

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

**ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN NUTRICIÓN**



**“EXPRESIÓN DE MARCADORES INFLAMATORIOS EN RATAS
HOLTZMAN OBESAS SUPLEMENTADAS CON HARINA DE
CUSHURO (*Nostoc sphaericum*)”**

Presentada por:

JESARELLA EMMA INGA LÓPEZ

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO
MAGISTER SCIENTIAE EN NUTRICIÓN**

Lima – Perú

2023

Tesis Jesarella

INFORME DE ORIGINALIDAD

11%

INDICE DE SIMILITUD

12%

FUENTES DE INTERNET

5%

PUBLICACIONES

7%

TRABAJOS DEL
ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	www.thefreelibrary.com Fuente de Internet	1%
2	orcid.org Fuente de Internet	1%
3	www.dspace.uce.edu.ec Fuente de Internet	1%
4	www.yumpu.com Fuente de Internet	1%
5	biblioteca.versila.com Fuente de Internet	1%
6	es.wikipedia.org Fuente de Internet	1%
7	www.nature95.com Fuente de Internet	1%
8	www.redalyc.org Fuente de Internet	1%
9	1library.co Fuente de Internet	1%

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN NUTRICIÓN**

**“EXPRESIÓN DE MARCADORES INFLAMATORIOS EN RATAS
HOLTZMAN OBESAS SUPLEMENTADAS CON HARINA DE
CUSHURO (*Nostoc sphaericum*)”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO
MAGISTER SCIENTIAE**

Presentada por:

JESARELLA EMMA INGA LÓPEZ

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

Ph.D. Víctor Guevara Carrasco
PRESIDENTE

Dra. María Elena Villanueva Espinoza
ASESOR

Ph.D. Nataly Bernuy Osorio
MIEMBRO

Mg.Sc. Cristina Rivera Romero
MIEMBRO

DEDICATORIA

A mi esposo Luis y a mi hijo Lucas.

AGRADECIMIENTOS

A Dios porque sin él la presente investigación no hubiera sido posible.

A mi esposo Luis Gutiérrez, por su ardua colaboración en la realización de la tesis.

A mi papá Willy y mis hermanos Hainer e Israel por su amor incondicional, así como a mi mamá Emma por su invaluable ayuda en los días previo a la sustentación de la tesis.

A mi asesora Dra. María Elena Villanueva por la idea inicial de la tesis y por el apoyo durante la realización de la misma.

A mis amigas, Vanesa Silva y Paola Finetti, quienes contribuyeron con sus experiencias previas en los ensayos.

Al Laboratorio de Química Biológica y Bioanálisis pertenecientes al departamento de Química de la Universidad Nacional Agraria La Molina donde se realizó el procesamiento de las muestras de sangre.

Al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica por la contribución económica para la realización de esta investigación.

Al programa de becas CIENCIACTIVA del CONCYTEC, Convenio de Gestión N°183-2015 FONDECYT, por la subvención de estudios de Maestría en Nutrición de la UNALM.

A la Universidad Nacional Agraria La Molina, mi alma mater.

ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA	3
	2.1 LA INFLAMACIÓN CRÓNICA.....	3
	2.1.1 Epidemiología.....	3
	2.1.2 Causas y factores que contribuyen a la inflamación crónica.....	4
	2.1.3 Inflamación.....	6
	2.1.4 La inflamación en la obesidad.....	7
	2.2 MARCADORES INFLAMATORIOS.....	9
	2.2.1 Interleucina-6.....	9
	2.2.2 Factor de necrosis tumoral- α	10
	2.3 <i>NOSTOC</i>	11
	2.3.1 Generalidades	11
	2.3.2 Compuestos con actividad antiinflamatoria de <i>Nostoc commune</i>	14
	2.3.3 Ensayo biológico	17
	2.4 LA RATA DE LABORATORIO	18
	2.4.1 Generalidades	18
	2.4.2 Inducción a la obesidad	20
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
	3.1 LUGAR Y FECHA DE EJECUCIÓN	21
	3.2 MATERIALES.....	21
	3.2.1 Organismos.....	21
	3.2.2 Materiales de bioterio	21
	3.2.3 Materiales de laboratorio	21
	3.2.4 Otros materiales.....	22

3.2.5 Equipos	22
3.3 METODOLOGÍA.....	22
3.3.1 Obtención del suplemento: harina de cushuro.....	22
3.3.2 Ensayo biológico	24
3.3.3. Obtención de la muestra	25
3.3.4. Determinación de marcadores inflamatorios	26
3.4 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	27
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES	28
4.1 HARINA DE CUSHURO	28
4.2 INDUCCIÓN A LA OBESIDAD	29
4.3 SUPLEMENTACIÓN	32
4.4 MARCADORES INFLAMATORIOS.....	33
4.4.1 FNT- α	33
4.4.2 IL-6.....	34
V. CONCLUSIONES.....	36
VI. RECOMENDACIONES	37
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	38
VIII. ANEXOS	43

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Distribución de tratamientos experimentales.....	25
Cuadro 2. Composición nutricional de macronutrientes de la harina de <i>Nostoc sphaericum</i>	28
Cuadro 3. Composición nutricional de macronutrientes de la dieta basal y la dieta obesogénica.....	29
Cuadro 4. Valores promedios de las variables evaluadas al finalizar el periodo de inducción a la obesidad.....	31
Cuadro 5. Valores promedios de las variables evaluadas al finalizar el periodo de suplementación.....	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Relación entre la expansión del tejido adiposo y el incremento del estado Inflamatorio.....	7
Figura 2. Especies de <i>Nostoc</i> . 2.1. <i>Nostoc commune</i> en su hábitat natural; 2.2 <i>Nostoc sphaericum</i>	11
Figura 3: 3.1 Células bacterianas especializadas; 3.2 Ciclo de vida de <i>Nostoc sphaericum</i> en su hábitat natural.....	13
Figura 4. Regulación de la expresión de ADN en la vía del factor nuclear kappa B.....	15
Figura 5. Respuesta antiinflamatoria de la Escitonemina reducida (R-scy) aislada de <i>Nostoc commune</i> en macrófagos estimulados por lipopolisacáridos.....	17
Figura 6. Reducción del estado inflamatorio inflamatorio evidenciado mediante la cuantificación de la interleucina 6 (IL-6) en los esplenocitos de ratón. NO: extracto lipídico de <i>Nostoc commune</i>	18
Figura 7. Requerimientos ambientales de la rata de laboratorio: jaula, comedero y bebedero individual.....	19
Figura 8. Diagrama del procesamiento del cushuro fresco hasta la obtención de la harina de cushuro.....	23
Figura 9. Esquema experimental en dos fases. Fase 1: inducción a la obesidad; Fase 2: suplementación con harina de cushuro.....	24
Figura 10. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima en sándwich (ELISA).....	26
Figura 11. Concentración del Factor de Necrosis Tumoral α en el suero de las ratas al finalizar el periodo de suplementación con harina de cushuro.....	33
Figura 12. Concentración de la Interleucina 6 en el suero de las ratas al finalizar el periodo de suplementación con harina de cushuro.....	35

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Certificado de metales pesados presentes en harina de <i>Nostoc sphaericum</i> procedente de Mesapampa-Huaráz.....	43
Anexo 2. Variables evaluadas al finalizar el periodo de inducción a la obesidad.....	44
Anexo 3. Consumo de alimento diario durante el periodo de inducción a la obesidad..	46
Anexo 4. Variables evaluadas al finalizar el periodo de suplementación.....	47
Anexo 5. Consumo de alimento diario durante el periodo de suplementación.....	49
Anexo 6. Cuantificación de la concentración del Factor de Necrosis Tumoral α	51
Anexo 7. Cuantificación de la concentración de la Interleucina 6.....	53

RESUMEN

Las enfermedades asociadas a inflamación crónica son una de las causas más importantes de muerte a nivel mundial. La Organización Mundial de la Salud afirma que tres de cada cinco personas mueren debido a enfermedades asociadas a la inflamación crónica, entre las que se encuentra la obesidad. En la obesidad, el sistema inmune sobreproduce compuestos proinflamatorios como el factor de necrosis tumoral alfa (FNT- α) y la interleucina-6 (IL-6) los cuales contribuyen a que la inflamación perpetúe. Se han encontrado compuestos con actividad antiinflamatoria en el extracto lipídico de una cianobacteria consumida en diversas partes del mundo, el *Nostoc commune*. En el Perú, se le ha atribuido por años dicha actividad, a otra especie del mismo género, el *Nostoc sphaericum* (Cushuro); sin embargo, no existe evidencia científica que corrobore dicha actividad. Por lo que, la presente investigación tuvo como objetivo evaluar la harina de *N. sphaericum* como un suplemento alimenticio para la reducción de la inflamación, evidenciado a través de la cuantificación de los marcadores inflamatorios FNT- α e IL-6, en ratas obesas. Ello se llevó a cabo en tres etapas, en la primera etapa, se indujo a la obesidad a las ratas con una dieta alta en grasas; en la segunda etapa, las ratas obesas recibieron en su dieta una suplementación con harina de Cushuro al 1.25, 2.5 y 5 por ciento; al finalizar el periodo de suplementación se obtuvo el suero de las ratas para cuantificar la expresión de los marcadores inflamatorios mediante el Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas. Los resultados mostraron que se redujeron significativamente las concentraciones de los dos marcadores inflamatorios en el suero de las ratas obesas que recibieron la suplementación con respecto al control. La concentración del FNT- α se redujo en 44, 51 y 42 por ciento con la suplementación al 1.25, 2.5 y 5 por ciento, respectivamente y la concentración de IL-6 se redujo en 56 y 64 por ciento, con la suplementación al 2.5 y 5 por ciento, respectivamente.

Palabras claves: Inflamación crónica, marcadores inflamatorios, IL-6, FNT- α , *Nostoc sphaericum*

ABSTRACT

Diseases associated with chronic inflammation are one of the most important causes of death worldwide. The World Health Organization states that three out of five people die from diseases associated with chronic inflammation, including obesity. In obesity, the immune system overproduces proinflammatory compounds such as tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) which contribute to the perpetuation of inflammation. Compounds with anti-inflammatory activity have been found in the lipid extract of a cyanobacterium consumed in various parts of the world, *Nostoc commune*. In Peru, this activity has been attributed for years to another species of the same genus, *Nostoc sphaericum* (Cushuro); however, there is no scientific evidence to corroborate such activity. Therefore, the present investigation aimed to evaluate *N. sphaericum* flour as a food supplement for the reduction of inflammation, evidenced through the quantification of the inflammatory markers TNF- α and IL-6, in obese rats. This was carried out in three stages: in the first stage, the rats were induced to become obese with a high-fat diet; in the second stage, the obese rats received in their diet a supplementation with Cushuro flour at 1.25, 2.5 and 5 percent; at the end of the supplementation period, serum was obtained from the rats to quantify the expression of the inflammatory markers means of the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. The results showed that the concentrations of the two inflammatory markers in the serum of the obese rats that received the supplementation were significantly reduced with respect to the control. TNF- α concentration was reduced by 44, 51, and 42 percent with 1.25, 2.5 and 5 percent supplementation, respectively, and IL-6 concentration was reduced by 56 and 64 percent with 2.5 and 5 percent supplementation, respectively.

Keywords: Chronic inflammation, inflammatory markers, IL-6, TNF- α , *Nostoc sphaericum*

I. INTRODUCCIÓN

La inflamación crónica contribuye de manera significativa en el desarrollo de algunas enfermedades crónicas como cáncer, obesidad, diabetes, enfermedades cardiovasculares y enfermedades respiratorias crónicas, las cuales son unas de las causas más importantes de muerte a nivel mundial (Pahwa *et al.* 2022). En el Perú, en el año 2014 la prevalencia de diabetes y obesidad en personas mayores de 15 años de edad fue de 3.2 y 17.5 por ciento, respectivamente; luego de seis años estas cifras incrementaron a 4.5 y 24.6 por ciento (INEI 2014; INEI 2020). Estas estadísticas muestran que el porcentaje de personas que padecen de estas enfermedades podrían seguir incrementándose. Por tanto, es necesario la búsqueda de productos naturales con propiedades antiinflamatorias, como alternativa a la medicina convencional (Park *et al.* 2008).

En la inflamación crónica, el sistema inmune del individuo sobreproduce sustancias como citocinas, óxido nítrico (ON) y especies reactivas de oxígeno (EROs), debido a que intenta reparar el tejido de manera repetitiva; sin embargo, esto resulta en daños locales e incluso sistémicos (Pu *et al.* 2020). Entre las citocinas más estudiadas por estimular y mantener la respuesta inflamatoria se encuentran el factor de necrosis tumoral alfa (FNT- α) y la interleucina-6 (IL-6). El FNT- α promueve la producción de otras citocinas, la activación de los macrófagos y la eliminación de células tumorales. En cuanto a la IL-6, promueve la maduración de las células B y la activación y diferenciación de las células T, células fundamentales en la respuesta inmunitaria (Germolec *et al.* 2018).

El *Nostoc sphaericum* (cushuro) es una cianobacteria que crece de manera natural en lagos, lagunas, arroyos y zonas húmedas sobre los 3000 msnm en el Perú. Ha sido consumido en diversos potajes desde tiempos inmemorables por pobladores que viven aledaños a las zonas donde crece, debido a que se le ha atribuido propiedades benéficas (Fernandez y Suyón 2018). Entre las propiedades benéficas que se le ha atribuido, solo se ha estudiado algunas como: el

efecto antioxidante, hipoglucemiante y de protección contra la radiación UV (Chávez 2014; Ishihara *et al.* 2017; Inocente *et al.* 2019).

La rata es un organismo modelo utilizado para estudiar patologías como es el caso de la obesidad. Estos mamíferos menores son manejables, fáciles de criar en cautividad y con un ciclo de vida corto que permite obtener resultados en poco tiempo (Sengupta 2013). La utilización de dietas hipercalóricas es una de las metodologías de inducción a la obesidad en ratas, que mejor simula la obesidad en el ser humano por una sobreingesta (Lutz y Wood 2012). Las ratas obesas han permitido evaluar el efecto benéfico de diversos productos alimenticios, lo cual se evidencia mediante evaluaciones antropométricas, genéticas, bioquímicas o inmunológicas (Aguilera *et al.* 2004).

Estudios anteriores en *Nostoc commune*, una especie del mismo género de *N. sphaericum*, reportaron que presenta actividad antiinflamatoria debido a sus ácidos grasos y compuestos como el heteroglicano Nc-5-s y la Escitonemina reducida (R-scy). Se determinó que los ácidos grasos participan en la inhibición de la unión del factor de transcripción NF- κ B al ADN, lo que reduce la producción de citoquinas inflamatorias (Park *et al.* 2008). En cuanto al Nc-5, encontraron que participa en la vía de la ERK1/2, esta proteína actúa sobre factores de transcripción implicados en la respuesta inflamatoria (Olafsdottir *et al.* 2014). Finalmente, R-scy suprime significativamente la producción de ON mediante la vía Nrf2/ARE (Itoh *et al.* 2014). Sin embargo, no existe evidencia científica que confirme que el *Nostoc sphaericum*, la especie más consumida en el Perú, posea actividad antiinflamatoria como se le ha atribuido por años.

En la presente investigación se evaluó la harina de *Nostoc sphaericum* como un suplemento alimenticio para la reducción de la inflamación, evidenciado a través de la cuantificación de los marcadores inflamatorios FNT- α e IL-6, en ratas Holtzman obesas.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 LA INFLAMACIÓN CRÓNICA

2.1.1 Epidemiología

Enfermedades asociadas a inflamación crónica como cáncer, enfermedades cardiovasculares (principalmente cardiopatías y enfermedades cerebrovasculares), enfermedades respiratorias crónicas, obesidad y diabetes causan la muerte de 3 de cada 5 personas a nivel mundial (Pahwa *et al.* 2022). Además, en el 2021, se reportaron 17.9 millones de decesos por enfermedades cardiovasculares, 9 millones por cáncer, 3.9 millones por enfermedades respiratorias y 1.6 millones por diabetes (Organización Mundial de la Salud 2021).

Los últimos reportes muestran una prevalencia importante a nivel mundial de estas enfermedades, por ejemplo, en el año 2014, el 8.5 por ciento de las personas mayores de 18 años padecían diabetes. En el 2016, el 13 por ciento de las personas mayores de 18 años tenían obesidad y el 4.5 por ciento tenía asma, y en el 2020, el 0.6 por ciento de las personas convivía con el cáncer (Organización Mundial de la Salud 2016, Centro Nacional de Epidemiología 2021). En países industrializados como los Estados Unidos existe un incremento progresivo de la prevalencia de estas enfermedades crónicas, por ejemplo, en el año 2000, el 43 por ciento de la población padecía de una enfermedad inflamatoria crónica, y el 21 por ciento más de uno. En el 2014, el 60 por ciento de los estadounidenses tenía al menos una afección crónica y el 42 por ciento tenía más de una (Pahwa *et al.* 2022).

En el Perú, la prevalencia de enfermedades como la diabetes y la obesidad se han incrementado. En el año 2014, el 3.3 y 17.5 por ciento de personas mayores de 15 años de edad tenía diabetes y obesidad, respectivamente; mientras que, en el 2020, el 4.5 y 24.6 por ciento, respectivamente (INEI 2014; INEI 2020). En cuanto a los decesos causados por enfermedades inflamatorias crónicas en el Perú, en el año 2014, las enfermedades cardiovasculares representaron el 16 por ciento de las muertes totales en el Perú en hombres

entre 30 y 69 años; y el 15 por ciento en las mujeres del mismo grupo etario. En el mismo año, las enfermedades respiratorias crónicas representaron el 7 por ciento en hombres y el 6 por ciento en mujeres en personas del mismo grupo etario (Organización Panamericana de Salud y Organización Mundial de la Salud 2014).

2.1.2 Causas y factores que contribuyen a la inflamación crónica

Las causas y los factores que contribuyen al establecimiento de la inflamación crónica son de diversa naturaleza.

Pahwa *et al.* (2022) describen 3 causas de inflamación crónica:

a. Agente biológico:

Bacteria, hongo, protozoo u otro parásito que cause una inflamación aguda y que sea difícil de eliminar, por ejemplo, *Mycobacterium tuberculosis*, el cual puede resistir las defensas del huésped y permanecer en el tejido durante un período prolongado.

b. Agente químico o físico:

Exposición prolongada a un nivel bajo de un irritante químico o material extraño que no puede eliminarse por descomposición enzimática o fagocitosis en el cuerpo, por ejemplo, exposición prolongada a polvo de sílice.

c. Trastorno autoinmune:

El sistema inmunitario reconoce componentes normales del cuerpo como un antígeno extraño y ataca el tejido sano, por ejemplo, la artritis reumatoide.

En tanto, Furman *et al.* (2019) describen 2 factores que contribuyen al desarrollo de la inflamación crónica:

a. Actividad física

En las últimas 2 décadas, existe una alta prevalencia de inactividad física en la población, es decir, personas que no cumplen con las recomendaciones internacionales mínimas de actividad física regular. En el año 2012, el 31 por ciento de la población mundial se consideraban físicamente inactivas. Estos porcentajes son aún mayores en países desarrollados, por ejemplo, en los Estados Unidos en el mismo año, aproximadamente el 50 por ciento de los adultos estadounidenses se consideraban físicamente inactivos.

La actividad física es importante, pues durante la contracción muscular se producen y liberan proteínas como las mioquinas al torrente sanguíneo, las cuales pueden reducir la inflamación. Se ha reportado que la baja actividad física está directamente relacionada con la reducción de la sensibilidad/respuesta del músculo esquelético ante el aumento de los niveles de proteína C reactiva (PCR) y de citoquinas proinflamatorias en individuos sanos, así como en sobrevivientes de cáncer de mama y pacientes con diabetes tipo 2.

b. Dieta

La dieta típica en muchos países en los últimos 40 años se ha caracterizado por contener un bajo porcentaje de frutas, verduras y otros alimentos ricos en fibra; por el contrario, existe un alto consumo de granos refinados y alimentos ultra procesados, en particular los que contienen emulsionantes. Este tipo de dieta altera la composición y función de la microbiota intestinal aumentando la permeabilidad intestinal y causando cambios epigenéticos en el sistema inmunológico que finalmente contribuyen en el desarrollo de la inflamación.

Los alimentos de alta carga glucémica, como los azúcares libres y los cereales refinados, que son ingredientes comunes en la mayoría de los alimentos ultraprocesados pueden provocar un aumento del estrés oxidativo. Por otro lado, se ha estudiado que el exceso de consumo de sal induce a los macrófagos hacia un fenotipo proinflamatorio caracterizado por una mayor diferenciación de linfocitos T CD4⁺ en linfocitos T colaboradores (T_H-17). Otro efecto del alto consumo de sal es que puede causar cambios adversos en la composición de la microbiota intestinal,

como lo demuestra la población reducida de *Lactobacillus* observada en animales y humanos alimentados con dietas altas en sal, esta población microbiana es importante pues participa en la regulación de T_H17 y mejora la integridad de la barrera epitelial intestinal, reduciendo así la inflamación sistémica.

Las deficiencias de micronutrientes como el zinc y el magnesio (causados por la ingesta de alimentos procesados o refinados bajos en vitaminas y minerales), y bajos niveles de omega-3 afectan negativamente la resolución de la inflamación. Los ácidos grasos omega-3 de cadena larga, especialmente el ácido eicosapentaenoico y el ácido docosahexaenoico, modulan la expresión de genes implicados en la inflamación. Más importante aún, es que estos ácidos grasos son precursores de moléculas como resolvinas, maresinas y protectinas, estas moléculas están involucradas en la resolución de la inflamación.

2.1.3 Inflamación

La inflamación ha sido definida de manera tradicional como “una respuesta a infecciones y tejidos dañados que lleva células y moléculas de defensa del huésped desde la circulación a los sitios donde se necesitan para eliminar los agentes agresores”. Sin embargo, esta definición ya no es la más adecuada, debido a que muchas condiciones consideradas como inflamatorias ocurren sin una infección, tejido dañado o un aparente agente agresor. Una de las características que prevalece en la inflamación es la concentración aumentada de elementos de respuesta inmunitaria innata como las citoquinas inflamatorias. Es así que, Antonelli y Kushner (2017) redefinen la inflamación como “la respuesta inmunitaria innata a estímulos nocivos como patógenos, lesiones y estrés metabólico”.

La inflamación en relación al tiempo de duración puede ser aguda o crónica. En la inflamación aguda los leucocitos, las células sanguíneas ejecutoras de la respuesta inmunitaria, migran hacia el sitio de la lesión con el objetivo de eliminar el estímulo inflamatorio e iniciar la curación. A diferencia de la inflamación aguda, la inflamación crónica no se resuelve con el tiempo; los tejidos permanecen en un estado anabólico y dan lugar a su remodelación y al deterioro metabólico sistémico, por lo que coexisten el daño tisular y los intentos de reparación repetitiva; sin embargo, los mecanismos que mantienen

esta cronicidad y evitan la resolución de la inflamación aún son poco conocidos (Germolec *et al.* 2018).

2.1.4 La inflamación en la obesidad

El tejido adiposo es el principal reservorio de energía a largo plazo del cuerpo, esta energía es almacenada en forma de lípidos. El tejido adiposo ahora es reconocido como el órgano endocrino más grande del cuerpo, capaz de secretar más de 50 adipocinas, citocinas y quimiocinas, que se encuentran en la confluencia del metabolismo y la inmunidad (Deng *et al.* 2016). Los adipocitos y las células inmunitarias, en condiciones normales de balance energético, cooperan estrechamente para regular el almacenamiento y movilización de energía en respuesta a las necesidades del organismo (Karczewski *et al.* 2018). Sin embargo, la sobrenutrición, debido al exceso de ingesta calórica o al gasto calórico reducido, da como resultado la expansión del tejido adiposo (hipertrofia e hiperplasia) para adaptarse a mayores demandas de almacenamiento de energía, alterando así la función e histología del tejido adiposo (Figura 1) (Deng *et al.* 2016).

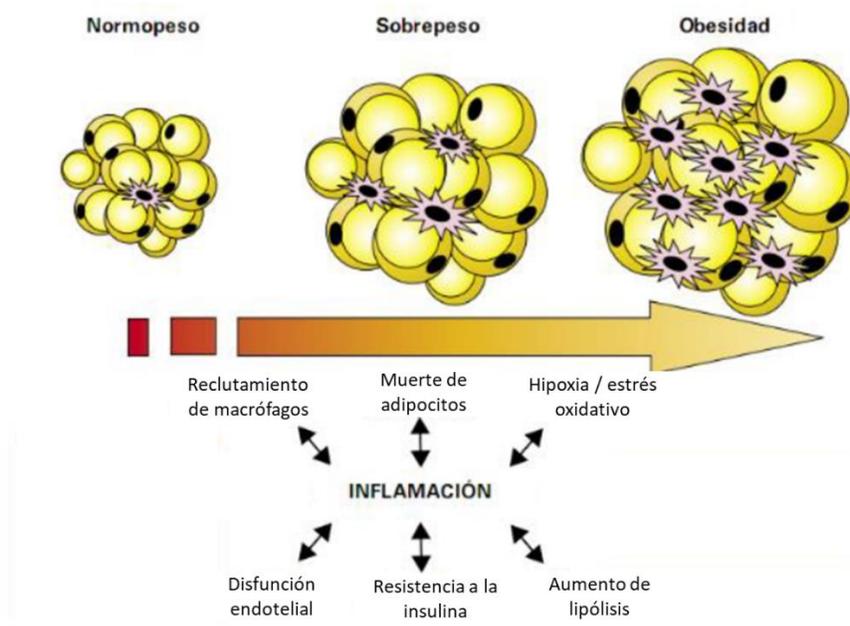


Figura 1: Relación entre la expansión del tejido adiposo y el incremento del estado inflamatorio

Fuente: Modificado de Fisiogenómica y salud (2016)

En la obesidad, la modificación del tejido adiposo induce un estrés tanto mecánico como del retículo endoplasmático en los adipocitos, lo que lleva a la liberación de ácidos grasos libres, citoquinas inflamatorias y finalmente al reclutamiento de células inmunitarias (Kern *et al.* 2018).

Un grupo importante de células inmunitarias innatas son los macrófagos que, dependiendo de su polarización, pueden ejercer funciones variables en el tejido adiposo, se ha denominado M1 a los macrófagos proinflamatorios y M2 a los macrófagos antiinflamatorios (Kern *et al.* 2018). Es importante mencionar que, los macrófagos del tejido adiposo comprenden menos del 10 por ciento de las células dentro de un depósito adiposo en individuos delgados, pero pueden representar hasta el 40-50 por ciento de todas las células dentro del depósito adiposo en individuos extremadamente obesos. Además, los macrófagos de diferentes depósitos de grasa muestran un comportamiento distinto. Por ejemplo, el tejido adiposo blanco visceral tiene aproximadamente el doble de niveles de macrófagos proinflamatorios que el tejido adiposo blanco subcutáneo, lo que indica que la contribución de la grasa visceral a la inflamación aumenta en condiciones de obesidad (Karczewski *et al.* 2018).

Otro grupo de células innatas son las naturales killers (NK), las cuales se activan y proliferan en el tejido adiposo obeso para desencadenar la acumulación y polarización de macrófagos M1 (Kern *et al.* 2018).

La inmunidad adaptativa mediada por los linfocitos T y B también está involucrada en la inflamación crónica. Los linfocitos T CD4 y CD8 contribuyen a la inflamación inducida por la obesidad. Mientras que el porcentaje de las células T reguladoras (Treg) es reducida en el tejido adiposo obeso, ya que cumplen función antiinflamatoria. Además, se ha reportado que las células B regulan el número de células Treg, en la investigación realizada con ratones obesos con deficiencia de células B aumentaron las células Treg residentes en el tejido adiposo y, en consecuencia, una reducción de la inflamación y una mejor sensibilidad a la insulina (Kern *et al.* 2018).

La inflamación crónica está considerada como uno de los factores etiológicos más importantes de la resistencia a la insulina. Citocinas inflamatorias e intermediarios lipídicos son los principales inductores de la resistencia a la insulina porque activan rutas de señalización inflamatorias que inhiben la cascada de transducción de señales del receptor de

la insulina. Las citoquinas proinflamatorias como la IL-1, la IL-6 y el FNT- α conducen a esta inflamación. La resistencia a la insulina hace que los adipocitos con aumento de la actividad lipolítica provoquen un aumento del flujo de ácidos grasos libres del tejido adiposo hacia el hígado o el músculo. Además, el exceso de tejido adiposo central tiene como consecuencia un aumento en la lipólisis basal con la consecuente liberación de ácidos grasos en el torrente sanguíneo; al llegar a sus células diana, éstos son captados para ser metabolizados. El aumento de los ácidos grasos intracelulares tiene como consecuencia la activación de vías metabólicas no oxidativas, como la formación de ceramidas, la degradación lisosomal y la generación de estrés del retículo endoplasmático. Este último tiene como consecuencia la activación de vías de señalización relacionadas con el inicio de la muerte celular programada (apoptosis) (Fisiogenómica y salud 2016).

2.2 MARCADORES INFLAMATORIOS

Un marcador es una proteína, secuencia de ADN u otra molécula que puede ser analizada con la finalidad de verificar algún proceso biológico. Las citocinas, algunas de ellas consideradas marcadores inflamatorios, son moléculas de comunicación intercelular producidas por una gran variedad de tipos celulares. Ellas se encargan de mediar muchas de las funciones de las células encargadas de la inmunidad innata y adquirida. Las citocinas más estudiadas por estimular y perpetuar las respuestas inflamatorias son IL-6, IL-1, IL-2, FNT- α , IFN- γ y el factor de crecimiento transformante (TGF)- β (Germolec *et al.* 2018; Saavedra *et al.* 2011).

2.2.1 Interleucina-6

La IL-6 es producida por diversos tipos celulares entre los cuales están los monocitos, macrófagos, linfocitos T y B, fibroblastos, células endoteliales, adipocitos y células epiteliales intestinales. Los principales estímulos para su síntesis y liberación son las infecciones por ciertos microorganismos y la acción de otras citocinas, como la IL-1, FNT- α y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas. La IL-6 tiene acciones tanto proinflamatorias como antiinflamatorias, ya que a diferencia de la IL-1 y el FNT- α , que poseen solo actividades proinflamatorias, los efectos de la IL-6 en la inmunidad dependen del contexto y de su concentración local, así como de la presencia o ausencia de otras

proteínas reguladoras que actúan en la vía de transducción de señales, o de la concentración de su receptor soluble (Saavedra *et al.* 2011).

La IL-6 promueve la diferenciación y maduración de los linfocitos T y B, estimula la producción de inmunoglobulinas por parte de las células B, inhibe la secreción de citocinas proinflamatorias como el FNT- α y la IL-1. La IL-6, en combinación con el factor de crecimiento transformante (TGF-b), es indispensable para la diferenciación de Th17 a partir de las células T CD4+ vírgenes; sin embargo, la IL-6 también inhibe la diferenciación de Treg inducida por TGF-b. Las células Th 17 producen la citocina proinflamatoria IL-17, la cual ayuda al reclutamiento de otras células del sistema inmune en los tejidos periféricos y ejerce un efecto patogénico en diferentes enfermedades autoinmunes. Además, se ha demostrado que la IL-6 promueve la diferenciación de células auxiliares foliculares T (Thf), así como la producción de IL-21, la cual regula la síntesis de inmunoglobulina (Ig) en particular la producción de IgG4. La IL-6 induce la diferenciación de células T CD8+ en células T citotóxicas. Finalmente, la IL-6 interviene en las etapas iniciales de la respuesta inflamatoria de fase aguda, y los niveles de IL-6 continúan siendo altos en afecciones inflamatorias crónicas, lo que conduce a una mayor supervivencia y crecimiento de linfocitos y macrófagos que perpetúan la inflamación (Germolec *et al.* 2018; Tanaka *et al.* 2014).

2.2.2 Factor de necrosis tumoral- α

El FNT- α es una citoquina proinflamatoria secretada en el sistema inmunitario por monocitos y macrófagos, por linfocitos T y B, células NK y por leucocitos polimorfonucleares, así como por adipocitos. Entre las principales funciones de esta citoquina están la activación y diferenciación de monocitos, inducción de la diferenciación de precursores inmaduros a monocitos, aumento de la actividad parasiticida y bactericida de los macrófagos al inducir las vías del superóxido y del óxido nítrico, inducción de la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales favoreciendo la migración local de leucocitos (Ramirez y Sanchez 2012). El FNT- α contribuye con la inflamación al promover la producción de otras citocinas, estimular el crecimiento y la proliferación celular. Esta citoquina aumenta la expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I y II en ciertos tipos de células, lo que da como resultado la activación celular y la liberación de

otras citoquinas inflamatorias. Además, es importante en el proceso de eliminación de células muertas y moribundas mediante la promoción de la apoptosis (Germolec *et al.* 2018).

La expresión del FNT- α esta incrementada en adipocitos de sujetos obesos y de sujetos con resistencia a la insulina. Además del incremento de la expresión del FNT- α en tejido adiposo de sujetos obesos, se ha descrito que los sujetos obesos presentan mayores niveles séricos de FNT- α , y que la pérdida de peso en obesos reduce los niveles séricos de esta citoquina y la expresión del ARNm del FNT- α en tejido adiposo (Ramirez y Sanchez 2012).

2.3 NOSTOC

2.3.1 Generalidades

El *Nostoc* es un género de cianobacterias que forman colonias verde-azuladas, verde-oliva o marrón. La clorofila, la ficocianina y en algunos casos la ficoeritrina son los pigmentos que le confiere estos colores característicos. La forma de la colonia depende de la especie que la conforma. Tiene aspecto de uva cuando está formada de *Nostoc sphaericum*, ya que son translúcidas, gelatinosas y esféricas, con un diámetro que varía de 10 a 25 μ m (Figura 2.2). Mientras que, son laminares y de geometría irregular cuando están formados de otras especies como *Nostoc commune* (Figura 2.1) (Ponce 2014).



2.1



2.2

Figura 2: 2.1 *Nostoc commune* en su hábitat natural; 2.2 *Nostoc sphaericum*

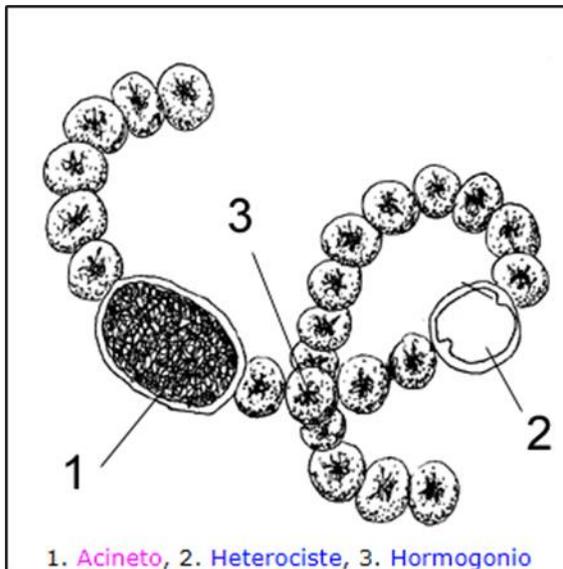
Fuente: 2.1 Li y Guo (2018) y 2.2- Sosa (2021)

El *Nostoc* ha colonizado zonas terrestres y acuáticas, principalmente de agua dulce (Whitton y Potss 2000). Suele vivir en climas extremos, por ejemplo, se ha encontrado esta cianobacteria en zonas semidesérticas e incluso en glaciares antárticos (Ponce 2014).

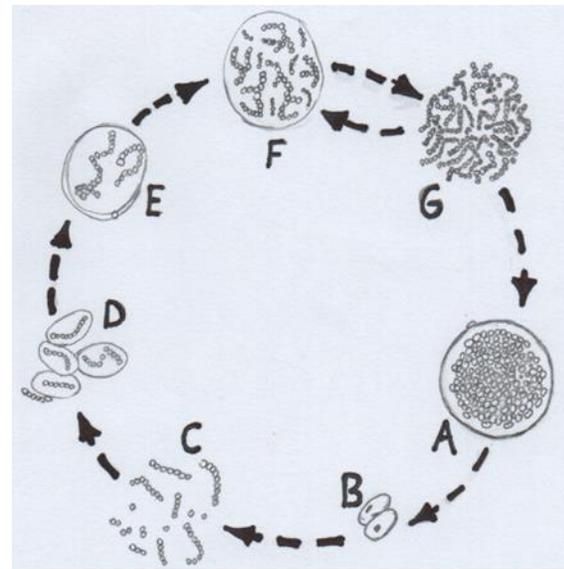
Nostoc sphaericum crece de manera natural en lagos, lagunas, charcos, puquios y diversos ambientes altoandinos. En el Perú se ha registrado en los departamentos de Amazonas, Ancash, Arequipa, Apurímac, Cajamarca, Cusco, Junín, La Libertad, Pasco y Puno, sobre los 3000 msnm, muchas veces con temperatura bajo cero. Se desecan parcialmente cada vez que disminuye el nivel de agua donde habitan, pero permanecen en estado latente (incluso durante años) hasta que vuelve a llover, rehidratándose (Fernandez y Suyón 2018)

Nostoc sphaericum se reproduce por hormosporas llamadas acinetos o heterocistos (Figura 3.1). Los acinetos son un tipo especializado de células más grandes y con una pared más gruesa que las células vegetativas, que se forma en respuesta a condiciones de vida desfavorables. En cuanto a los heterocistos son células especializadas que se forman por la necesidad de fijar nitrógeno atmosférico (Fernandez y Suyón 2018).

El Ciclo de vida de *N. sphaericum* en su hábitat natural fue descrito por Becerra (2009), este transcurre entre el periodo lluvioso y seco. Cuando empieza el periodo seco, la envoltura de la estructura globular de la colonia se vuelve dura, compacta y de color marrón amarillento oscuro; los tricomas (conjunto de hormogonios) se encuentran densamente empaquetados (Figura 3.2.A). Luego se da la formación de acinetos (Figura 3.2.B). Cuando la lluvia es irregular, los acinetos liberan nuevos hormogonios (filamentos móviles formados por estas cianobacterias), algunos de ellos portadores de heterocisto (Figura 3.2.C). Luego los hormogonios se rodean de una gruesa envoltura (Figura 3.2.D). Los hormogonios crecen produciendo tricomas (hormogonios ramificados) y dejando los heterocistos fuera de la envoltura (Figura 3.2.E). Durante la época lluviosa, los tricomas siguen creciendo y dividiéndose, produciendo nuevos hormogonios dentro de la envoltura, lo que resulta en un talo grande suelto y delgado (Figura 3.2.F). Hacia el final del período de inundación los talos se encuentran sueltos con envolturas difusas o definidas, pero siempre delgados e incoloros (Figura 3.2.G).



3.1



3.2

Figura 3: 3.1 Células bacterianas especializadas; 3.2 Ciclo de vida de *Nostoc sphaericum* en su hábitat natural

Fuente: Becerra (2009)

Nostoc commune contiene entre el 25 y el 27 por ciento de su peso seco conformado por proteínas, péptidos y aminoácidos libres. Además, consta de 51.12 por ciento de carbohidratos, que incluyen galactosa, glucosa, trehalosa, fructosa, xilosa y alcohol polihídrico. Los ácidos grasos de *N. commune* solo representan el 0.21 por ciento de su materia seca. Contiene elementos esenciales como hierro (Fe), zinc (Zn) y calcio (Ca). Cabe señalar que *N. commune* también contiene fibra dietética (Li y Guo 2018).

Según las Tablas Peruanas de Composición de Alimentos (Instituto Nacional de Salud, 2017), el cushuro deshidratado al 15 por ciento de humedad contiene 29 por ciento de proteínas, 0.5 por ciento de grasa total, carbohidratos totales 46.9 por ciento y cenizas 8.5 por ciento. Además, aporta 147 mg de calcio, 64 mg de fósforo y 83.6 mg de hierro por cada 100 g de cushuro deshidratado.

Alegre (2019) evaluó *Nostoc sphaericum* originario de la Laguna de Conococha, Catachuaraz y encontró un contenido de proteínas de 26.68 ± 0.01 g, 15.72 ± 0.72 mg/100g de hierro y 1260.13 ± 35.80 mg/100g de calcio.

Es importante mencionar que los componentes nutricionales del cushuro varían, pues depende de las condiciones nutricionales y los factores ambientales como la luz, la temperatura, la altitud, etc. donde crecen estas cianobacterias.

2.3.2 Compuestos con actividad antiinflamatoria de *Nostoc commune*

Estudios anteriores de *Nostoc commune*, una especie del mismo género de *N. sphaericum*, reportaron que presenta actividad antiinflamatoria debido a que sus ácidos grasos y compuestos como el heteroglicano Nc-5-s y la Escitonemina reducida participan en vías de regulación como la NF- κ B, ERK1/2 y Nrf2/ARE, respectivamente (Park *et al.* 2008; Olafsdottir *et al.* 2014; Itoh *et al.* 2014).

Extracto lipídico

Park *et al.* (2008) estudiaron si la inhibición de la producción de mediadores proinflamatorios por el extracto de lípidos de *N. commune* es conferida principalmente por sus ácidos grasos. Para ello se hicieron 2 tratamiento, en uno se incubaron macrófagos de murinos con extracto de lípidos de *N. commune* y en el otro se incubaron macrófagos con una mezcla de ácidos grasos (26 por ciento de ácido palmítico, 24 por ciento de ácido palmitoleico, 16 por ciento de ácido linoleico y 25 por ciento de ácido linolénico) que fue formulada con la finalidad de reflejar la composición de ácidos grasos del extracto lipídico, para ambos tratamientos posteriormente se indujo la inflamación con lipopolisacáridos (LPS) de *Salmonella entérica*. La mezcla de ácidos grasos redujo significativamente la abundancia de ARN de FNT- α y COX-2, pero en menor medida que el extracto de lípidos, lo que sugiere la presencia de compuestos bioactivos adicionales con propiedades antiinflamatorias en el extracto de lípidos. Además, al medir la actividad de unión del factor nuclear- κ B (NF- κ B) al ADN (Figura 4) se redujo significativamente por efecto del extracto de lípidos de *N. commune*. Finalmente, se concluye que el extracto de lípidos de *N. commune* reprime la expresión de genes proinflamatorios que codifican para citoquinas como el FNT- α en macrófagos de murinos, al menos en parte, al inhibir la activación de la vía NF-Kb. Esta es una de las principales vías involucrada en la respuesta inflamatoria en la obesidad.

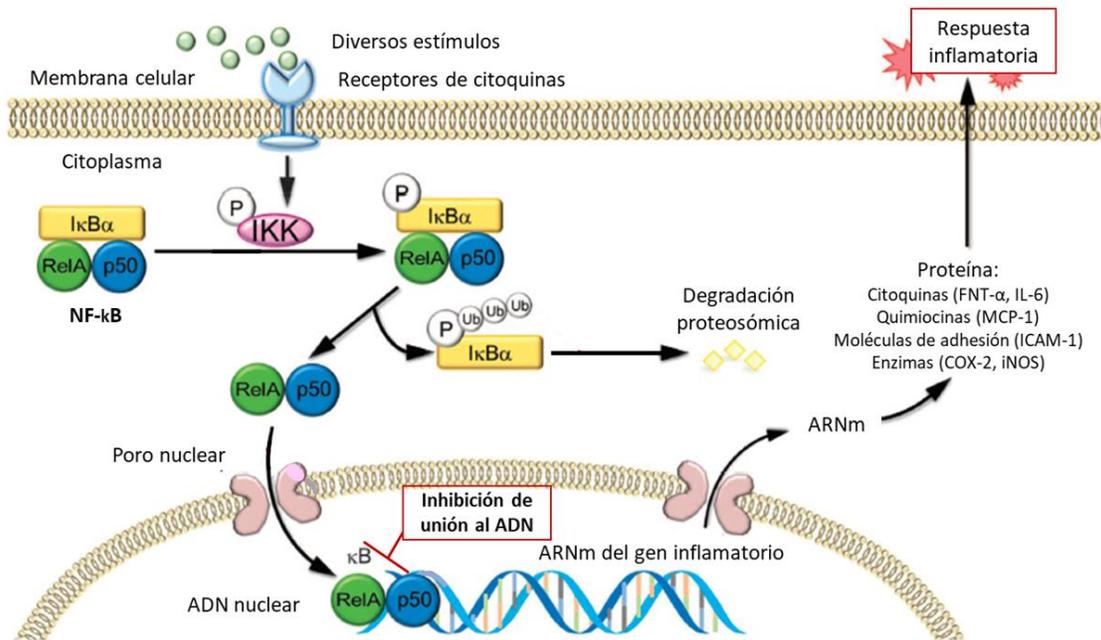


Figura 4: Regulación de la expresión de ADN en la vía del factor nuclear kappa B

Fuente: Modificado de Liu et al. (2017)

Vía de regulación de NF-κB: El heterodímero NF-κB (RelA y p50) es un complejo proteico que controla la transcripción del ADN. En su estado inactivo, el NF-κB se encuentra en el citosol formando un complejo con la proteína inhibitoria IκBα. A través de receptores integrales de membrana, una variedad de señales extracelulares (entre ellas el FNT-α) activa la enzima quinasa (IKK). La IKK fosforila la proteína IκBα, lo que resulta en la disociación del complejo IκBα -NF-κB, y la degradación de IκBα por el sistema ubiquitina-proteosoma. En consecuencia, NF-κB queda libre para trasladarse al núcleo, donde se une al elemento κB de los genes diana que participan en los procesos inflamatorios, sintetizándose finalmente proteínas como las citoquinas. La inhibición de esta vía puede darse en varios puntos, entre ellas sustancias que eviten que las subunidades de NF-κB se unan a los genes diana y, por lo tanto, inhiban la transcripción de los genes proinflamatorios (Figura 4) (Liu *et al.* 2017).

Nc-5-s

Olafsdottir *et al.* (2014) estudiaron los efectos de Nc-5-s en la respuesta inflamatoria de los monocitos THP-1 humanos estimulados por LPS. Los monocitos inducidos por LPS en presencia de Nc-5-s secretaron menos citocina proinflamatoria IL-6 y más citocina

antiinflamatoria IL-10 que los monocitos estimulados sin Nc-5-s. Por el contrario, Nc-5-s aumentó la secreción inducida por LPS de las citocinas proinflamatorias FNT- α e IL-8. Nc-5-s disminuyó la fosforilación inducida por LPS de la quinasa regulada por señales extracelulares 1/2 (ERK) y la quinasa Akt, pero no afectó la fosforilación de la quinasa p38, la activación de la vía del NF- κ B ni la unión al ADN de c-fos. Estos resultados muestran que Nc-5-s tiene efectos antiinflamatorios sobre la secreción de IL-6 e IL-10 por los monocitos THP-1, pero sus efectos son proinflamatorios cuando se trata de FNT α - e IL-8. Se muestran que los efectos de Nc-5-s pueden estar mediados por la ruta ERK1/2 o la ruta fosfoinositida 3-quinasa/Akt y sus efectos aguas abajo.

Vía de la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK 1/2): La vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos, también llamada vía de las MAP quinasas, es una ruta de transducción de señal de células. En términos globales, la señal se transporta mediante GRB2 y de SOS a RAS (una proteína G monomérica). Esta RAS, ya activada, estimula a tres proteínas quinasas que actúan de forma secuencial y que culmina con la activación de la proteína ERK capaz de translocarse al núcleo, donde regula la transcripción modificando la actividad de proteínas (incluyendo factores de transcripción), modulando así la expresión de distintos genes (Lodish *et al.* 2005).

Vía de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K/Akt): esta vía es crucial en numerosos aspectos celulares involucrados en el crecimiento y la supervivencia celular. La vía de la PI3K es estimulada fisiológicamente como consecuencia de la activación de receptores de membrana tirosina quinasa, los cuales se autofosforilan y fosforilan el sustrato del receptor de insulina (IRS); éste último, a la vez, fosforilara la subunidad p85 de la PI3K. La fosforilación de la subunidad p85 conduce a un cambio conformacional de dicha proteína que conduce a la unión de la subunidad catalítica. La PI3K activa, fosforila el fosfatidil inositol 3,4 difosfato (PIP2) convirtiéndolo en el segundo mensajero fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato (PIP3), el cual, corriente abajo, conduce a la activación de la proteína Akt. La Akt tiene múltiples blancos, responsables de los efectos de la activación de la vía (Pinzón *et al.* 2009).

Escitonemina reducida

En el estudio realizado por Itoh *et al.* (2014) la Escitonemina reducida (R-scy) suprimió significativamente la producción de óxido nítrico inducida por las citocinas proinflamatorias

LPS/IFN γ en macrófagos de murinos. Se determinó que R-scy genera especies reactivas del oxígeno (EROs) intracelular, lo que activa la proteína de unión específica de citoquinina p38 MAP quinasa y la vía de señalización PI3K/Akt. La activación resultante del factor de transcripción/ elemento de respuesta antioxidante Nrf2/ARE induce la expresión de hemo oxigenasa (HO-1) y aumenta la actividad antioxidante, lo que resulta en la supresión de las respuestas inflamatorias inducidas por LPS/IFN γ (Figura 5).

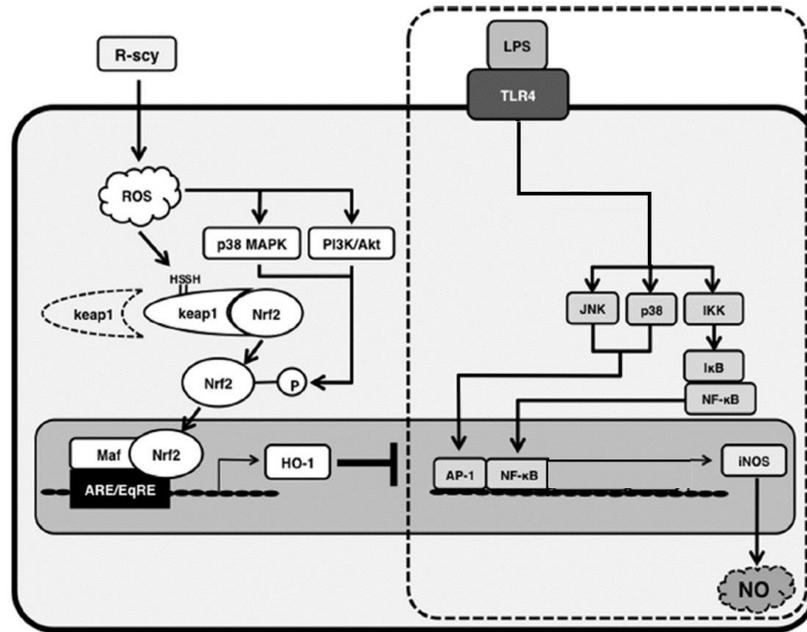


Figura 5: Respuesta antiinflamatoria de la Escitonemina reducida (R-scy) aislada de *Nostoc commune* en macrófagos estimulados por lipopolisacáridos

Fuente: Modificado de Itoh et al. (2014)

2.3.3 Ensayo biológico

Ku y colaboradores (2013) realizaron un ensayo biológico donde se alimentaron ratones machos de 8 semanas de edad con una dieta con alto contenido de grasa/colesterol (15 por ciento de grasa, 0.2 por ciento de colesterol) y que además contenía 5 por ciento de extracto lipídico de *N. commune* en peso, durante 12 semanas. Finalizado dicho tiempo, se sacrificaron a los animales y se recolectaron los bazo para cuantificar las concentraciones de IL-6 utilizando el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) comercial. Es importante mencionar que los esplenocitos (células blancas del bazo) fueron incubados con

LPS durante 20 h para inducir la inflamación, previamente a la cuantificación de IL-6. Los resultados se muestran en la Figura 6.

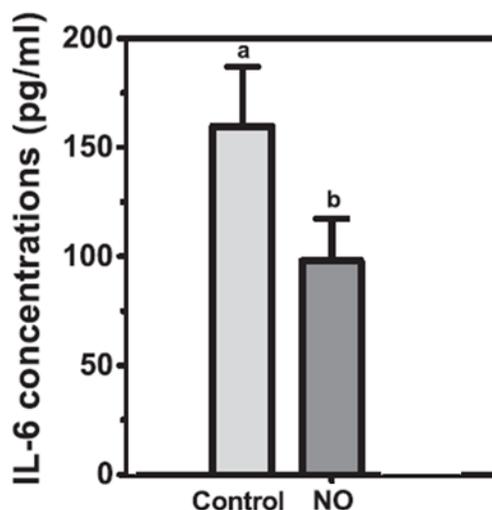


Figura 6: Reducción del estado inflamatorio evidenciado mediante la cuantificación de la interleucina 6 (IL-6) en los esplenocitos de ratón. NO es extracto lipídico de *Nostoc commune*

Fuente: Modificado de Ku et al. (2013)

Cuando los esplenocitos fueron expuestos a LPS durante 20 h, las células de ratones alimentados con el extracto lipídico de *N. commune* mostraron niveles de IL-6 significativamente más bajos en el medio celular que los ratones de control.

2.4 LA RATA DE LABORATORIO

2.4.1 Generalidades

La rata es el animal experimental más utilizado en las investigaciones, debido a que es manejable, fácil de criar en cautividad y con un ciclo de vida corto. El ciclo de vida de la rata dura entre 3 a 5 años; sin embargo, alcanzan la adultez a temprana edad aproximadamente a los 2 meses, esto, debido a que experimentan la maduración sexual entre el mes y 1.5 meses.

Las características del ambiente son esenciales para el bienestar animal. Temperatura entre 20 y 26°C. El fotoperiodo ideal es de 12 a 14 horas de luz en 24 horas. Además, una

ventilación adecuada previene la acumulación de tóxicos respiratorios de origen animal (amonio principalmente), disminuye la carga de alérgenos ambientales y de microorganismos contaminantes. En cuanto a la alimentación, las ratas pueden llegar a consumir el 15 por ciento de su peso al día y el agua debe ser administrada a libre demanda (López 2005).



Figura 7: Requerimientos ambientales de la rata de laboratorio con jaula, comedero y bebedero individual

Fuente propia (2021)

Los requerimientos de nutrientes no son estáticos; cambian según el estado de desarrollo, la actividad reproductiva y la edad; incluso dependen del sexo o de la cepa. Sin embargo, se reportan valores promedio como una ingesta dietética de 15 g/rata/día para ratas en crecimiento o ratas adultas en mantenimiento, 15 a 20 g/rata /día durante la gestación y de 30 a 40 g/rata/día durante la lactancia. Las dietas que contienen del 5 al 10 por ciento de grasa tienen valores de energía bruta (GE) de alrededor de 4.0 a 4.5 Mcal/kg. La energía digestible (DE) de la mayoría de las dietas oscila entre el 90 y el 95 por ciento de la GE. La energía metabolizable (EM) varía del 90 al 95 por ciento de la ED. Se requiere una concentración de proteína en la dieta de 10 a 15 por ciento para un crecimiento máximo cuando se alimenta con una dieta baja en fibra que contiene un patrón balanceado de aminoácidos, 5 por ciento de grasa y 4 kcal de EM/g (17 kJ de EM/g). Mientras que el requerimiento de proteína para el crecimiento máximo de la rata es del 12 por ciento cuando se usa proteína altamente digerible de un patrón balanceado de aminoácidos (National Research Council 1995)

2.4.2 Inducción a la obesidad

La inducción de obesidad puede realizarse en animales por cambios neuroendocrinos, dietéticos o genéticos. La gran similitud y homología entre los genomas de roedores y humanos hacen de estos modelos animales una importante herramienta para estudiar la obesidad. Algunos de los modelos de inducción de obesidad en ratas son una lesión del núcleo hipotalámico ventromedial (VMH), ovariectomía, alimentación con dietas hipercalóricas y manipulación genética (Von *et al.* 2006).

Las dietas hipercalóricas son el modelo de inducción a la obesidad más simple y posiblemente el que más se parece a lo que sucede en la obesidad humana. Existen varios tipos de dietas para inducir la obesidad que han demostrado su eficacia. Unas pocas dietas alcanzan valores hipercalóricos añadiendo hidratos de carbono y otras con grasas, y la mayoría de ellas oscilan entre 3.7 Kcal/g y 5.4 Kcal/g. Todos ellos son muy palatables e inducen a la obesidad. En un modelo de dieta hipercalórica con grasas, se utilizó una dieta que contenía 17.4 por ciento de carbohidratos, 42.9 por ciento de proteínas y 39.7 por ciento de grasas. Otro modelo utilizó 55 por ciento de grasas, 21 por ciento de carbohidratos y 24 por ciento de proteínas (Von *et al.* 2006).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LUGAR Y FECHA DE EJECUCIÓN

El estudio se realizó en las instalaciones del Bioterio perteneciente a la Facultad de Zootecnia y en el Laboratorio de Micología y Biotecnología en la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM). El periodo experimental se desarrolló entre los meses de abril y junio del 2021.

3.2 MATERIALES

3.2.1 Organismos

- Ratas machos *Holtzman* (35) de dos meses de edad con un peso promedio 234.7 ± 0.5 g; adquiridas en el Centro Nacional de Alimentación y Nutrición.
- *Nostoc sphaericum* fresco (35 kilos), libre de metales pesados (Anexo 1), extraído de las cochas del centro poblado Mesapampa-Chiquian-Ancash.

3.2.2 Materiales de bioterio

- Jaulas metálicas individuales (35) con una base extraíble para facilitar la limpieza de las excretas depositadas en ellas.
- Comederos y bebederos (35)
- Alimento para ratas (80 kg) del Programa de Investigación y Proyección Social en Alimentos de la UNALM (dieta basal).
- Manteca vegetal (10 kg) “Tropical”

3.2.3 Materiales de laboratorio

- Jeringas de 5 ml
- Tubos de recolección de sangre sin aditivos

- Cooler con gel refrigerante
- Tubos eppendorf de 1.5 mL
- Rat ELISA kit ab46070 TNF Alpha marca Abcam
- Rat ELISA kit RTFI00034 IL-6 marca Assay Genie

3.2.4 Otros materiales

- Ketamina y Xilacina
- Hipoclorito de sodio al 4% (1L)

3.2.5 Equipos

- Mezcladora de alimento
- Lector de microplacas
- Refrigerador de 4 °C
- Refrigeradora de -20°C
- Balanza analítica
- Estufa
- Centrífuga
- Molino

3.3 METODOLOGÍA

3.3.1 Obtención del suplemento: harina de cushuro

Para la obtención de harina se procedió como se muestra en la Figura 8:

A continuación, se detalla el procedimiento utilizado:

- a. Lavado: se lavó de forma manual el cushuro fresco con agua potable para eliminar restos de plantas y tierra.
- b. Escurredo: se retiró la mayor cantidad de agua utilizando escurridores, luego se extendieron los cushuros en bandejas a temperatura ambiente con la finalidad de retirar el agua que se encontraba en la superficie externa de los cushuros por aproximadamente 24 horas.

- c. Secado: se secó en una estufa a una temperatura de 60° C a 3 m/s de velocidad de aire, hasta obtener cushuro con 12 por ciento de humedad.
- d. Enfriado: se dejó enfriar por unos minutos a temperatura ambiente
- e. Molienda: se molió hasta obtener un tamaño de partícula de 1 mm
- f. Almacenamiento: se almacenó el cushuro molido en un recipiente hermético a temperatura ambiente hasta su uso.



Figura 8: Diagrama del procesamiento del cushuro fresco hasta la obtención de la harina de cushuro

Fuente propia (2022)

Una vez obtenida la harina de cushuro se realizó el análisis proximal.

3.3.2 Ensayo biológico

Los animales fueron alojados en las jaulas provistas de comederos y bebederos. La sala de trabajo se mantuvo a una temperatura equilibrada de 22 ± 1 °C con 12 horas luz y 12 horas oscuridad.

El experimento se llevó a cabo en 2 fases consecutivas, una de 37 días y la otra de 51 días como se muestra en la Figura 9.

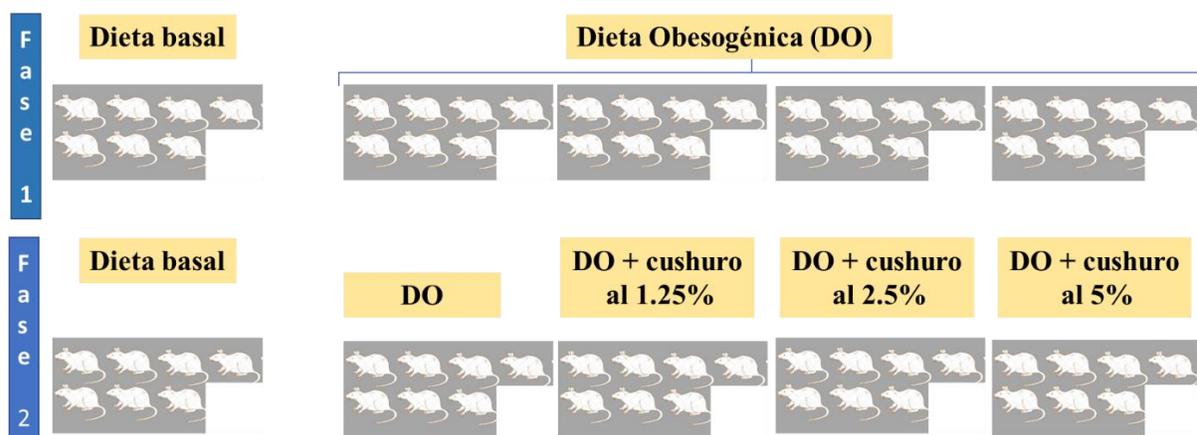


Figura 9: Esquema experimental en dos fases. Inducción a la obesidad (Fase 1), suplementación con harina de cushuro (Fase 2)

Fuente propia (2022)

Fase 1: Inducción a la obesidad

Los animales fueron divididos en dos grupos, uno de 7 y el otro de 28 ratas con un diseño completamente al azar. El primer grupo, denominada grupo control no obeso, recibió la dieta basal; mientras que, el segundo grupo recibió una dieta obesogénica que consistió en 79.4 por ciento de alimento basal y 20.6 por ciento de manteca vegetal. Además, todas las ratas recibieron agua *ad libitum*.

Al término de esta fase se evaluó la obesidad mediante el índice de Lee. Para ello se registró el peso corporal y la longitud naso-anal de las ratas. Con estas medidas se calculó la raíz cúbica del peso corporal (g) dividida por la longitud naso-anal (cm). Los valores menores e iguales a 0.300 se clasificaron en la categoría “NORMAL” y aquellos animales que

alcanzaron valores mayores a 0.300 fueron clasificados como “OBESOS” (Contini *et al.* 2017).

Durante este periodo se hizo un registro diario del alimento consumido.

Fase II: Suplementación con cushuro

Se inició con la homogenización de la muestra tomando como punto de referencia las medias y coeficientes de variación obtenidos del peso de los 28 animales alimentados con la dieta obesogénica de manera que su distribución en los 4 grupos experimentales sea uniforme. Los 4 tratamientos fueron asignados a los animales obesos bajo un diseño completamente al azar. Sumados al grupo control no obeso, se tuvo un total de 5 tratamientos con 7 repeticiones cada uno, como se detalla a continuación:

Cuadro 1: Distribución de tratamientos experimentales

Tratamientos	Dieta basal	Dieta obesogénica	Harina de cushuro
T1: control no obeso	X		
T2: control obeso		X	
T3: Suplementación 1.25%		X	1.25%
T4: Suplementación 2.5%		X	2.5%
T5: Suplementación 5%		X	5%

Durante este periodo se hizo un registro diario del alimento consumido, así como del peso de los animales semanalmente.

3.3.3. Obtención de la muestra

A cada individuo se le tomó una muestra de sangre al finalizar la etapa de suplementación. Para ello, se inyectó a cada animal vía intraperitoneal una dosis letal de ketamina (150mg/kg) y xilacina (10 mg/kg). Luego de comprobar la inconsciencia y la ausencia de dolor, según los indicadores de falta de reflejo podal y de respiración localizada en la región abdominal, se procedió a la toma de muestra por punción cardiaca utilizando la jeringa de 5 ml. Las muestras de sangre fueron depositadas en tubos de recolección dentro de un cooler con gel refrigerante, una vez culminado este proceso, inmediatamente se colocaron los tubos dentro de una refrigeradora a 4°C, donde permanecieron toda la noche con la finalidad de que las

muestras se coagulen. Al día siguiente, las muestras se centrifugaron durante 15 min. a 1000 RFC (Fuerza Centrífuga Relativa), luego se separó el sobrenadante para la obtención de suero en tubos eppendorf, los cuales se conservaron a -20 °C hasta su utilización (Torres 2022).

3.3.4. Determinación de marcadores inflamatorios

ELISA

Se utilizaron los kits ELISA tipo sándwich para FNT- α e IL-6, para el desarrollo de la prueba se siguió sus respectivos manuales. Los kits contienen con el primer anticuerpo fijado en los pocillos de la microplaca, donde se agregan los estándares (para la curva estándar) y las muestras (suero de las ratas), luego de ello se agrega el segundo anticuerpo que está ligado con una enzima, el cual desarrolla color al reaccionar con el sustrato, la absorbancia del color es proporcional a la concentración de analito evaluado, ello se mide en el lector de microplaca (Figura 10). Finalmente, para obtener la concentración del analito se utiliza la curva estándar, donde la absorbancia es directamente proporcional a la concentración del analito.

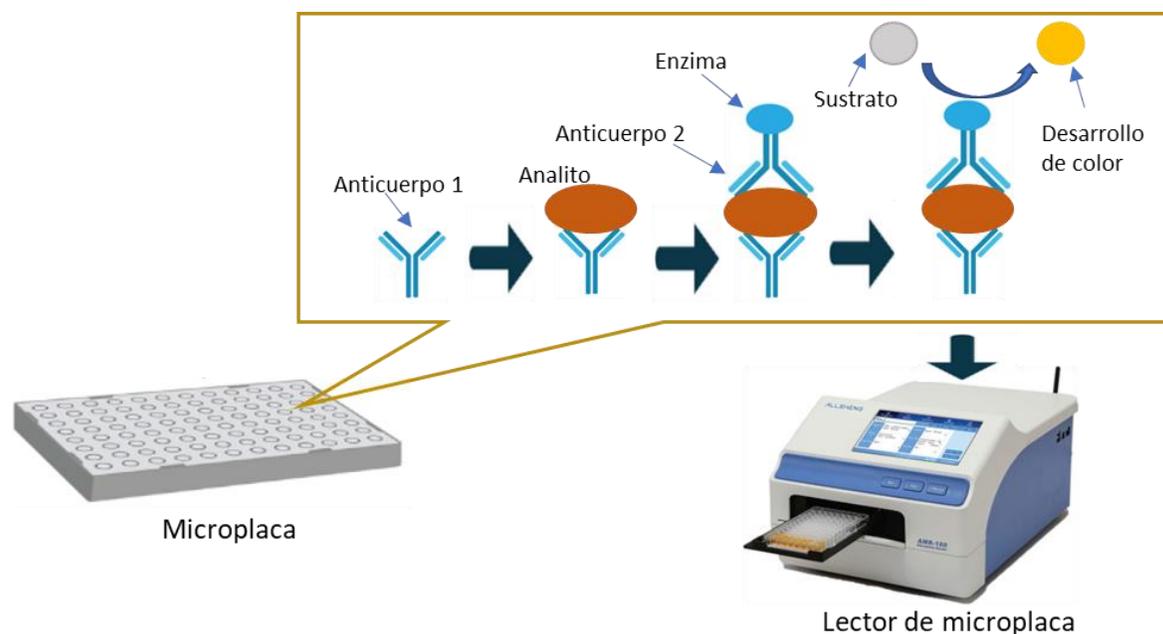


Figura 10: Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzima en sándwich (ELISA)

Fuente propia (2022)

3.4 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El diseño experimental fue completamente al azar, tanto para la etapa de inducción a la obesidad como para la etapa de suplementación. El análisis de los resultados se hizo mediante ANOVA y se identificaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos mediante comparación por pares de Tukey utilizando el programa estadístico Minitab. Las diferencias se consideraron significativas con un nivel de significancia de 0.05.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 HARINA DE CUSHURO

Los resultados del análisis proximal de la harina de *N. sphaericum* se muestran en el Cuadro 2. Las Tablas Peruanas de Composición de Alimentos (INS, 2017) reportaron valores similares en cuanto a porcentaje de humedad y proteína. El contenido de proteína fue de 30.53 por ciento, mientras que las Tablas reportaron un valor del 29 por ciento, en cuanto al contenido de humedad fue de 15 por ciento, el mismo, al reportado por las Tablas.

Cuadro 2: Composición nutricional de macronutrientes de la harina de *Nostoc sphaericum*

Componente	Contenido
Humedad, %	15
Proteína total (Nx6.25), %	30.53
Extracto etéreo, %	0.22
Fibra cruda, %	10.51
Cenizas, %	4.90
Extracto libre de nitrógeno, %	38.84
Energía, Kcal/g	2.79

Por otro lado, el contenido de carbohidratos, grasa total y cenizas resultó menor a los reportados por las Tablas (INS, 2017). Se determinó que los carbohidratos representaron el 38.85 por ciento, mientras que las Tablas indicaron un valor de 46.9 por ciento. Se cuantificó 0.22 por ciento de grasa total, casi la mitad del reportado por las Tablas que fue de 0.5 por ciento, pero muy cercano al reportado en *N. commune* (Li y Guo 2018). En cuanto al contenido de cenizas fue de 4.89 por ciento, mientras que las Tablas indicaron un valor de

8.5 por ciento. Las diferencias en el porcentaje de componentes nutricionales dependen de los factores ambientales como la luz, la temperatura y las condiciones nutricionales donde crecen las cianobacterias.

Se determinó un aporte energético de 2.7 Kcal/g de harina de cushuro, muy cercano al reportado por las Tablas que fue de 2.4 Kcal/g.

4.2 INDUCCIÓN A LA OBESIDAD

El análisis proximal de la dieta basal y la dieta obesogénica se muestra en el Cuadro 3. La dieta basal, la cual fue suministrada al control no obeso, contenía 2.89 por ciento de grasa y 3.3 Kcal/g de alimento; mientras que la dieta obesogénica contenía 20.71 por ciento de grasa y 4.3 Kcal/g de alimento. Según Von *et al.* (2006), una dieta hipercalórica debe contener entre 3.7 Kcal/g y 5.4 Kcal/g de alimento.

Por otro lado, se determinó que la dieta obesogénica contenía 13.19 por ciento de proteína, un importante macronutriente que garantiza el crecimiento óptimo del animal. La literatura menciona que con una concentración de proteína en la dieta de 10 a 15 por ciento se logra un crecimiento máximo, siempre que haya un contenido balanceado de aminoácidos (National Academy of Sciences 1995).

Cuadro 3: Composición nutricional de macronutrientes de la dieta basal y la dieta obesogénica

Componente	Dieta basal	Dieta obesogénica
Humedad, %	14.01	12.01
Proteína total (Nx6.25), %	18.28	13.19
Extracto etéreo, %	2.89	20.71
Fibra cruda, %	2.22	1.69
Cenizas, %	4.78	3.46
Extracto libre de nitrógeno, %	57.82	48.94
Energía, Kcal/g	3.30	4.34

Transcurrido 37 días de iniciada esta fase, las ratas alcanzaron la obesidad según el índice de Lee con un valor promedio de 0.322 ± 0.0002 . Los valores promedios de los parámetros evaluados terminada esta fase se muestran en el Cuadro 4, además, en el Anexo 2 los valores detallados de cada repetición.

Los animales iniciaron el ensayo con un peso promedio de 234.7 g, los que recibieron la dieta basal (T1) tuvieron un incremento de peso de 48.57 g; mientras que los que recibieron la dieta obesogénica (T2, T3, T4 y T5) tuvieron un incremento de peso de 120.78 g. Lo que resultó en un peso promedio final de 279.57 g y de 354.36 g, respectivamente. Por otro lado, el consumo de alimento diario del primer grupo fue de 16.36 g un valor superior al del grupo obesogénico que fue de 15.29 g, esto debido a que los animales alimentados con la dieta obesogénica comían menos cantidad conforme más se acercaban a la obesidad.

No se reportaron diferencias significativas entre los grupos alimentados con la dieta obesogénica. Tales resultados eran esperados ya que no se adicionó ninguna fuente de variación; de esta manera se prueba la homogeneidad de la muestra previa al inicio de la fase de suplementación.

Cuadro 4: Valores promedios de las variables evaluadas al finalizar el periodo de inducción a la obesidad

Variables	Tratamientos				
	T1	T2	T3	T4	T5
Peso corporal final (g)	279.57±10.83b	353.29±8.20a	354.43±8.24a	353.86±7.38a	355.86±7.79a
Longitud Naso-Anal (cm)	22.19±0.17	22.03±0.25	22.00±0.19	22.01±0.21	22.01±0.26
Índice de Lee	0.29±0.003b	0.32±0.005a	0.32±0.004a	0.32±0.003a	0.32±0.003a
Consumo diario de alimento (g)	16.36±1.27a	15.14±1.22b	15.39±0.96b	15.34±0.96b	15.30±1.09b
Incremento de peso (g)	48.57±6.52b	119.71±10.29a	121.29±11.10a	119.43±8.08a	122.71±9.01a

T1: control no obeso; T2: control obeso; T3: Suplementación 1.25%; T4: Suplementación 2.5%; T5: Suplementación 5%.

Valores que no comparten letras en común en una fila indican diferencia significativa, Prueba de Tukey (p<0.05)

4.3 SUPLEMENTACIÓN

Al iniciar el periodo de suplementación el peso corporal de los individuos de los grupos experimentales T2, T3, T4 y T5 fueron similares (354.36 ± 7.52 g).

Al culminar la segunda fase experimental se realizó nuevamente el análisis de variables, tales resultados se describen en el Cuadro 5.

Cuadro 5: Valores promedios de las variables evaluadas al finalizar el periodo de suplementación

Variables	Tratamientos				
	T1	T2	T3	T4	T5
Consumo diario de alimento (g)	18.99±0.58a	18.62±0.73ab	18.43±0.82b	18.41±0.59b	16.71±0.83c
Consumo diario de suplemento (g)			0.23	0.46	0.84
Incremento de peso (g)	99±16.40a	72.86±14.67b	64.14±8.70bc	63.71±13.27bc	48.29±7.22c
Peso corporal final (g)	378.57±11.50c	426.14±10.71a	418.57±5.12ab	417.57±7.72ab	404.14±11.27b

T1: control no obeso; T2: control obeso; T3: Suplementación 1.25%; T4: Suplementación 2.5%; T5: Suplementación 5%.

Valores que no comparten letras en común en una fila indican diferencia significativa, Prueba de Tukey ($p < 0.05$)

Es importante señalar que no hubo diferencias significativas en el incremento de peso de los animales que recibieron la suplementación con la harina cushuro a las tres concentraciones.

4.4 MARCADORES INFLAMATORIOS

4.4.1 FNT- α

Se determinaron las concentraciones del FNT- α en el suero de las ratas de cada tratamiento utilizando la curva estándar mostrada en el ANEXO 6. Los resultados fueron graficados en la Figura 11, el grupo no obeso (T1) evidenció una concentración de 65 pg/mL, mientras que el grupo control obesogénico (T2) casi cuadruplicó la concentración de esta citoquina 249.38 pg/mL. En cuanto a los tratamientos, se redujo el 44 por ciento de FNT- α con la suplementación de cushuro al 1.25 por ciento (T3), el 51 por ciento con la suplementación de 2.5 por ciento (T4) y el 42 por ciento con la suplementación de 5 por ciento (T5) con respecto al control obesogénico; sin embargo, no hubo diferencias significativas entre los 3 tratamientos.

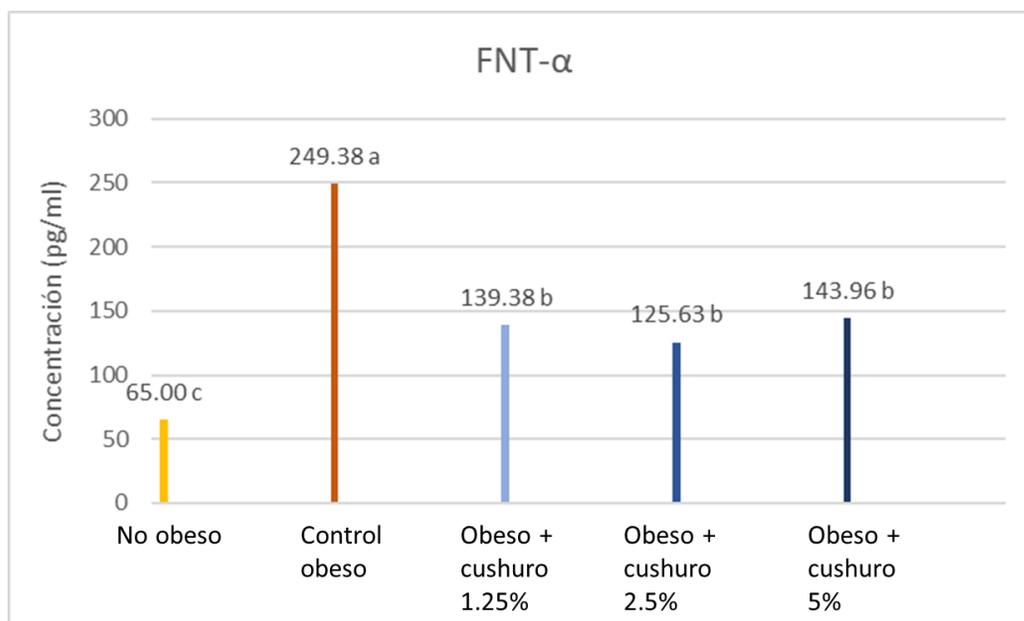


Figura 11: Concentración del Factor de Necrosis Tumoral α en el suero de las ratas al finalizar el periodo de suplementación con harina de cushuro

Letras diferentes indican diferencia significativa, Prueba de Tukey ($p < 0.05$)

En el estudio realizado por Park *et al.* (2008) donde se trabajó con otra especie, *Nostoc commune*, y macrófagos de murinos, se indujo la inflamación con LPS y se utilizó solo el extracto lipídico de *N. commune*, se logró reducir la producción de FNT- α aproximadamente en un 80 por ciento con respecto al control. Park *et al.* (2008) lograron una mayor disminución de la producción del FNT- α en comparación a la presente investigación debido a múltiples factores, en primer lugar, a que se trabajó con otra especie, sumado a ello, a que el extracto no tuvo que pasar por el proceso de la digestión, ya que el extracto lipídico se aplicó directamente sobre los macrófagos. Park *et al.* (2008) atribuyen esta disminución de la producción del FNT- α , al menos en parte, a la inhibición de la vía NF- κ B al evitar que la subunidad del NF- κ B se una a los genes que codifican para citoquinas proinflamatorias como el FNT- α (Figura 4).

4.4.2 IL-6

Se determinaron las concentraciones de la IL-6 en el suero de las ratas de cada tratamiento utilizando la curva estándar mostrada en el ANEXO 7. Los resultados fueron graficados en la Figura 12, el grupo no obeso (T1) evidenció una concentración de 83.47 pg/mL, mientras que el grupo control obesogénico (T2) casi cuadruplicó la concentración de esta citoquina 331.76 pg/mL. En cuanto a los tratamientos, se redujo en 45 por ciento la concentración de IL-6 con la suplementación de 1.25 por ciento de harina de cushuro (T3) con respecto al control obesogénico. La suplementación con 1.25 (T4) y 2.5 (T5) por ciento redujeron en 55 y 63 por ciento, sin diferencias significativas entre estos 2 tratamientos, pero con diferencias significativas respecto a T3.

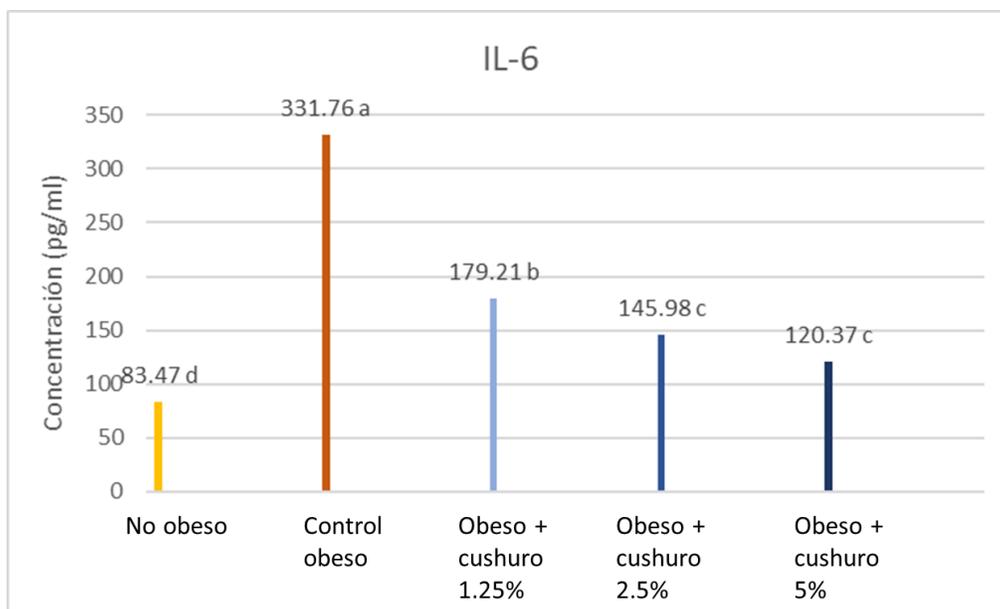


Figura 12: Concentración de la Interleucina 6 en el suero de las ratas al finalizar el periodo de suplementación con harina de cushuro

Letras diferentes indican diferencia significativa, Prueba de Tukey ($p < 0.05$)

En el ensayo realizado por Ku *et al.* (2013), donde se trabajó con *Nostoc commune* y ratones alimentados con una dieta que contenía 5 por ciento de extracto lipídico de *N. commune* durante 12 semanas, se cuantificó la concentración de IL-6 en los esplenocitos a los que previamente se les había inducido la inflamación con LPS. Ku *et al.* (2013) reportaron una reducción del 37.5% de la concentración la citoquina con respecto al control que no recibió el extracto de *N. commune* (Figura 6). En nuestra investigación la reducción de la concentración de esta citoquina con las 3 dosis de suplementación fue mayor.

V. CONCLUSIONES

- La suplementación con 1.25, 2.5 y 5 por ciento de harina de cushuro en la dieta de las ratas obesas, redujo significativamente la concentración de la citoquina proinflamatoria FNT- α en el suero de las ratas en 44, 51 y 42 por ciento, respectivamente, en comparación al control obeso; más no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.
- La suplementación con 2.5 y 5 por ciento de harina de cushuro en la dieta de las ratas obesas, redujo significativamente la concentración de la IL-6 en el suero de las ratas en 56 y 64 por ciento, respectivamente, en comparación al control obeso; sin diferencias estadísticamente significativas entre ambos tratamientos.

VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar análisis especializados en el extracto lipídico de *Nostoc sphaericum* con la finalidad de identificar los compuestos con actividad antiinflamatoria encontrados en *Nostoc commune*.
- Se recomienda realizar ensayos biológicos para determinar si la harina de *Nostoc sphaericum* inhibe la absorción de macronutrientes como la proteína presente en la dieta.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera A, Díaz G, Barcelata M, Guerrero O, Ros R. 2004. Effects of fish oil on hypertension, plasma lipids, and tumor necrosis factor-alpha in rats with sucrose-induced metabolic syndrome. *J Nutr Biochem.* 15(6):350-7. doi: 10.1016/j.jnutbio.2003.12.008.
- Antonelli M, Kushner I. 2017. It's time to redefine inflammation. *FASEB J.* 31(5):1787-1791. doi: 10.1096/fj.201601326R.
- Alegre R. 2019. Contenido de proteínas, hierro y calcio de *Nostoc sphaericum* “Cushuro” procedente de la Laguna de Conococha, Catac - Huaraz (Tesis para obtener el grado de Licenciado en Nutrición). Universidad Cesar Vallejo.
- Becerra-Absalón I y Tavera R. 2009. Life cycle of *Nostoc sphaericum* (Nostocales, Cyanoprokaryota) in tropical wetlands. *Nova Hedwigia* 88: 117-128. DOI: 10.1127/0029-5035/2009/0088-0117.
- Chávez, L. 2014. Composición química y actividad antioxidante in vitro del extracto acuoso de *Nostoc sphaericum* (Cushuro), laguna Cushurococha – Junín” (Tesis para obtener el grado de Licenciado en Nutrición). Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Contini, M. Millen N; Benmelej A. Fabro A, Mahiu S. 2017. Evaluación del estado nutricional y metabolismo hepático en ratas macho expuestas crónicamente a la ingesta de glutamato monosódico. *FABICIB.* 21:38-54. https://www.academia.edu/en/72235689/Evaluaci%C3%B3n_Del_Estado_Nutricional_y_Metabolismo_Hep%C3%A1tico_en_Ratas_Macho_Expuestas_Cr%C3%B3nicamente_a_La_Ingesta_De_Glutamato_Monos%C3%B3dico
- Deng T, Lyon CJ, Bergin S, Caligiuri MA, Hsueh WA. 2016. Obesity, Inflammation, and Cancer. *Annu Rev Pathol.* 23; 11:421-49. doi: 10.1146/annurev-pathol-012615-044359.

- Centro Nacional de Epidemiología. 2021. Situación del cáncer en el Perú 2021. Ministerio de Salud. <https://www.dge.gob.pe/portal/docs/tools/teleconferencia/2021/SE252021/03.pdf>
- Fernández, W. y Suyón S. 2018. Efecto del secado convectivo en el valor nutricional, compuestos bioactivos y capacidad antioxidante in vitro del *Nostoc sphaericum* Vaucher ex Bornet & Flahault “cushuro” procedente de Recuay (Tesis para obtener el grado de Licenciada y Tecnología de los Alimentos). Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Fisiogenómica y salud. 2016. Obesidad e inflamación. <http://www.fisiogenomica.es/2016/06/obesidad-e-inflamacion.html>
- Furman D, Campisi J, Verdin E, Carrera-Bastos P, Targ S, Franceschi C, et al. 2019. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nat Med.* 25(12):1822-1832. doi: 10.1038/s41591-019-0675-0.
- Germolec D, Shipkowski K, Frawley R, Evans E. 2018. Markers of Inflammation. *Methods Mol Biol.* 1803:57-79. doi: 10.1007/978-1-4939-8549-4_5. PMID: 29882133.
- Inocente M; Jurado B; Ramos E; Alvarado B; Fuertes C; Cárdenas L; Rivera B. 2019. Actividad hipoglucemiante in vitro de los polisacáridos digeridos de *Nostoc sphaericum* Vaucher ex Bornet & Flahault (cushuro). *Horizonte Médico (Lima)*, 19(1), 26-31. <https://dx.doi.org/10.24265/horizmed.2019.v19n1.05>
- Instituto Nacional de Estadística e Informática. 2014. Enfermedades No Transmisibles y Transmisibles. Encuesta Demográfica y de Salud Familiar.
- Instituto Nacional de Estadística e Informática. 2020. Enfermedades No Transmisibles y Transmisibles. Encuesta Demográfica y de Salud Familiar.
- Instituto Nacional de Salud. 2017. Tablas Peruanas de Composición de Alimentos.
- Ishihara K, Watanabe R, Uchida H, Suzuki T, Yamashita M, Takenaka H, Nazifi E, Matsugo S, Yamaba M, Sakamoto T. 2017. Novel glycosylated mycosporine-like amino acid, 13-O-(β -galactosyl)-porphyrin-334, from the edible cyanobacterium *Nostoc sphaericum*-protective activity on human keratinocytes from UV light. *J Photochem Photobiol B.* 172:102-108. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2017.05.019.

- Itoh T, Koketsu M, Yokota N, Touho S, Ando M, Tsukamasa Y. 2014. Reduced scytonemin isolated from *Nostoc commune* suppresses LPS/IFN γ -induced NO production in murine macrophage RAW264 cells by inducing hemeoxygenase-1 expression via the Nrf2/ARE pathway. *Food Chem Toxicol.* 2014 Jul; 69:330-8. doi: 10.1016/j.fct.2014.04.019.
- Karczewski J, Śledzińska E, Baturo A, Jończyk I, Maleszko A, Samborski P, Begier-Krasińska B, Dobrowolska A. 2018. Obesity and inflammation. *Eur Cytokine Netw.* 1;29(3):83-94. doi: 10.1684/ecn.2018.0415.
- Kern L, Mittenbühler M, Vesting A, Ostermann A, Wunderlich C, Wunderlich F. 2018. Obesity-Induced TNF α and IL-6 Signaling: The Missing Link between Obesity and Inflammation-Driven Liver and Colorectal Cancers. *Cancers (Basel).* Dec 27;11(1):24. doi: 10.3390/cancers11010024. PMID: 30591653; PMCID: PMC6356226.
- Ku C, Pham T, Park Y, Kim B, Shin M, Kang I, Lee J. 2013. Edible blue-green algae reduce the production of pro-inflammatory cytokines by inhibiting NF- κ B pathway in macrophages and splenocytes. *Biochim Biophys Acta.*1830(4):2981-8. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.01.018.
- Li Z, Guo M. 2018. Healthy efficacy of *Nostoc commune* Vaucher. *Oncotarget.* 9(18):14669-14679. doi: 10.18632/oncotarget.23620.
- Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. 2017. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther.* 2:17023-. doi: 10.1038/sigtrans.2017.23.
- Lodish, H; Berk, A; Kaiser, C; Krieger, M; Bretscher, A; Ploegh, H; Amon, A; Scott, M. 2005. *Biología celular y molecular.* Buenos Aires: Médica Panamericana. <https://www.medicapanamericana.com/es/libro/biologia-celular-y-molecular>
- López, C. 2005. *Normas básicas para la mantención de ratones y ratas de laboratorio.* Instituto de Salud Pública de Chile. <https://tecnovet.uchile.cl/index.php/RT/article/view/38998>
- Lutz T, Woods S. Overview of animal models of obesity. *Curr Protoc Pharmacol.* 2012 Sep;Chapter 5:Unit5.61. doi: 10.1002/0471141755.ph0561s58.
- National Research Council (US) Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition. 1995. *Nutrient Requirements of Laboratory Animals: Fourth Revised Edition.*

Washington (DC): National Academies Press (US).
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25121259/>

- Olafsdottir A, Thorlacius GE, Omarsdottir S, Olafsdottir ES, Vikingsson A, Freysdottir J, Hardardottir I. 2014. A heteroglycan from the cyanobacterium *Nostoc commune* modulates LPS-induced inflammatory cytokine secretion by THP-1 monocytes through phosphorylation of ERK1/2 and Akt. *Phytomedicine*. 2014 Sep 25;21(11):1451-7. doi: 10.1016/j.phymed.2014.04.023.
- Organización Panamericana de Salud, Organización Mundial de la Salud. 2014. Sistema de información regional de mortalidad. <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2014/PERU-PERFIL-ECV-2014.pdf>
- Organización Mundial de la Salud. (13 de abril del 2021). Enfermedades no transmisibles. <https://www.who.int/es/newsroom/factsheets/detail/noncommunicable-diseases>
- Organización Mundial de la Salud. 2016. Informe Mundial sobre la Diabetes. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254649/9789243565255-spa.pdf>
- Pahwa R, Goyal A, Jialal I. *Chronic Inflammation*. 2022. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493173/>
- Park Y, Rasmussen H, Ehlers S, Blobaum K, Lu F, Schlegal V, Carr T, Lee J. 2008. Repression of proinflammatory gene expression by lipid extract of *Nostoc commune* var *sphaeroides* Kützing, a blue-green alga, via inhibition of nuclear factor-kappaB in RAW 264.7 macrophages. *Nutr Res*. Feb;28(2):83-91. doi: 10.1016/j.nutres.2007.11.008.
- Ponce, Ernesto. 2014. *Nostoc*: un alimento diferente y su presencia en la precordillera de Arica. *Idesia (Arica)*, 32(2),119-121. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292014000200015>
- Pinzón, Carlos Eduardo, Serrano, Martha Lucía, & Sanabria, María Carolina. 2009. Papel de la vía fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K/Akt) en humanos. *Revista Ciencias de la Salud*, 7(2), 47-66. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-72732009000200007&lng=en&tlng=es.

- Pu, W. *et al.* 2020. Anti-inflammatory effects of *Rhodiola rosea* L.: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 121. 109552. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109552.
- Ramírez Alvarado, M.^a M., & Sánchez Roitz, C. 2012. El factor de necrosis tumoral- α , la resistencia a la insulina, el metabolismo de lipoproteínas y la obesidad en humanos. *Nutrición Hospitalaria*, 27(6), 1751-1757. <https://dx.doi.org/10.3305/nh.2012.27.6.6004>
- Saavedra P; Vásquez G; González, L. 2011. Interleucina-6: ¿amiga o enemiga? Bases para comprender su utilidad como objetivo terapéutico. *Iatreia*, 24(2), 157-166. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-07932011000200005&lng=en&tlng=es.
- Sengupta P. 2013. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *Int J Prev Med*. 4(6):624-630.
- Sosa C. 2021. Calidad nutricional y la aceptabilidad del producto obtenido por deshidratación osmótica del nostoc sphaericum (cushuro) (Tesis para obtener el grado de Licenciado en Nutrición). Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. 2014. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 4;6(10): a016295. doi: 10.1101/cshperspect.a016295.
- Torres, C. 2022. Modificación de la conducta alimentaria en ratas por influencia del consumo de aceite de linaza (*Linum usitatissimum*) (Tesis de Maestría en Nutrición). Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Von Diemen V, Trindade E, Trindade M. 2006. Modelo experimental para induzir obesidade em ratos [Experimental model to induce obesity in rats]. *Acta Cir Bras*. 21(6):425-9. Portuguese. doi: 10.1590/s0102-86502006000600013.
- Whitton A y Potts M. 2020. *The Ecology of Cyanobacteria*, Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands. Chapter 17. <https://link.springer.com/book/10.1007/0-306-46855-7>

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Certificado de metales pesados presentes en harina de *Nostoc sphaericum* procedente de Mesapampa-Huaráz



LA MOLINA CALIDAD TOTAL LABORATORIOS
UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
Instituto de Certificación, Inspección y Ensayos



INFORME DE ENSAYOS

N° 005667 - 2019

SOLICITANTE : P.B.J.M. S.A.C.
DIRECCIÓN LEGAL : JR. BARTOLOME DE LAS CASAS NRO. 358 URB. LOS JAZMINES LIMA - LIMA -
: SANTIAGO DE SURCO
RUC: 20602980261 Teléfono: 973297946

PRODUCTO : CUSHURO (NOSTOC)
NÚMERO DE MUESTRAS : Uno
IDENTIFICACIÓN/MTRA. : PROCEDENCIA : MESAPAMPA- HUARAZ
CANTIDAD RECIBIDA : 897,3 g (+envase) de muestra proporcionada por el solicitante.
MARCA(S) : S.M.
FORMA DE PRESENTACIÓN : Envasado, la muestra ingresa en bolsa sellada a temperatura ambiente.
SOLICITUD DE SERVICIO : S/S N°EN-003634 -2019
REFERENCIA : PERSONAL

FECHA DE RECEPCIÓN : 12/07/2019
ENSAYOS SOLICITADOS : FÍSICO/QUÍMICO
PERÍODO DE CUSTODIA : No aplica

RESULTADOS :

ENSAYOS FÍSICOS/QUÍMICOS :
ALCANCE : N.A.

ENSAYOS	RESULTADO
1.- Mercurio (*) (mg / kg de muestra original)	No detectable
2.- Arsénico (*) (mg / kg de muestra original)	No detectable
3.- Plomo (*) (mg / kg de muestra original)	No detectable
4.- Cadmio (*) (mg / kg de muestra original)	No detectable

MÉTODOS UTILIZADOS EN EL LABORATORIO :
1.- Métodos Oficiales de los Alimentos A. Madrid Vicente 1994
2.- AOAC 975.03 Cap. 3, Pág. 5-6, 20th Edition 2016 / AOAC 920.205 Cap. 11, Pág. 25, 20th Edition 2016
3.- AOAC 972.25 Cap. 9, Pág. 38, 20th Edition 2016
4.- AOAC 973.34 Cap. 9, Pág. 28-29, 20th Edition 2016

Observaciones: (*) Límite de detección: Mercurio: 0,005 mg/kg; Arsénico: 0,1 mg/kg; Plomo: 0,08 mg/kg; Cadmio 0,028 mg/kg
FECHA DE EJECUCION DE ENSAYOS: Del 12/07/2019 Al 19/07/2019.

ADVERTENCIA :
1.- El muestreo, las condiciones de muestreo, tratamiento y transporte de la muestra hasta su ingreso a La Molina Calidad Total - Laboratorios son de responsabilidad del Solicitante.
2.- Se prohíbe la reproducción parcial o total del presente Informe sin la autorización de La Molina Calidad Total - Laboratorios.
3.- Válido sólo para la cantidad recibida. No es un Certificado de Conformidad ni Certificado del Sistema de Calidad de quien lo produce.

La Molina, 19 de Julio de 2019



LA MOLINA CALIDAD TOTAL LABORATORIOS-UNALM
Mary Flor Cesare Coral
Ing. Mg. Quím. Mary Flor Cesare Coral
DIRECTORA TÉCNICA
C.Q.P. N° 635

Pág 1/1

Av. La Molina S/N (frente a la puerta principal de la Universidad Agraria) - La Molina - Lima - Perú
Telf.: (511) 3495640 - 3492507 Fax: (511) 3495794
E-mail: mktg@lamolina.edu.pe - Página Web: www.lamolina.edu.pe/calidadtotal -  la molina calidad total

Anexo 2. Variables evaluadas al finalizar el periodo de inducción a la obesidad

Tratamiento	Repetición	Peso Inicial	Incremento de peso	Peso final	Longitud	Índice de Lee
T1	1	228	47	275	22.1	0.294
	2	225	44	269	22.2	0.291
	3	231	44	275	22	0.296
	4	228	42	270	22.3	0.290
	5	239	61	300	22.5	0.298
	6	233	50	283	22.2	0.296
	7	233	52	285	22	0.299
	Promedio	231.000	48.571	279.571	22.186	0.295
	DesvSt	4.583	6.528	10.830	0.177	0.003
T2	1	230	128	358	21.7	0.327
	2	228	118	346	21.8	0.322
	3	236	118	354	22	0.322
	4	233	132	365	22.3	0.320
	5	240	100	340	22.4	0.312
	6	233	124	357	22	0.322
	7	235	118	353	22	0.321
	Promedio	233.571	119.714	353.286	22.029	0.321
	DesvSt	3.952	10.291	8.200	0.250	0.005
T3	1	232	110	342	22	0.318
	2	235	123	358	21.7	0.327
	3	229	135	364	22.2	0.322
	4	233	124	357	21.8	0.325
	5	228	132	360	22.2	0.320
	6	240	104	344	22.1	0.317
	7	235	121	356	22	0.322
	Promedio	233.143	121.286	354.429	22.000	0.322
	DesvSt	4.059	11.101	8.243	0.191	0.004
T4	1	240	108	348	21.8	0.323
	2	233	118	351	21.9	0.322
	3	231	123	354	22.2	0.319
	4	234	109	343	21.8	0.321
	5	232	124	356	22.4	0.316
	6	232	128	360	22	0.323
	7	239	126	365	22	0.325
	Promedio	234.429	119.429	353.857	22.014	0.321
	DesvSt	3.599	8.080	7.381	0.219	0.003
T5	1	240	124	364	22.4	0.319

	2	232	126	358	22	0.323
	3	236	113	349	21.8	0.323
	4	228	132	360	22.3	0.319
	5	234	122	356	22.1	0.321
	6	233	109	342	21.8	0.321
	7	229	133	362	21.7	0.328
	Promedio	233.143	122.714	355.857	22.014	0.322
	DesvSt	4.100	9.013	7.798	0.267	0.003

Anexo 3. Consumo de alimento diario durante el periodo de inducción a la obesidad

Dia	Tratamiento				
	T1	T2	T3	T4	T5
7	18.4	16.8	15.5	15.7	14.9
8	16.8	15.8	15.0	16.3	14.7
9	16.0	14.9	15.0	15.0	15.3
10	15.2	15.0	13.6	15.0	13.3
11	15.2	14.0	14.7	14.1	15.0
12	14.1	14.3	14.1	13.6	14.8
13	14.6	14.2	13.8	13.6	14.8
14	15.5	14.8	15.2	14.8	15.5
15	14.3	13.8	13.9	13.6	15.1
16	14.4	14.0	14.3	14.0	15.0
17	15.0	14.0	15.7	14.7	17.2
18	15.4	14.5	14.6	15.0	14.2
19	15.6	14.0	14.4	14.5	13.6
20	15.1	13.2	13.9	14.2	13.8
21	16.0	13.7	15.1	15.2	13.8
22	15.9	15.0	15.1	15.0	15.6
23	16.4	15.6	16.8	16.6	14.9
24	17.0	15.3	15.9	16.4	15.5
25	16.7	15.8	16.4	16.4	15.7
26	16.8	14.8	16.0	15.5	15.0
27	17.7	15.1	16.2	16.1	15.0
28	17.2	15.2	16.2	16.6	16.0
29	17.3	15.9	16.5	16.5	16.1
30	16.9	15.5	16.0	15.5	15.9
31	17.0	14.6	16.4	15.6	14.8
32	17.5	15.0	16.0	16.2	15.8
33	17.1	16.2	16.3	15.2	15.3
34	17.3	15.4	16.7	16.8	15.8
35	18.1	16.4	16.6	16.2	16.0
36	17.8	17.8	15.6	15.7	17.2
37	19.0	19.0	15.7	15.9	18.6
Promedio	16.368	15.139	15.392	15.336	15.302
DesvSt	1.273	1.225	0.960	0.968	1.097

Anexo 4. Variables evaluadas al finalizar el periodo de suplementación

Tratamiento	Repetición	Peso final (g)	Incremento de peso (g)
T1	1	369	94
	2	380	111
	3	380	105
	4	375	105
	5	367	67
	6	377	94
	7	402	117
	Promedio	378.571	99.000
	DesvSt	11.502	16.401
T2	1	436	78
	2	446	100
	3	420	66
	4	419	54
	5	418	78
	6	420	63
	7	424	71
	Promedio	426.143	72.857
	DesvSt	10.715	14.679
T3	1	420	78
	2	425	67
	3	420	56
	4	421	64
	5	411	51
	6	412	68
	7	421	65
	Promedio	418.571	64.143
	DesvSt	5.127	8.707
T4	1	424	76
	2	411	60
	3	428	74
	4	420	77
	5	418	62
	6	417	57
	7	405	40
	Promedio	417.571	63.714
	DesvSt	7.721	13.275
T5	1	402	38

	2	418	60
	3	395	46
	4	415	55
	5	403	47
	6	386	44
	7	410	48
	Promedio	404.143	48.286
	DesvSt	11.276	7.228

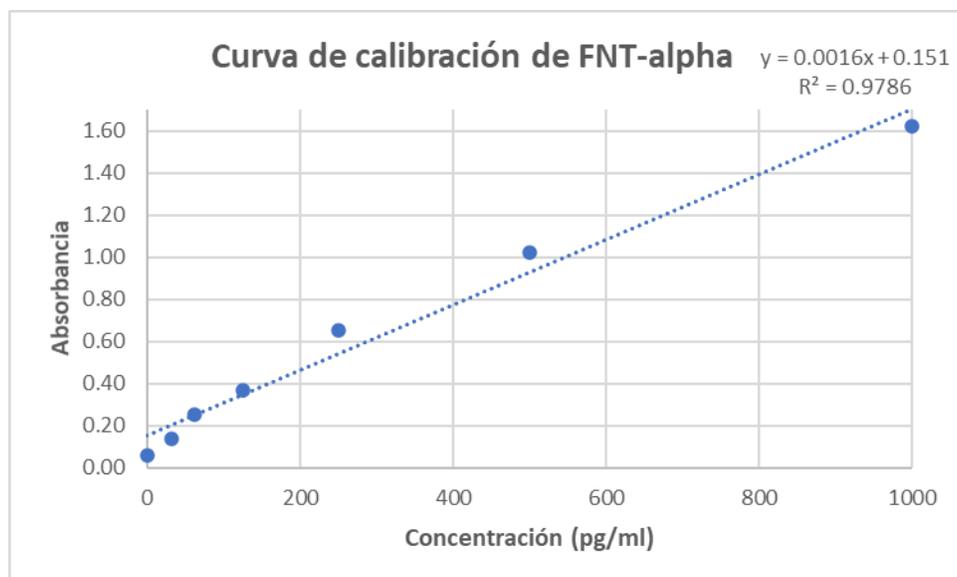
Anexo 5. Consumo de alimento diario durante el periodo de suplementación

Día	Tratamiento				
	T1	T2	T3	T4	T5
38	18.7	18.8	18.0	18.5	17.8
39	19.4	19.1	18.7	18.9	18.7
40	16.8	16.2	14.7	15.8	16.4
41	17.5	16.7	17.2	17.4	17.4
42	17.8	18.0	17.3	17.8	17.2
44	17.9	17.5	17.2	17.3	17.1
45	17.8	17.7	17.0	18.2	16.2
46	20.0	20.0	20.0	19.8	19.2
47	19.2	19.5	20.0	19.1	18.4
48	18.4	19.3	18.2	18.7	16.7
49	19.0	17.9	18.3	19.0	16.9
50	19.5	18.3	18.9	18.5	17.4
51	19.3	17.8	18.6	18.4	16.4
52	19.0	19.0	18.4	18.2	16.3
53	18.7	18.0	17.9	18.2	15.8
54	18.9	17.9	18.1	18.1	16.0
55	19.1	18.6	18.8	18.2	16.6
56	19.0	18.5	18.0	18.3	16.0
57	19.5	18.4	18.5	18.0	15.9
58	19.3	18.5	18.6	18.7	17.1
59	19.1	18.2	18.8	18.5	15.7
60	19.0	18.5	18.5	19.2	17.0
62	19.0	18.5	18.7	18.8	16.1
63	19.2	19.2	18.6	18.8	17.4
64	19.5	19.7	19.6	18.7	17.2
65	19.5	19.7	19.4	19.1	16.9
66	19.2	19.2	19.0	18.5	16.5
67	19.1	18.6	18.9	17.8	16.5
68	19.3	19.2	19.0	18.3	16.8
69	19.0	19.5	18.6	18.6	16.7
70	19.0	18.7	18.6	18.5	16.5
71	18.9	19.3	18.3	18.5	16.5
72	19.2	18.8	19.3	18.4	16.7
73	18.7	18.8	18.4	18.6	15.5
74	19.1	18.8	18.9	18.5	16.3
75	19.0	19.0	18.1	18.4	16.2
76	19.3	19.0	18.4	18.3	16.5

77	19.5	19.2	18.5	18.4	16.1
78	19.1	19.3	18.4	18.5	16.1
79	19.0	18.6	18.3	18.8	18.8
80	19.5	19.2	19.0	18.8	16.4
81	19.8	19.3	18.8	18.6	17.3
83	19.2	18.4	18.0	18.0	16.2
84	19.1	18.6	18.2	18.1	16.1
85	19.1	18.3	18.4	18.7	15.6
86	19.4	18.4	18.9	18.8	17.3
87	18.9	18.3	18.4	17.6	15.7
88	18.9	18.0	18.2	18.6	16.0
Promedio	18.991	18.623	18.426	18.407	16.714
DesvSt	0.582	0.733	0.826	0.594	0.831
Porcentaje de suplementación			1.25%	2.50%	5%
Gramos de suplemento			0.230	0.460	0.836

Anexo 6. Cuantificación de la concentración del Factor de Necrosis Tumoral α

Curva de calibración



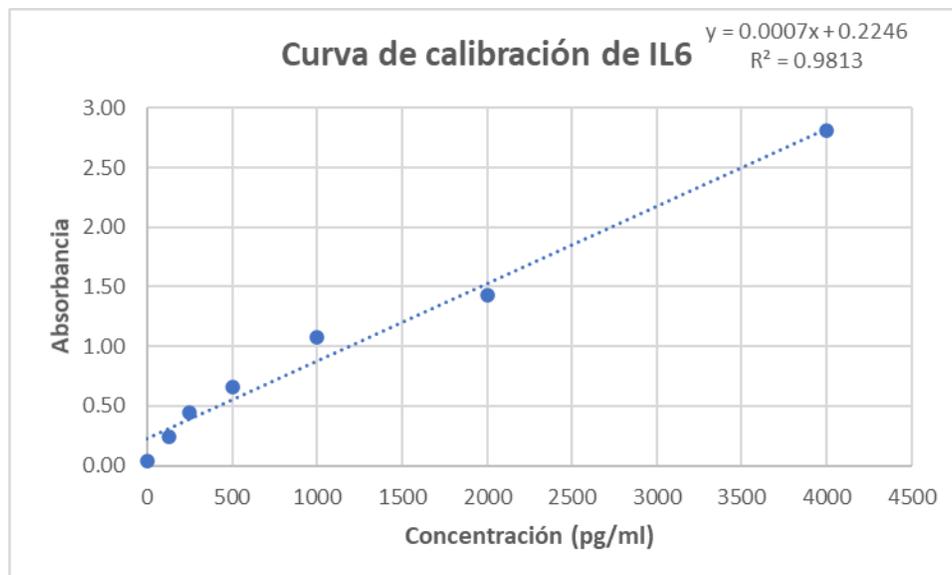
Concentración del FNT- α a partir de la absorbancia medidas en las muestras

Tratamiento	Repetición	Absorbancia	Concentración (pg/ml)	Promedio	DesvSt
T1	1	0.35	69.686	65.000	4.931
	2	0.334	62.188		
	3	0.358	73.438		
	4	0.332	61.250		
	5	0.334	62.188		
	6	0.342	65.938		
	7	0.33	60.313		
T2	1	0.543	245.000	249.375	10.782
	2	0.546	246.875		
	3	0.54	243.125		
	5	0.531	237.500		
	6	0.561	256.250		
	7	0.579	267.500		
T3	1	0.378	141.875	139.375	14.470
	2	0.402	156.875		
	4	0.398	154.375		
	5	0.352	125.625		

	6	0.368	135.625		
	7	0.346	121.875		
T4	1	0.364	133.125	125.625	10.983
	2	0.334	114.375		
	3	0.376	140.625		
	4	0.36	130.625		
	5	0.346	121.875		
	6	0.332	113.125		
T5	1	0.37	136.875	143.958	26.109
	2	0.404	158.125		
	3	0.368	135.625		
	4	0.354	126.875		
	5	0.338	116.875		
	6	0.454	189.375		

Anexo 7. Cuantificación de la concentración de la Interleucina 6

Curva de calibración



Concentración de la IL-6 a partir de la absorbancia medidas en las muestras

Tratamiento	Repetición	Absorbancia	Concentración (pg/ml)	Promedio	DesvSt
T1	1	0.35	69.686	65.000	4.931
	2	0.334	62.188		
	3	0.358	73.438		
	4	0.332	61.250		
	5	0.334	62.188		
	6	0.342	65.938		
	7	0.33	60.313		
T2	1	0.543	245.000	249.375	10.782
	2	0.546	246.875		
	3	0.54	243.125		
	5	0.531	237.500		
	6	0.561	256.250		
	7	0.579	267.500		
T3	1	0.378	141.875	139.375	14.470
	2	0.402	156.875		
	4	0.398	154.375		
	5	0.352	125.625		

	6	0.368	135.625		
	7	0.346	121.875		
T4	1	0.364	133.125	125.625	10.983
	2	0.334	114.375		
	3	0.376	140.625		
	4	0.36	130.625		
	5	0.346	121.875		
	6	0.332	113.125		
T5	1	0.37	136.875	143.958	26.109
	2	0.404	158.125		
	3	0.368	135.625		
	4	0.354	126.875		
	5	0.338	116.875		
	6	0.454	189.375		