



Máster Nutrición y Metabolismo

Curso 2021-2022

***EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON HESPERIDINA EN  
RATAS ALIMENTADAS CON UNA DIETA OBESOGÉNICA.  
ANÁLISIS METABOLÓMICO EN HÍGADO MEDIANTE <sup>1</sup>H RMN***

Maria Benaiges Lluís

Trabajo de final de máster

Dirigido por el Dr. Miguel Ángel Rodríguez Gómez

Junio 2022

# ÍNDICE

RESUMEN .....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	4
2. OBJETIVOS.....	7
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
3.1. FUENTE DE HESPERIDINA .....	7
3.2. ANIMALES, DIETAS Y TRATAMIENTOS.....	7
3.3. PROCEDIMIENTOS DE EXTRACCIÓN DE LOS TEJIDOS PARA LOS ENSAYOS METABOLÓMICOS BASADOS EN <sup>1</sup> H RMN .....	9
3.4. MEDIDA DE <sup>1</sup> H RMN .....	9
3.5. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE METABOLITOS.....	10
3.6. PROCESAMIENTO DE DATOS Y ANÁLISIS MULTIVARIANTE.....	10
4. RESULTADOS .....	11
5. DISCUSIÓN.....	18
6. CONCLUSIONES .....	19
7. BIBLIOGRAFIA.....	21
8. ANEXOS .....	22
Anexo 1.....	22
Anexo 2.....	23
Anexo 3.....	24

## RESUMEN

El síndrome metabólico (SM) no es considerado una sola enfermedad, sino un conjunto de factores de riesgo de la enfermedad cardiovascular, como la resistencia a la insulina, hipertensión, diabetes tipo II, obesidad, etc. La evidencia epidemiológica pone de manifiesto el consumo de frutas y verduras, ya que los polifenoles, como la hesperidina que se encuentra en los cítricos, han surgido como estrategias nutricionales para mejorar la salud de pacientes que padecen de ello.

La dieta obesogénica o de cafetería (CAF) induce este SM. Por lo tanto, la suplementación con hesperidina tendrá beneficios a nivel metabólico en las ratas alimentadas con esta dieta y ejercerá efectos protectores contra el SM. Para ello, se estudia el efecto de diferentes dosis de hesperidina en ratas alimentadas con una dieta CAF midiendo los perfiles metabólicos mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN).

Se utilizaron 60 ratas macho *Sprague-Dawley* las cuales se dividieron aleatoriamente en dos grupos dietéticos (n=30): el grupo alimentado con dieta STD y el grupo con dieta CAF. Cada grupo se dividió en tres grupos de tratamiento: vehículo (VE), hesperidina en dosis bajas (H1) o hesperidina en dosis altas (H2). A la semana 19 se recolectaron varios órganos, en este estudio se utilizó el hígado como tejido a estudiar.

Se hizo una extracción acuosa de los metabolitos con H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN y una extracción lipídica con CHCl<sub>3</sub>:MeOH. Las muestras se sometieron a un análisis metabólico con resonancia magnética nuclear de protón <sup>1</sup>H-RMN.

El análisis multivariante se hizo para comparar grupos de dos en dos (STD\_VE y CAF\_VE, CAF\_VE y CAF\_H1, CAF\_H1 y CAF\_H2).

Se demostró que una dieta CAF indujo al síndrome metabólico. Aunque la suplementación con hesperidina en las ratas que presentaron esta patología no tuvo ningún efecto relevante en cuanto a los metabolitos del hígado de éstas. Sin embargo, una baja dosis de hesperidina tendría un ligero efecto en el hígado de los animales alimentados con la dieta STD.

## 1. INTRODUCCIÓN

El síndrome metabólico (SM) es un estado fisiopatológico complejo que se origina principalmente en un desequilibrio de la ingesta de calorías y del gasto de energía del individuo, aunque también se ve afectado por la genética o epigenética de este. En realidad, el SM no es una sola enfermedad, sino un conjunto de factores de riesgo de la enfermedad cardiovascular, como la resistencia a la insulina, hipertensión, diabetes tipo II, obesidad, etc.<sup>1</sup>

Es por eso que una dieta óptima y el ejercicio regular son dos grandes aliados contra esta enfermedad. La evidencia epidemiológica pone de manifiesto el consumo de frutas y verduras, ya que los polifenoles vegetales han surgido como estrategias nutricionales para mejorar la salud de pacientes que padecen SM.<sup>2</sup>

Los polifenoles son biomoléculas que se encuentran en productos de origen vegetal y se ha demostrado que ejercen efectos antioxidantes y antiinflamatorios, tanto in vivo como in vitro.

Éstos tienen en común un anillo fenólico, pero tienen diferentes estructuras, se han encontrado más de 500 moléculas diferentes en los alimentos. Dependiendo de su estructura química se pueden dividir en dos grupos principales: flavonoides y no flavonoides, con varios subgrupos que se muestran en la figura 1:<sup>2</sup>

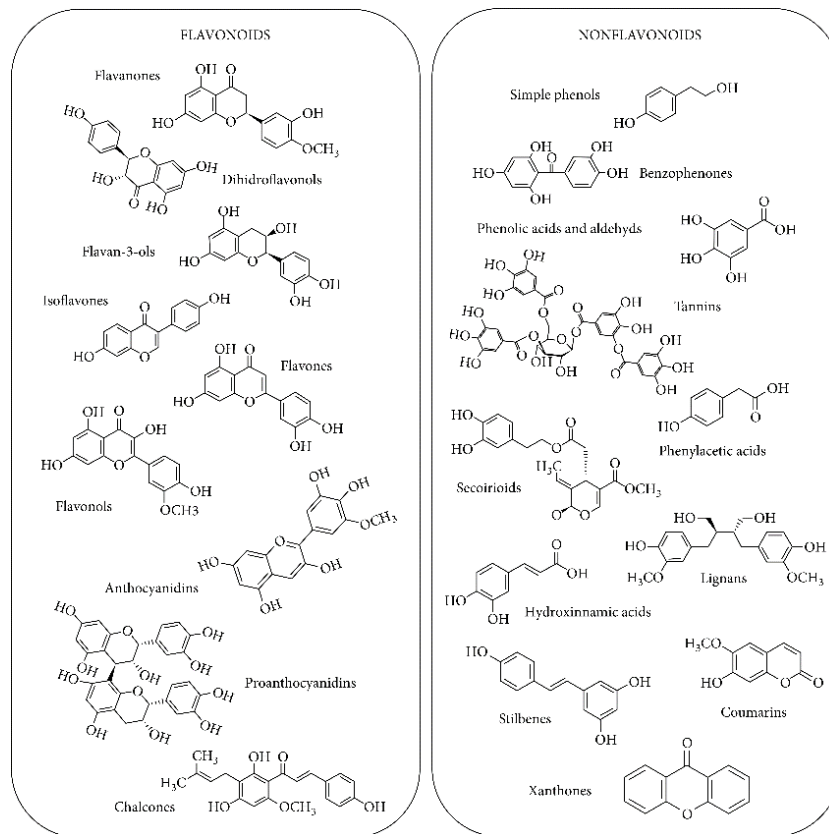


Fig 1. Subgrupos de los polifenoles flavonoides y no flavonoides

La hesperidina se conoce como un glucósido de flavonona que se encuentra en los cítricos como el limón, la naranja dulce (*Citrus Sinensis*) y los pomelos. También se puede aislar en otros géneros de plantas como Fabaceae, Papilionaceae, Betulaceae, etc.

Se han reportado varios efectos biológicos y farmacológicos para la hesperidina. Posee actividades antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas. También se sabe que es efectiva en diferentes tipos de cáncer. También ejerce actividad antihipercolesterolemica, antiheperlipidemica, antihipertensiva, diurética y bloqueadora de los canales de calcio.<sup>3</sup>

En este caso, la metabolómica es una herramienta muy buena porque puede llegar a hacer una evaluación holística de moléculas de bajo peso molecular que se encuentran en los tejidos, llamados metabolitos. Los cuales proporcionan información sobre la acción, inacción o sobre acción de especies moleculares como genes, transcripciones y proteínas en la salud y las enfermedades.

El análisis de datos de metabolitos complejos en combinación con métodos estadísticos univariantes y multivariantes, así como las vías metabólicas que

permite descifrar mecanismos e identificar biomarcadores o acciones de algunos fármacos o componentes nutricionales como sería la hesperidina en el organismo de los individuos.<sup>4</sup>

En cuanto a los tejidos, el hígado es el principal órgano metabólico que realiza una variedad de funciones bioquímicas necesarias para la homeostasis metabólica de todo el cuerpo, ya que es sensible a muchas patologías que conducen a una serie de diferentes signos y síntomas clínicos.<sup>5</sup>

La dieta obesogénica o dieta cafetería (CAF) induce síndrome metabólico, y se ha demostrado que en roedores es un modelo robusto de MS humano.<sup>6</sup>

Por lo tanto, se plantea la hipótesis de que la suplementación con hesperidina tendrá beneficios a nivel metabólico en las ratas alimentadas con la dieta CAF y ejercerá efectos protectores contra la MS. Para ello, estudiamos el efecto de diferentes dosis de hesperidina en ratas alimentadas con una dieta CAF midiendo los perfiles metabólicos mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN).

La RMN es un método analítico importante en el campo de la metabolómica. Aunque es una técnica poco sensible, tiene otras características importantes; como por ejemplo, que es una técnica altamente reproducible y cuantitativa; permite identificar metabolitos desconocidos, lo cual es importante teniendo en cuenta que los avances en las tecnologías analíticas han permitido la detección de un número elevado de señales en mezclas biológicas complejas y muchas de ellas desconocidas; permite el análisis de biofluidos y tejidos sin la necesidad de separación; no es una técnica destructiva, por lo que después del análisis se puede utilizar para un nuevo análisis; tiene la capacidad de detectar metabolitos a través de uno o más tipos de núcleos atómicos como  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$  o  $^{15}\text{N}$ . También se puede hacer la recombinación de métodos como experimentos bidimensionales (2D) para la identificación desconocida de metabolitos.

Por lo tanto, la metabolómica basada en RMN ha permitido la identificación y cuantificación de un grupo amplio y desconocido de metabolitos, muy útil para muestras con una matriz compleja como sería el análisis de metabolitos en el hígado.<sup>4</sup>

## 2. OBJETIVOS

El principal objetivo de este estudio es estudiar el efecto de diferentes dosis de hesperidina en el hígado de ratas alimentadas con una dieta CAF utilizando como método analítico la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$ .

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. FUENTE DE HESPERIDINA

La hesperidina fue proporcionada por NUTRAFUR S.A. (Murcia, España). La cual se extrajo de la cáscara de fruta de *Citrus sinensis* (naranja dulce) y su pureza fue del 93% (HPLC). Existen dos formas isoméricas de la hesperidina: 2S y 2R - hesperidina, ya que tiene un átomo de carbono quiral en la posición 2. En los cítricos no procesados, la hesperidina es casi todo 2S, y en el jugo de naranja la 2S constituye el 92% de la hesperidina, siendo esta la más bioactiva.

Durante el procesamiento industrial, la 2S se transforma en el isómero 2R, por lo tanto, la hesperidina comercial contiene una relación 2S:2R que tiene relación 1,5:1 aproximadamente.

En este estudio, la proporción de hesperidina 2S fue del 66%, según los resultados de RMN.<sup>7</sup>

### 3.2. ANIMALES, DIETAS Y TRATAMIENTOS

Se utilizaron 60 ratas macho *Sprague-Dawley* de ocho semanas de edad (Laboratorios *Charles River*, Barcelona) con un peso medio de  $251 \pm 2,5$  g. Las ratas fueron alojadas individualmente a  $22^\circ\text{C}$  con un período de 12 horas de luz/oscuridad y tuvieron libre acceso a agua y alimento. Después de un período de cuarentena de una semana, las ratas se dividieron aleatoriamente en dos grupos dietéticos (n=30): el grupo STD, alimentado con dieta *chow* estándar

(Teklad global 18% proteína, Envigo) durante 9 semanas; grupo CAF, alimentado con dieta cafetería durante nueve semanas. La dieta CAF estaba compuesta por: *chow* estándar, tocino (8-12 g), galletas con paté (12-15 g), galletas con queso crema (10-12 g), zanahoria (6-9 g), magdalenas (4-5 g) y 100 mL de leche con azúcar (220 g/L). La dieta STD (3,1 Kcal/g) contenía un 24% de calorías de proteínas, un 18% de grasas y un 58 % de carbohidratos, mientras que la distribución calórica de la dieta CAF fue de un 10% proteínas, 41% de grasas, y 49% de carbohidratos.

Cada grupo se dividió en tres grupos de tratamiento: vehículo (VE) (n=10), hesperidina en dosis bajas (H1) (n=10) o hesperidina en dosis altas (H2) (n=10). Por lo tanto, dos grupos en cada régimen dietético se suplementaron todos los días (a las 9:00 h) con hesperidina que se disolvió en leche condensada baja en grasa diluida 1:1 a una dosis de 40 mg / kg (STD-H1 y CAF-H1) o 100 mg / kg (STD-H2 y CAF-H2) durante ocho semanas.

Los tratamientos de hesperidina se administraron por vía oral con una jeringa de 1 ml. Las dosis diarias utilizadas fueron equivalentes al consumo diario de 500 mg y 1350 mg de hesperidina para un humano de 60 kg, respectivamente. La dosis más baja se seleccionó en base a la eficacia de la hesperidina y las ingestas dietéticas alcanzables. Por lo tanto, 500 mg del extracto comercial de hesperidina equivalen a 330 mg de la isoforma más activa de la hesperidina, una cantidad que se puede encontrar en 50 ml de jugo de naranja fresco. Además, 500 mg de cápsulas de hesperidina han demostrado tener efecto beneficioso sobre la función vascular, el estrés oxidativo y la inflamación en pacientes con SM.

La dosis más alta se basó en los efectos beneficiosos de la hesperidina sobre las alteraciones relacionadas con el SM en modelos de roedores obesos inducidos por la dieta CAF.

En la semana 18, se obtuvieron muestras de sangre por punción venosa. Las ratas se colocaron en jaulas metabólicas individuales para recolectar las muestras urinarias de 24 horas. Una semana después, las ratas fueron ayunadas durante 8 horas y anestesiadas con pentobarbital sódico (80 mg/kg de peso corporal), se recogió sangre mediante punción cardíaca (sacrificio). Varios

tejidos (cerebro, corazón, riñón, hígado, músculos del sóleo) fueron rápidamente extraídos y congelados en nitrógeno líquido. Todas las muestras se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el análisis y manipulación de estos.<sup>7</sup>

### 3.3. PROCEDIMIENTOS DE EXTRACCIÓN DE LOS TEJIDOS PARA LOS ENSAYOS METABOLÓMICOS BASADOS EN $^1\text{H}$ RMN

#### *Preparación de muestras:*

Se cogió una pequeña muestra de hígado congelado, de entre unos 30-100 mg aproximadamente, en un eppendorf de 2 mL (trabajar bajo  $\text{N}_2$  líquido).

Las muestras congeladas se pusieron en el liofilizador para la eliminación del agua del tejido y se deja mínimo 16h.

Para la extracción acuosa de los metabolitos, se añadió a la muestra liofilizada anterior 1 ml de una solución de  $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$  en frío (1:1 v/v  $T=0^{\circ}\text{C}$ ) y se agita en el vórtex para su homogeneización y mejor extracción de los metabolitos.

Seguidamente se procedió a centrifugar las muestras (15000 g, 30 min,  $T=4^{\circ}\text{C}$ ), y una vez centrifugadas, la fase sobrenadante, con los metabolitos acuosos, se transfirió a otro eppendorf y se puso en una corriente de  $\text{N}_2$  hasta sequedad. Se recuperó el pellet a  $-80^{\circ}\text{C}$  para la extracción lipídica. Para ésta, se añadió 1 ml de una solución de  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  en frío (2:1  $T=0^{\circ}\text{C}$ ) y se realizó el mismo procedimiento anterior.<sup>8</sup>

### 3.4. MEDIDA DE $^1\text{H}$ RMN

Las muestras se sometieron a un análisis metabólico con resonancia magnética nuclear de protón  $^1\text{H}$ -RMN.

Para la medida del extracto acuoso, se reconstituyó con 600  $\mu\text{l}$  de una solución tampón de fosfato 0,05 mM que contenía 0,75 mM de TSP y azida de sodio en agua deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ).

Para la medida del extracto lipídico se disolvió éste en 700  $\mu\text{l}$  de una mezcla de cloroformo:metanol:agua deuterados en una proporción 16:8:1 con TMS como

referencia.<sup>8</sup> Los espectros de RMN se midieron con una frecuencia de 600,20 MHz utilizando un espectrómetro Avance III-600 Bruker equipado con una sonda PABBO BB- de 5mm. Se utilizó una secuencia de pulso de NOESY unidimensional estándar (1D) (RD-90°-t1-90°-tm-90°-acquire, noesypr1d) con supresión de agua. Se utilizó un tiempo de reciclado (Recycle Delay (RD)) de 5,0 s, un tiempo de mezcla (tm) de 100 ms, un tiempo de adquisición (AQ) de 3,4 s, y un pulso calibrado de 90° de 10 µs. Se utilizaron cuatro escaneos para establecer el equilibrio del spin, y luego se recopilaron 128 escaneos en 64K de puntos de datos con una anchura espectral de 16 ppm.

### 3.5. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE METABOLITOS

Los espectros de RMN se procesaron utilizando el software TopSpin (versión 3.5 pl 7, Bruker). Se escalaron manualmente, se corrigió la línea base y se referenció a 0,0 ppm con el ácido trisilipropiónico deuterado (TSP) para la extracción acuosa o tetrametilsilano (TMS) para la lipídica. Para minimizar los efectos de distorsión causados por la supresión del agua se eliminó la región del agua entre  $\delta=4,7$  y  $5,17$ .

La identificación de metabolitos se llevó a cabo usando información de la literatura y las bases de datos de *Chenomx NMR Suite 7.7*, *Human Metabolite DataBase*, *Biological Magnetic Resonance Data Bank*. Se adquirieron experimentos bidimensionales (2D) de RMN de correlación protón-protón ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ; COSY, TOCSY) y protón-carbono ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ; HSQC) para ayudar a confirmar la identificación de metabolitos.

Después de la corrección de la línea base y la identificación de metabolitos, se seleccionaron los picos más aislados y se procedió a su cuantificación utilizando el software AMIX 3.8 (Bruker, GmBH)

### 3.6. PROCESAMIENTO DE DATOS Y ANÁLISIS MULTIVARIANTE

El análisis multivariante se realizó en la página web de MetaboAnalyst 5.0.<sup>9</sup> Se procedió a comparar grupos de dos en dos (STD\_VE y CAF\_VE, CAF\_VE y

CAF\_H1, CAF\_H1 y CAF\_H2), se normalizaron los datos haciendo un  $\log_{10}$  *transformation* y *autoscaling*.

Se hizo un t-Test para ver si había diferencias significativas, con un *P value* = 0,05. Luego se hizo el Análisis de Componentes Principales (PCA) para simplificar la complejidad de las muestras, ver las diferencias entre los grupos e identificar metabolitos discriminatorios. También se miraron los *VIP-Plots* para ver la diferencia de los principales metabolitos en los diferentes grupos.

#### 4. RESULTADOS

Guirro et al. 2020 habían hecho la medición de parámetros corporales como la presión arterial, la composición corporal e índice de adiposidad y análisis bioquímicos. Se vio que después de nueve semanas de dieta, los animales que habían sido alimentados con una dieta CAF habían desarrollado síndrome metabólico; caracterizado por un aumento de peso corporal por la masa grasa, hipertriglicemia, hiperglucemia y presión arterial elevada.

Haciendo un t-Test se ve claramente que hay diferencias significativas entre CAF VE y STD VE, en cambio con CAF VE y CAF H1, y CAF H1 y CAF H2 no se observó ninguna diferencia significativa. Es decir, sí hay diferencias entre dietas, pero no con el tratamiento. Lo mismo pasó con los del perfil lipídico.

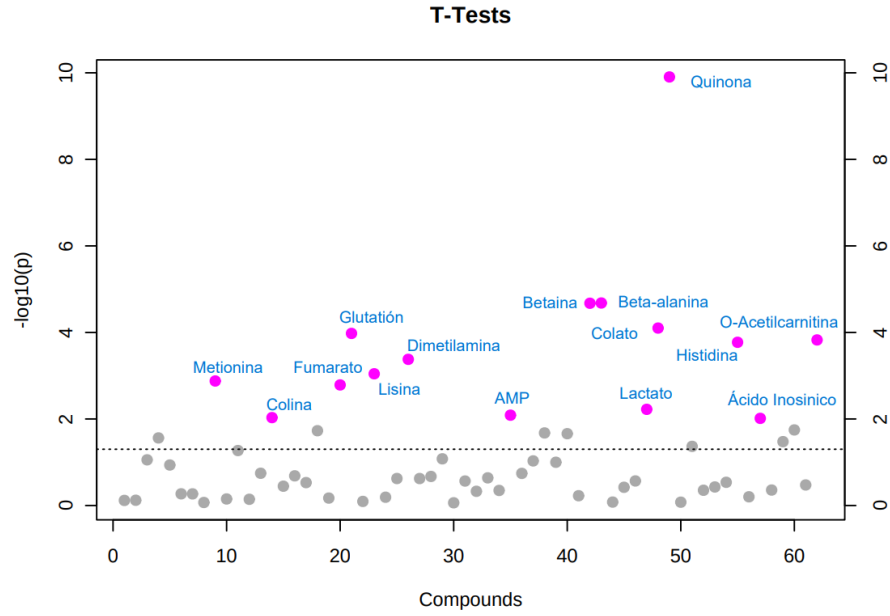


Fig 2. T-Test del perfil metab3lico acuoso entre CAF VE y STD VE.

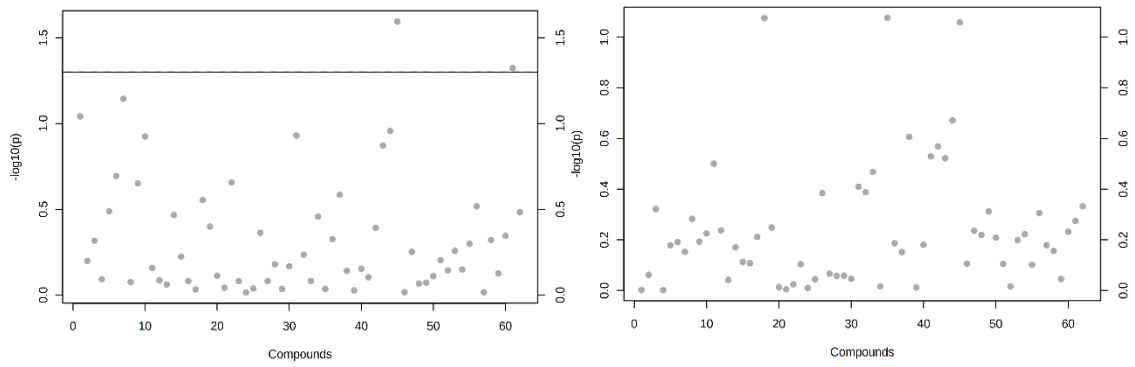


Fig 3. T-Test del perfil metab3lico acuoso entre CAF VE y CAF H1, y entre CAF H1 y CAF H2.

Con el PCA se vio claramente los grupos CAF y STD diferenciados:

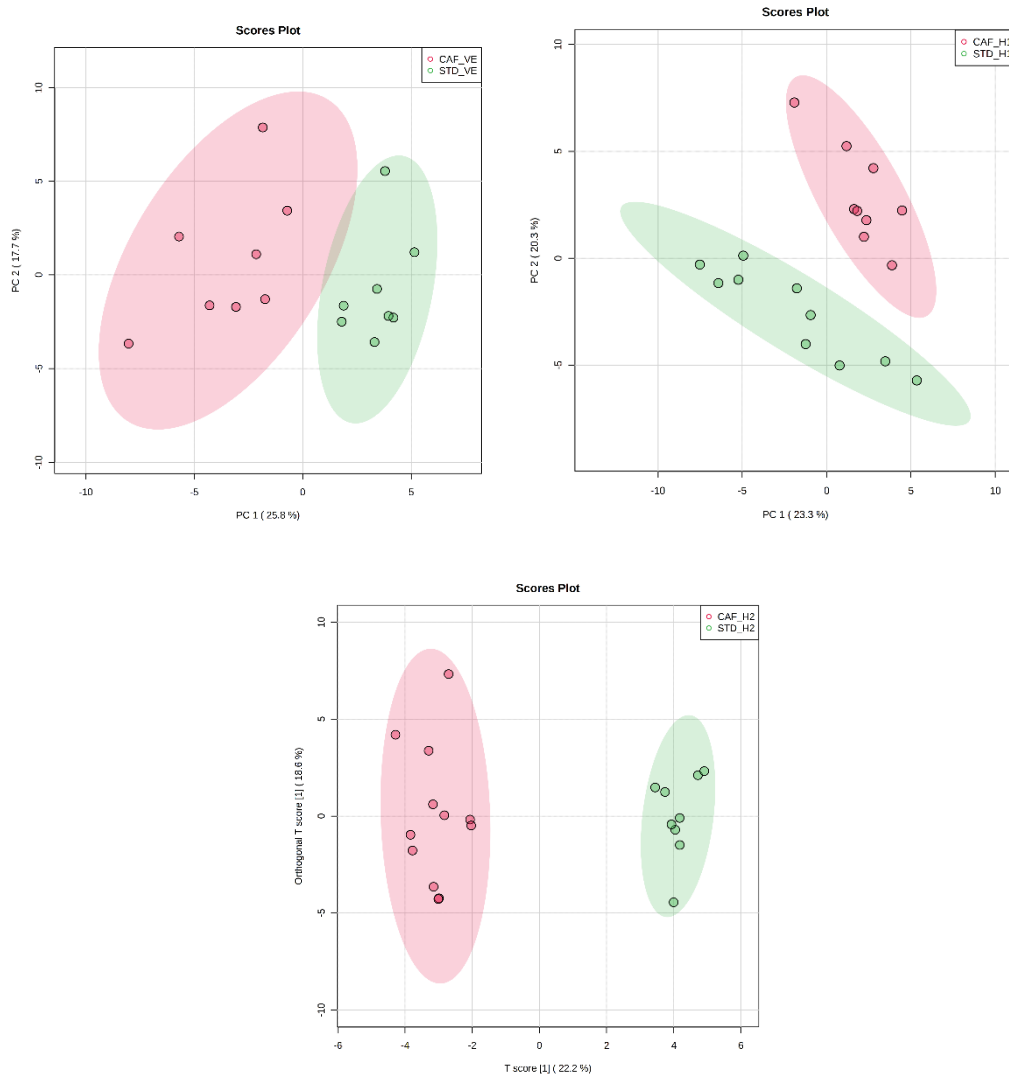


Fig 4. PCA de los grupos del perfil metabólico acuoso entre CAF VE y STD VE, CAF H1 y STD H1, CAF H2 y STD H2.

Con los metabolitos lipídicos pasa lo mismo, en el caso que comparemos los grupos de diferente dieta se ven claramente diferenciados en dos grupos:

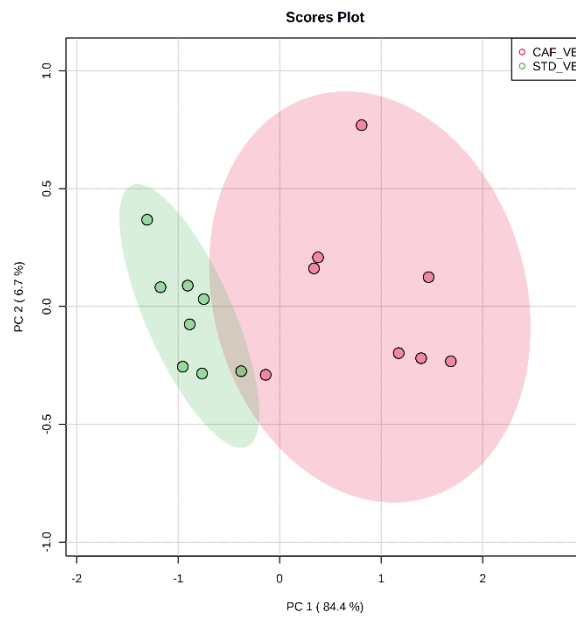


Fig 5. PCA del perfil metabólico lipídico entre dieta STD VE y CAF VE.

Pero en el caso de la comparación dentro de la misma dieta y tratamiento con hesperidina, los grupos no se ven diferenciados, ni en el perfil metabólico acuoso ni en el lipídico.

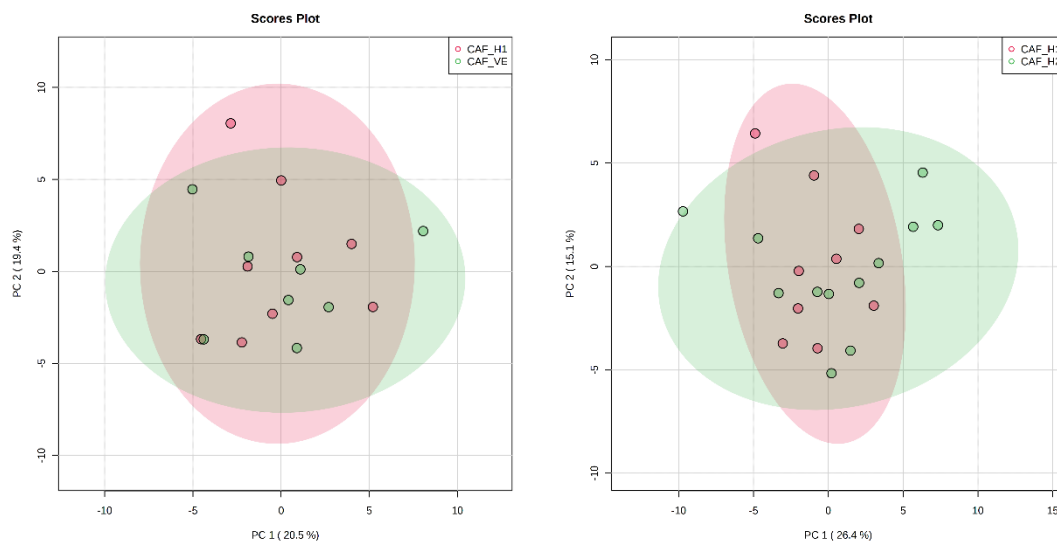


Fig 6. PCA de CAF VE y CAF H1, CAF H1 y CAF H2 del perfil metabólico acuoso.

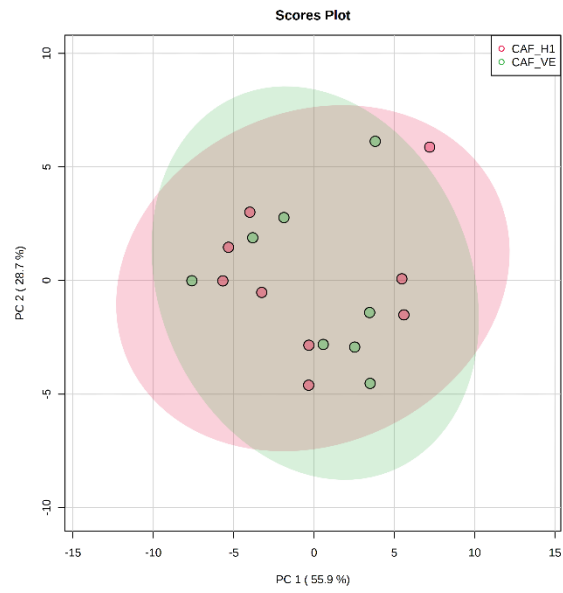


Fig 7. PCA de CAF VE y CAF H1 del perfil metabólico lipídico.

Al ver los metabolitos de mayor importancia, llamados *VIP Plots*, se vieron algunos cambios en la importancia de algunos de los metabolitos según la dieta y tratamiento.

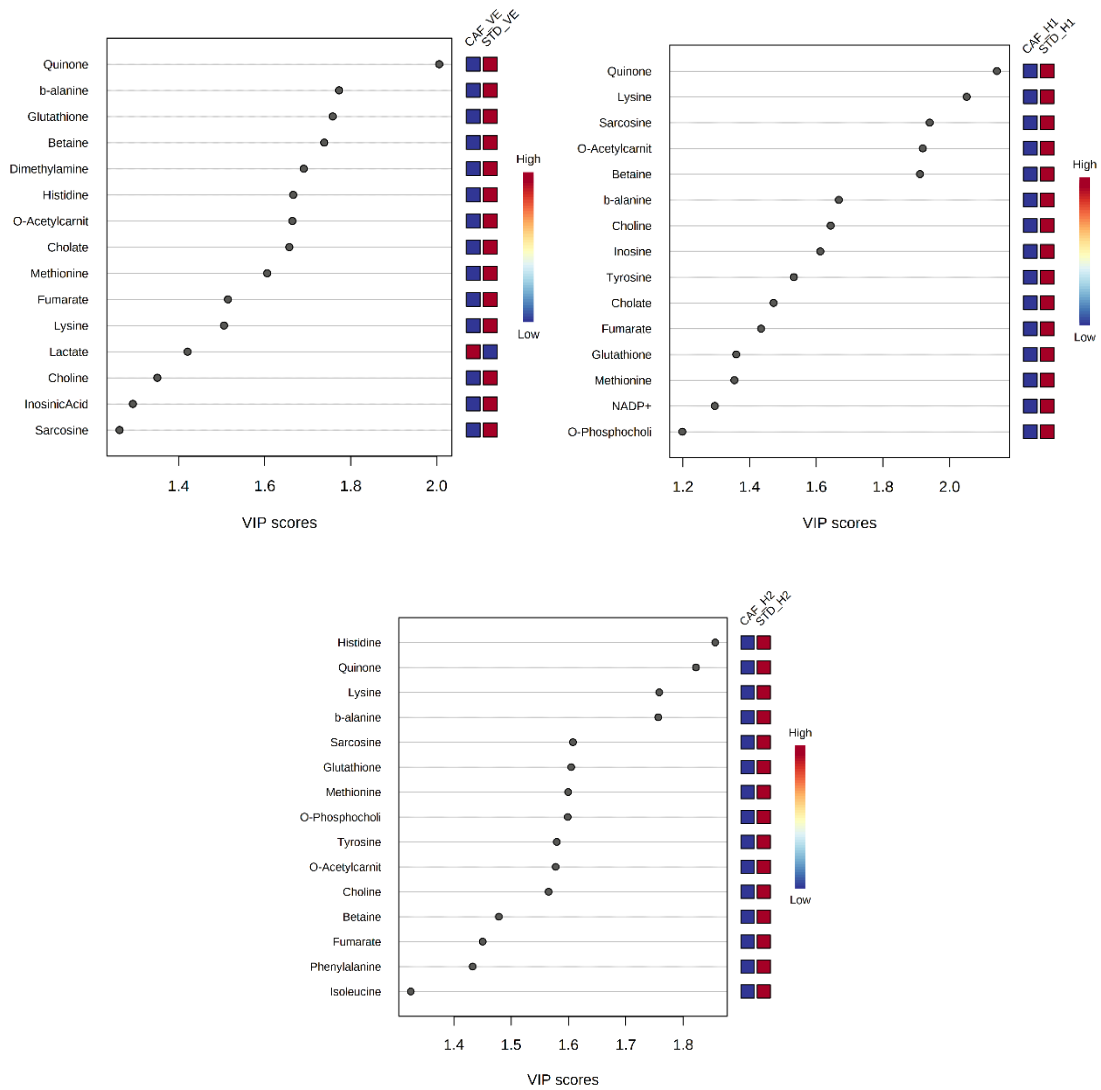


Fig 8. VIP Plots de los metabolitos acuosos de los grupos STD VE y CAF VE, CAF H1 y STD H1, CAF H2 y STD H2.

En el caso de la quinona, en las tres comparaciones tiene un grado de importancia bastante elevando en comparación con otros metabolitos, aunque es inusual encontrar la quinona como metabolito principal en el hígado.

El metabolito que si vemos que varía su importancia es el glutatión, un importante antioxidante, ya que sin tratamiento su importancia es mayor que cuando se les administra la dosis de hesperidina.

Aunque cuando se comparan los 6 grupos, al final es irrelevante, no tiene tanta importancia como se esperaba en los animales de dieta CAF, ya que la concentración de este metabolito solo varía entre las dietas STD.

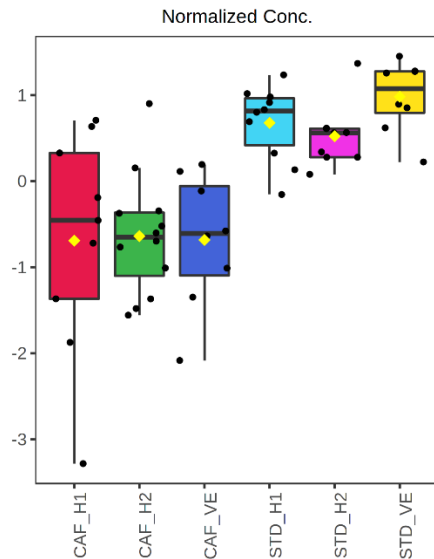


Fig 9. Concentración de glutatión en los diferentes tipos de dieta y tratamientos.

En cuanto a los VIP Plots del perfil lipídico, no se observaron cambios muy notables. Por lo tanto, puede que en el caso del perfil lipídico del hígado la hesperidina tenga poco efecto sobre este.

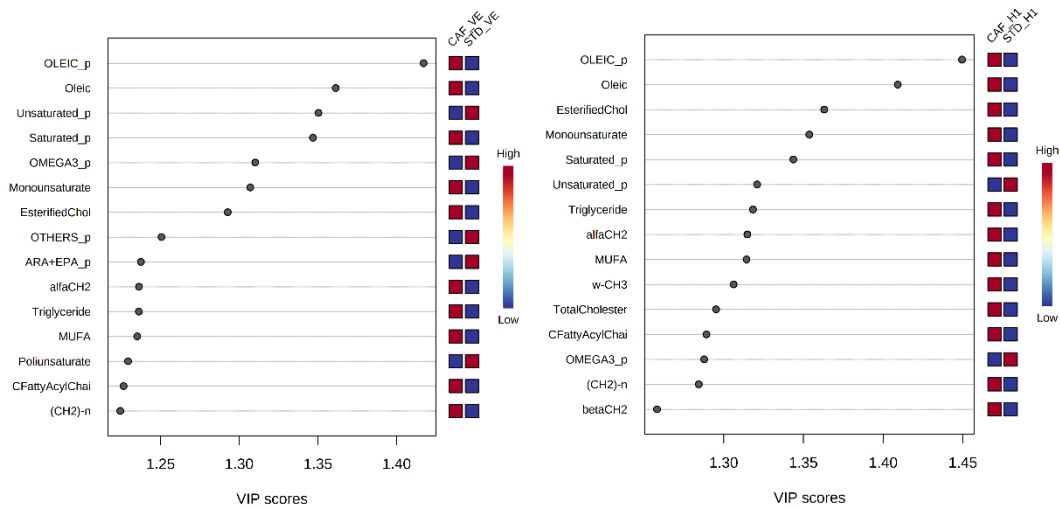


Fig 10. VIP Plots del perfil metabólico lipídico de los grupos CAF VE y STD VE, CAF H1 y STD H1.

## 5. DISCUSIÓN

El SM es muy frecuente en la sociedad occidental. No obstante, los casos están aumentando rápidamente en los países de desarrollo debido a la globalización y la propagación de la dieta occidental. De forma que se ha convertido en un importante problema de salud mundial.<sup>1</sup>

Con los datos de los resultados obtenidos, se ha visto claramente que los animales alimentados con una dieta cafetería indujeron síndrome metabólico, y por lo tanto la diferencia entre el grupo que tenía una dieta STD y el grupo alimentado con dieta CAF era clara y evidente, ya que las ratas con la dieta cafetería habían aumentado su peso corporal por la masa grasa además de presentar hipertriglicemia, hiperglucemia y una presión arterial elevada.<sup>7</sup>

Al comparar los grupos que tuvieron la misma dieta, pero con tratamiento de hesperidina diferentes, no se vieron diferenciados con el PCA, ni con una dosis menor ni con la mayor. Aunque al mirar los VIP *Plots* se vieron algunos cambios en la importancia de algunos de los metabolitos.

La quinona tiene un grado de importancia bastante elevado en las tres comparaciones, aunque no es muy común encontrarlo como metabolito en el organismo ya que es un componente de moléculas biológicamente relevantes como por ejemplo de la vitamina K.<sup>10</sup> Por lo tanto, seguramente sea un compuesto que proviene de la dieta *chow* y que no se ha metabolizado en el organismo, ya que en los animales de dieta estándar la importancia de la quinona se ve bastante elevado.

En el caso del glutatión, que es un excelente antioxidante, especialmente en el hígado que se une a productos tóxicos para su desintoxicación.<sup>11</sup> En el grupo de animales que se les administró la hesperidina, en los VIP *Plots* se observa que de los animales vehículo a los tratados con hesperidina la importancia del glutatión disminuye considerablemente. Uno de los beneficios de la hesperidina es su poder antioxidante en el organismo también, esto explicaría la disminución de la importancia del glutatión en el hígado. Por ello, se podría decir que la hesperidina en una dosis de 40 mg/kg tendría un ligero efecto en el metabolismo del hígado de los animales.

Aunque al final este dato sería irrelevante, ya que cuando comparamos los 6 grupos, se vio que el cambio de concentración del glutatión en el hígado era entre los animales del grupo STD VE, STD H1 y STD H2. No hubo diferencias significativas en los animales que tomaban la dieta CAF, que sería lo interesante, ya que son los que presentan síndrome metabólico.

En cuanto al perfil lipídico, también se vieron las diferencias entre dietas CAF y STD, pero no entre tratamientos. Ningún metabolito lipídico destacó en ningún momento ni en ninguno de los tratamientos y comparaciones, es por ello por lo que se podría decir que la hesperidina no afectó significativamente al perfil lipídico a nivel de hígado.

Aunque en el estudio metabólico que hicieron de orina y sangre <sup>7</sup>, si se vio que la hesperidina produjo una disminución significativa en los niveles circulantes de TC, LDL-C y FFA en rata alimentadas en dieta CAF.

## 6. CONCLUSIONES

Se demostró que una dieta CAF, alta en calorías y con un alto contenido de carbohidratos y grasa con un bajo porcentaje de proteína, indujo al síndrome metabólico.

La suplementación con hesperidina en las ratas que presentaron síndrome metabólico no tuvo ningún efecto relevante en cuanto a los metabolitos del hígado de éstas, ni en bajas dosis ni en altas dosis.

Sin embargo, el metabolito de mayor interés fue el glutatión en las ratas que llevaban una dieta STD. Así pues, una dosis de 40 mg/Kg de hesperidina tendría un ligero efecto en el hígado de los animales con este tipo de dieta.

Este estudio no proporciona ninguna información robusta para afirmar que la hesperidina atenúa los síntomas del síndrome metabólico en el hígado.

Se necesitaría más investigación para estudiar con más profundidad estos efectos en el hígado, ya que podría ser que el número de muestra no fuera

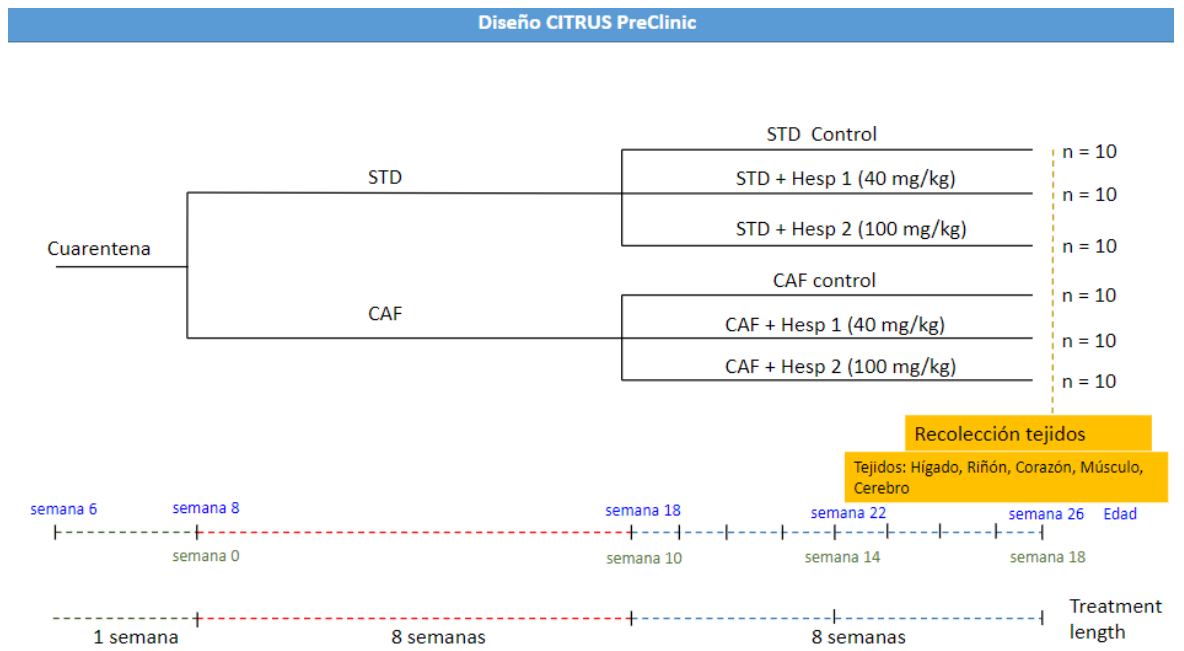
suficiente o que el síndrome metabólico inducido no fue suficiente para ver el efecto de la hesperidina en los metabolitos del tejido estudiado.

## 7. BIBLIOGRAFIA

1. Saklayen MG. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Curr Hypertens Rep.* 2018;20(2):12. doi:10.1007/s11906-018-0812-z
2. Chiva-Blanch G, Badimon L. Effects of Polyphenol Intake on Metabolic Syndrome: Current Evidences from Human Trials. Morishita R, ed. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2017;2017:5812401. doi:10.1155/2017/5812401
3. Hajjalyani M, Hosein Farzaei M, Echeverría J, Nabavi SM, Uriarte E, Sobarzo-Sánchez E. Hesperidin as a Neuroprotective Agent: A Review of Animal and Clinical Evidence. *Molecules.* 2019;24(3). doi:10.3390/molecules24030648
4. Nagana Gowda GA, Raftery D. NMR-Based Metabolomics. *Adv Exp Med Biol.* 2021;1280:19-37. doi:10.1007/978-3-030-51652-9\_2
5. Vinaixa M, Ángel Rodríguez M, Rull A, et al. Metabolomic Assessment of the Effect of Dietary Cholesterol in the Progressive Development of Fatty Liver Disease. *Journal of Proteome Research.* 2010;9(5):2527-2538. doi:10.1021/pr901203w
6. Sampey BP, Vanhoose AM, Winfield HM, et al. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. *Obesity (Silver Spring).* 2011;19(6):1109-1117. doi:10.1038/oby.2011.18
7. Guirro M, Gual-Grau A, Gibert-Ramos A, et al. Metabolomics Elucidates Dose-Dependent Molecular Beneficial Effects of Hesperidin Supplementation in Rats Fed an Obesogenic Diet. *Antioxidants (Basel).* 2020;9(1):79. doi:10.3390/antiox9010079
8. Palacios-Jordan H, Martín-González MZ, Suárez M, et al. The Disruption of Liver Metabolic Circadian Rhythms by a Cafeteria Diet Is Sex-Dependent in Fischer 344 Rats. *Nutrients.* 2020;12(4). doi:10.3390/nu12041085
9. MetaboAnalyst. *Metaboanalyst.ca.*
10. Human Metabolome Database: Showing metabocard for Quinone (HMDB0003364). *Hmdb.ca.*
11. Human Metabolome Database: Showing metabocard for Glutathione (HMDB0000125). *Hmdb.ca.*

## 8. ANEXOS

### Anexo 1: Diseño del estudio CITRUS PreClinic



Anexo 2: Regiones de los espectros RMN de los metabolitos del perfil lipídico del hígado.

<b>left (ppm)</b>		1,02	1,05	sum	5,31	5,17	3,23	3,17	3,62	4,06
<b>right (ppm)</b>		1,01	1,03		5,26	5,12	3,19	3,13	3,60	4,02
<b>Protons</b>		3	3	3	1,00	1,00	9,00	2,00	2,00	2,00
<b>Metabolite</b>		Free Cholesterol	Esterified Cholesterol	Total Cholesterol	Triglyceride	Diglycerides	PC	PE	PI	LPC

4,01	5,75	5,94		0,91	1,39	2,37	1,68	1,00
3,97	5,67	5,91		0,86	1,22	2,33	1,56	0,96
2,00	1,00	1,00	1,00	3,00	2,00	2,00	2,00	3,00
<b>Total PL</b>	<b>Sphingomyelin</b>	<b>Plasmalogen</b>	<b>C Fatty Acyl Chain</b>	<b>w-CH3</b>	<b>(CH2)-n</b>	<b>alfa CH2</b>	<b>beta CH2</b>	<b>omega-3</b>

2,05	1,73	2,16	2,44	2,80	2,90	
1,98	1,68	2,11	2,40	2,75	2,80	
2,00	2,00	2,00	4,00	4,00	2,00	1,00
<b>Oleic</b>	<b>ARA+EPA</b>	<b>ARA+EPA</b>	<b>DHA</b>	<b>LINOLEIC</b>	<b>PUFA</b>	<b>MUFA</b>

PC= PhosphatidylCholines

PE= PhosphoEthanolAmine

PI = Phospho Inositol

LPC= Lyso PhosphatidylCholines

PL= Phospholipids

### Anexo 3: Concentraciones medias y regiones de los espectros RMN de los metabolitos del perfil acuoso del hígado.

metabolite	TSP: S	Pyruvate R04 3H	Leucine R17 6H	Valine R18 3H	Alanine R19 3H	Isoleucine R20 3H	3-hydroxybutyricacid	Lactate R06 1H
ppm left	0,05	2,40	0,98	1,06	1,50	1,02	1,21	4,13
ppm right	-0,05	2,39	0,95	1,03	1,46	1,00	1,19	4,09
# <sup>1</sup> H	9	mean mg liver	3	6	3	3	3	1
mean concentration umol/g liver	0,527	21,666	0,050	1,205	1,317	9,450	0,925	26,866

Glutamine R22 2H	Glutamate R23 2H	Methionine R24 2H	Creatinine R32 3H	Phenylalanine R25 5H	Free glycerol R08 1H	Threonine R26 1H	Choline R14 9H	Glucose-6-P(a) R01 1
2,48	2,37	2,66	3,06	7,45	3,63	4,26	3,21	5,25
2,43	2,33	2,64	3,05	7,31	3,62	4,24	3,20	5,22
2	2	2	3	5	1	1	9	1
8,828	3,356	0,401	0,188	0,487	15,107	1,729	0,212	59,925

Glucose-6-P(b) R01 0	Glycogen R02 1H	tyrosine: D NQ	Tyrosine R27 2H	Uridine 1H	Inosine R10 1H N-CH-	Fumarate R07 1H	Histidine + Histamine	UDPG R03 1H
4,67	5,44	7,21	6,92	7,89	8,36	6,53	7,10	7,98
4,66	5,38	7,18	6,89	7,86	8,34	6,51	7,08	7,95
0,5	1	2	2	1	1	1	1	1
11,252	116,814	0,337	0,264	0,993	4,716	0,275	1,058	1,739

Glutathione oxidized	Creatine R31 3H	Uridine 1H -O-CH-N, 1	Inosine NR 1H H1	NAD+ 1H CH=N+	ERETIC Reference	Lysine + Leucine beta	Succinate 2xCH2	Aspartate half beta-
2,60	3,05	5,93	6,11	9,36	11,05	1,76	2,41	2,84
2,52	3,03	5,88	6,09	9,32	10,95	1,69	2,40	2,80
4	3	1	1	1	1	2	4	1
4,837	0,962	1,828	4,705	1,619	29,736	1,857	4,043	1,770

Dimethylamine	Asparagine halfCH2/2	sn-glycerophosphochol	myo-inositol 1H H3 cr	Glycine 2H	Ethanolamine -CH2-NH-	Serine half-CH2	GTP 1H	Adenosine 1H
2,73	2,89	3,23	4,07	3,56	3,16	4,00	5,95	6,09
2,71	2,86	3,22	4,06	3,56	3,13	3,99	5,93	6,07
6	1	9	1	2	2	1	1	1
0,026	0,139	4,363	1,510	5,240	0,857	10,417	0,542	1,548

Niacinamide 1H CH=CH	GTP N=CH-N	Carnosine N=CH-N ?	Guanosine N=CH-N	Niacinamide CH=N	Niacinamide CH=N	NAD+ CH=N+	NADP+ 1H CH=N+	NADP+ 1H CH=N+
7,62	8,12	8,11	8,01	8,73	8,95	9,17	9,32	9,13
7,58	8,12	8,10	7,99	8,70	8,93	9,14	9,28	9,10
1	1	1	1	1	1	1	1	1
0,378	0,136	0,102	0,384	0,331	0,289	1,502	0,982	0,935

AMP 1H N-CH=N	ADP 1H N-CH=N	ATP 1H N-CH=N	Formate 1H	NAD+ 1H N-CH=N	NADP+ 1H N-CH=N	Inosine 1H N-CH=N	NADP+ 1H N-CH=N	UDP-Glucuronate 1H
8,62	8,53	8,52	8,47	8,44	8,43	8,25	8,16	7,95
8,59	8,52	8,51	8,45	8,43	8,41	8,23	8,14	7,92
1	1	1	1	1	1	1	1	1
1,045	0,067	0,162	0,083	1,601	0,866	2,185	0,707	0,203

Coenzyme A	UDPGs	UDP-Glucose 1H	UDP-NAcGlu	Betaine 2H N+-CH2-CC	b-alanine 2H CH2-NH2	Ornithine 3/2H dCH2-I	Glutathione R30 2H Cl	N-Acetylprotein 3H Cl
6,19	6,01	5,63	5,53	3,27	3,19	3,08	3,00	2,09
6,17	5,96	5,59	5,49	3,26	3,17	3,06	2,91	2,06
1	1	1	1	2	2	1,5	2	3
0,463	4,262	0,734	0,461	25,212	0,411	0,216	5,915	6,765

Acetate 3H CH3-COO	Lactate 3H CH3	Cholate 3H	Quinone 4H	Carnitine 9H	1-Methyluric acid	sn-Glycero-3-phospho	Dehydroascorbic acid,	Glucose
1,93	1,35	0,75	6,81	3,24	3,30	4,34	4,62	4,66
1,91	1,31	0,73	6,79	3,23	3,29	4,32	4,60	4,63
3	3	3	4	9	1	2	2	1
0,799	37,790	0,351	0,082	5,185	17,494	1,727	0,499	36,158

Histidine 1H	Coenzyme A	Inosinic Acid	ADP	O-Phosphocholine 2H	Sarcosine 3H	Trimethylamine 3H	O-Acetylcarnitine 9H
7,87	8,55	8,56	8,58	4,19	2,75	2,90	3,20
7,85	8,53	8,55	8,57	4,15	2,73	2,89	3,19
1	1	1	1	2	3	3	9
1,245	0,519	0,344	0,169	3,798	0,097	0,0214	0,2620