se han asociado con la NAFLD, lo que probablemente sea una de las principales razones para tener niveles bajos de testosterona. Los niveles de SHBG son más bajos con el aumento de la obesidad, la diabetes tipo 2 y el desarrollo de Síndrome Metabólico (Le et al., 2012; Mohammed et al., 2018; Pivonello et al., 2019). Se ha demostrado que el aumento de TNF α e IL-1 β en el Síndrome Metabólico reduce la expresión de SHBG en las células HepG2 al disminuir el HNF4 α (factor nuclear de hepatocitos 4- α), que es responsable de activar los promotores de múltiples genes expresados en el hígado y que intervienen en el metabolismo lipídico (Simó et al., 2012). Actualmente se está desarrollando una creciente investigación sobre la relación entre la

testosterona y los microARN (miARN) en el hígado. Algunos estudios sugieren que la regulación negativa de los miARN en el hígado puede conducir a enfermedades hepáticas, y que la testosterona está relacionada con la regulación de miARN en el hígado del ratón (Delić et al., 2010; Hsu & Ghoshal, 2013). Específicamente, la testosterona parece afectar la regulación positiva de 6 miRNA: miR-22, miR-690, miR-122, let-7A, miR-30D y let-7D.

[3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS]

Hipótesis de partida:

Las dietas altas en grasa han demostrado ejercer un profundo efecto sobre el funcionamiento de distintos sistemas fisiológicos, cuyas alteraciones se relacionan con patologías como el Síndrome Metabólico y la infertilidad. Estas alteraciones podrían estar relacionadas con cambios en la actividad de distintos enzimas proteolíticos que intervienen en la regulación de péptidos bioactivos. No obstante, el efecto sobre el desarrollo de dichas patologías podría depender no solo de la cantidad de grasa en la dieta, sino también de su calidad.

Objetivo general

Estudiar el efecto crónico, tanto de la cantidad como de la calidad de la grasa en la dieta, sobre la actividad de distintas aminopeptidasas reguladoras de péptidos bioactivos en hipotálamo, hipófisis, hígado y testículos, y su relación con cambios fisiológicos vinculados al Síndrome Metabólico y la infertilidad.

Objetivos específicos

Objetivo#1. Efectos sobre ingesta de alimento y energía, el incremento de peso corporal, y la regulación de la presión arterial sistólica (PAS)

Analizar la evolución del peso corporal, los valores de presión arterial sistólica (PAS), y la conducta alimentaria (tasa de ingesta de alimentos y de energía), tras la administración a largo plazo (6 meses) de HFDs con distintos grados de saturación de los ácidos grasos y distinta composición.

Objetivo#2. Efectos a nivel metabólico: cambios plasmáticos en el perfil glicémico, lipídico, en factores hormonales (insulina y GLP-1) y en marcadores de estrés oxidativo (NOx y NO total)

Mejorar nuestro conocimiento sobre los mecanismos subyacentes a los efectos beneficiosos o nocivos de la dieta mediterránea sobre las funciones metabólicas, mediante el análisis de parámetros bioquímicos. Además, se evaluará en plasma la capacidad

antioxidante de las dietas a través de los valores de óxido nítrico (NO) total y NOx (nitratos y nitritos).

Objetivo#3. Aminopeptidasas en hipotálamo-hipófisis: relación con el control de la glucemia, la regulación de la ingesta de alimento, y la regulación de los Sistemas Renina-Angiotensina (RAS).

Estudiar el posible efecto de la composición de las dietas enriquecida con aceite de oliva virgen extra (EVOO) y enriquecida con mantequilla y colesterol (Bch) sobre la actividad enzimática cerebral de AP reguladores del RAS, del control metabólico y del estrés oxidativo.

Objetivo#4. Aminopeptidasas en hígado: relación con el control de la glucemia, la regulación de la ingesta de alimento, la regulación del Sistema Renina-Angiotensina (RAS) local, y con marcadores de estrés oxidativo.

Estudiar el posible efecto de la composición de las dietas EVOO y Bch sobre la actividad enzimática hepática de AP reguladores del RAS, del control metabólico, y sobre marcadores de estrés oxidativo y daño funcional.

Objetivo#5. Aminopeptidasas en testículo: relación con los cambios en el perfil lipídico en plasma y los niveles de estrés oxidativo.

Estudiar el posible efecto de la composición de las dietas EVOO y Bch en las gónadas masculinas sobre la actividad enzimática de AP reguladores del RAS y AP implicadas en el estrés oxidativo y la inmunomodulación.

[4. DISEÑO EXPERIMENTAL Y MÉTODOS]

Para el inicio de la fase experimental se contó con ratas macho de la raza Wistar, de 6 meses de edad, de un suministrador autorizado de la Universidad de Jaén (Centro de Producción y Experimentación Animal (CPEA)). La manipulación y el cuidado de los animales se realizaron de acuerdo con las directrices del Consejo de la Unión Europea, (86/609/UE) y las regulaciones españolas (Ley 32/2007, de 7 de noviembre; RD 53/2013, de 1 de febrero; Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo; Ley 9/2003, de 25 de abril; RD 178/2004, de 31 de enero) sobre el uso y cuidado de animales de laboratorio y organismos modificados genéticamente. El estudio se llevó a cabo tras la aprobación por el Comité de Ética en Experimentación Animal (CEEA) de la Universidad de Jaén. Los animales se alojaron en una habitación con la temperatura y humedad controladas y con un ciclo luz/oscuridad 12:12 h. El alimento y el agua estuvieron disponibles *ad libitum* durante 24 semanas hasta la finalización de los experimentos. El periodo experimental duró un total de 12 meses (6 + 6 meses). Desde el nacimiento de los animales, se esperó a que alcanzasen la edad adulta (seis meses). Durante este periodo todos los animales recibieron la dieta estándar (E). A partir de los 6 meses, los animales se dividieron en tres grupos: Uno de ellos siguió consumiendo la dieta estándar (E). Los otros dos grupos recibieron dos dietas altas en grasa, en uno de ellos la dieta estándar se suplementó con un 20% de EVOO, y la segunda con un 20% de mantequilla más 0,1% de colesterol.

A continuación, se describe el procedimiento experimental y la metodología en función de los objetivos marcados en el apartado anterior:

Objetivo#1. Efectos sobre ingesta de alimento y energía, el incremento de peso corporal, y la regulación de la presión arterial sistólica (PAS)

Los animales fueron divididos en tres grupos. Al primero de ellos se le administró una dieta estándar (E), al segundo una HFD (20%) enriquecida con aceite de oliva virgen (EVOO), y al tercero una HFD (20%) pero enriquecida con mantequilla y colesterol (0,1%) (Bch). Las dietas HFD fueron isocalóricas. El valor nutricional y el perfil lipídico de las dietas utilizadas durante los periodos experimentales se muestran en la Tabla 2 (Anexo I: *Nutrients*, 2020) y en la Tabla Suplementaria S1 (Anexo II: *IJMS*, 2017). La dieta E era baja en grasa (3%) y alta en carbohidratos en comparación con las dietas EVOO y Bch. La dieta EVOO se caracterizaba por su alto contenido en ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) y polifenoles, y la dieta Bch por su alto contenido en ácidos grasos saturados (SAFA) y colesterol.

Previo al periodo experimental se tomaron de cada animal medidas de peso corporal, presión arterial sistólica (PAS) y frecuencia cardiaca una vez por semana, con el fin de distribuirlos en los grupos de manera homogénea, y evitar que los factores indicados con anterioridad influyeran en los resultados. La medición de la PAS se realizó con el medidor Letica 5000, utilizando el método de pletismografía neumática “tail-cuff” por poseer un manguito de cola. La técnica consistía en medir la presión y las pulsaciones con un transductor aplicado sobre la arteria caudal dilatada de la cola, tras la introducción de los animales en hábitaculos aclimatados con una temperatura de 37° C durante 15-20 minutos. Se insuflaba aire al manguito ocluser hasta alcanzar los 250 mmHg, valor de referencia para la oclusión de la arteria caudal. A continuación, se desinflaba bruscamente el manguito ocluser hasta el aviso de un testigo luminoso del medidor, correspondiendo con el valor de la PAS e indicando la aparición de un flujo sanguíneo aumentado y turbulento como resultado de la hiperemia. En cada sesión se llevó a cabo al menos siete mediciones de la PAS, considerándose como valor de PAS la media de los tres valores menores dentro de un rango de 5 mmHg (Prieto et al., 2001).

Los animales se alimentaron con las dietas experimentales seis meses, durante los cuales se realizaron dos periodos de balance en jaulas de metabolismo individuales (segundo y sexto mes), con el fin de obtener valores de ingesta de agua y alimento, así como muestras de heces y orina.

Objetivo#2. Efectos a nivel metabólico: cambios plasmáticos en el perfil glicémico, lipídico, en factores hormonales (insulina y GLP-1) y en marcadores de estrés oxidativo (NOx y NO total)

Obtención de las muestras

Al final del periodo experimental, concluidos los 6 meses de tratamiento dietético, se les realizó una curva de tolerancia a la glucosa (GTT) a todos los animales. Para ello, a cada animal se le determinó los niveles de glucosa basales en sangre antes de suministrarles una sobrecarga de glucosa intraperitonealmente (ip). A los 20, 40, 60 y 90 minutos se les volvió a tomar muestras de sangre para determinar la evolución en la glucemia.

Los animales se mantuvieron en ayuno 12 horas antes del sacrificio. Se anestesiaron con equitensin (2 mL/kg peso corporal) y se procedió a la extracción de las muestras de sangre por punción en el ventrículo izquierdo. Las muestras del resto de tejidos centrales (hipotálamo e hipófisis) y periféricos (hígado y testículo) se obtuvieron por disección, previa perfusión del animal con solución salina (NaCl 9 ‰) a través del ventrículo cardíaco izquierdo. Las muestras de tejido fueron rápidamente congeladas y mantenidas a -80°C hasta su utilización. Las muestras de sangre se centrifugaron durante 10 minutos a 2000 g para obtener el plasma y analizar los niveles plasmáticos de proteína, triglicéridos, colesterol total y sus fracciones lipoproteicas (cHDL, cLDL, VLDL), GLP-1, insulina, NOx y otros parámetros bioquímicos.

Determinación de colesterol y triglicéridos

Se determinó el colesterol total y de las distintas fracciones lipoproteicas en plasma, HDL y LDL, por separado, tras precipitación con ácido fosfotúngstico y cloruro de magnesio. Con este método precipitan las lipoproteínas que contienen apoB (quilomicrones, VLDL, LDL) quedando en el sobrenadante las lipoproteínas HDL (constituidas por una población heterogénea de lipopartículas que contienen apoA). Posteriormente se cuantificó el colesterol total y el del sobrenadante (cHDL) por el método enzimático CHOD-PAP mediante un kit (Sigma, EE. UU.). El colesterol-LDL se calculó mediante la fórmula de Friedewald:

$$\text{Col LDL} = \text{col TOTAL} - (\text{TGL}/5) - \text{col HDL}$$

Los triglicéridos del plasma se cuantificaron por un método enzimático basado en la reacción de Bucolo y David (1973) mediante un kit (Sigma, EE.UU.).

Determinación de insulina y GLP-1

Los niveles de insulina en plasma se determinaron usando un kit ELISA (Mercodia Developing Diagnostics, EE.UU.). Las concentraciones plasmáticas de GLP-1 se determinaron usando un kit ELISA (Cayman, EE. UU.).

Determinación de la resistencia a la insulina (RI)

Se calculó un modelo de homeostasis de resistencia a la insulina (HOMA2-RI) usando el software HOMA Calculator v.2.2.3 (www.dtu.ox.ac.uk), donde se estableció una

relación lineal entre la glucosa y la insulina. Con este programa, es posible calcular HOMA2-% B, un índice de secreción de insulina y valoración de la utilidad de las células β (% de secreción de células β), y conocer HOMA2-% S, un índice para estimar la sensibilidad a la insulina (% sensibilidad a la insulina).

Medición indirecta de óxido nítrico (NO): Niveles plasmáticos de nitrito y nitrato (NOx)

Como indicador de los niveles de estrés oxidativo se estudiaron los niveles plasmáticos de NOx, que fueron analizados mediante el método de Griess como la suma de NO_2^- y NO_3^- , determinados mediante un kit de ensayo (Óxido Nítrico Total y Nitrato/Nitrito) adquirido a R&D Systems (Minneapolis, EE.UU.).

Objetivo#3. Aminopeptidasas en hipotálamo-hipófisis: relación con el control de la glucemia, la regulación de la ingesta de alimento, y la regulación de los Sistemas Renina-Angiotensina (RAS).

Se recogieron muestras de hipotálamo e hipófisis para determinar las actividades AP/angiotensinasa que regulan el RAS, así como otras AP involucradas en el control metabólico y en la regulación de las ENK (encefalinas) y TRH (tiroliberinas).

Para obtener la fracción soluble de las muestras de tejido, se homogeneizaron con 0,5 mL de tampón Tris-HCl 10 mM (pH 7,4) y se ultracentrifugaron a 100.000 g durante 30 minutos a 4°C. Los sobrenadantes resultantes se usaron para medir las actividades enzimáticas de la fracción soluble, y el contenido en proteínas. Para solubilizar las proteínas de membrana, los sedimentos se rehomogeneizaron en tampón Tris-HCl 10 mM (pH 7,4) con Triton-X-100 al 1%. Se mantuvieron durante al menos 4h a 4°C y en agitación con bio-beads SM-2, al objeto de retirar el detergente utilizado para solubilizar las proteínas de membrana. Posteriormente se ultracentrifugaron (100.000 g, 30 minutos, 4°C). Las muestras resultantes, tras la extracción de los bio-beads SM-2 (Alba et al., 1995) se usaron para medir las mismas actividades enzimáticas de la fracción unida a membrana, y el contenido en proteínas.

Este protocolo de extracción de proteínas (solubles y unidas a membrana) es el mismo independientemente del tejido que sea tratado.

Determinaciones enzimáticas

Las fracciones solubles y unida a membrana de las actividades enzimáticas de Ala-AP, Arg-AP, Asp-AP, Cys-AP / IRAP, Glu-AP, GGT, Leu-AP, pGlu-AP, PIP, Tyr-AP, y DPP4, se midieron por fluorimetría utilizando como sustratos las arilamidas L-Ala- β -NA, L-Arg- β -NA, L-Asp- β -NA, L-Cys- β -NA, L-Glu- β -NA, L- γ Glu- β -NA, L-Leu- β -NA, L-pGlu- β -NA, L-Pro- β -NA, L-Tyr- β -NA y L-Gly-Pro- β -NA respectivamente, de acuerdo con los métodos de Greenberg (1962), Tobe et al. (1980) y Cheung and Cushman (1971), modificados por Prieto et al. (2001) y Ramírez et al. (2011). Se utilizaron placas negras de 96 pocillos, en cada pocillo se pipetearon 10 μ L de muestra sobrenadante que se incubaron durante 30 minutos a 37°C en 100 μ L de las soluciones sustrato. A los 30 minutos de incubación, la reacción enzimática se detuvo mediante la adición de 100 μ L de tampón acetato 0,1 M (pH 4,2). La β -NA liberada como resultado de la actividad enzimática, se cuantificó por fluorimetría a 412 nm de emisión con una excitación de 345nm. Cada determinación se realizó por triplicado. Las actividades solubles y unidas a membrana se expresaron como pmoles de L-Ala- β -NA, L-Arg- β -NA, L-Asp- β -NA, L-Cys- β -NA, L-Glu- β -NA, L- γ Glu- β -NA, L-Leu- β -NA, L-pGlu- β -NA, L-Pro- β -NA, L-Tyr- β -NA y L-Gly-Pro- β -NA hidrolizados por minuto y por mg de proteína (μ mol aa- β -NA/min/mg prot).

Este protocolo de determinaciones enzimáticas es el mismo independientemente del tejido que sea tratado.

Determinación de proteínas

Para la determinación de proteínas se utilizó el método de Bradford (1976), basado en la emisión de luz a 595 nm. Para realizar la curva patrón se utilizó albúmina de suero bovino (BSA) como estándar.

Este protocolo de determinación de concentración de proteínas (solubles y unidas a membrana) es el mismo independientemente del tejido que sea tratado.

Objetivo#4. Aminopeptidasas en hígado: relación con el control de la glucemia, la regulación de la ingesta de alimento, la regulación del Sistema Renina-Angiotensina (RAS) local, y con marcadores de estrés oxidativo.

Se recogieron muestras de tejido hepático para actividades de angiotensinasa, encefalinasa y tiroliberinas, marcadores de daño hepático, e inmunotransferencia para iNOS hepático.

El nivel del estrés oxidativo, como efecto de la peroxidación lipídica, fue estimado mediante marcadores funcionales convencionales (GGT). Se midió también la PIP como una nueva herramienta de diagnóstico del estado funcional del hígado.

Las distintas actividades aminopeptidasas objeto de estudio en el hígado (Ala-AP, Asp-AP, Cys-AP / IRAP, DPP4, GGT, Glu-AP, Leu-AP, PIP, pGlu-AP y Tyr-AP) se determinaron siguiendo los mismos métodos que se indican en el apartado anterior.

Extracción de proteínas y análisis de la expresión de iNOS por Western Blot

Para la transferencia Western, se aisló la proteína total de las muestras de hígado. Las muestras de hígado se homogeneizaron en un tampón de extracción de proteínas en frío, suplementado con inhibidores de fosfatasa y proteasas (Tris-HCl, 0,1 M, pH 7,5; aprotinina, 0,1 mg / mL; pirofosfato de sodio, 0,1 M; fluoruro de sodio, 0,1 M; EDTA (ácido tetracético de etilendiamina), 0,01 M; ortovanadato de sodio, 0,01 M; y PMSF (fluoruro de metil sulfonilo de fenilo), 0,002 M), mezclado con Triton X-100 al 10% y centrifugado (12.000 g durante 30 minutos a 4°C). Se recogieron los sobrenadantes y se analizaron los contenidos de proteínas con una reacción de micro Lowry (Ensayo de proteínas DCTM # 500-0116) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.). Se cargó la misma cantidad de proteína extraída de cada muestra (30~40 µg) para el análisis de inmunoblotting con electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE). Las proteínas separadas se transfirieron electroforéticamente a una membrana de nitrocelulosa (Amersham), que luego se bloqueó con BSA al 5% y Tween al 0,1% durante 60 minutos a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron, durante toda la noche a 4°C, con un anticuerpo primario específico dirigido contra iNOS (1:100; BD Biosciences, EE.UU.). Las membranas se procesaron con un anticuerpo anti- α 1-tubulina (1:4.000; Sigma) como controles internos de la cantidad total de proteína cargada en cada carril. Las regiones que contienen proteínas se visualizaron usando ECL (reactivo de detección de transferencia

Western Amersham ECL # RPN2232) adquirido de GE Healthcare Life Sciences (Buckinghamshire, Reino Unido). Cada banda se normalizó por el valor correspondiente de α 1-tubulina como control interno. El análisis densitométrico se llevó a cabo con el software ImageJ 1.36b del National Institute of Health (NIH, EE.UU.). Los anticuerpos primarios y secundarios contra las proteínas se enumeran en la Tabla S3 (Anexo I: *Nutrients*, 2020).

Objetivo#5. Aminopeptidasas en testículo: relación con los cambios en el perfil lipídico en plasma y los niveles de estrés oxidativo.

Se recogieron muestras de tejido testicular para determinar si la influencia de la cantidad y calidad de la grasa en la dieta sobre el RAS testicular y la fertilidad masculina puede estar mediada en parte por actividades de AP/angiotensinasas, AP inmunoregulatoras (DDP4), y AP de funcionalidad ante el daño oxidativo (GGT). Las distintas actividades aminopeptidasas objeto de estudio en el testículo (Ala-AP, Asp-AP, Cys-AP / IRAP, DPP4, GGT, Glu-AP) se determinaron siguiendo los mismos métodos que se indican en los apartados anteriores.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico mediante ANOVA unidireccional seguido de la prueba post-hoc de Tukey para comparaciones múltiples. Se realizó una comparación paramétrica entre dos grupos con una prueba t de Student no apareada. La relación entre variables se evaluó mediante el coeficiente de correlación de Pearson. La presencia de diferencia significativa se estimó con el software Sigmaplot v11.0 (Systat Software, Inc., San José, CA, EE.UU.), y los valores de p-valor por debajo de 0,05 ($p < 0,05$) se consideraron estadísticamente significativos. Todos los datos se presentan como media \pm error estándar de la media (SEM).

[5. RESUMEN GLOBAL DE LOS RESULTADOS]

A continuación, se resumen los principales resultados obtenidos en función de los parámetros que se definieron en los objetivos anteriores:

Objetivo#1. Efectos sobre ingesta de alimento y energía, el incremento de peso corporal, y la regulación de la presión arterial sistólica (PAS)

5.1. Cambios en la ingesta de alimento y el peso corporal.

5.1.1. Peso corporal. (Información y figuras recogidas en el artículo del Anexo II: Domínguez-Vías et al. *Int. J. Mol. Sci.* 2017).

Los animales alimentados con la dieta Bch mostraron un mayor peso corporal al final del periodo experimental en comparación con los grupos E y EVOO. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre las dietas E y EVOO durante todo el período experimental (figura 1A).

Al final del período experimental, el aumento de peso corporal fue de $61,32 \pm 8,39$ g/día para la dieta E y $84,21 \pm 6,71$ g/día para la dieta EVOO (37,33% mayor que el grupo E) sin diferencias significativas entre ellos. Sin embargo, el aumento medio de peso corporal para Bch fue $140,08 \pm 8,92$ g/día, que fue significativamente mayor en comparación con los grupos E y EVOO (128,44% más que E y 65,56% más que EVOO) (figura 1B).

5.1.2. Ingestas de alimento y energía. (Información y figuras recogidas en el artículo del Anexo I: Domínguez-Vías et al. *Nutrients* 2020).

Se observó una diferencia significativa entre las dietas EVOO y Bch para la ingesta diaria de alimentos (g/100g de peso corporal), con los valores más bajos encontrados para las ratas alimentadas con Bch (figura 1A: Bch, $1,6 \pm 0,3$ g; EVOO, $1,8 \pm 0,2$ g; E, $2,6 \pm 0,3$ g; $p < 0,05$). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas para la ingesta de energía (kJ/día) entre los grupos (figura 1B: E, $181,8 \pm 19,9$; EVOO, $178,2 \pm 15,4$; Bch, $171,4 \pm 22,8$).

5.2. Presión arterial sistólica (PAS).

Con la misma periodicidad que para el peso, una vez al mes, se realizaron medidas de los valores de PAS de cada uno de los animales utilizando el método pletismográfico.

Los resultados obtenidos (figura 7) indicaron que, si bien durante los dos primeros meses de experimento prácticamente no se observaron diferencias entre los tres grupos de animales, en el tercer mes se observó un incremento muy marcado para los animales que estaban consumiendo la dieta Bch, valores superiores que se mantuvieron hasta el final del periodo experimental (Mes 3: E, $127,0 \pm 3,5$; EVOO, $129,4 \pm 5,4$; Bch, $147,6 \pm 6,2$ mmHg; Mes 4: E, $132,0 \pm 4,5$; EVOO, $124,4 \pm 4,3$; Bch, $147,6 \pm 7,6$ mmHg; Mes 5: E, $127,1 \pm 5,4$; EVOO, $128,7 \pm 7,2$; Bch, $144,1 \pm 5,3$ mmHg). Sin embargo, no hubo diferencias apreciables para este valor entre los animales alimentados con la dieta E y la EVOO, aun cuando esta última contenía un porcentaje superior de grasa.

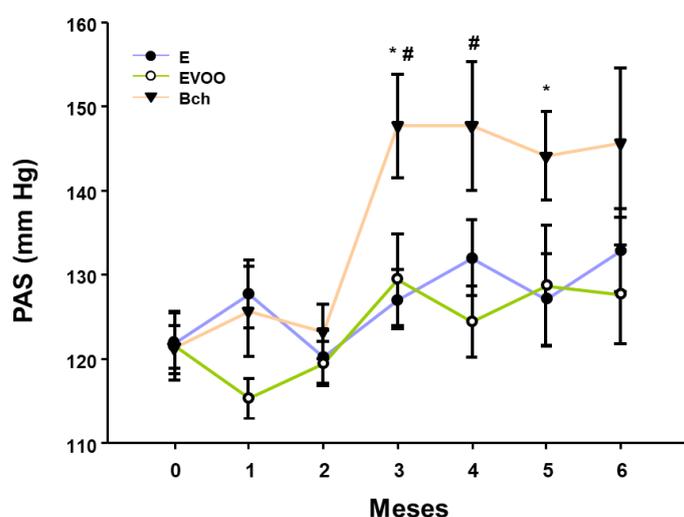


Figura 7. Valores medios \pm errores estándar de la evolución temporal de la presión arterial sistólica (PAS) de los grupos que recibieron la dieta estándar (E), enriquecida en aceite de oliva virgen (EVOO) y mantequilla más colesterol (Bch). Los valores se han expresado como milímetros de mercurio (mmHg). * $p < 0,05$; muestra diferencias significativas de la dieta Bch con respecto a la dieta E. # $p < 0,05$; muestra diferencias significativas de la dieta Bch con respecto a la dieta EVOO.

Objetivo#2. Efectos a nivel metabólico: cambios plasmáticos en el perfil glicémico, lipídico, en factores hormonales (insulina y GLP-1) y en marcadores de estrés oxidativo (NOx y NO total)

5.3. Análisis de los parámetros bioquímicos: cambios plasmáticos en el perfil glicémico, lipídico y en factores hormonales (insulina y GLP-1).

5.3.1. Prueba de tolerancia a la glucosa (GTT), cambios en el control glucémico y relación con la insulina. (Información y figuras recogidas en el artículo del Anexo I: Domínguez-Vías et al. *Nutrients* 2020).

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos en la glucosa plasmática en ayunas (Figura 1E: E, $63,8 \pm 7,6$ mg/dL; EVOO, 83 ± 13 mg/dL; Bch, $63 \pm 2,5$ mg/dL) e insulina (Figura 1C: E, $0,5 \pm 0,1$ ng/mL; EVOO, $0,4 \pm 0,1$ ng/mL; Bch, $0,5 \pm 0,1$ ng/mL). Los efectos de diferentes dietas sobre la tolerancia a la glucosa se establecieron al final del período experimental mediante el uso de GTT (Figura 1D). Los niveles más altos de glucosa en plasma se alcanzaron después de 20 min de una inyección i.p. en los grupos E y Bch (Figura 1E: E, $286,7 \pm 34,9$ mg/dL; EVOO, $214,5 \pm 43,4$ mg/dL; Bch, $214,8 \pm 15,7$ mg/dL). Sin embargo, los animales EVOO alcanzaron los mayores valores de glucosa plasmática a los 60 minutos después de la inyección i.p. (E, $124,5 \pm 11,7$ mg/dL; EVOO, $282,8 \pm 58,5$ mg/dL; Bch, $135 \pm 12,3$ mg/dL), y se mantuvieron elevados a los 90 min.

Con respecto al modelo de homeostasis de resistencia a la insulina (HOMA2-RI), en ayunas no se encontraron diferencias significativas entre las dietas en la relación de insulina/glucosa (Figura 1D: E, $25,8 \pm 9,5$ μ IU/mg; EVOO, $13,7 \pm 5,0$ μ IU/mg; Bch, $26,3 \pm 5,5$ μ IU/mg), HOMA2-RI (Figura 1F: E, $1,7 \pm 0,4$; EVOO, $1,3 \pm 0,3$; Bch, $1,9 \pm 0,5$), HOMA2-% S (Figura 1G: E, $74,8 \pm 19,8$; EVOO, $86,6 \pm 22,6$; Bch, $60,7 \pm 19,1$) o HOMA2-% B (Figura 1H: E, $286,5 \pm 87,7$; EVOO, $159,6 \pm 58,9$; Bch, $317,2 \pm 31,6$). De la misma forma, tampoco se encontró diferencias significativas en los niveles de GLP-1 con los tres tipos de dietas (figura 1I: E, $4,3 \pm 1,0$ pmol/l; EVOO, $6,0 \pm 0,7$ pmol/l; Bch, $7,4 \pm 1,3$ pmol/l).

5.3.2. Perfil de lípidos en plasma (Información y figuras recogidas en el artículo del Anexo II: Domínguez-Vías et al. *Int. J. Mol. Sci.* 2017).

Se determinaron los valores plasmáticos de triglicéridos, colesterol total y sus fracciones lipoproteicas HDL, LDL y VLDL en los animales alimentados con las dietas E, EVOO y Bch (figura 2). Los resultados indicaron diferencias significativas en triglicéridos ($p < 0,01$), colesterol total ($p < 0,01$), LDL ($p < 0,01$) y colesterol VLDL ($p < 0,01$).

Mientras que los niveles de triglicéridos fueron mayores en Bch en comparación con E, sin diferencias en comparación con EVOO (E, $131,7 \pm 10,8$ mg/dl; EVOO, $171,2 \pm 25,2$ mg/dl; Bch, $240,1 \pm 32,8$ mg/dl), el colesterol total fue mayor en Bch que en E y EVOO (figura 2A: E, $95,9 \pm 11,4$ mg/dl; EVOO, $100,3 \pm 8,9$ mg/dl; Bch, $158,4 \pm 14,9$ mg/dl). La fracción HDL fue significativamente mayor en E en comparación con EVOO y Bch (E, $21,6 \pm 2,6$ mg/dl; EVOO, $11,5 \pm 1,4$ mg/dl; Bch, $11,2 \pm 1,4$ mg/dl), LDL fue mayor en Bch en comparación con EVOO y E (E, $47,9 \pm 9,5$ mg/dl; EVOO, $54,6 \pm 7,9$ mg/dl; Bch, $99,2 \pm 12,3$

mg/dl), y VLDL fue mayor en Bch solo en comparación con E (figura 2B: E, $26,3 \pm 2,2$ mg/dl; EVOO, $34,2 \pm 5,0$ mg/dl; Bch, $48,0 \pm 6,6$ mg/dl).

5.4. Determinación de NOx en plasma. (Información y figuras recogidas en el artículo del Anexo I: Domínguez-Vías et al. *Nutrients* 2020).

Las concentraciones plasmáticas de NO (NOx) se midieron mediante la conversión de nitrato (NO_3^-) en nitrito (NO_2^-) por nitrato reductasa (Figura 5C). La concentración de NOx fue significativamente mayor en la dieta Bch en comparación con las dietas E y EVOO. Además, curiosamente, la dieta EVOO mostró niveles de NOx más bajos que la dieta E (figura 5C: E, $1,4 \pm 0,1$ $\mu\text{mol/l}$; EVOO, $0,9 \pm 0,0$ $\mu\text{mol/l}$; Bch, $2,1 \pm 0,2$ $\mu\text{mol/l}$).

Objetivo#3. Aminopeptidasas en hipotálamo-hipófisis: relación con el control de la glucemia, la regulación de la ingesta de alimento, y la regulación de los Sistemas Renina-Angiotensina (RAS).

5.5. Aminopeptidasas relacionadas con el control de la glucemia (DPP4)

5.5.1. Hipotálamo

No se observaron diferencias en las fracciones soluble o unida a membrana para la actividad DPP4, independientemente de la cantidad o calidad de la grasa suplementada en la dieta (figura 8).

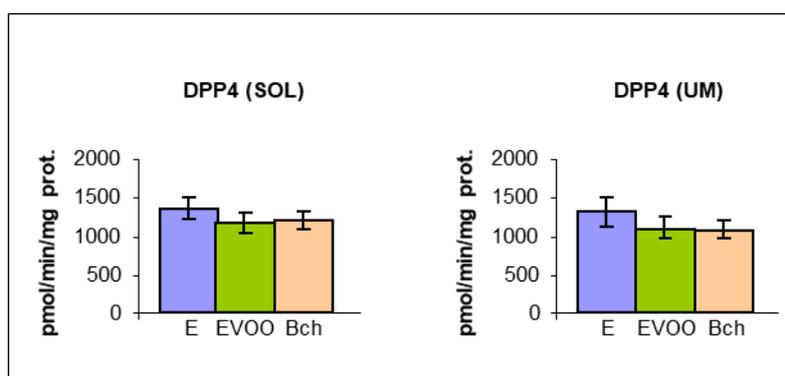


Figura 8. Valores medios \pm errores estándar de las actividades dipeptidil-peptidasa 4 (DPP4) en las fracciones soluble (SOL) y unidas a membrana (UM) en el hipotálamo de los grupos que recibieron la dieta estándar (E), enriquecida en aceite de oliva virgen (EVOO) y mantequilla más colesterol (Bch). Los valores se han expresado como pmol de β -naftilamida hidrolizados por min y por mg de proteína.

5.5.2. Hipófisis

Al contrario de lo que ocurrió en el hipotálamo, en la hipófisis anterior sí que se advierte una posible alteración secundaria por el aumento de la actividad DPP4 sol en la dieta Bch con respecto a la dieta E ($p < 0,05$) (figura 9: E, $533,0 \pm 28,0$ pmol/min/mg de proteína; EVOO, $604,0 \pm 42,0$ pmol/min/mg de proteína; Bch, $651,7 \pm 18,0$ pmol/min/mg de proteína).

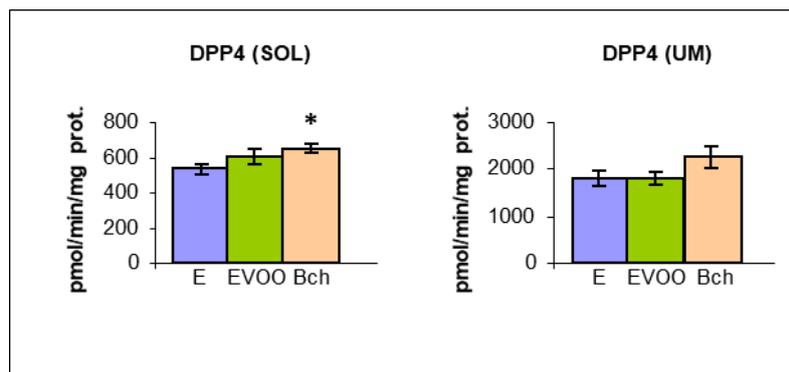


Figura 9. Valores medios \pm errores estándar de las actividades dipeptidil-peptidasa 4 (DPP4) en las fracciones soluble (SOL) y unidas a membrana (UM) en la hipófisis de los grupos que recibieron la dieta estándar (E), enriquecida en aceite de oliva virgen (EVOO) y mantequilla más colesterol (Bch). Los valores se han expresado como pmol de β -naftilamida hidrolizados por min y por mg de proteína. * $p < 0,05$; muestra diferencias significativas entre las dietas Bch y E.

5.6. Piroglutamil-aminopeptidasa y Tirosil-aminopeptidasa

5.6.1. Hipotálamo

Tampoco se observó que las HFDs causaran diferencias estadísticamente significativas en las actividades hipotalámicas de las AP degradantes de TRH / GnRH (pGlu-AP) y ENK (Tyr-AP) (figura 10).

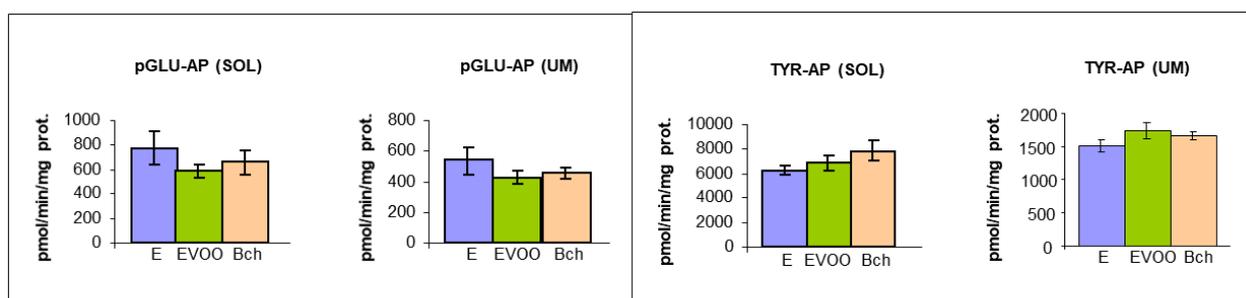


Figura 10. Valores medios \pm errores estándar de las actividades piroglutamil-aminopeptidasa (pGlu-AP) y tirosil-aminopeptidasa (Tyr-AP) en las fracciones soluble (SOL) y unidas a membrana (UM) en el

hipotálamo de los grupos que recibieron la dieta estándar (E), enriquecida en aceite de oliva virgen (EVOO) y mantequilla más colesterol (Bch). Los valores se han expresado como pmol de β -naftilamida hidrolizados por min y por mg de proteína.

5.6.2. Hipófisis

Sin embargo, en la hipófisis de los animales tratados con una dieta Bch se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas para la actividad Tyr-AP sol frente a las dietas E y EVOO ($p < 0,05$; E, $2504,1 \pm 196,0$ pmol/min/mg de proteína; EVOO, $2378,0 \pm 203,6$ pmol/min/mg de proteína; Bch, $3072,3 \pm 113,6$ pmol/min/mg de proteína). Por otro lado, no se observaron diferencias en la actividad pGlu-AP (figura 11).

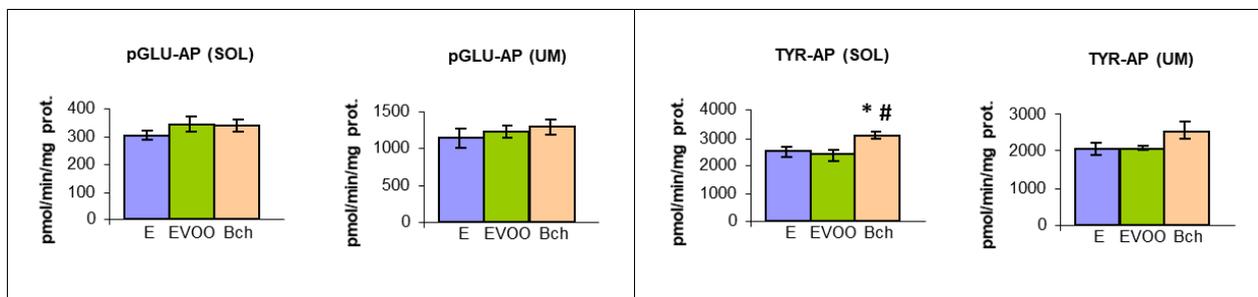


Figura 11. Valores medios \pm errores estándar de las actividades piroglutamil-aminopeptidasa (pGlu-AP) y tirosil-aminopeptidasa (Tyr-AP) en las fracciones soluble (SOL) y unidas a membrana (UM) en la hipófisis de los grupos que recibieron la dieta estándar (E), enriquecida en aceite de oliva virgen (EVOO) y mantequilla más colesterol (Bch). Los valores se han expresado como pmol de β -naftilamida hidrolizados por min y por mg de proteína. La * $p < 0,05$; muestra diferencias significativas de la dieta Bch con respecto a la dieta E. # $p < 0,05$; muestra diferencias significativas de la dieta Bch con respecto a la dieta EVOO.

5.7. Aminopeptidasas relacionadas con el Sistema Renina-Angiotensina (RAS) en el eje Hipotálamo-Hipófisis

5.7.1. Hipotálamo

Los resultados obtenidos mostraron que no hay diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las actividades estudiadas en hipotálamo (figura 12).

5.7.2. Hipófisis

La dieta Bch mostró la capacidad de aumentar significativamente las actividades angiotensinas Ala-AP sol (E, $2027,1 \pm 180,7$ pmol/min/mg de proteína; EVOO, $2361,6 \pm 112,4$ pmol/min/mg de proteína; Bch, $2955,3 \pm 75,3$ pmol/min/mg de proteína), Ala-AP um

(E, $4120,3 \pm 286,4$ pmol/min/mg de proteína; EVOO, $4156,6 \pm 227,1$ pmol/min/mg de proteína; Bch, $5553,3 \pm 523,0$ pmol/min/mg de proteína), Arg-AP um (E, $2876,2 \pm 300,0$ pmol/min/mg de proteína; EVOO, $3023,3 \pm 47,2$ pmol/min/mg de proteína; Bch, $3810,5 \pm 214,0$ pmol/min/mg de proteína), e IRAP sol (E, $614,0 \pm 37,2$ pmol/min/mg de proteína; EVOO, $667,0 \pm 33,0$ pmol/min/mg de proteína; Bch, $822,4 \pm 48,0$ pmol/min/mg de proteína) con respecto a las dietas E y EVOO ($p < 0,05$) (figura 13).

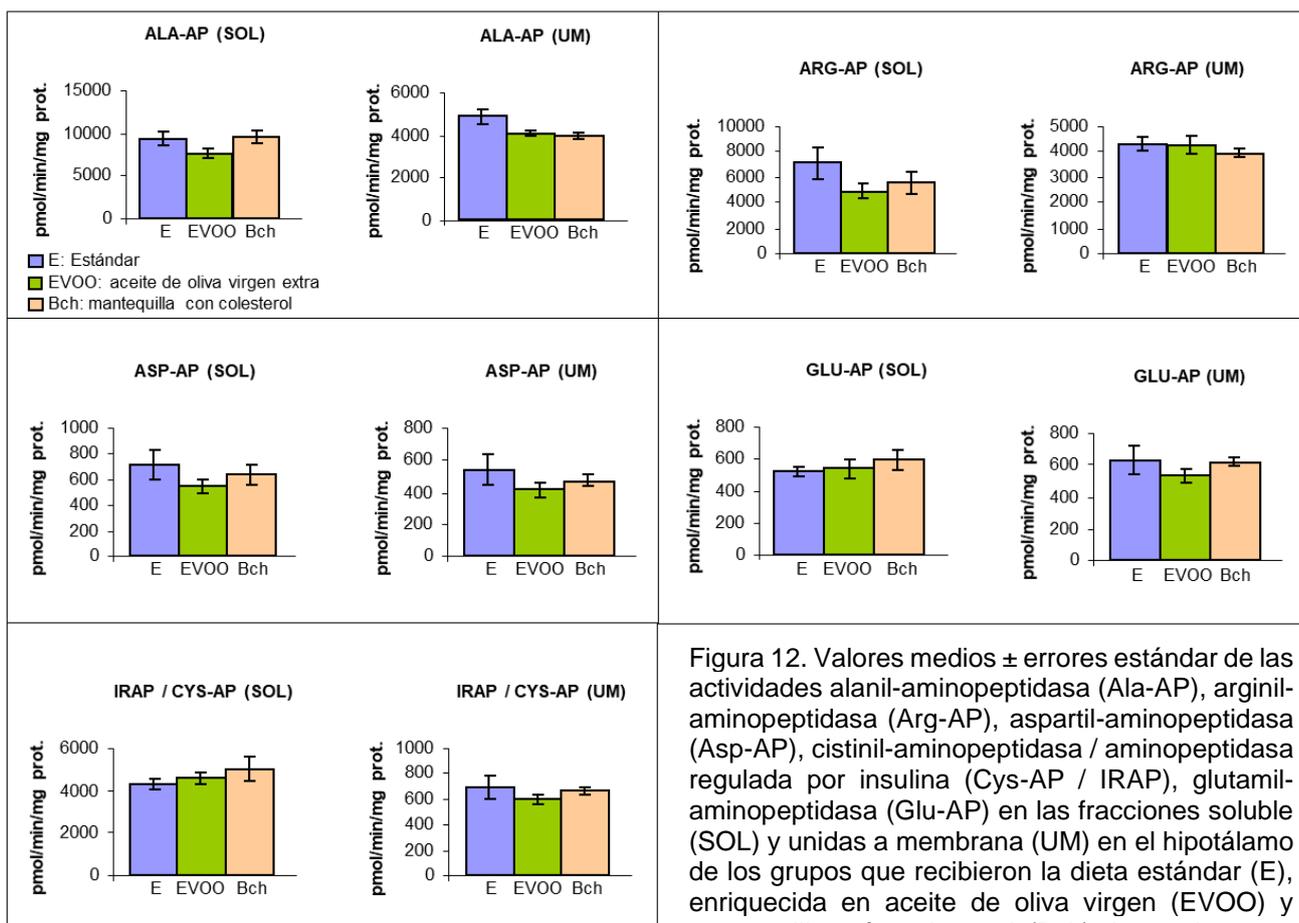


Figura 12. Valores medios \pm errores estándar de las actividades alanil-aminopeptidasa (Ala-AP), arginil-aminopeptidasa (Arg-AP), aspartil-aminopeptidasa (Asp-AP), cistinil-aminopeptidasa / aminopeptidasa regulada por insulina (Cys-AP / IRAP), glutamil-aminopeptidasa (Glu-AP) en las fracciones soluble (SOL) y unidas a membrana (UM) en el hipotálamo de los grupos que recibieron la dieta estándar (E), enriquecida en aceite de oliva virgen extra (EVOO) y mantequilla más colesterol (Bch). Los valores se han expresado como pmol de β -naftilamida hidrolizados por min y por mg de proteína.

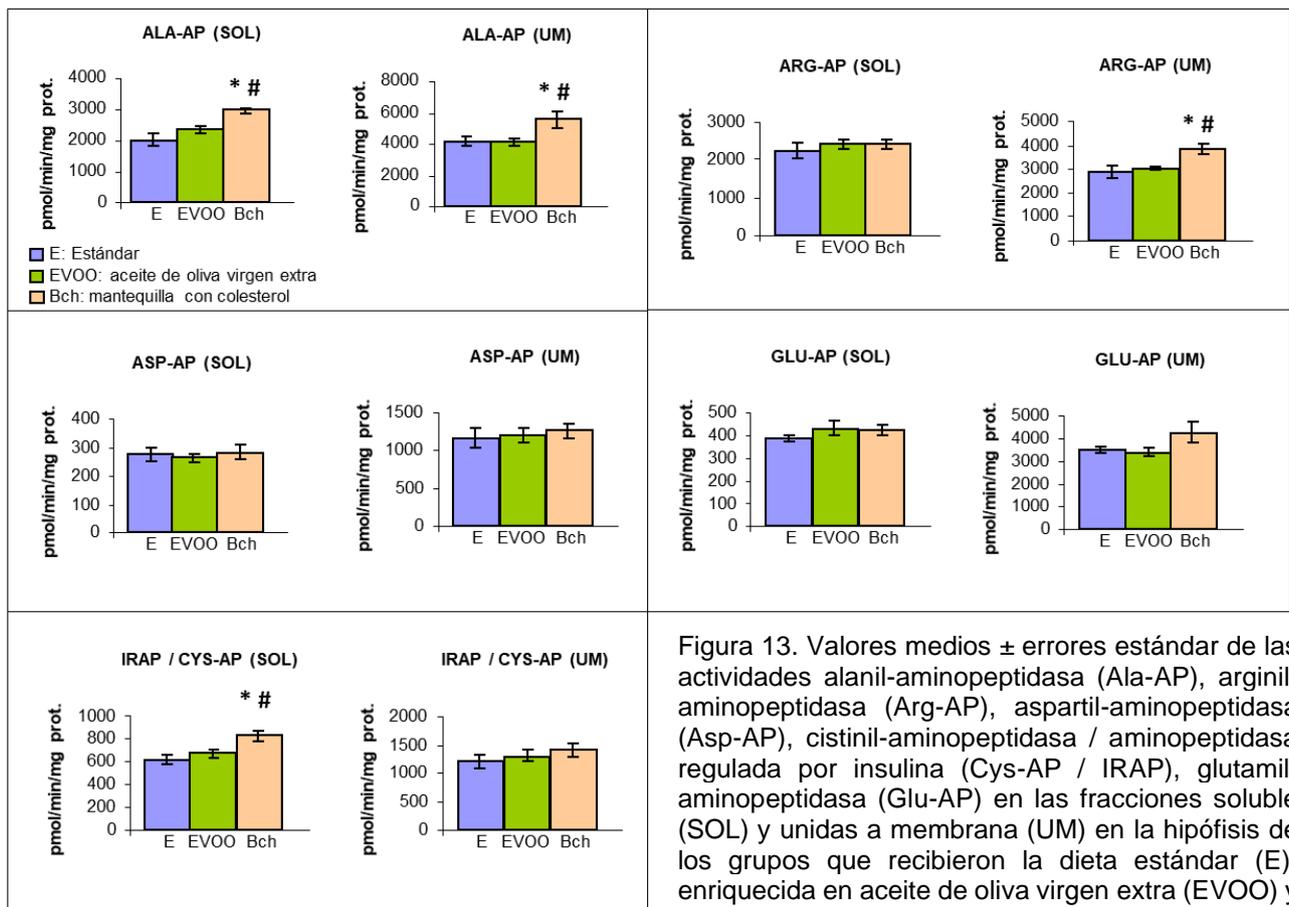


Figura 13. Valores medios \pm errores estándar de las actividades alanil-aminopeptidasa (Ala-AP), arginil-aminopeptidasa (Arg-AP), aspartil-aminopeptidasa (Asp-AP), cistinil-aminopeptidasa / aminopeptidasa regulada por insulina (Cys-AP / IRAP), glutamil-aminopeptidasa (Glu-AP) en las fracciones soluble (SOL) y unidas a membrana (UM) en la hipófisis de los grupos que recibieron la dieta estándar (E), enriquecida en aceite de oliva virgen extra (EVOO) y mantequilla más colesterol (Bch). Los valores se han expresado como pmol de β -naftilamida hidrolizados por min y por mg de proteína. Las * p < 0,05; muestra diferencias significativas de la dieta Bch con respecto a la dieta E. # p < 0,05; muestra diferencias significativas de la dieta Bch con respecto a la dieta EVOO.

5.8. Actividad Prolil-Imino-peptidasa (PIP)

5.8.1. Hipotálamo

No se encontraron en el hipotálamo diferencias estadísticamente significativas para la actividad hidrolítica de residuos de prolina conservada, PIP, entre las HFDs (figura 14).

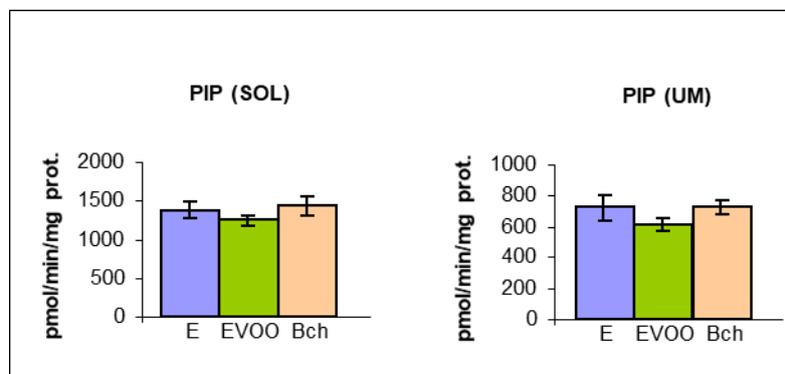


Figura 14. Valores medios \pm errores estándar de las actividades prolil-iminopeptidasa (PIP) en las fracciones soluble (SOL) y unidas a membrana (UM) en el hipotálamo de los grupos que recibieron la dieta

estándar (E), enriquecida en aceite de oliva virgen (EVOO) y mantequilla más colesterol (Bch). Los valores se han expresado como pmol de β -naftilamida hidrolizados por min y por mg de proteína.

5.8.2. Hipófisis

Diferentes fueron los resultados obtenidos en las muestras de hipófisis, donde sí que se observó una alteración secundaria por diferencias significativas de la PIP sol en la dieta Bch con respecto a la dieta E ($p < 0,05$) (figura 15: E, $431,0 \pm 15,8$ pmol/min/mg de proteína; EVOO, $476,3 \pm 28,6$ pmol/min/mg de proteína; Bch, $520,0 \pm 20,0$ pmol/min/mg de proteína).

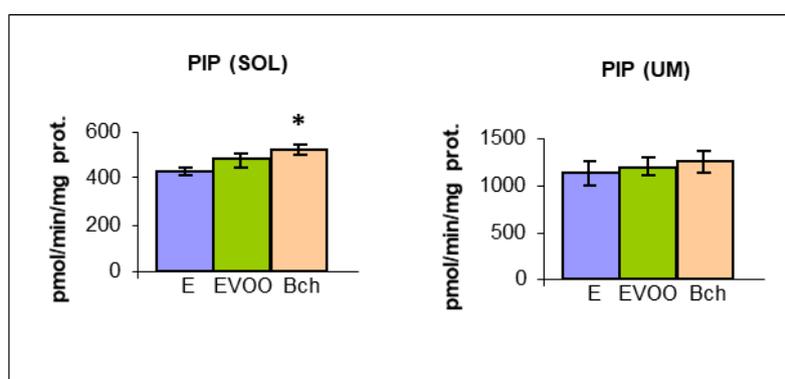


Figura 15. Valores medios \pm errores estándar de las actividades prolil-iminopeptidasa (PIP) en las fracciones soluble (SOL) y unidas a membrana (UM) en la hipófisis de los grupos que recibieron la dieta estándar (E), enriquecida en aceite de oliva virgen (EVOO) y mantequilla más colesterol (Bch). Los valores se han expresado como pmol de β -naftilamida hidrolizados por min y por mg de proteína. * $p < 0,05$; muestra diferencias significativas de la dieta Bch con respecto a la dieta E.

Objetivo#4. Aminopeptidasas en hígado: relación con el control de la glucemia, la regulación de la ingesta de alimento, la regulación del Sistema Renina-Angiotensina (RAS) local, y con marcadores de estrés oxidativo

5.9. Aminopeptidasas relacionadas con el control de la glucemia (DPP4) en hígado. (Información y figuras recogidas en el artículo del Anexo I: Domínguez-Vías et al. *Nutrients* 2020).

Anteriormente se ha descrito que entre las diferentes dietas no se observaron diferencias significativas en los niveles circulantes del sustrato de la enzima DPP4, la hormona GLP1. Sin embargo, la actividad DPP4 hepática (figura 1, J–K) fue significativamente mayor en las HFDs que en el grupo control, siendo la fracción DPP4 um quien mostró los valores significativamente más altos en las ratas alimentadas con la dieta

EVOO en comparación con los grupos E y Bch. (Figura 1K: E, $5,0 \pm 0,5$ pmol ($\times 10^2$)/min/mg de proteína; EVOO, $7,8 \pm 0,8$ pmol ($\times 10^2$)/min/mg de proteína; Bch, $7,0 \pm 0,4$ pmol ($\times 10^2$)/min/mg proteína) (Figura 1L: E, $0,8 \pm 0,1$ pmol ($\times 10^2$)/min/mg de proteína; EVOO, $1,4 \pm 0,2$ pmol ($\times 10^2$)/min/mg de proteína).

5.10. Aminopeptidasas hepáticas reguladoras de la ingesta de alimento (pGlu-AP y Tyr-AP). (Información y figuras recogidas en el artículo del Anexo I: Domínguez-Vías et al. *Nutrients* 2020).

Estudios anteriores han demostrado que los efectos del estado tiroideo sobre el pGlu-AP hepático y la liberación de péptidos endógenos como cHP son determinantes en la sensibilidad a la insulina y el control del peso corporal (Scharfmann et al., 1990; Prasad et al., 2015). En nuestros resultados, las HFDs aumentaron significativamente la actividad de pGlu-AP sol en el hígado (figura 2A: E, $1,0 \pm 0,1$ pmol ($\times 10^2$)/min/mg de proteína; EVOO, $1,5 \pm 0,0$ pmol ($\times 10^2$)/min/mg de proteína; Bch, $1,4 \pm 0,0$ pmol ($\times 10^2$)/min/mg de proteína). Sin embargo, no se encontraron diferencias en la actividad de la fracción um (figura 2B).

Por otro lado, recalcar que las encefalinas se han implicado ampliamente en el comportamiento de alimentación, y estos péptidos opioides endógenos se hidrolizan por la actividad Tyr-AP. Se encontraron niveles más altos de actividad Tyr-AP sol en el hígado de las ratas que fueron alimentadas con la dieta Bch (figura 2: E, $3,9 \pm 0,5$ pmol ($\times 10^2$)/min/mg de proteína; EVOO, $4,5 \pm 0,3$ pmol ($\times 10^2$)/min/mg de proteína; Bch, $6,2 \pm 0,5$ pmol ($\times 10^2$)/min/mg de proteína), pero no se encontraron diferencias significativas en la fracción Tyr-AP um.

5.11. Aminopeptidasas relacionadas con la regulación del Sistema Renina-Angiotensina (RAS) local del hígado. (Información y figuras recogidas en el artículo del Anexo I: Domínguez-Vías et al. *Nutrients* 2020).

Con la administración de HFDs no se encontraron diferencias significativas en las fracciones sol y um para las actividades Asp-AP y Glu-AP, implicadas en el metabolismo de las angiotensinas (figura 3B-E). Sin embargo, la dieta EVOO aumentó significativamente la actividad Ala-AP en la fracción um del hígado (figura 3G: E, $1,2 \pm 0,1$ pmol ($\times 10^2$)/min/mg de proteína; EVOO, $2,4 \pm 0,2$ pmol ($\times 10^2$)/min/mg de proteína; Bch, $1,6 \pm 0,2$ pmol ($\times 10^2$)/min/mg de proteína) y Cys-AP (figura 3I: E, $1,9 \pm 0,3$ pmol ($\times 10^2$)/min/mg de proteína;

EVOO: $3,9 \pm 0,2$ pmol ($\times 10^2$)/min/mg de proteína; Bch: $2,7 \pm 0,4$ pmol ($\times 10^2$)/min/mg de proteína).

5.12. Aminopeptidasas hepáticas relacionadas con marcadores de estrés oxidativo (GGT) y marcadores funcionales (Leu-AP y PIP). (Información y figuras recogidas en el artículo del Anexo I: Domínguez-Vías et al. *Nutrients* 2020; con excepción de los resultados sobre actividad PIP).

Se evaluaron varios indicadores de estrés oxidativo y de función hepática, como GGT, Leu-AP (figura 4A-E) y PIP (dato no publicado). La dieta Bch aumentó significativamente la fracción um de la actividad hepática de GGT, en comparación con las dietas E y EVOO (figura 4B: E, $0,8 \pm 0,0$ pmol ($\times 10^2$)/min/mg de proteína; EVOO, $0,9 \pm 0,0$ pmol ($\times 10^2$)/min/mg de proteína; Bch, $1,2 \pm 0,1$ pmol ($\times 10^2$)/min/mg de proteína).

Además, se estableció una relación significativa entre la actividad GGT um y el perfil lipídico plasmático (triglicéridos totales) (figura 4C). La fracción sol de la actividad Leu-AP también aumentó en el grupo Bch (figura 4D: E, $4,6 \pm 0,8$ pmol ($\times 10^2$)/min/mg de proteína; EVOO, $6,6 \pm 0,4$ pmol ($\times 10^2$)/min/mg de proteína; Bch, $7,9 \pm 0,8$ pmol ($\times 10^2$)/min /mg de proteína), mientras que la fracción um de la actividad Leu-AP fue mayor en las dos HFD (figura 4E: $4,0 \pm 0,2$ pmol ($\times 10^2$)/min/mg de proteína; EVOO, $5,3 \pm 0,3$ pmol ($\times 10^2$)/min/mg de proteína; Bch, $5,5 \pm 0,2$ pmol ($\times 10^2$)/min/mg de proteína).

La actividad PIP no mostraba cambios en los grupos HFDs, pero sí destacaba una correlación clara entre la fracción um de la actividad PIP con la proporción de triglicéridos totales en plasma ($p < 0,05$; figura 16). Por otro lado, las significativas asociaciones de la actividad PIP sol con el marcador LeuAP sol, así como PIP um con GGT um, podrían dar indicios de que PIP sea un nuevo marcador hepático funcional que debería ser estudiado en el futuro (figura 17).

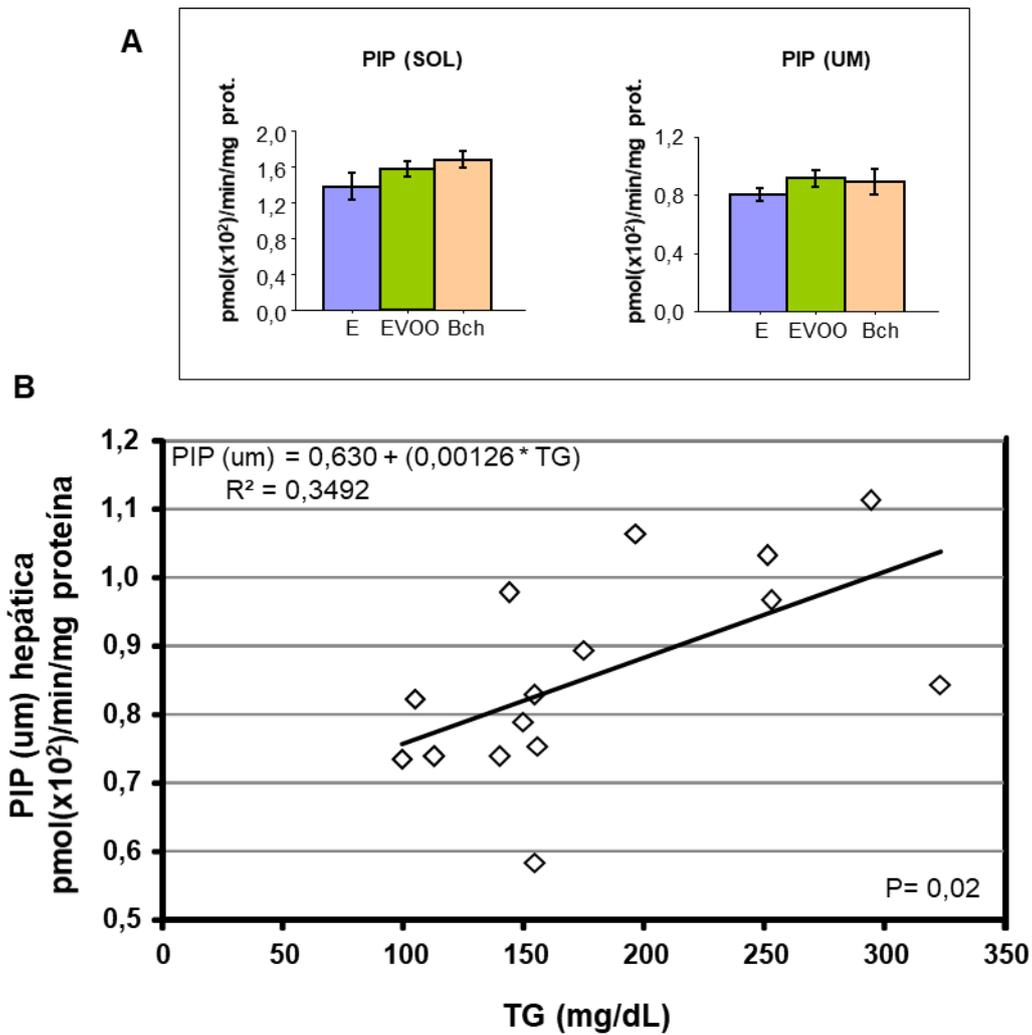


Figura 16. (A) Valores medios \pm errores estándar de las actividades prolil-iminopeptidasa (PIP) en las fracciones soluble (SOL) y unidas a membrana (UM) en el hígado de los grupos que recibieron la dieta estándar (E), enriquecida en aceite de oliva virgen (EVOO) y mantequilla más colesterol (Bch). Los valores se han expresado como pmol de β -naftilamida hidrolizados por min y por mg de proteína. (B) Correlación de la PIP (UM) con los triglicéridos (TG) plasmáticos.

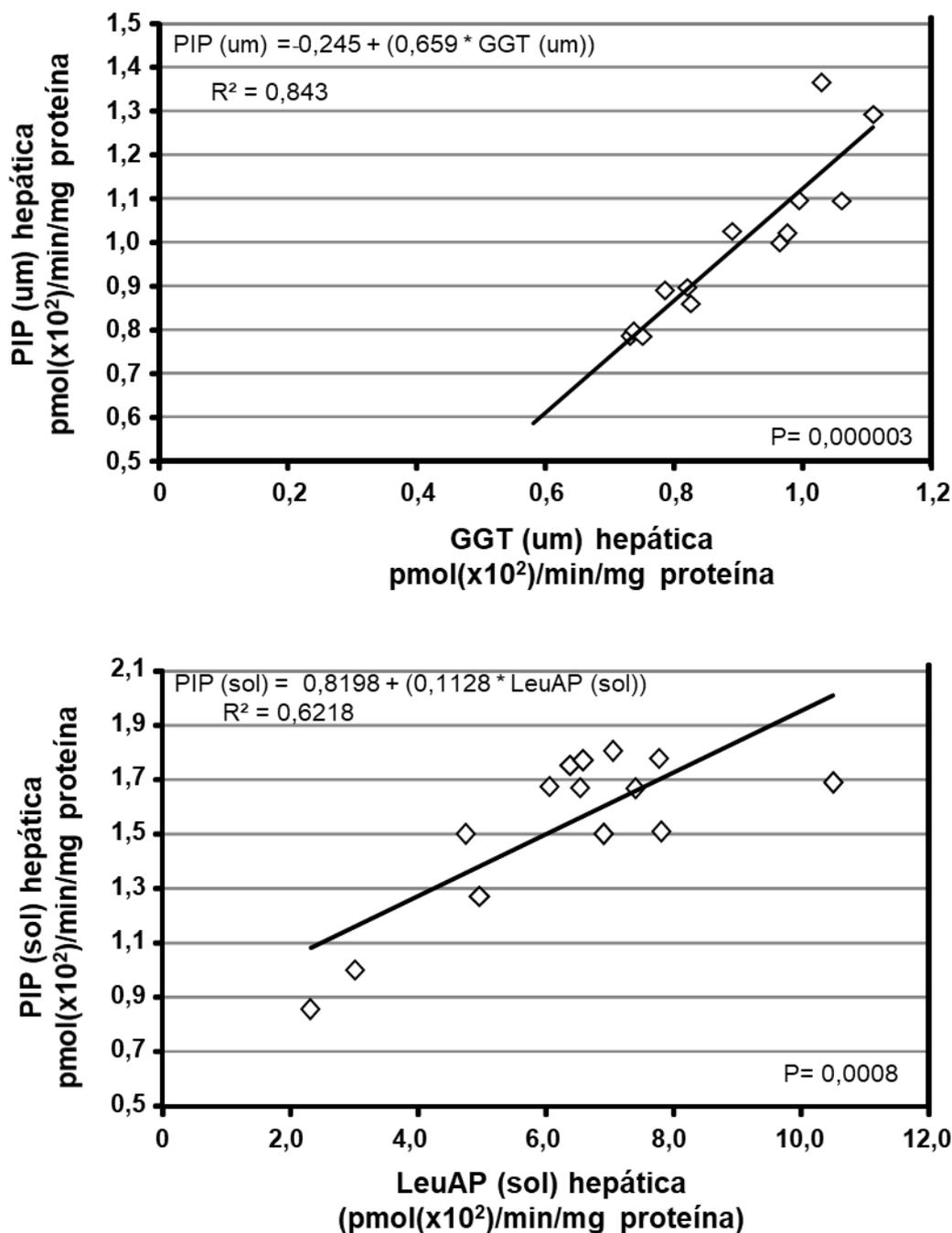


Figura 17. Asociación entre las actividades de la prolina-iminopeptidasa (PIP) con leucil-aminopeptidasa (Leu-AP) y γ -glutamyl-transaminasa (GGT) como un posible nuevo marcador funcional hepático. SOL: fracción soluble; UM: fracción unida a membrana.

5.13. Expresión de la isoforma inducible del óxido nítrico sintasa (iNOS). (Información y figuras recogidas en el artículo del Anexo I: Domínguez-Vías et al. *Nutrients* 2020).

Las ratas alimentadas con la dieta Bch mostraron un aumento significativo en la expresión de iNOS (figura 5B: E, $1,0 \pm 0,2$; EVOO, $1,3 \pm 0,1$; Bch: $2,3 \pm 0,5$). Además, la concentración de NOx en plasma fue significativamente mayor en la dieta Bch en

comparación con las dietas E y EVOO. Curiosamente, la dieta con EVOO mostró niveles de NOx más bajos que con la dieta E (figura 5C: E, $1,4 \pm 0,1$ $\mu\text{mol/l}$; EVOO, $0,9 \pm 0,0$ $\mu\text{mol/l}$; Bch, $2,1 \pm 0,2$ $\mu\text{mol/l}$).

Objetivo#5. Peptidasas en testículo: relación con los cambios en el perfil lipídico en plasma y los niveles de estrés oxidativo.

5.14. Aminopeptidasas implicadas en la fertilidad. (Información y figuras recogidas en el artículo del Anexo II: *Int. J. Mol. Sci.* 2017).

En nuestros resultados, la administración de la dieta EVOO confirmó cambios en la actividad inmunoestimuladora de DPP4 sol en el testículo en comparación con las dietas E y Bch (tabla 1 y figura 3C: E, $302,3 \pm 47,4$ pmol/min/mg de proteína; EVOO, $476,6 \pm 41,2$ pmol/min/mg de proteína; Bch, $327,0 \pm 49,0$ pmol/min /mg de proteína). Por tanto, la DPP4 testicular puede representar una posible diana farmacológica.

5.15. Aminopeptidasas relacionadas con la regulación del Sistema Renina-Angiotensina (RAS) local del testículo. (Información y figuras recogidas en el artículo del Anexo II: Domínguez-Vías et al. *Int. J. Mol. Sci.* 2017).

En el testículo se encontró que solo la fracción um de la actividad Glu-AP fue mayor ($p < 0,05$) en la dieta con Bch que con las dietas EVOO y E (tabla 1 y figura 3A: E, $160,0 \pm 11,0$ pmol/min/mg de proteína; EVOO, $166,6 \pm 7,9$ pmol/min/mg de proteína; Bch, $204,2 \pm 7,5$ pmol/min/mg de proteína). No se observaron diferencias en la fracción sol. Además, se establecieron correlaciones significativas y positivas entre la actividad Glu-AP um de las gónadas y los triglicéridos totales (figura 3D; $p < 0,01$, $r = 0,664$) y el colesterol total plasmático (figura 3E; $p < 0,05$, $r = 0,593$).

5.16. Gamma-Glutamil-Transferasa (GGT) como marcador funcional de estrés oxidativo en testículo. (Información y figuras recogidas en el artículo del Anexo II: Domínguez-Vías et al. *Int. J. Mol. Sci.* 2017).

Solo la fracción um de la actividad GGT testicular fue mayor ($p < 0,05$) en la dieta con Bch que en las dietas con EVOO y E (tabla 1 y figura 3B: E, $164,0 \pm 27,1$ pmol/min/mg de proteína; EVOO, $236,8 \pm 50,3$ pmol/min/mg de proteína; Bch, $341,6 \pm 59,2$ pmol/min /mg de

proteína). No se observaron diferencias entre los grupos en la fracción sol. Además, se estableció una correlación positiva significativa entre la actividad testicular de GGT um y el colesterol plasmático total (figura 3F; $p < 0,05$, $r = 0,536$).

[6. DISCUSIÓN]

6.1. Ingesta de alimento, incremento de peso corporal, regulación de la glucemia y de los valores de Presión Arterial Sistólica

Conocer en profundidad cómo los cambios en la composición lipídica de la dieta pueden influir sobre los mecanismos de regulación homeostática de nuestro organismo tiene, sin lugar a dudas, importancia tanto desde el punto de vista del aumento de nuestros conocimientos básicos sobre la manera en la que se pueden condicionar estos mecanismos, como desde el punto de vista clínico, ya que nos aportaría una herramienta básica en el campo de la prevención de muchas enfermedades.

Aunque desde hace bastante tiempo se conoce la estrecha relación entre un consumo elevado de determinados tipos de grasa en los alimentos y el desarrollo de patologías como la obesidad, la hipertensión, la diabetes y la infertilidad, los mecanismos moleculares de dicha relación aún no están del todo claros (Boozer et al., 1995; Shalaby et al., 2004; Hurtado de Catalfo et al., 2009; Gao et al., 2015; Liu et al., 2015), en especial, si dichos efectos son ejercidos de igual manera por todas las fuentes de lípidos.

El principal objetivo del presente trabajo de investigación ha sido estudiar si la composición de dos dietas altas en grasa, isoenergéticas pero con distinto perfil de ácidos grasos y componentes minoritarios, podría tener efectos distintos en comparación con una dieta estándar, que en el caso del modelo experimental que hemos utilizado (ratas) se caracteriza por ser baja en grasa.

Como ya se indicó con anterioridad, el primer aspecto estudiado fue el posible efecto de las dietas sobre la ingesta de alimento y el aumento de peso corporal. De las dos dietas altas en grasa, solo los animales del grupo Bch mostraron valores significativamente superiores de peso corporal y un perfil de lípidos en sangre distinto al de los animales del grupo control, no alcanzándose diferencias significativas para estos valores entre los grupos estándar y EVOO. Este incremento del peso corporal en el grupo Bch no estuvo condicionado por un aumento en la ingesta de alimento, de hecho, al final del periodo experimental los valores diarios de ingesta para estos animales fueron inferiores a los de los otros dos grupos.

Este resultado, en principio sorprendente, puede explicarse por un principio bien establecido en nutrición, según el cual los animales cuando se alimentan *Ad libitum*, aún

cuando se les proporcionen dietas con distinta densidad de energía, son capaces de adaptar su ingesta para obtener siempre el mismo aporte energético (Blundell & Gillett, 2001). Sin embargo, esta asunción no explicaría por qué no se obtuvieron los mismos resultados para las dos dietas altas en grasa. Estudios previos ya han demostrado que los ácidos grasos saturados muestran una mayor eficiencia energética, al tiempo que son capaces de disminuir la capacidad oxidativa mitocondrial en el hígado y el músculo esquelético (Iossa et al., 2003).

Por el contrario, la inclusión de EVOO en la dieta aumenta la termogénesis inducida por dieta (Polley et al., 2018), fundamentalmente mediante el incremento de la secreción de adrenalina y noradrenalina (Oi-Kano et al., 2007) y la expresión de las UCP1 en el tejido adiposo marrón (Shin & Ajuwon, 2018). Los resultados obtenidos en nuestro estudio apoyarían, por tanto, los efectos del tipo de grasa en la dieta sobre la termogénesis, pudiendo estar las diferencias condicionadas bien por el distinto perfil de saturación de los ácidos grasos y por el contenido en polifenoles de la dieta EVOO (Castro-Barquero et al., 2018; Prieto et al., 2018a).

Aunque las evidentes diferencias en el incremento de peso corporal parecieron no asociarse a cambios en las concentraciones plasmáticas en ayunas de glucosa o insulina, nuestros resultados sí evidenciaron alteraciones en el metabolismo de la glucosa entre las dos dietas altas en grasas. Durante la prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (GTT), realizada al final del periodo experimental, tanto en la dieta E como en la Bch el pico en los valores de glucemia se alcanzó a los 20 minutos tras la inyección intraperitoneal. Sin embargo, el valor más alto de glucemia para los animales del grupo EVOO no apareció hasta los 90 min de la inyección intraperitoneal y se mantuvo elevado hasta los 120 minutos. Estos resultados pudieran parecer contradictorios con resultados obtenidos anteriormente y que apuntarían a un mejor uso de la glucosa tras la ingestión de aceite de oliva (Blundell & Gillett, 2001; Jiang et al., 2015; Liu et al., 2015). Sin embargo, cuando analizamos los diferentes índices de resistencia a la insulina (HOMA-IR, HOMA-%S y HOMA-%B) no encontramos diferencias entre las tres dietas, incluso los valores medios de Insulina/glucosa en ayunas y el HOMA2-%B fueron inferiores para la dieta EVOO.

Otro de los parámetros analizados en relación con el control glucémico fueron los valores plasmáticos de GLP-1 en ayunas. El péptido GLP-1 se ha relacionado con el control de la glucosa en plasma, por su capacidad de estimular la liberación de insulina por el

páncreas y la síntesis de glucógeno en el hígado, contribuyendo a reducir la hiperglucemia postprandial. Los valores de GLP-1 también se han relacionado con el desarrollo de obesidad, ya que también regula el vaciamiento gástrico y, por tanto, la ingesta de alimento. Distintos estudios han demostrado una menor concentración de GLP-1 en individuos con obesidad y síndrome metabólico (Lugari et al., 2004; Pérez-Durillo et al., 2018), debido principalmente a un aumento en la actividad del principal enzima que interviene en su degradación, la DPP4. Nuestros resultados no demuestran cambios significativos en las concentraciones plasmáticas de GLP-1 entre las tres dietas analizadas, si bien estos resultados podrían estar condicionados por la baja vida media de este péptido y la alta actividad del enzima DPP4, cuya actividad mostró diferencias significativas entre las tres dietas estudiadas, como veremos en los siguientes apartados.

En cuanto a la evolución de los valores de PAS, también encontramos diferencias claras entre las dos dietas altas en grasa. Mientras que la ingesta prolongada (durante 6 meses) de una dieta alta en grasa enriquecida con EVOO no afecta significativamente a los valores medios de PAS, la dieta enriquecida con mantequilla y colesterol sí que provoca a partir de los dos meses de administración incrementos significativos en los valores de PAS en comparación con la dieta estándar. Este resultado demuestra que los efectos de las grasas dietéticas sobre los mecanismos de regulación de la PAS dependen del tipo de grasa, y el efecto beneficioso del EVOO y la Dieta Mediterránea para los pacientes con hipertensión (Villarejo et al., 2015).

6.2. Aminopeptidasas en el eje Hipotálamo-Hipófisis

Estudios previos de nuestro grupo de investigación han demostrado un efecto del tipo de grasa en la dieta sobre distintas actividades aminopeptidasa en la corteza frontal (Segarra et al., 2019). Sin embargo, en nuestros resultados no establecemos diferencias significativas en ninguna de las peptidasas determinadas para los animales que recibieron las distintas dietas analizadas a pesar de los claros cambios metabólicos y endocrinos provocados por la dieta enriquecida en mantequilla. En estudios también previos de nuestro grupo, distintos modelos de alteración hormonal, como los cambios en la función tiroidea (Prieto et al., 2003; Wangensteen et al., 2015; Segarra et al., 2018b), la inhibición del Enzima Convertidor de Angiotensina (Villarejo et al., 2012) o la hipertensión (Villarejo et al., 2014; Prieto et al., 2015; 2018b), si que afectaron a distintas aminopeptidasas en el hipotálamo, en particular a las que participan en la cascada del Sistema Renina

Angiotensina. Además, estos cambios en las aminopeptidasas hipotalámicas se relacionaron con cambios en la hipófisis (Bernstein et al., 2017; Segarra et al., 2018a).

Al contrario de lo que ocurría en hipotálamo, nuestros resultados si demuestran un efecto del tipo de grasa en la dieta sobre las peptidasas en hipófisis en el grupo de animales que consumieron la dieta alta en mantequilla, y sobre las actividades del RAS. En concreto, un incremento de las actividades Ala-AP sol y mb, Arg-AP sol e IRAP sol. Estas modificaciones podrían relacionarse con un mayor metabolismo de la AngIII en AngIV y vincularse, por lo tanto, con cambios en la actividad secretora que podría afectar a distintas glándulas reguladas por el eje hipotálamo-hipófisis (Ganong, 1993).

Otra de las aminopeptidasas que incrementó su actividad en la fracción soluble de la hipófisis anterior fue la DPP4. Un reciente estudio de Golub et al (2019) ha demostrado que en un modelo animal deficiente en DPP4 (DPP4mut) en el eje hipotálamo-hipófisis-adrenales, se describe una mayor resistencia al estrés. Teniendo en cuenta que uno de los sustratos para la actividad DPP4 es el NPY, conocido por sus efectos orexigénicos en el SNC, la mayor actividad DPP4 podría afectar a la degradación del NPY, y por tanto condicionar los cambios en la ingesta de alimento y en la producción de calor en estos animales. Por otro lado, los cambios en la actividad DPP4 y el NPY también se han relacionado con modificaciones observadas en el metabolismo de la glucosa en el modelo DPP4mut (Canneva et al., 2015), y en el control de la ingesta de dietas altas en grasa y fructosa (Gumbs et al., 2019).

La administración de otros tipos de ácidos grasos (ácidos grasos de la serie ω 3) distintos a los mayoritariamente empleados en nuestras dietas, también parece afectar a distintas aminopeptidasas en el eje hipotálamo-hipófisis, como la actividad PIP, que también se modificó en los animales que recibieron la dieta suplementada con mantequilla (Krupina & Khlebnikova, 2016).

Por último, también hemos observado un aumento significativo de la actividad Tyr-AP en hipófisis, actividad implicada en el metabolismo de las encefalinas, péptidos ampliamente relacionados con la regulación de la ingesta y el metabolismo intermediario (Hill-Pryor et al., 2006; Karatayev et al., 2009).

6.3. Aminopeptidasas en el hígado

A pesar de que, como hemos indicado anteriormente, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las dietas para las concentraciones de GLP-1 plasmáticas, al analizar las actividades aminopeptidasas en hígado si que encontramos valores significativamente superiores para la DPP4 en los animales que consumieron la dieta EVOO. Este aumento podría relacionarse con una adaptación de estos animales a unos mayores valores de secreción postprandial del péptido GLP-1, lo que estaría de acuerdo con resultados obtenidos anteriormente por otros autores (Rocca et al., 2001; Prieto et al., 2005; Cancelas et al., 2006). La falta de diferencias en los valores plasmáticos de GLP-1 podría deberse a la rápida inactivación de este péptido, y a que nuestras muestras se tomaron en ayunas.

Por otro lado, este resultado estaría en concordancia con los obtenidos para la curva de la GTT ya que, al administrarse la glucosa por vía intraperitoneal en ayunas, no aparecerían los estímulos necesarios para la liberación del GLP-1 por las células L intestinales, lo que ocasionaría que en los animales del grupo EVOO los valores de glucemia se mantuvieran superiores durante más tiempo.

Otro péptido importante en la regulación de la glucemia, además del GLP-1, es la ciclohistidina-prolina (cHP) (Song et al., 2005; Ra et al., 2012). Este péptido es el producto metabólico de la degradación de la TRH por la actividad pGlu-AP (Scharfmann et al., 1990) en los hepatocitos (Scharfmann et al., 1990; 1991).

Tanto cHP como la pGlu-AP parecen estar relacionadas también con el consumo de dietas altas en grasa y con la obesidad. Se ha demostrado que en modelos animales de obesidad (ratones ob/ob) la administración de cHP junto con Zinc es capaz de regular las concentraciones de glucosa en plasma (Hwang et al., 2003). La actividad (Arechaga et al., 2002) y la expresión (Araujo et al., 2010) de pGlu-AP parecen estar afectadas por la cantidad y calidad de la grasa en la dieta. Nuestros resultados indican que las dos dietas altas en grasa (EVOO y Bch) provocaron un aumento de la actividad pGlu-AP en la fracción soluble del hígado, lo que podría indicar un mayor metabolismo de la TRH y una mayor producción del péptido cHP.

Además de los péptidos implicados en el control de la glucemia, otros péptidos como las ENK, juegan un papel muy importante en el control de la ingesta y del metabolismo

energético (Hill-Pryor & Dunbar, 2006; Karatayev et al., 2009). Hay estudios donde se ha demostrado que las dietas altas en grasa son capaces de afectar a la expresión de las ENK en el hipotálamo, al tiempo que aumentan la ingesta, el peso corporal y la cantidad de tejido adiposo blanco (Karatayev et al., 2009). En nuestros resultados, como se ha indicado anteriormente, no encontramos diferencias significativas para la actividad encefalinasasa (Tyr-AP) en el hipotálamo. Sin embargo, sí que demostramos un aumento significativo en la hipófisis anterior de los animales del grupo Bch. De manera similar, también hemos encontrado en el hígado un aumento significativo de la actividad Tyr-AP soluble exclusivamente en los animales que consumieron la dieta Bch. Este cambio podría estar relacionado con las modificaciones tanto en la ingesta de alimento como del aumento de peso corporal de los animales de este grupo experimental (Suo et al., 2018).

Otro importante grupo de actividades que se han analizado en este trabajo forman parte de la cascada del sistema renina angiotensina. Además de la regulación de la PAS y del equilibrio hidroelectrolítico, los sistemas renina angiotensina locales descritos en distintos tejidos y órganos, incluido el hígado (Fukasawa et al., 1996; Nagasaka et al., 1997; Barrett et al., 2004; Bergasa et al., 2008), parecen tener un papel destacado en el desarrollo de distintas patologías, así como en la regulación metabólica (van den Hoven et al., 2014; Shim et al., 2018; Sansoè et al., 2020). De hecho, el bloqueo de los receptores de angiotensina es capaz de mejorar el control glucémico y reducir los valores de triglicéridos en el hígado (Graus-Nunes et al., 2019).

La concentración relativa de las distintas angiotensinas, y por lo tanto la actividad del sistema en distintos tejidos, está regulada por la actividad de distintas actividades aminopeptidasas que reciben el nombre de “angiotensinasas” (figura 1). Estas actividades han demostrado estar condicionadas por distintos factores como el estado tiroideo (Segarra et al., 2018b), la presencia de obesidad (Gajdosechova, et al., 2014; Prieto et al., 2018a) o por la cantidad y calidad de la grasa en dieta (Reaux et al., 1999; Min et al., 2000; Segarra et al., 2002; 2008; 2011; Villarejo et al., 2015). En concreto, nuestros resultados demuestran un aumento de distintas angiotensinasas (Ala-AP y Cys-AP / IRAP) en el hígado de los animales del grupo EVOO. La actividad Ala-AP (angiotensinasa M) está implicada en el metabolismo de AngIII a Ang IV (Villarejo et al., 2012), mientras que la actividad Cys-AP se ha descrito como la aminopeptidasa regulada por insulina (IRAP) y también como el receptor específico para unir Ang IV (AT4) (Prieto et al., 2015; 2018a; 2018b; Segarra et al., 2018a; 2018b). Este resultado podría indicar un aumento de la concentración local en

hígado de la Ang IV, el péptido que se une al receptor AT4 y que se colocaliza con el transportador de glucosa GluT4 (Chai et al., 2004). Cabe también destacar que estos cambios se observaron en la fracción unida a la membrana, lo que sugiere un papel funcional más específico (Chai et al., 2004).

Además de su papel funcional, distintas aminopeptidasas se han propuesto como marcadores de daño hepático (Kanno et al., 1984; Porta et al., 2012). La dieta enriquecida en mantequilla aumentó la actividad de alguna de estas peptidasas, en concreto de la GGT y la Leu-AP, resultados en concordancia con los obtenidos con otras dietas altas en grasa, mientras que las dietas hipocalóricas y los antioxidantes han demostrado disminuir esta actividad (Li et al., 1997; Bezerra-Duarte et al., 2014). Además, los valores de GGT en el hígado mostraron una correlación significativa y positiva con los valores plasmáticos tanto de colesterol total como de triglicéridos.

Por otro lado, el daño hepático ocasionado por las dietas altas en grasa normalmente está asociado a un aumento en los valores de estrés oxidativo (Li et al., 1997) y se ha descrito una respuesta adaptativa a este tipo de daño mediante un incremento en la expresión de iNOS y la concentración de NO, encaminada a disminuir la inflamación y el daño hepático (Blundell & Gillett, 2001). Por ejemplo, en estudios sobre la enfermedad del hígado graso no alcohólica (NAFLD) donde se utilizaron dietas altas en grasa, se ha demostrado un aumento notable de la expresión de iNOS (Hassanin et al., 2014; Pan et al., 2015). En nuestros resultados, estos efectos descritos para las dietas altas en grasa (aumento de la expresión de iNOS en hígado e incremento de los valores plasmáticos de nitratos y nitritos) solo aparecieron en los animales del grupo Bch, probablemente porque solo en ellos se desarrolló un daño hepático por estrés oxidativo, y marcando de nuevo una clara diferencia entre las dos dietas altas en grasa estudiadas.

6.4. Aminopeptidasas en los testículos

Hasta la fecha, distintos estudios han demostrado que el aumento de los triglicéridos plasmáticos y el colesterol están relacionados con una menor calidad del semen y la infertilidad masculina (Ramírez-Torres et al., 2000; Saez-Lancellotti et al., 2010). De hecho, se ha sugerido que la hipercolesterolemia es un factor de riesgo independiente para la disfunción testicular (Feng et al., 2005). Por el contrario, la administración oral concomitante de tocoferol (un antioxidante) y simvastatina (un agente reductor del colesterol) a ratas

hipercolesterolémicas machos induce un efecto protector sobre la fertilidad (Shalaby et al., 2004).

También se ha demostrado que la suplementación con oleuropeína, un compuesto fenólico presente en el aceite de oliva virgen, aumenta los niveles de testosterona en ratas alimentadas con una dieta alta en proteínas (Oi-Kano et al., 2013), y la administración de aceite de oliva a conejos macho hipercolesterolémicos es capaz de recuperar la disminución en la calidad del semen y la funcionalidad de los espermatozoides (Saez-Lancellotti et al., 2013).

Parte de los efectos negativos de la grasa dietética parecen ejercerse a través de modificaciones en el RAS local del testículo. Estudios anteriores de nuestro grupo de investigación demostraron un efecto diferencial de varias fuentes de grasa sobre la actividad de Glu-AP en plasma y sobre los niveles de testosterona en ratas macho Wistar, lo que indica la importancia de los componentes de grasa en la dieta (Segarra et al., 2008). Otros trabajos también han apuntado el efecto beneficioso del aceite de oliva virgen extra, capaz de reducir los efectos adversos de la soja genéticamente modificada en los órganos reproductivos de ratas macho adultas (El-Kholy et al., 2015), lo que ha llevado a sugerir que una mezcla apropiada de aceite de oliva y aceite de soja podría mejorar la homeostasis redox y el estado esteroidogénico en los testículos de rata (Hurtado de Catalfo et al., 2008).

Nuestros resultados indican que solo la dieta enriquecida en mantequilla afectó a la actividad Glu-AP en los testículos, marcando una diferencia entre los efectos de las dos dietas altas en grasa sobre el RAS testicular. Además, los cambios en la actividad Glu-AP correlacionaron positivamente con las concentraciones plasmáticas tanto de colesterol como de triglicéridos.

Como hemos indicado anteriormente, el RAS local de los testículos ha demostrado jugar un importante papel en la regulación de la función reproductora masculina (Prieto et al., 2002; Alves-Pereira et al., 2014). Sabemos que está implicado en la inhibición de la producción de testosterona durante la esteroidogénesis masculina (Dufau et al., 1987) y se ha demostrado que la Ang II inhibe la función de las células de Leydig y, por lo tanto, está implicada en la regulación local de los testículos por la LH (Khanum & Dufau, 1988).

La Ang II es capaz de inhibir la actividad de la adenilato ciclasa en las membranas de las células de Leydig y de reducir las concentraciones basales de adenosín monofosfato cíclico (AMPc), así como la producción de testosterona (Khanum & Dufau, 1988). Estos datos sugieren que la Ang II producida localmente podría modular negativamente la estimulación de las células de Leydig por la LH.

La Ang II participa en la regulación paracrina de los túbulos seminíferos, ya que a través de los receptores AT1 controla la concentración intracelular de calcio en las células mioideas peritubulares, y por lo tanto la contracción y el crecimiento de estos tubos (Rossi et al., 2002).

También se conoce la relación entre el RAS testicular y las dietas altas en grasa, ya que se ha demostrado que este tipo de dietas son capaces de inhibir la expresión de distintos componentes del RAS local, entre otros los del Enzima Convertidor de Angiotensina (ECA) y el receptor de la Ang II (AT1). Además, estos efectos son revertidos por la administración de Enalapril, un inhibidor del ECA (Alves-Pereira et al., 2014).

Como hemos indicado, la dieta rica en mantequilla fue la única que afectó a las actividades del RAS local, provocando un aumento de la Glu-AP. La actividad Glu-AP hidroliza selectivamente residuos de aminoácidos ácidos del extremo amino terminal de los oligopéptidos (Banegas et al., 2006), principalmente de la Ang II. La eliminación del residuo Asp N-terminal de Ang II da como resultado Ang III, un vasoconstrictor menos potente que Ang II (Ramírez et al., 2008).

Por lo tanto, el aumento de la actividad Glu-AP en los testículos con la dieta Bch, y su correlación positiva con las concentraciones de triglicéridos y colesterol plasmáticos, respaldaría su participación en los mecanismos subyacentes a los efectos de las dietas ricas en ácidos grasos saturados y colesterol sobre la función testicular.

La dieta Bch también aumentó la actividad GGT, una importante enzima unida a membrana e implicada en el metabolismo del glutatión (Hanigan et al., 1993). En el túbulo seminífero, esta enzima se localiza en las células de Sertoli y ha sido considerado un marcador funcional de estas células (Meroni et al., 1998). La actividad GGT es estimulada por la FSH y por productos secretados por las células germinales (Agrawal & Vanha-Perttula, 1988). Estudios previos han demostrado que la GGT está presente en las células

epiteliales del epidídimo y en los fluidos luminales (Agrawal & Vanha-Perttula, 1988). Se ha propuesto que la GGT puede tener un papel en la protección de los espermatozoides frente a los procesos de estrés oxidativo en el conducto epididimario (Agrawal & Vanha-Perttula, 1988). Nuestros resultados demuestran que una dieta alta en grasas saturadas y colesterol puede modular la actividad testicular de GGT. La alta actividad de GGT (um) provocada por la dieta Bch puede ser una señal de la necesidad de una mayor protección frente al estrés oxidativo provocado por la peroxidación lipídica.

A diferencia de la dieta Bch, la dieta enriquecida en EVOO afectó fundamentalmente a la actividad DPP4. El enzima DPP4 parece influir en el desarrollo de los testículos y la espermatogénesis al regular el estado inmune en los testículos. La DPP4 también es conocida como el antígeno de activación CD26 de células T (Kajiyama et al., 2002). DPP4 y DPP8 se consideran coestimuladores de células T para participar en la inmunoreacción (Abbot et al., 2000). La DPP4 probablemente también influye en la actividad quimiotáctica de algunas quimiocinas en linfocitos Th2 y en células dendríticas, pero no en linfocitos Th1. Además, los niveles elevados de DPP4 y el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) en el secretoma parece desempeñar un papel crucial en la espermatogénesis (Schmid et al., 2019).

Este papel inmunorregulador de la DPP4 puede ser especialmente importante en los testículos, ya que la inmunoreacción debe alcanzar un equilibrio entre la resistencia inmune y la protección inmune, lo que contribuiría al mantenimiento normal de la espermatogénesis. El incremento descrito por nuestros resultados para la actividad DPP4 en los testículos de los animales que recibieron la dieta EVOO podría contribuir a un mejor equilibrio en el proceso de espermatogénesis (Dubois et al., 2009), y estar de acuerdo con el efecto beneficioso de los compuestos con actividad antioxidante del aceite de oliva virgen sobre la producción de testosterona por los testículos (Saez-Lancellotti et al., 2013).

[7. CONCLUSIONES]

1. Según los resultados del presente estudio, solo los animales que entraron a formar parte del grupo que recibió la dieta enriquecida con mantequilla y colesterol (Bch) mostraron al final del periodo experimental valores de peso corporal significativamente superiores a los del grupo estándar, no estando este efecto asociado a un aumento en la ingesta de energía. El que este mismo resultado no se obtuviera para el grupo que recibió la dieta enriquecida con aceite de oliva (EVOO), apoyaría un efecto diferencial de los dos tipos de fuentes lipídicas estudiadas sobre la termogénesis y el uso energético.
2. Resultados similares se obtuvieron para los valores de Presión Arterial Sistólica. Sólo la dieta Bch indujo un aumento progresivo de los valores de Presión Arterial, que se mostraron significativamente superiores a la media de los otros dos grupos desde el segundo mes hasta el final del periodo experimental. Este resultado indica que no todas las grasas tienen el mismo efecto sobre el desarrollo de la hipertensión, y apoya el papel protector del aceite de oliva virgen.
3. Los resultados sobre el control de la glucemia muestran que fueron los animales del grupo EVOO los que mostraron diferencias respecto al grupo estándar. Tras la inyección intraperitoneal de glucosa, en este grupo se alcanzó más tarde el pico en los valores de glucemia, si bien no se llegaron a establecer diferencias significativas entre los tres grupos para los índices de resistencia a la insulina analizados.
4. El estudio de las distintas actividades aminopeptidasas en hipotálamo no mostró diferencias significativas. Sin embargo, en hipófisis anterior si se establecieron diferencias en varias de las actividades que forman parte del RAS local, cambios que podrían estar relacionados con un mayor metabolismo de la Ang III a Ang IV en el grupo Bch.
5. También en hipófisis anterior encontramos aumentos significativos en la dieta Bch de varias aminopeptidasas implicadas en el control metabólico y la regulación de la ingesta de alimento, como la DPP4, PIP y Tyr-AP.
6. La dieta EVOO también incrementó la actividad DPP4 en hígado, aumento que podría relacionarse con la adaptación de estos animales a una mayor secreción postprandial de GLP-1, resultado que estaría de acuerdo con los cambios obtenidos en la curva del test de tolerancia a la glucosa.

7. Por otro lado, encontramos un efecto de la dieta EVOO sobre distintas aminopeptidasas del RAS local en hígado, con un aumento en las actividades Ala-AP e IRAP. De nuevo, este resultado podría estar relacionado con una mayor producción de Ang IV hepática.

8. Por el contrario, la dieta Bch afectó específicamente a aminopeptidasas que son utilizadas como marcadores de daño hepático, como la GGT. Además, en este grupo también encontramos una mayor expresión de iNOS en hígado y de los valores plasmáticos de nitratos y nitritos, resultado que vincularía el daño hepático con un aumento del estrés oxidativo.

9. Además de los cambios metabólicos y en la conducta de alimentación, las dietas altas en grasa se han relacionado con alteraciones en la reproducción. En nuestros resultados, solo la dieta Bch afectó a la actividad Glu-AP en los testículos, uno de los enzimas clave en el RAS local. Además, los valores de actividad GluAP correlacionaron con las concentraciones en plasma de triglicéridos y colesterol, lo que vincularía las alteraciones en el RAS testicular con cambios en los lípidos plasmáticos.

10. Al igual que ocurrió en el hígado, la dieta Bch también aumentó la actividad GGT, considerada un marcador funcional y un índice de la necesidad de protección frente al aumento de daño por estrés oxidativo.

11. Por el contrario, la dieta EVOO aumentó la actividad DPP4, enzima al que se le ha asignado un papel inmunomodulador en los testículos. Este resultado estaría de acuerdo con el efecto beneficioso que los polifenoles del aceite de oliva virgen podrían tener sobre la función testicular.

12. Considerados en su conjunto, los resultados de este estudio ponen de manifiesto el efecto diferencial de las dietas altas en grasa, en este caso mantequilla y colesterol o aceite de oliva virgen. Estos efectos se reflejarían en cambios sobre distintas variables fisiológicas y metabólicas, podrían estar mediados por modificaciones en las actividades peptidasas y, por lo tanto, por cambios en las concentraciones de los péptidos que éstas regulan. El conjunto de los resultados obtenidos apunta a un efecto protector del aceite de oliva virgen en comparación con fuentes lipídicas ricas en ácidos grasos saturados y colesterol.

[8. BIBLIOGRAFÍA]

- Abbas AM, Sakr HF. Simvastatin and vitamin E effects on cardiac and hepatic oxidative stress in rats fed on high fat diet. *J Physiol Biochem.* 2013;69(4):737-50. doi: 10.1007/s13105-013-0250-y.
- Abbott CA, Yu DM, Woollatt E, Sutherland GR, McCaughan GW, Gorrell MD. Cloning, expression and chromosomal localization of a novel human dipeptidyl peptidase (DPP) IV homolog, DPP8. *Eur J Biochem.* 2000;267(20):6140-50. doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01617.x.
- Agrawal YP, Vanha-Perttula T. Gamma-glutamyl transpeptidase, glutathione, and L-glutamic acid in the rat epididymis during postnatal development. *Biol Reprod.* 1988;38(5):996-1000. doi: 10.1095/biolreprod38.5.996.
- Alba F, Arenas JC, Lopez MA. Comparison of soluble and membrane-bound pyroglutamyl peptidase I activities in rat brain tissues in the presence of detergents. *Neuropeptides.* 1995;29(2):103-7. doi: 10.1016/0143-4179(95)90092-6.
- Alves-Pereira JL, Frantz ED, da Fonte Ramos C. Beneficial effects of renin-angiotensin system blockers on testicular steroidogenesis. *J. Urol.* 2014, 192, 1878–1883. doi: 10.1016/j.juro.2014.05.093.
- Araujo RL, Andrade BM, Padrón AS, Gaidhu MP, Perry RL, Carvalho DP, Ceddia RB. High-fat diet increases thyrotropin and oxygen consumption without altering circulating 3,5,3'-triiodothyronine (T3) and thyroxine in rats: the role of iodothyronine deiodinases, reverse T3 production, and whole-body fat oxidation. *Endocrinology.* 2010;151(7):3460-9. doi: 10.1210/en.2010-0026.
- Arechaga G, Martínez JM, Prieto I, Ramírez MJ, Sánchez MJ, Alba F, De Gasparo M, Ramírez M. Serum aminopeptidase A activity of mice is related to dietary fat saturation. *J Nutr.* 2001 Apr;131(4):1177-9. doi: 10.1093/jn/131.4.1177.
- Arechaga G, Prieto I, Segarra AB, Alba F, Ruiz-Larrea MB, Ruiz-Sanz JI, de Gasparo M, Ramirez M. Dietary fatty acid composition affects aminopeptidase activities in the testes of mice. *Int J Androl.* 2002;25(2):113-8. doi: 10.1046/j.1365-2605.2002.0334a.x.
- Banegas I, Prieto I, Vives F, Alba F, de Gasparo M, Segarra AB, Hermoso F, Durán R, Ramírez M. Brain aminopeptidases and hypertension. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2006;7(3):129-34. doi: 10.3317/jraas.2006.021.
- Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF. In: *Handbook of Proteolytic Enzymes*; Elsevier Academic Press: Amsterdam, The Netherlands, 2004.
- Benedict M, Zhang X. Non-alcoholic fatty liver disease: An expanded review. *World J Hepatol.* 2017;9(16): 715–732. doi: 10.4254/wjh.v9.i16.715.
- Bergasa NV, Boyella VD. Liver derived endogenous opioids may interfere with the therapeutic effect of interferon in chronic hepatitis C. *Med Hypotheses.* 2008;70(3):556-9. doi: 10.1016/j.mehy.2007.06.022.

- Bernstein HG, Müller S, Dobrowolny H, Wolke C, Lendeckel U, Bukowska A, Keilhoff G, Becker A, Trübner K, Steiner J, Bogerts B. Insulin-regulated aminopeptidase immunoreactivity is abundantly present in human hypothalamus and posterior pituitary gland, with reduced expression in paraventricular and suprachiasmatic neurons in chronic schizophrenia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2017;267(5):427-443. doi: 10.1007/s00406-016-0757-7.
- Bezerra Duarte SM, Faintuch J, Stefano JT, Sobral de Oliveira MB, de Campos Mazo DF, Rabelo F, Vanni D, Nogueira MA, Carrilho FJ, Marques Souza de Oliveira CP. Hypocaloric high-protein diet improves clinical and biochemical markers in patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Nutr Hosp.* 2014;29(1):94-101. doi: 10.3305/nh.2014.29.1.7068.
- Blundell JE, Gillett A. Control of Food Intake in the Obese. *Obes. Res.* 2001; 9:S263–S270.
- Boozer CN, Schoenbach G, Atkinson RL. Dietary fat and adiposity: A dose-response relationship in adult male rats fed isocalorically. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 1995;268:E546–E550. doi: 10.1152/ajpendo.1995.268.4.E546.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54. doi: 10.1006/abio.1976.9999.
- Bucolo G, David H. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clin Chem.* 1973;19(5):476-82.
- Campos-Silva P, Furriel A, Costa WS, Sampaio FJ, Gregorio BM. Metabolic and testicular effects of the long-term administration of different high-fat diets in adult rats. *Int. Braz. J. Urol.* 2015, 41, 569–575. doi: 10.1590/S1677-5538.IBJU.2014.0244.
- Cancelas J, Prieto PG, Villanueva-Peñacarrillo ML, Valverde I, Malaisse WJ. Effects of an olive oil-enriched diet on glucagon-like peptide 1 release and intestinal content, plasma insulin concentration, glucose tolerance and pancreatic insulin content in an animal model of type 2 diabetes. *Horm Metab Res.* 2006;38(2):98-105. doi: 10.1055/s-2006-925126.
- Canneva F, Golub Y, Distler J, Dobner J, Meyer S, von Hörsten S. DPP4-deficient congenic rats display blunted stress, improved fear extinction and increased central NPY. *Psychoneuroendocrinology.* 2015;53:195-206. doi: 10.1016/j.psyneuen.2015.01.007.
- Carnevale R, Loffredo L, Del Ben M, Angelico F, Nocella C, Petruccioli A, Bartimoccia S, Monticolo R, Cava E, Violi F. Extra virgin olive oil improves postprandial glycemic and lipid profile in patients with impaired fasting glucose. *Clin Nutr.* 2017;36(3):782-7. doi: 10.1016/j.clnu.2016.05.016.
- Carnevale R, Silvestri R, Loffredo L, Novo M, Cammisotto V, Castellani V, Bartimoccia S, Nocella C, Violi F. Oleuropein, a component of extra virgin olive oil, lowers postprandial glycaemia in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol.* 2018;84(7):1566-74. doi: 10.1111/bcp.13589.

- Castellano-Castillo D, Royo JL, Martínez-Escribano A, Sánchez-Alcoholado L, Molina-Vega M, Queipo-Ortuño MI, Ruiz-Galdon M, J Álvarez-Millán J, Cabezas-Sanchez P, Reyes-Engel A, Tinahones FJ, Cardona F, Fernandez-Garcia JC. Effects of SHBG rs1799941 Polymorphism on Free Testosterone Levels and Hypogonadism Risk in Young Non-Diabetic Obese Males. *J Clin Med*. 2019;8(8). pii: E1136. doi: 10.3390/jcm8081136.
- Castro-Barquero S, Lamuela-Raventós RM, Doménech M, Estruch R. Relationship between Mediterranean Dietary Polyphenol Intake and Obesity. *Nutrients*. 2018;10(10). pii: E1523. doi: 10.3390/nu10101523.
- Ceriello A, Esposito K, La Sala L, Pujadas G, De Nigris V, Testa R, Bucciarelli L, Rondinelli M, Genovese S. The protective effect of the Mediterranean diet on endothelial resistance to GLP-1 in type 2 diabetes: a preliminary report. *Cardiovasc Diabetol*. 2014;13(1):140. doi: 10.1186/s12933-014-0140-9.
- Chai SY, Fernando R, Peck G, Ye SY, Mendelsohn FA, Jenkins TA, Albiston AL. The angiotensin IV/AT4 receptor. *Cell Mol Life Sci*. 2004;61(21):2728-37. doi: 10.1007/s00018-004-4246-1.
- Chen T, Zamora R, Zuckerbraun B, Billiar TR. Role of nitric oxide in liver injury. *Curr Mol Med*. 2003;3(6):519-26. doi: 10.2174/1566524033479582.
- Cheung HS, Cushman DW. A soluble aspartate aminopeptidase from dog kidney. *Biochim Biophys Acta*. 1971;242(1):190-3. doi: 10.1016/0005-2744(71)90098-2.
- Chowdhury S, Chen Y, Yao TW, Ajami K, Wang XM, Popov Y, Schuppan D, Bertolino P, McCaughan GW, Yu DM, Gorrell MD. Regulation of dipeptidyl peptidase 8 and 9 expression in activated lymphocytes and injured liver. *World J Gastroenterol*. 2013;19(19):2883-93. doi: 10.3748/wjg.v19.i19.2883.
- Coleman JK, Krebs LT, Hamilton TA, Ong B, Lawrence KA, Sardinia MF, Harding JW, Wright JW. Autoradiographic identification of kidney angiotensin IV binding sites and angiotensin IV-induced renal cortical blood flow changes in rats. *Peptides*. 1998;19(2):269-77. doi: 10.1016/s0196-9781(97)00291-x.
- Cynis H, Kehlen A, Haegele M, Hoffmann T, Heiser U, Fujii M, Shibazaki Y, Yoneyama H, Schilling S, Demuth HU. Inhibition of Glutaminyl Cyclases alleviates CCL2-mediated inflammation of non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Int J Exp Pathol*. 2013;94(3):217-25. doi: 10.1111/iep.12020.
- de Gasparo M, Whitebread S, Bottari SP, Levens NR. Heterogeneity of Angiotensin Receptor Subtypes. In: *Medicinal Chemistry of the Renin-Angiotensin System*; Pbmwm, T., Wexler, R.R., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1994; pp. 269–294.
- Delić D, Grosser C, Dkhil M, Al-Quraishy S, Wunderlich F. Testosterone-induced upregulation of miRNAs in the female mouse liver. *Steroids*. 2010;75(12):998-1004. doi: 10.1016/j.steroids.2010.06.010.

- Domínguez-Vías G, Segarra AB, Wangenstein R, Banegas I, Ramírez M, Prieto I. Estudio del efecto protector del aceite de oliva en un modelo animal de diabetes. Papel de distintos componentes del sistema renina-angiotensina. En: Castro-Galiano E, editor. *Proyectos de Investigación 2006-2007*. Universidad de Jaén; 2008. Pp. 116-66.
- Dubois V, Van Ginneken C, De Cock H, Lambeir AM, Van der Veken P, Augustyns K, Chen X, Scharpé S, De Meester I. Enzyme activity and immunohistochemical localization of dipeptidyl peptidase 8 and 9 in male reproductive tissues. *J Histochem Cytochem*. 2009;57(6):531-41. doi: 10.1369/jhc.2009.952739.
- Dufau ML, Khanum A, Winters CA, Tsai-Morris CH. Multistep regulation of Leydig cell function. *J Steroid Biochem*. 1987;27(1-3):343-50. doi: 10.1016/0022-4731(87)90326-8.
- Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet (London, England)*. 2005;365(9468):1415-28. doi: 10.1016/S0140-6736(05)66378-7.
- El-Kholy TA, Al-Abbadi HA, Qahwaji D, Al-Ghamdi AK, Shelat VG, Sobhy HM, Abu Hilal M. Ameliorating effect of olive oil on fertility of male rats fed on genetically modified soya bean. *Food Nutr Res*. 2015;59:27758. doi: 10.3402/fnr.v59.27758.
- Feng Y, Zhu Y, Chen X, Sha J, Fan L, Chen Q. Effects of diet-induced hypercholesterolemia on testosterone-regulated protein expression in mice liver. *J Nanosci Nanotechnol*. 2005;5(8):1273-6. doi: 10.1166/jnn.2005.204.
- Fukasawa KM, Fukasawa K, Kanai M, Fujii S, Harada M. Molecular cloning and expression of rat liver aminopeptidase B. *J Biol Chem*. 1996;271(48):30731-5. doi: 10.1074/jbc.271.48.30731.
- Gajdosechova L, Krskova K, Segarra AB, Spolcova A, Suski M, Olszanecki R, Zorad S. Hypo-oxytocinaemia in obese Zucker rats relates to oxytocin degradation in liver and adipose tissue. *J Endocrinol*. 2014;220(3):333-43. doi: 10.1530/JOE-13-0417.
- Ganong WF. Blood, pituitary, and brain renin-angiotensin systems and regulation of secretion of anterior pituitary gland. *Front Neuroendocrinol*. 1993;14(3):233-49. doi: 10.1006/frne.1993.1008.
- Gao M, Ma Y, Liu D. High-Fat Diet-Induced Adiposity, Adipose Inflammation, Hepatic Steatosis and Hyperinsulinemia in Outbred CD-1 Mice. Stadler K, editor. *PLoS One*. 2015;10(3):e0119784. doi: 10.1371/journal.pone.0119784.
- García-Sáinz JA, Martínez-Alfaro M, Romero-Avila MT, González-Espinosa C. Characterization of the AT1 angiotensin II receptor expressed in guinea pig liver. *J. Endocrinol*. 1997, 154(1):133–38. doi: 10.1677/joe.0.1540133.
- Golub Y, Schildbach EM, Touma C, Kratz O, Moll GH, von Hörsten S, Canneva F. Role of hypothalamus-pituitary-adrenal axis modulation in the stress-resilient phenotype of DPP4-deficient rats. *Behav Brain Res*. 2019;356:243-249. doi: 10.1016/j.bbr.2018.08.029.

- Graus-Nunes F, Santos FO, Marinho TS, Miranda CS, Barbosa-da-Silva S, Souza-Mello V. Beneficial effects of losartan or telmisartan on the local hepatic renin-angiotensin system to counter obesity in an experimental model. *World J Hepatol.* 2019;11(4):359-369. doi: 10.4254/wjh.v11.i4.359.
- Greenberg LJ. Fluorometric measurement of alkaline phosphatase and aminopeptidase activities in the order of 10⁻¹⁴ mole. *Biochem Biophys Res Commun.* 1962;9:430-5. doi: 10.1016/0006-291x(62)90029-3.
- Gumbs MCR, Eggels L, Kool T, Unmehopa UA, van den Heuvel JK, Lamuadni K, Mul JD, la Fleur SE. Neuropeptide Y Signaling in the Lateral Hypothalamus Modulates Diet Component Selection and is Dysregulated in a Model of Diet-Induced Obesity. *Neuroscience.* 2019. pii: S0306-4522(19)30862-0. doi: 10.1016/j.neuroscience.2019.12.014.
- Gustafsson JA, Eneroth P, Hökfelt T, Mode A, Norstedt G, Skett P. Role of the hypothalamo-pituitary-liver axis in sex differences in susceptibility of the liver to toxic agents. *Environ Health Perspect.* 1981;38:129-41. doi: 10.1289/ehp.8138129.
- Guyenet SJ, Schwartz MW. Regulation of Food Intake, Energy Balance, and Body Fat Mass: Implications for the Pathogenesis and Treatment of Obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(3):745-55. doi: 10.1210/jc.2011-2525.
- Hammond GL. Plasma steroid-binding proteins: primary gatekeepers of steroid hormone action. *J Endocrinol.* 2016;230(1):R13-25. doi: 10.1530/JOE-16-0070.
- Hanigan MH, Ricketts WA. Extracellular glutathione is a source of cysteine for cells that express gamma-glutamyl transpeptidase. *Biochemistry.* 1993;32(24):6302-6. doi: 10.1021/bi00075a026.
- Härdtner C, Mörke C, Walther R, Wolke C, Lendeckel U. High glucose activates the alternative ACE2/Ang-(1-7)/Mas and APN/Ang IV/IRAP RAS axes in pancreatic β -cells. *Int J Mol Med.* 2013;32(4):795-804. doi: 10.3892/ijmm.2013.1469.
- Hare KJ, Vilsbøll T, Asmar M, Deacon CF, Knop FK, Holst JJ. The glucagonostatic and insulinotropic effects of glucagon-like peptide 1 contribute equally to its glucose-lowering action. *Diabetes.* 2010;59(7):1765-70. doi: 10.2337/db09-1414.
- Hariri N, Thibault L. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutr Res Rev.* 2010;23(02):270-99. doi: 10.1017/S0954422410000168.
- Hassanin A, Malek HA, Saleh D. Heparin modulation on hepatic nitric oxide synthase in experimental steatohepatitis. *Exp Ther Med.* 2014;8(5):1551-1558. doi: 10.3892/etm.2014.1963.
- Hill-Pryor C, Dunbar JC. The effect of high fat-induced obesity on cardiovascular and physical activity and opioid responsiveness in conscious rats. *Clin Exp Hypertens.* 2006;28(2):133-45. doi: 10.1080/10641960500468326.

- Hsu SH, Ghoshal K. MicroRNAs in Liver Health and Disease. *Curr Pathobiol Rep.* 2013;1(1):53-62. doi: 10.1007/s40139-012-0005-4.
- Hurtado de Catalfo GE, de Alaniz MJ, Marra CA. Dietary lipids modify redox homeostasis and steroidogenic status in rat testis. *Nutrition.* 2008;24(7-8):717-26. doi: 10.1016/j.nut.2008.03.008.
- Hurtado de Catalfo, GE; de Alaniz, MJ; Marra, C. Influence of commercial dietary oils on lipid composition and testosterone production in interstitial cells isolated from rat testis. *Lipids* 2009, 44(4):345–357. doi: 10.1007/s11745-008-3277-z.
- Hwang IK, Go VL, Harris DM, Yip I, Kang KW, Song MK. Effects of cyclo (his-pro) plus zinc on glucose metabolism in genetically diabetic obese mice. *Diabetes Obes Metab.* 2003;5(5):317-24. doi: 10.1046/j.1463-1326.2003.00281.x.
- Iossa S, Lionetti L, Mollica MP, Crescenzo R, Botta M, Barletta A, Liverini G. Effect of high-fat feeding on metabolic efficiency and mitochondrial oxidative capacity in adult rats. *Br. J. Nutr.* 2003; 90:953–960. doi: 10.1079/bjn2003000968.
- Jiang B, Le L, Wan W, Zhai W, Hu K, Xu L, Xiao P. The Flower Tea *Coreopsis tinctoria* Increases Insulin Sensitivity and Regulates Hepatic Metabolism in Rats Fed a High-Fat Diet. *Endocrinology.* 2015;156(6):2006-18. doi: 10.1210/en.2015-1015.
- Juillerat-Jeanneret L, Gerber-Lemaire S. The prolyl-aminodipeptidases and their inhibitors as therapeutic targets for fibrogenic disorders. *Mini Rev Med Chem* 2009; 9(2):215-26. doi: 10.2174/138955709787316100.
- Jung EY, Hong YH, Park C, Suh HJ. Effects of Cyclo-His-Pro-enriched yeast hydrolysate on blood glucose levels and lipid metabolism in obese diabetic ob/ob mice. *Nutr Res Pract.* 2016;10(2):154-60. doi: 10.4162/nrp.2016.10.2.154.
- Kajiyama H, Kikkawa F, Suzuki T, Shibata K, Ino K, Mizutani S. Prolonged survival and decreased invasive activity attributable to dipeptidyl peptidase IV overexpression in ovarian carcinoma. *Cancer Res.* 2002;62(10):2753-7.
- Kanno T, Maekawa M, Kanda S, Kohno H, Sudo K. Evaluation of cytosolic aminopeptidase in human sera. Evaluation in hepatic disorders. *Am J Clin Pathol.* 1984;82(6):700-5. doi: 10.1093/ajcp/82.6.700.
- Karatayev O, Gaysinskaya V, Chang GQ, Leibowitz SF. Circulating triglycerides after a high-fat meal: predictor of increased caloric intake, orexigenic peptide expression, and dietary obesity. *Brain Res.* 2009;1298:111-22. doi: 10.1016/j.brainres.2009.08.001.
- Khanum A, Dufau ML. Angiotensin II receptors and inhibitory actions in Leydig cells. *J Biol Chem.* 1988;263(11):5070-4.
- Krupina NA, Khlebnikova NN. Omega-3 polyunsaturated fatty acids when administered to lactating rats modify the development of experimental anxiety-depressive state in the rat pups exposed to the dipeptidyl peptidase-IV inhibitor

diprotin A on the second - third weeks after the birth. *Patol Fiziol Eksp Ter.* 2016;60(4):9-19.

- Le TN, Nestler JE, Strauss JF, Wickham EP. Sex hormone-binding globulin and type 2 diabetes mellitus. *Trends Endocrinol Metab.* 2012;23(1):32-40. doi: 10.1016/j.tem.2011.09.005.
- Li Q, Feenstra M, Pfaffendorf M, Eijnsman L, van Zwieten PA. Comparative vasoconstrictor effects of angiotensin II, III, and IV in human isolated saphenous vein. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1997;29(4):451-6. doi: 10.1097/00005344-199704000-00004.
- Li J, Billiar TR. Nitric Oxide. IV. Determinants of nitric oxide protection and toxicity in liver. *Am J Physiol.* 1999;276(5 Pt 1):G1069-73. doi: 10.1152/ajpgi.1999.276.5.G1069.
- Liu X-J, Wang B-W, Zhang C, Xia M-Z, Chen Y-H, Hu C-Q, Wang H, Chen X, Xu DX. Vitamin D Deficiency Attenuates High-Fat Diet-Induced Hyperinsulinemia and Hepatic Lipid Accumulation in Male Mice. *Endocrinology.* 2015;156(6):2103-13. doi: 10.1210/en.2014-2037.
- Lonardo A, Ballestri S, Guaraldi G, Nascimbeni F, Romagnoli D, Zona S, Targher G. Fatty liver is associated with an increased risk of diabetes and cardiovascular disease - Evidence from three different disease models: NAFLD, HCV and HIV. *World J Gastroenterol.* 2016; 22(44): 9674–93. doi: 10.3748/wjg.v22.i44.9674.
- Lovshin JA, Drucker DJ. Incretin-based therapies for type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol.* 2009;5(5):262-9. doi: 10.1038/nrendo.2009.48.
- Lugari R, Dei Cas A, Ugolotti D, Barilli AL, Camellini C, Ganzerla GC, Luciani A, Salerni B, Mittenperger F, Nodari S, Gnudi A, Zandomeneghi R. Glucagon-like Peptide 1 (GLP-1) Secretion and Plasma Dipeptidyl Peptidase IV (DPP-IV) Activity in Morbidly Obese Patients Undergoing Biliopancreatic Diversion. *Horm Metab Res.* 2004;36(2):111-5. doi: 10.1055/s-2004-814222.
- Mandøe MJ, Hansen KB, Hartmann B, Rehfeld JF, Holst JJ, Hansen HS. The 2-monoacylglycerol moiety of dietary fat appears to be responsible for the fat-induced release of GLP-1 in humans. *Am J Clin Nutr.* 2015;102(3):548-55. doi: 10.3945/ajcn.115.106799.
- Martinez JM, Ramirez MJ, Prieto I, Alba F, Ramirez M. Sex differences and in vitro effects of steroids on serum aminopeptidase activities. *Peptides.* 1998;19(9):1637-40. doi: 10.1016/s0196-9781(98)00095-3.
- Mendez M, Cruz C, Joseph-Bravo P, Wilk S, Charli JL. Evaluation of the role of prolyl endopeptidase and pyroglutamyl peptidase I in the metabolism of LHRH and TRH in brain. *Neuropeptides.* 1990;17(2):55-62. doi:10.1016/0143-4179(90)90050-9.
- Mentlein R, Gallwitz B, Schmidt WE. Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7-36)amide, peptide histidine

methionine and is responsible for their degradation in human serum. *Eur J Biochem.* 1993;214(3):829-35. doi: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb17986.x.

- Meroni SB, Cánepa DF, Pellizzari EH, Schteingart HF, Cigorraga SB. Effects of purinergic agonists on aromatase and gamma-glutamyl transpeptidase activities and on transferrin secretion in cultured Sertoli cells. *J Endocrinol.* 1998;157(2):275-83. doi: 10.1677/joe.0.1570275.
- Min L, Sim MK, Xu XG. Effects of des-aspartate-angiotensin I on angiotensin II-induced incorporation of phenylalanine and thymidine in cultured rat cardiomyocytes and aortic smooth muscle cells. *Regul Pept.* 2000;95(1-3):93-7. doi: 10.1016/s0167-0115(00)00162-2.
- Mohammed M, Al-Habori M, Abdullateef A, Saif-Ali R. Impact of Metabolic Syndrome Factors on Testosterone and SHBG in Type 2 Diabetes Mellitus and Metabolic Syndrome. *J Diabetes Res.* 2018;2018:4926789. doi: 10.1155/2018/4926789.
- Morgan DH, Ghribi O, Hui L, Geiger JD, Chen X. Cholesterol-enriched diet disrupts the blood-testis barrier in rabbits. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2014;307(12):E1125-30. doi: 10.1152/ajpendo.00416.2014.
- Muraleedharan V, Jones TH. Testosterone and the metabolic syndrome. *Ther Adv Endocrinol Metab.* 2010;1(5):207-23. doi: 10.1177/2042018810390258.
- Nagasaka T, Nomura S, Okamura M, Tsujimoto M, Nakazato H, Oiso Y, Nakashima N, Mizutani S. Immunohistochemical localization of placental leucine aminopeptidase/oxytocinase in normal human placental, fetal and adult tissues. *Reprod Fertil Dev.* 1997;9(8):747-53. doi: 10.1071/r97055.
- Nauck MA, Homberger E, Siegel EG, Allen RC, Eaton RP, Ebert R, Creutzfeldt W. Incretin effects of increasing glucose loads in man calculated from venous insulin and C-peptide responses. *J Clin Endocrinol Metab.* 1986a;63(2):492-8. doi: 10.1210/jcem-63-2-492.
- Nauck M, Stöckmann F, Ebert R, Creutzfeldt W. Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia.* 1986b;29(1):46-52. doi: 10.1007/bf02427280.
- Oi-Kano Y, Kawada T, Watanabe T, Koyama F, Watanabe K, Senbongi R, Iwai K. Extra virgin olive oil increases uncoupling protein 1 content in brown adipose tissue and enhances noradrenaline and adrenaline secretions in rats. *J Nutr Biochem.* 2007;18(10):685-92. doi: 10.1016/j.jnutbio.2006.11.009.
- Oi-Kano Y, Kawada T, Watanabe T, Koyama F, Watanabe K, Senbongi R, Iwai K. Oleuropein supplementation increases urinary noradrenaline and testicular testosterone levels and decreases plasma corticosterone level in rats fed high-protein diet. *J Nutr Biochem.* 2013;24(5):887-93. doi: 10.1016/j.jnutbio.2012.06.003.

- Padron RS; Mas J; Zamora R; Riverol F; Licea M; Mallea M; Rodríguez J. Lipids and testicular function. *Int. Urol. Nephrol.* 1989;21:515–519. doi: 10.1007/bf02549590.
- Pan X, Wang P, Luo J, Wang Z, Song Y, Ye J, Hou X. Adipogenic changes of hepatocytes in a high-fat diet-induced fatty liver mice model and non-alcoholic fatty liver disease patients. *Endocrine.* 2015;48(3):834-47. doi: 10.1007/s12020-014-0384-x.
- Pérez-Durillo FT, Segarra AB, Villarejo AB, Ramírez-Sánchez M, Prieto I. Influence of Diet and Gender on Plasma DPP4 Activity and GLP-1 in Patients with Metabolic Syndrome: An Experimental Pilot Study. *Molecules.* 2018;23(7):pii: E1564. doi: 10.3390/molecules23071564.
- Pi-Sunyer FX. The Obesity Epidemic: Pathophysiology and Consequences of Obesity. *Obes Res.* 2002;10(S12):97S-104S. doi: 10.1038/oby.2002.202.
- Pitteloud N, Hardin M, Dwyer AA, Valassi E, Yialamas M, Elahi D, Hayes FJ. Increasing insulin resistance is associated with a decrease in Leydig cell testosterone secretion in men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(5):2636-41. doi: 10.1210/jc.2004-2190.
- Pivonello R, Menafra D, Riccio E, Garifalos F, Mazzella M, de Angelis C, Colao A. Metabolic Disorders and Male Hypogonadotropic Hypogonadism. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019;10:345. doi: 10.3389/fendo.2019.00345.
- Polley KR, Miller MK, Johnson M, Vaughan R, Paton CM, Cooper JA. Metabolic responses to high-fat diets rich in MUFA v. PUFA. *Br J Nutr.* 2018;120(1):13-22. doi: 10.1017/S0007114518001332.
- Porta M, Pumarega J, Guarner L, Malats N, Solà R, Real FX; PANKRAS II Study Group. Relationships of hepatic and pancreatic biomarkers with the cholestatic syndrome and tumor stage in pancreatic cancer. *Biomarkers.* 2012 Sep;17(6):557-65. doi: 10.3109/1354750X.2012.701331.
- Prasad C, Imrhan V, Juma S, Maziarz M, Prasad A, Tiernan C, Vijayagopal P. Bioactive Plant Metabolites in the Management of Non-Communicable Metabolic Diseases: Looking at Opportunities beyond the Horizon. *Metabolites.* 2015;5(4):733-65. doi: 10.3390/metabo5040733.
- Prieto I, Martínez JM, Hermoso F, Ramírez MJ, de Gasparo M, Vargas F, Alba F, Ramírez M. Effect of valsartan on angiotensin II- and vasopressin-degrading activities in the kidney of normotensive and hypertensive rats. *Horm Metab Res.* 2001;33(9):559-63. doi: 10.1055/s-2001-17207.
- Prieto I, Arechaga G, Ramírez-Expósito MJ, De Gasparo M, Martínez-Martos JM, Ramírez M. Aminopeptidases in the gonads of male and female rats. *Fertil Steril.* 2002;77(4):802-4. doi: 10.1016/s0015-0282(01)03242-3.
- Prieto I, Segarra AB, Vargas F, Alba F, de Gasparo M, Ramírez M. Angiotensinase activity in hypothalamus and pituitary of hypothyroid, euthyroid

and hyperthyroid adult male rats. *Horm Metab Res.* 2003;35(5):279-81. doi: 10.1055/s-2003-41302.

- Prieto PG, Cancelas J, Villanueva-Peñacarrillo ML, Valverde I, Malaisse WJ. Effects of an olive oil-enriched diet on plasma GLP-1 concentration and intestinal content, plasma insulin concentration, and glucose tolerance in normal rats. *Endocrine.* 2005;26(2):107-15. doi: 10.1385/ENDO:26:2:107.
- Prieto I, Villarejo AB, Segarra AB, Wangensteen R, Banegas I, de Gasparo M, Vanderheyden P, Zorad S, Vives F5, Ramírez-Sánchez M. Tissue distribution of CysAP activity and its relationship to blood pressure and water balance. *Life Sci.* 2015;134:73-8. doi: 10.1016/j.lfs.2015.04.023.
- Prieto I, Hidalgo M, Segarra AB, Martínez-Rodríguez AM, Cobo A, Ramírez M, Abriouel H, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Influence of a diet enriched with virgin olive oil or butter on mouse gut microbiota and its correlation to physiological and biochemical parameters related to metabolic syndrome. *PLoS One.* 2018a;13(1):e0190368. doi: 10.1371/journal.pone.0190368.
- Prieto I, Segarra AB, de Gasparo M, Martínez-Cañamero M, Ramírez-Sánchez M. Divergent profile between hypothalamic and plasmatic aminopeptidase activities in WKY and SHR. Influence of beta-adrenergic blockade. *Life Sci.* 2018b;192:9-17. doi: 10.1016/j.lfs.2017.11.022.
- Ra KS, Suh HJ, Choi JW. Hypoglycemic effects of Cyclo (His-Pro) in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biotechnol Bioproc* 2012;E 17:176–184 (2012). doi: 10.1007/s12257-011-0618-1.
- Ramírez-Torres MA, Carrera A, Zambrana M. High incidence of hyperestrogenemia and dyslipidemia in a group of infertile men. *Ginecol Obstet Mex.* 2000;68:224-9.
- Ramírez M, Arechaga G, Martínez JM, Prieto I, Ramírez-Expósito MJ, Sánchez B, Alba F. Environmental light-darkness conditions induce changes in brain and peripheral pyroglutamyl-peptidase I activity. *Neurochem Res.* 2001;26(5):463-468. doi:10.1023/a:1010996425408.
- Ramírez M, Prieto I, Alba F, Vives F, Banegas I, de Gasparo M. Role of central and peripheral aminopeptidase activities in the control of blood pressure: a working hypothesis. *Heart Fail Rev.* 2008;13(3):339-53. doi: 10.1007/s10741-007-9066-6.
- Ramírez M, Prieto I, Banegas I, Segarra AB, Alba F. Neuropeptidases. *Methods Mol Biol.* 2011;789:287-94. doi: 10.1007/978-1-61779-310-3_18.
- Reame V, Pytlowanciv EZ, Ribeiro DL, Pissolato TF, Taboga SR, Góes RM, Pinto-Fochi ME. Obesogenic environment by excess of dietary fats in different phases of development reduces spermatid efficiency of wistar rats at adulthood: Correlations with metabolic status. *Biol. Reprod.* 2014, 91, 151. doi: 10.1095/biolreprod.114.121962.

- Reaux A, Fournie-Zaluski MC, David C, Zini S, Roques BP, Corvol P, Llorens-Cortes C. Aminopeptidase A inhibitors as potential central antihypertensive agents. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96(23):13415-20. doi: 10.1073/pnas.96.23.13415.
- Rocca AS, LaGreca J, Kalitsky J, Brubaker PL. Monounsaturated fatty acid diets improve glycemic tolerance through increased secretion of glucagon-like peptide-1. *Endocrinology*. 2001;142(3):1148-55. doi: 10.1210/endo.142.3.8034.
- Rohrbasser LJ, Alsaffar H, Blair J. The Hypothalamus–Pituitary Axis. In: Belfiore A, LeRoith D. (eds) *Principles of Endocrinology and Hormone Action*. *Endocrinology*. Springer, Cham. 2016. Pp. 1-35. doi: 10.1007/978-3-319-27318-1_12-1.
- Rossi F, Ferraresi A, Romagni P, Silvestroni L, Santiemma V. Angiotensin II stimulates contraction and growth of testicular peritubular myoid cells in vitro. *Endocrinology*. 2002;143(8):3096-104. doi: 10.1210/endo.143.8.8955.
- Saez Lancellotti TE, Boarelli PV, Monclus MA, Cabrillana ME, Clementi MA, Espínola LS, Cid Barría JL, Vincenti AE, Santi AG, Fornés MW. Hypercholesterolemia impaired sperm functionality in rabbits. *PLoS One*. 2010;5(10):e13457. doi: 10.1371/journal.pone.0013457.
- Saez-Lancellotti TE, Boarelli PV, Romero AA, Funes AK, Cid-Barria M, Cabrillana ME, Monclus MA, Simón L, Vicenti AE, Fornés MW. Semen quality and sperm function loss by hypercholesterolemic diet was recovered by addition of olive oil to diet in rabbit. *PLoS One*. 2013;8(1):e52386. doi: 10.1371/journal.pone.0052386.
- Sansoè G, Aragno M, Wong F. Pathways of hepatic and renal damage through non-classical activation of the renin-angiotensin system in chronic liver disease. *Liver Int*. 2020;40(1):18-31. doi: 10.1111/liv.14272.
- Scharfmann R, Ebiou JC, Morgat JL, Aratan-Spire S. Thyroid status regulates particulate but not soluble TRH-degrading pyroglutamate aminopeptidase activity in the rat liver. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1990;123(1):84-9. doi: 10.1530/acta.0.1230084.
- Scharfmann R, Aratan-Spire S. Ontogeny of two topologically distinct TRH-degrading pyroglutamate aminopeptidase activities in the rat liver. *Regul Pept*. 1991;32(2):75-83. doi: 10.1016/0167-0115(91)90036-g.
- Schmid N, Flenkenthaler F, Stöckl JB, Dietrich KG, Köhn FM, Schwarzer JU, Kunz L, Luckner M, Wanner G, Arnold GJ, Fröhlich T, Mayerhofer A. Insights into replicative senescence of human testicular peritubular cells. *Sci Rep*. 2019;9(1):15052. doi: 10.1038/s41598-019-51380-w.
- Segarra AB, Arechaga G, Prieto I, Ramirez-Exposito MJ, Martinez-Martos JM, Ramirez M, Alba F, Ruiz-Larrea MB, Ruiz-Sanz JI. Effects of dietary supplementation with fish oil, lard, or coconut oil on oxytocinase activity in the testis of mice. *Arch Androl*. 2002;48(3):233-6. doi: 10.1080/01485010252869333.

- Segarra A, Ramirez M, Banegas I, Alba F, Vives F, Gasparo M de, Ortega E, Ruiz E, Prieto I. Dietary Fat Influences Testosterone, Cholesterol, Aminopeptidase A, and Blood Pressure in Male Rats. *Horm Metab Res.* 2008;40(4):289-91. doi: 10.1055/s-2008-1046800.
- Segarra AB, Ruiz-Sanz JI, Ruiz-Larrea MB, Ramírez-Sánchez M, de Gasparo M, Banegas I, Martínez-Cañamero M, Vives F, Prieto I. The profile of fatty acids in frontal cortex of rats depends on the type of fat used in the diet and correlates with neuropeptidase activities. *Horm Metab Res.* 2011;43(2):86-91. doi: 10.1055/s-0030-1269855.
- Segarra AB, Prieto I, Villarejo AB, Banegas I, Wangenstein R, de Gasparo M, Vives F, Ramírez-Sánchez M. Effects of antihypertensive drugs on angiotensinase activities in the testis of spontaneously hypertensive rats. *Horm Metab Res.* 2013;45(5):344-8. doi: 10.1055/s-0032-1329988.
- Segarra AB, Prieto I, Martínez-Cañamero M, de Gasparo M, Luna JD, Ramírez-Sánchez M. Thyroid Disorders Change the Pattern of Response of Angiotensinase Activities in the Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Axis of Male Rats. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018a;9:731. doi: 10.3389/fendo.2018.00731.
- Segarra AB, Prieto I, Martinez-Canamero M, Vargas F, De Gasparo M, Vanderheyden P, Zorad S, Ramirez-Sanchez M. Cystinyl and pyroglutamyl-beta-naphthylamide hydrolyzing activities are modified coordinately between hypothalamus, liver and plasma depending on the thyroid status of adult male rats. *J Physiol Pharmacol.* 2018b;69(2). doi: 10.26402/jpp.2018.2.04.
- Segarra AB, Prieto I, Martinez-Canamero M, Ruiz-Sanz JI, Ruiz-Larrea MB, De Gasparo M, Banegas I, Zorad S, Ramirez-Sanchez M. Enkephalinase activity is modified and correlates with fatty acids in frontal cortex depending on fish, olive or coconut oil used in the diet. *Endocr Regul.* 2019;53(2):59-64. doi: 10.2478/enr-2019-0007.
- Shalaby MA, el-Zorba HY, Kamel GM. Effect of α -tocopherol and simvastatin on male fertility in hypercholesterolemic rats. *Pharmacol Res.* 2004;50(2):137-42. doi: 10.1016/j.phrs.2003.10.013.
- Shim KY, Eom YW, Kim MY, Kang SH, Baik SK. Role of the renin-angiotensin system in hepatic fibrosis and portal hypertension. *Korean J Intern Med.* 2018;33(3):453-461. doi: 10.3904/kjim.2017.317.
- Shin S, Ajuwon KM. Effects of Diets Differing in Composition of 18-C Fatty Acids on Adipose Tissue Thermogenic Gene Expression in Mice Fed High-Fat Diets. *Nutrients.* 2018;10(2). pii: E256. doi: 10.3390/nu10020256.
- Simó R, Barbosa-Desongles A, Hernandez C, Selva DM. IL1 β down-regulation of sex hormone-binding globulin production by decreasing HNF-4 α via MEK-1/2 and JNK MAPK pathways. *Mol Endocrinol.* 2012;26(11):1917-27. doi: 10.1210/me.2012-1152.

- Song MK, Rosenthal MJ, Song AM, Yang H, Ao Y, Yamaguchi DT. Raw vegetable food containing high cyclo (his-pro) improved insulin sensitivity and body weight control. *Metabolism*. 2005;54(11):1480-9. doi: 10.1016/j.metabol.2005.05.014.
- Stål P. Liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease - diagnostic challenge with prognostic significance. *World J Gastroenterol*. 2015; 21(39): 11077–087. doi: 10.3748/wjg.v21.i39.11077.
- Suo J, Zhao X, Guo X, Zhao X. Met-enkephalin improves metabolic syndrome in high fat diet challenged mice through promotion of adipose tissue browning. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2018;359:12-23. doi: 10.1016/j.taap.2018.09.015.
- Taylor BS, Alarcon LH, Billiar TR. Inducible nitric oxide synthase in the liver: regulation and function. *Biochemistry (Mosc)*. 1998;63(7):766-81.
- Tobe H, Kojima F, Aoyagi T, Umezawa H. Purification by affinity chromatography using amastatin and properties of aminopeptidase A from pig kidney. *Biochim Biophys Acta*. 1980;613(2):459-68. doi: 10.1016/0005-2744(80)90100-x.
- Tsai TY, Yeh TK, Chen X, Hsu T, Jao YC, Huang CH, Song JS, Huang YC, Chien CH, Chiu JH, Yen SC, Tang HK, Chao YS, Jiaang WT. Substituted 4-carboxymethylpyroglutamic acid diamides as potent and selective inhibitors of fibroblast activation protein. *J Med Chem*. 2010;53(18):6572-83. doi: 10.1021/jm1002556.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(1):44-84. doi: 10.1016/j.biocel.2006.07.001.
- van den Hoven AF, Smits ML, Rosenbaum CE, Verkooijen HM, van den Bosch MA, Lam MG. The effect of intra-arterial angiotensin II on the hepatic tumor to non-tumor blood flow ratio for radioembolization: a systematic review. *PLoS One*. 2014;9(1):e86394. doi: 10.1371/journal.pone.0086394.
- Van der Veken P, Haemers A, Augustyns K. Prolyl peptidases related to dipeptidyl peptidase IV: potential of specific inhibitors in drug discovery. *Curr Top Med Chem*. 2007;7(6):621-35. doi: 10.2174/156802607780091046.
- Villarejo AB, Segarra AB, Ramírez M, Banegas I, Wangensteen R, de Gasparo M, Cobo J, Alba F, Vives F, Prieto I. Angiotensinase and vasopressinase activities in hypothalamus, plasma, and kidney after inhibition of angiotensin-converting enzyme: basis for a new working hypothesis. *Horm Metab Res*. 2012;44(2):152-4. doi: 10.1055/s-0031-1299693.
- Villarejo AB, Prieto I, Segarra AB, Banegas I, Wangensteen R, Vives F, de Gasparo M, Ramírez-Sánchez M. Relationship of angiotensinase and vasopressinase activities between hypothalamus, heart, and plasma in L-NAME-treated WKY and SHR. *Horm Metab Res*. 2014;46(8):561-7. doi: 10.1055/s-0034-1370992.
- Villarejo AB, Ramírez-Sánchez M, Segarra AB, Martínez-Cañamero M, Prieto I. Influence of extra virgin olive oil on blood pressure and kidney angiotensinase

activities in spontaneously hypertensive rats. *Planta Med.* 2015;81(8):664-9. doi: 10.1055/s-0034-1383263.

- Violi F, Loffredo L, Pignatelli P, Angelico F, Bartimoccia S, Nocella C, Cangemi R, Petruccioli A, Monticolo R, Pastori D, Carnevale R. Extra virgin olive oil use is associated with improved post-prandial blood glucose and LDL cholesterol in healthy subjects. *Nutr Diabetes.* 2015;5(7):e172-e172. doi: 10.1038/nutd.2015.23.
- Wagner L, Klemann C, Stephan M, von Hörsten S. Unravelling the immunological roles of dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) activity and/or structure homologue (DASH) proteins. *Clin Exp Immunol.* 2016;184(3):265-83. doi: 10.1111/cei.12757.
- Walter R, Simmons WH, Yoshimoto T. Proline specific endo- and exopeptidases. *Mol Cell Biochem* 1980;30(2):111-27. doi: 10.1007/bf00227927.
- Wangensteen R, Segarra AB, Ramirez-Sanchez M, Gasparo MD, Dominguez G, Banegas I, Vargas F, Vives F, Prieto I. Influence of thyroid disorders on the kidney expression and plasma activity of aminopeptidase A. *Endocr Regul.* 2015;49(2):68-72. doi: 10.4149/endo_2015_02_68.
- Wolke C, Teumer A, Endlich K, Endlich N, Rettig R, Stracke S, Fiene B, Aymanns S, Felix SB, Hannemann A, Lendeckel U. Serum protease activity in chronic kidney disease patients: The GANI_MED renal cohort. *Exp Biol Med (Maywood).* 2017;242(5):554-63. doi: 10.1177/1535370216684040.
- Zhang L, Perdomo G, Kim DH, Qu S, Ringquist S, Trucco M, Dong HH. Proteomic analysis of fructose-induced fatty liver in hamsters. *Metabolism.* 2008;57(8):1115-24. doi: 10.1016/j.metabol.2008.03.017.

[9. ANEXOS (PUBLICACIONES)]

ANEXO I

Autores: Germán Domínguez-Vías, Ana Belén Segarra, Manuel Ramírez-Sánchez, Isabel Prieto.

Título: The Role of High Fat Diets and Liver Peptidase Activity in the Development of Obesity and Insulin Resistance in Wistar Rats.

Artículo de revista: *Nutrients*. 2020;12(3):636.

DOI: 10.3390/nu12030636.

Resumen:

High-fat diets (HFD) have been widely associated with an increased risk of metabolic disorders and overweight. However, a high intake of sources that are rich in monounsaturated fatty acids has been suggested as a dietary agent that is able to positively influence energy metabolism and vascular function. The main objective of this study was to analyze the role of dietary fats on hepatic peptidases activities and metabolic disorders. Three diets: standard (S), HFD supplemented with virgin olive oil (VOO), and HFD supplemented with butter plus cholesterol (Bch), were administered over six months to male Wistar rats. Plasma and liver samples were collected for clinical biochemistry and aminopeptidase activities (AP) analysis. The expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) was also determined by Western blot in liver samples. The diet supplement with VOO did not induce obesity, in contrast to the Bch group. Though the VOO diet increased the time that was needed to return to the basal levels of plasma glucose, the fasting insulin/glucose ratio and HOMA2-%B index (a homeostasis model index of insulin secretion and valuation of β -cell usefulness (% β -cell secretion)) were improved. An increase of hepatic membrane-bound dipeptidyl-peptidase 4 (DPP4) activity was found only in VOO rats, even if no differences in fasting plasma glucagon-like peptide 1 (GLP-1) were obtained. Both HFDs induced changes in hepatic pyroglutamyl-AP in the soluble fraction, but only the Bch diet increased the soluble tyrosyl-AP. Angiotensinase activities that are implicated in the metabolism of angiotensin II (AngII) to AngIV increased in the VOO diet, which was in agreement with the higher activity of insulin-regulated-AP (IRAP) in this group. Otherwise, the diet that was enriched with butter increased soluble gamma-glutamyl transferase (GGT) and Leucyl-AP, iNOS expression in the liver, and plasma NO. In summary, VOO increased the hepatic activity of AP that were related to glucose metabolism (DPP4, angiotensinases, and IRAP). However, the Bch diet increased activities that are implicated in the control of food intake (Tyrosine-AP), the index of hepatic damage (Leucine-AP and GGT), and the expression of hepatic iNOS and plasma NO. Taken together, these results support that the source of fat in the diet affects several peptidases activities in the liver, which could be related to alterations in feeding behavior and glucose metabolism.

ANEXO II

Autores: Germán Domínguez-Vías, Ana Belén Segarra, Magdalena Martínez-Cañamero, Manuel Ramírez-Sánchez, Isabel Prieto.

Título: Influence of a Virgin Olive Oil versus Butter Plus Cholesterol-Enriched Diet on Testicular Enzymatic Activities in Adult Male Rats.

Artículo de revista: *International journal of molecular sciences*. 2017;18(8):1701.

DOI: 10.3390/ijms18081701.

Resumen:

The aim of the present work was to improve our knowledge on the mechanisms underlying the beneficial or deleterious effects on testicular function of the so-called Mediterranean and Western diet by analyzing glutamyl aminopeptidase (GluAP), gamma glutamyl transpeptidase (GGT) and dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) activities in testis, as enzymes involved in testicular function. Male Wistar rats (6 months old) were fed for 24 weeks with three different diets: standard (S), an S diet supplemented with virgin-olive-oil (20%) (VOO), or a S diet enriched with butter (20%) plus cholesterol (0.1%) (Bch). At the end of the experimental period, plasma lipid profiled (total triglycerides, total cholesterol and cholesterol fractions (HDL, LDL and VLDL)) were measured. Enzymatic activities were determined by fluorimetric methods in soluble (sol) and membrane-bound (mb) fractions of testicular tissue using arylamide derivatives as substrates. Results indicated an increase in plasmatic triglycerides, total cholesterol, LDL and VLDL in Bch. A significant increase of mb GluAP and GGT activities was also found in this diet in comparison with the other two diets. Furthermore, significant and positive correlations were established between these activities and plasma triglycerides and/or total cholesterol. These results support a role for testicular GluAP and GGT activities in the effects of saturated fat (Western diet) on testicular functions. In contrast, VOO increased sol DPP IV activity in comparison with the other two diets, which support a role for this activity in the effects of monounsaturated fat (Mediterranean diet) on testicular function. The present results strongly support the influence of fatty acids and cholesterol on testicular GluAP and GGT activities and also provide support that the reported beneficial influence of the Mediterranean diet in male fertility may be mediated in part by an increase of testicular sol DPP IV activity.

ANEXO III

Autores: Ana Belén Segarra, Magdalena Martínez-Cañamero, **Germán Domínguez-Vías**, Marina Hidalgo, Manuel Ramírez-Sánchez, Isabel Prieto.

Título: *Extra-Virgin Olive Oil and Blood Pressure. A New Approach to the Treatment of Cardiovascular Disease.*

Capítulo de libro: In: Natural products and cardiovascular health (1st Edition). Caballero-George, Catherina C (Ed.). Boca Raton: CRC Press. Taylor & Francis Group. 2018. Chapter 7; Pp. 161-172. **ISBN:** 9780429402180.

DOI: <https://doi.org/10.1201/9780429402180>.

Resumen:

At present, cardiovascular disease and hypertension are accepted as major health problems all over the world. The rapid rate of increase in these global problems needs a solution that includes the identification of the most effective prevention strategies that involve both dietary and lifestyle changes as well as drugs. The use of natural products and the diet could be an effective method of management of hypertension, and a lot of effort has been put into finding plants with antihypertensive therapeutic value. The DASH diet (Dietary Approach to Stop Hypertension) has been recommended since the last decade of the 20th century for the non-pharmacological management of hypertension, but other dietary patterns are useful to stop hypertension, such as the Mediterranean Diet. Different studies have demonstrated that when subjects adopt the Mediterranean Diet during at least one year, arterial blood pressure values are reduced. These effects are associated with the intake of virgin olive oil, the main fat source in the Mediterranean Diet. In experimental models, virgin olive oil is able to reduce arterial blood pressure, changing the membrane composition and biophysical properties, improving the endothelial function and enhancing the nitric oxide release. Virgin olive oil also has demonstrated effects on both systemic and local renin angiotensin pathways, the main hormonal system involved in the long-term control of blood pressure. These results point to virgin olive oil and the Mediterranean Diet as an effective dietary strategy in the prevention of hypertension and cardiovascular disease.