

P9-Efectos comparativos de la administración de *Bacillus coagulans* probiótico o postbiótico en la prevención de la obesidad y resistencia a la insulina inducido por la dieta. Implicación de las vesículas extracelulares como componentes efectores

La obesidad es una enfermedad compleja asociada a diversos factores cuya elevada prevalencia la convierte en un grave problema de salud pública. Esta enfermedad provoca un estado inflamatorio crónico de bajo grado, la cual promueve la disfunción del tejido adiposo y el desarrollo de resistencia a la insulina/diabetes tipo 2. En los últimos años se ha prestado especial interés a la disbiosis de la microbiota intestinal como factor etiológico clave en la obesidad. En este contexto, y considerando la baja adherencia al abordaje no-farmacológico convencional de la obesidad (dieta hipocalórica y actividad física), se ha propuesto abordar esta enfermedad metabólica actuando directamente sobre la microbiota intestinal mediante la administración de bacterias probióticas. El *Bacillus coagulans* (*B. coagulans*) ha mostrado eficacia para el manejo de algunas alteraciones metabólicas en estudios preclínicos y ensayos clínicos. Dado que la administración de bacterias vivas puede conllevar riesgos la comunidad científica se ha centrado recientemente en los postbióticos; células microbianas no-viables obtenidas por la inactivación de bacterias probióticas o extractos celulares crudos. Asimismo, algunos componentes de los probióticos pueden ser responsables de los beneficios derivados de su consumo. Entre estos destacan las vesículas extracelulares (VEs) bacterianas ya que pueden penetrar en el torrente sanguíneo y llegar a los tejidos del hospedador.

Objetivo general

Determinar si el *B. coagulans*, administrado como bacteria no-viable tras un tratamiento térmico, mantiene su eficacia en la prevención de la obesidad y la resistencia a la insulina inducida por la dieta y si las VEs derivadas de esta bacteria son, al menos parcialmente, responsables de dicho efecto.

Metodología

Este proyecto se basa en un estudio preclínico en un modelo animal de obesidad y resistencia a la insulina inducidos por dieta. Para abordar el posible dimorfismo sexual, se realizarán dos experimentos diferentes con un diseño idéntico. Se usarán ratas Wistar de 8 semanas de edad que se distribuirán en cinco grupos experimentales por sexo: grupo control sano alimentado con dieta comercial estándar y el resto de los grupos con una dieta comercial rica en grasa saturada y fructosa (40% y 10% de la energía, respectivamente) con el fin de desarrollar un modelo dietético de obesidad, resistencia a la insulina y esteatosis hepática. Un grupo de estas ratas recibirá solo la dieta (grupo control obeso), un grupo recibirá *B. coagulans* viable (1×10^9 UFC/día), otro *B. coagulans* inactivado por calor (1×10^9 UFC/día) y el otro VEs de *B. coagulans* (cantidad equivalente de VEs producidas por una dosis de 1×10^9 UFC/día de *B. coagulans*). Los tratamientos se administrarán diariamente por vía oral (con pipeta) utilizando agua enriquecida con sacarosa (5%) como vehículo. Los animales de los grupos no tratados solo recibirán el vehículo. Se mantendrán estas condiciones experimentales durante 8 semanas, tras las cuales los animales serán sacrificados y se obtendrán muestras de diferentes depósitos adiposos (blanco y marrón), músculo esquelético, sangre, mucosa intestinal y heces (análisis de la microbiota y metabolitos bacterianos).

El diseño experimental propuesto implica trabajo diario con animales (cuidado de animales de experimentación y realización de procedimientos de lunes a domingo) en el estabulario de la Facultad de Farmacia de la UPV/EHU.

Valoraciones a realizar

Durante las 8 semanas de periodo experimental se controlará diariamente el peso corporal de los animales y la ingesta de alimento de estos (para controlar el correcto desarrollo del estudio y/o valorar la necesidad de un grupo *pair fed*).

Durante el sacrificio de los animales se registrarán los pesos finales de diferentes órganos y tejidos (principalmente hígado y diferentes depósitos de tejido adiposo blanco y marrón) para determinar la eficacia de los tratamientos a estudio tanto en ratas macho como en hembras.

Determinaciones séricas

Se estudiarán los niveles séricos de TG, colesterol total, -HDL y -LDL, ácidos grasos libres, glucosa, insulina (cálculo del índice HOMA-IR) y adipokinas relacionadas con el control glucémico y la inflamación (leptina, adiponectina, TNF- α , CRP, FGF-21, visfatina, apelina, resistina, IL-1 β , IL-6, IL-10) (ELISA).

*Todas las determinaciones séricas se realizarán mediante **espectrofotometría y/o fluorimetría**.*

Determinaciones en tejido adiposo blanco

Se estudiará, mediante tinción H&E y posterior análisis microscópico el número y tamaño de adipocitos de diferentes depósitos.

Se analizará la lipogénesis *de novo* mediante el estudio de la actividad enzimática, la expresión proteica y/o activación de glucosa-6P dehidrogenasa, enzima málica, ACC y FAS, y expresión de SREBP1 (Western Blot), mientras que el ensamblaje de TG se estudiará mediante el análisis de la expresión proteica de DGAT (Western Blot).

Se estudiará la captación de ácidos grasos y glucosa (expresión proteica de CD36, FATP1 y GLUT-4 por Western Blot), así como la captación de ácidos grasos de los TG de las lipoproteínas (actividad enzimática de LPL y expresión génica de PPAR γ por RT-PCR).

Para el estudio de la lipólisis, se determinará la tasa lipolítica *ex vivo*, y se medirá la expresión proteica y/o grado de activación de HSL, ATGL, perilipina y CGI-58 (Western Blot).

De cara al análisis de la disfunción del tejido adiposo blanco se medirán diferentes marcadores de estrés del retículo endoplasmático, así como citokinas pro- y anti-inflamatorias. Asimismo, se analizarán marcadores de inflamación/hipertrofia, adipokinas, cascada de señalización de la insulina, autofagia y fibrosis (principalmente por Western Blot).

Finalmente, y de cara a estudiar la posible marronización del tejido adiposo blanco, se utilizará la tinción de UCP1 para su posterior estudio inmunohistoquímico, y se medirá su expresión proteica (Western Blot).

*Una parte significativa de las determinaciones previstas a realizar en esta parte del proyecto se basan en la utilización de técnicas como la **RT-PCR y el Western Blot**.*

Determinaciones en tejido adiposo marrón

Se analizará mediante espectrofotometría el contenido de TG de este tejido, y se analizará la expresión proteica de UCP1, así como la expresión y/o grado de activación de diversos marcadores mitocondriales (Western Blot).

Se analizará la expresión proteica y/o grado de activación de factores de transcripción y cofactores involucrados en la adipogénesis, lipólisis, la captación de ácidos grasos, la mitocondriogénesis, la oxidación de ácidos grasos, la captación de glucosa y la síntesis de UCP1 en este tejido (Western Blot).

También se estudiará la expresión proteica de DIO2, de receptores de tiroxina y de diferentes batokinas en este tejido (Western Blot).

*La mayoría de las determinaciones previstas a realizar en esta parte del proyecto se basan en la utilización de técnica **Western Blot**.*

Determinaciones en músculo esquelético (músculo gastrocnemio)

Se estudiará el contenido lipídico de este tejido mediante gravimetría y determinación de TG por espectrofotometría.

Se medirá la expresión proteica y/o grado de activación de proteínas clave de la cascada de señalización de la insulina y captación de glucosa (Western Blot).

Para la determinación de la actividad de enzimas involucradas en el metabolismo del glucógeno, se estudiarán la G6PC y GK en este tejido (espectrofotometría).

*La mayoría de las determinaciones previstas a realizar en esta parte del proyecto se basan en la utilización de técnicas de **espectrofotometría y Western Blot**.*

Consideraciones

Dadas las características del proyecto de investigación (parte preclínica que implica el uso de animales de experimentación), resulta de gran importancia que la persona que se vaya a incorporar al mismo tenga experiencia previa en el manejo de animales de laboratorio (idealmente que haya cursado o este cursando formación para el manejo de animales de experimentación).

En cuanto al trabajo de laboratorio, debido a la importancia de la caracterización de diferentes rutas metabólicas tanto en tejido adiposo blanco y marrón, como en músculo esquelético, es imprescindible que la persona que se incorpore al presente proyecto tenga experiencia (demostrable) en el manejo de técnicas de biología molecular como la RT-PCR y el Western Blot.