TRABAJO DE FIN DE GRADO

Grado en Biomedicina

DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LA INGESTA DE κ-CARRAGENANO SOBRE LAS VÍAS DE Nf-κb y Nrf2 EN ÓRGANOS DE RATONES JÓVENES

Autor: Gloria Ariño Sinusía

ANEXO IX

Título del Trabajo: Determinación del efecto de la ingesta de κ-carragenano sobre las vías de Nf-κb y Nrf2 en órganos de ratones jóvenes

Este trabajo ha sido realizado en la Universidad Europea de Madrid en el grupo *Nanocaging Research Group* perteneciente a la Facultad de Ciencias Biomédicas y de la Salud.

Tutor/es: Dr. Antonio Garrido Tarrío

El presente Trabajo Fin de Grado (TFG) del Grado en Biomedicina titulado:

"Determinación del efecto de la ingesta de κ-carragenano sobre las vías Nf-κb y Nrf2 en órganos de ratones jóvenes"

desarrollado por la estudiante Gloria Ariño Sinusía y dirigido por el Dr. Antonio Garrido Tarrío, forma parte de un Proyecto *OneHealth* titulado:

"Impacto del κ-carragenano en la Salud: Perspectivas biomédicas,

nutricionales y farmacéuticas para analizar su seguridad en colectivos vulnerables".

Este TFG multidisciplinar ha sido elaborado en colaboración con:

Mariana del Carmen Fernández-Fígares Jiménez, estudiante del Grado en Nutrición Humana y Dietética, cuyo TFG ha sido dirigido por la Dra. Esmeralda Parra-Peralbo.

Andrea Olmedo Sánchez, estudiante del Grado en Farmacia, cuyo TFG ha sido dirigido por la Dra. Elena Pérez Izquierdo.

Todos ellos vinculados a la Facultad de Ciencias Biomédicas y de la Salud de la Universidad Europea de Madrid.

Agradecimientos

Concluir este TFG es, en parte, un fin simbólico a 4 años de carrera inolvidables. Para cerrar el transcurso de estos 4 años llenos de crecimiento quisiera extender mis agradecimientos a personas que han sido la clave para poder decir que soy biomédica.

Gracias.

A todo el claustro de profesores por ser mis referentes. Ellos han puesto en mi camino palabras y gestos que han hecho que seguir adelante valiera la pena. Especialmente, gracias a Manu y Antonio.

A Antonio, por embarcarse conmigo no solo en este proyecto sino también a lo largo de estos años. Por abrirme los ojos en muchos aspectos y estimularme a seguir, a buscar y, finalmente, encontrar. Su estímulo ha permitido que crezca y vaya más allá.

A Manu, que me ha acompañado en este transcurso de manera implícita y explícita. Desde aquel libro de Anatomía Aplicada de primero de Bachillerato que tanto estudié, hasta su crucial presencia estos años de carrera llenos de crecimiento. Sin su ayuda yo no hubiera desplegado mis capacidades.

A mi tía, que este último año ha sido mi ejemplo de fortaleza y siempre ha estado ahí. A mi tío, por sus recomendaciones literarias y ser una persona tan jovial.

A todos mis amigos. Que siempre confían en mí más de lo que yo lo hago y siguen siendo las personas con las que más disfruto.

A cada persona que ha formado parte de este camino como aprendizaje, lección o ejemplo. Me gusta pensar que nos construimos de pequeñas partes de los demás.

Y gracias a mis abuelos. Mis yayos. Mi carrera está dedicada a ellos. Son mi más puro ejemplo. Porque ellos me han enseñado que la forma más pura de grandeza está en la sencillez.

"En las profundidades del invierno
finalmente aprendí que en mi interior
habitaba un verano invencible".

Albert Camus, *El verano*

"Quise ser valiente y aprendí a estudiar".

Antonio Escohotado

ABREVIATURAS

AKR1C3/Akr1c3: aldo-keto reductasa familia 1 miembro C3

AKT/Akt: proteína quinasa B

BSA: albúmina sérica bovina (del inglés, *bovine serum albumin*)

CGN: carragenina, carragenano o carragenato

df: grados de libertad (del inglés, *degrees of freedom*)

E-407: aditivo alimentario

ECL: quimioluminiscencia mejorada (del inglés, *enhanced chemiluminescence*)

G6PD/G6pd: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (del inglés, *glucose-6-phosphate dehydrogenase*)

GSH: glutatión reducido (del inglés, *glutathione reduced*)

GSK3β/Gsk3 β: glicógeno sintasa quinasa-3 beta (del inglés, *glycogen synthase kinase-3 beta*)

GLP: Buenas Prácticas de Laboratorio (del inglés, *Good Laboratory Practices*)

HRP: peroxidasa de rábano picante (del inglés, *horseradish peroxidase*)

IKK: complejo IκB quinasa (del inglés, *IκB kinase complex*)

IL-1β/Il-1β: interleucina-1 beta (del inglés, *interleukin 1 beta*)

IL-6/Il-6: interleucina-6 (del inglés, *interleukin 6*)

IL-8/Il-8: interleucina-8 (del inglés, *interleukin 8*)

IL-10/Il-10: interleucina-10 (del inglés, *interleukin 10*)

IκB: inhibidor kappa B (del inglés, *inhibitor kappa B*)

IκBα: inhibidor kappa B alfa (del inglés, *inhibitor kappa B alpha*)

KEAP1/Keap1: proteína Kelch-like ECH-associated 1 (del inglés, *Kelch-like ECH-associated protein 1*)

K-CGN/κ-CGN/k-CGN: kappa-carragenano

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (del inglés, *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)

NIH: Institutos Nacionales de Salud (del inglés, *National Institutes of Health*)

NK: células asesinas naturales (del inglés, *natural killer*)

NKT: células T asesinas naturales (del inglés, *natural killer T cells*)

NF-κB/Nf-κb/Nf-κB: factor nuclear kappa B (del inglés, *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)

NRF2/Nrf2: factor nuclear eritroide 2 relacionado 2 (del inglés, *nuclear factor erythroid 2–related factor 2*)

PBS: solución salina tamponada (del inglés, *phosphate buffered saline*)

PI3K/Pi3k: fosfatidilinositol 3-quinasa (del inglés, *phosphoinositide 3-kinase*)

p-AKT/p-Akt: proteína quinasa B fosforilada

p-GSK3β/p-Gsk3β: glicógeno sintasa quinasa-3 beta fosforilada

ROS: especies reactivas de oxígeno (del inglés, *reactive oxygen species*)

SDS: dodecil sulfato sódico (del inglés, *sodium dodecyl sulfate*)

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (del inglés, *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)

SEM: error estándar de la media (del inglés, *standard error of the mean*)

TBS-T: buffer salino tamponado con Tween-20 (del inglés, *Tris-buffered saline with Tween 20*)

TLR/TLRs: receptores tipo *Toll* (del inglés, *Toll-like receptor(s)*)

t-AKT/t-Akt: proteína quinasa B total

t-NF-κB/t-Nf-κb/t-Nf-κB: factor nuclear kappa B total

TNFα/Tnfα: factor de necrosis tumoral alfa (del inglés, *tumor necrosis factor alpha*)

Índice

1. Resumen 1

2. Introducción 2

3. Objetivos 7

3.1. Objetivo general 7

3.2. Objetivos específicos 7

4. Metodología 7

4.1. Animales y diseño experimental 7

4.2. Preparación de muestras de tejido 8

4.3. Cuantificación de proteínas 8

4.4. Electroforesis y transferencia 9

4.5. Inmunodetección 9

4.6. Revelado y análisis de resultados 9

4.7. Análisis estadístico 10

5. Resultados 11

5.1. Estudio de la expresión proteica hepática 11

5.1.1. Proteínas asociadas a la vía Nrf2 tras tratamiento con κ-CGN 11

5.1.2. Mediadores inflamatorios tras tratamiento con κ-CGN 14

5.1.3. Ratio p-Akt/t-Akt tras tratamiento con κ-CGN 14

5.2. Estudio de la expresión proteica cardiaca 17

5.2.1. Proteínas asociadas a la vía Nrf2 tras tratamiento con κ-CGN 17

5.2.2. Mediadores inflamatorios tras tratamiento con κ-CGN 20

5.2.3. Ratio p-Gsk3β/t-Gsk3β tras tratamiento con κ-CGN 20

5.3. Integración en los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) 22

6. Discusión 23

7. Conclusiones 30

8. ANEXO TFG *OneHealth* 31

8.1. Prólogo 31

8.2 Conclusiones 32

9. Bibliografía 34

1. Resumen

El κ-carragenano (κ-CGN), polisacárido sulfatado ampliamente utilizado como aditivo alimentario, ha generado una inquietud creciente por su potencial para promover procesos inflamatorios y oxidativos sistémicos. Este estudio profundiza en la caracterización molecular de la respuesta hepática y cardiaca tras una exposición oral subcrónica a κ-CGN en ratones Swiss jóvenes (2 meses), administrado a 540 mg/kg/día durante 2 semanas. Los hallazgos revelan una activación significativa y coordinada del eje inflamatorio Nf-κb y antioxidante Nrf2 en hígado de hembras, reflejada en el incremento del cociente Il-1β madura/precursor, la elevación de Nrf2 y G6pd, y la activación del eje regulador Akt/Gsk3β. Este patrón denota una respuesta integrada y adaptativa, que conjuga activación inflamatoria incipiente con mecanismos citoprotectores, situando al hígado como órgano sensible frente al daño oxidativo inducido por κ-CGN. En machos, la respuesta fue más limitada, con escasas alteraciones detectables en estos marcadores, sugiriendo un dimorfismo funcional precoz. En tejido cardiaco, la alteración molecular fue más sutil: mientras los machos exhibieron una tendencia al alza de las vías, las hembras reportaron una inhibición significativa de Gsk3β, que podría preservar la estabilidad redox y modular la inflamación local. Esta divergencia resalta diferencias biológicas en la capacidad de defensa antioxidante y regulación inflamatoria entre sexos. Además, este trabajo aporta evidencia científica acerca de la vía mecanística sobre la opera el κ-CGN y cómo este puede desencadenar daño tisular en un modelo murino. La implicación del eje Akt/Gsk3β se alza como un nodo integrador de las respuesta inflamatoria y oxidativa, siendo un posible blanco estratégico para futuras intervenciones que busquen mitigar el impacto del κ-CGN.

PALABRAS CLAVE: κ-carragenano, estrés oxidativo; inflamación; Nrf2; Nf-κB

2. Introducción

La carragenina o carragenano (CGN) es un polisacárido sulfatado derivado de algas rojas, ampliamente empleado en las industrias alimentaria y farmacéutica debido a sus propiedades gelificantes y estabilizantes. Su estructura está compuesta por unidades repetitivas de D-galactosa enlazadas de forma alternante mediante enlaces α (1→3) y β (1→4), lo que le confiere una notable capacidad para interactuar con cationes, especialmente el potasio, favoreciendo así la formación de geles estables (Pangestuti & Kim, 2014). En la actualidad, aproximadamente el 90 % de la producción mundial de CGN proviene de especies de los géneros *Kappaphycus* y *Eucheuma*, de las cuales se obtienen tres tipos principales de CGN —κ (kappa), ι (iota) y λ (lambda)—, clasificados según el número de grupos sulfato presentes en su estructura (Rupert et al., 2022). Entre ellos, el κ-carragenano (κ-CGN), con un solo grupo sulfato por disacárido y clasificado como aditivo alimentario E-407, constituye una de las formas más habituales en la dieta contemporánea (Udo et al., 2023).

Durante décadas, el κ-CGN ha sido considerado un aditivo alimentario seguro, lo que ha favorecido su incorporación sistemática en numerosos productos procesados, incluidos lácteos, bebidas vegetales, embutidos y preparados infantiles. Esta percepción de inocuidad se ha sustentado en su origen natural, en la ausencia de toxicidad aguda aparente y en evaluaciones regulatorias centradas en exposiciones de corta duración (Weiner, 2016). Desde esta perspectiva, algunos autores argumentaron que el κ-CGN, al unirse fuertemente a proteínas presentes en matrices como el pienso o las fórmulas infantiles, no estaría disponible para interactuar directamente con la mucosa intestinal, limitando así su potencial efecto biológico nocivo (Weiner, 2016). Sin embargo, evidencia más reciente ha comenzado a cuestionar esta supuesta seguridad. Diversos estudios han señalado que la exposición crónica a κ-CGN puede inducir respuestas inflamatorias, comprometer la integridad de la barrera intestinal y alterar procesos relacionados con el estrés oxidativo, especialmente en contextos de susceptibilidad previa. En este sentido, un ensayo clínico aleatorizado demostró que pacientes con colitis ulcerosa en remisión que consumieron dosis moderadas de κ-CGN presentaron una recaída más temprana de la enfermedad junto con un aumento de biomarcadores inflamatorios como la interleucina-6 (IL-6) y la calprotectina fecal (Bhattacharyya et al., 2017). Estos hallazgos reabren el debate sobre el impacto real de ciertos aditivos ampliamente asumidos como inofensivos en la dieta moderna y plantean la necesidad de reevaluar críticamente los patrones alimentarios contemporáneos en los que la exposición prolongada a compuestos como el κ-

CGN podría estar contribuyendo silenciosamente al desarrollo de procesos inflamatorios crónicos.

Uno de los mecanismos moleculares que han sido implicados en los efectos biológicos adversos del κ-CGN es la activación mantenida de rutas proinflamatorias, destacando la vía del factor nuclear kappa B (NF-κB). Esta vía representa un nodo crucial en la regulación de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa frente a señales de peligro celular (Bhattacharyya et al., 2008; Borthakur et al., 2012). En este contexto, la activación de los receptores tipo *Toll* (TLRs) en la membrana celular actúa como evento inicial, desencadenando una cascada intracelular que converge en el complejo IKK. Este complejo fosforila al inhibidor IκBα, promoviendo su degradación proteasomal y permitiendo la liberación del dímero NF-κB. Una vez liberado, NF-κB es fosforilado y transloca al núcleo, donde se une a regiones promotoras específicas para inducir la transcripción de genes proinflamatorios como *IL-1β*, *IL-6* o *IL-8*. Esta activación génica favorece el desarrollo y la amplificación de la respuesta inflamatoria, así como el reclutamiento de células inmunes, promoviendo un entorno tisular proinflamatorio (Tak & Firestein, 2001) (**Figura 1A**).

Paralelamente, el estado redox celular también parece verse alterado en respuesta a la exposición a κ-CGN. Estructuralmente, la molécula de κ-CGN contiene grupos funcionales hidroxilo y sulfato, los cuales han sido ampliamente descritos como promotores de especies reactivas de oxígeno (ROS, de sus siglas en inglés) (Moloney & Cotter, 2018). En este contexto, la vía antioxidante regulada por el *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (NRF2) y su inhibidor *Kelch-like ECH-associated protein 1* (KEAP1) constituye el principal sistema citoprotector frente al estrés oxidativo, presumiblemente, inducido por κ-CGN, controlando la expresión de una amplia batería de genes antioxidantes y detoxificantes. En condiciones fisiológicas, NRF2 permanece secuestrado en el citoplasma por KEAP1, que actúa como sensor redox y facilita su degradación proteasomal. Sin embargo, ante un aumento de ROS, modificaciones estructurales en residuos sulfhidrilo de KEAP1 conducen a su inactivación y permiten la liberación de NRF2. Este factor de transcripción se transloca entonces al núcleo, donde forma heterodímeros con proteínas Maf, uniéndose a elementos de respuesta antioxidante (ARE, de sus siglas en inglés) en los promotores génicos, y activando la transcripción de genes implicados en la defensa frente al daño oxidativo (Adinolfi et al., 2023) (**Figura 1B**).

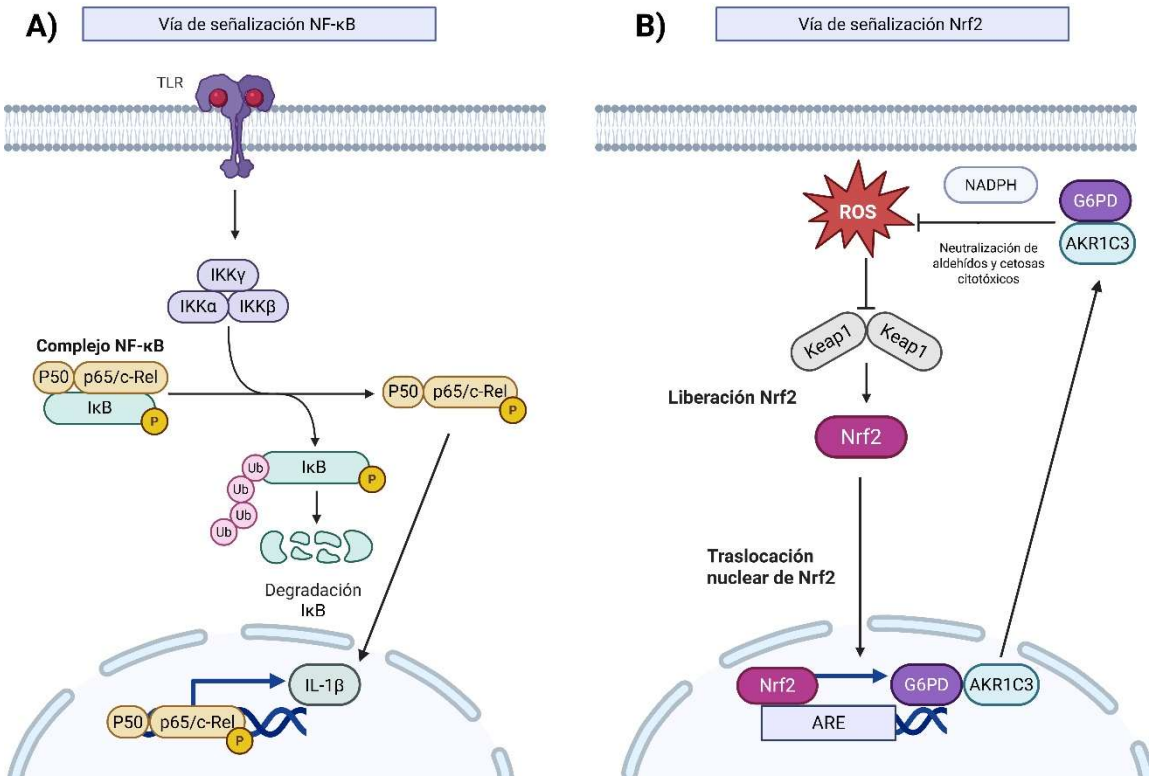

Figura 1. Activación diferencial de las vías de señalización NF-κB y NRF2 en respuesta a estímulos proinflamatorios y ROS. (A) La vía NF-κB se activa tras el reconocimiento de señales de peligro por los receptores tipo *Toll*, lo que desencadena la fosforilación del complejo IκB por parte del complejo IKK (IKKα, IKKβ, IKKγ). La posterior degradación del inhibidor IκB libera al complejo NF-κB (p65/p50), que transloca al núcleo y promueve la transcripción de genes proinflamatorios como *IL-1β*. **(B)** En condiciones de estrés oxidativo, las ROS inducen la disociación de Nrf2 del complejo KEAP1, lo que permite su estabilización y translocación al núcleo. Una vez allí, NRF2 se une a elementos de respuesta antioxidante (ARE), activando la expresión de genes citoprotectores como *G6PD* y *AKR1C3*, implicados en la neutralización de aldehídos y cetosas citotóxicos. Creado con Biorender.com.

Entre los genes diana más relevantes de la ruta de NRF2/KEAP1 se encuentran glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (*G6PD)* y aldo-keto reductasa familia 1 miembro C3 (*AKR1C3)*. G6PD cataliza la primera reacción de la vía de las pentosas fosfato, siendo responsable de la generación de NADPH, una coenzima esencial para la regeneración del glutatión reducido (GSH) y el mantenimiento del potencial redox intracelular (He et al., 2020). A través de su regulación positiva sobre G6PD, NRF2 garantiza un suministro adecuado de NADPH, indispensable no solo para la síntesis de GSH, sino también para el funcionamiento de otros sistemas antioxidantes, como la tiorredoxina reductasa. De forma análoga, NRF2 regula la expresión de AKR1C3, que desempeña un papel fundamental en la detoxificación de aldehídos reactivos generados durante la peroxidación lipídica. En particular, AKR1C3 permite reducir compuestos como el 4-hidroxinonenal (4-HNE) a formas menos reactivas, protegiendo

así la integridad de membranas celulares, proteínas estructurales y material genético (Penning, 2017).

Por tanto, la activación sostenida de la vía proinflamatoria NF-κB y la disrupción del eje antioxidante NRF2/KEAP1 configuran un entorno celular propenso al daño persistente. Ambas rutas, lejos de actuar de forma independiente, mantienen una estrecha interrelación funcional: mientras NF-κB promueve la expresión de mediadores proinflamatorios y la producción de ROS, NRF2 contrarresta estos efectos mediante la inducción de sistemas antioxidantes y detoxificantes. En este contexto, la exposición continuada a κ-CGN podría alterar este equilibrio dinámico, favoreciendo un estado de inflamación de bajo grado y estrés oxidativo mantenido en el tiempo, promoviendo el desarrollo o progresión de estados patológicos.

Dentro del binomio inflamación–estrés oxidativo, adquiere especial protagonismo la interacción funcional entre la glicógeno sintasa quinasa-3 beta (GSK3β) y la proteína quinasa B (AKT), dos nodos de control crítico en la convergencia de las vías proinflamatoria y antioxidante. El equilibrio dinámico entre ambos determina la activación relativa de NF-κB y NRF2, definiendo así el predominio de señales citotóxicas o citoprotectoras según el estado celular. En este circuito, GSK3β y AKT actúan como moduladores opuestos: mientras que la forma activada de GSK3β (no fosforilada) favorece la transcripción de citocinas proinflamatorias como IL-1β a través de la potenciación de NF-κB, AKT atenúa esta respuesta al fosforilar e inhibir GSK3β, modulando negativamente la inflamación (Zhou et al., 2022; Cuzzocrea et al., 2006). De forma paralela, GSK3β reprime la vía antioxidante al marcar a NRF2 para su degradación proteasomal, impidiendo su acumulación nuclear y la inducción de genes como *AKR1C3* o *G6PD*, esenciales para la defensa ante un estrés oxidativo (Bitra et al., 2024). Esta doble acción de GSK3β—promotora de inflamación e inhibidora de citoprotección—contribuye a consolidar un entorno celular desfavorable bajo condiciones de estrés oxidativo. En contraposición, la activación de AKT bloquea esta deriva al inhibir GSK3β y facilitar la estabilización de NRF2, frenando la inflamación y restaurando la homeostasis oxidativa. Esta intersección entre NF-κB y NRF2, regulada en gran parte por el eje AKT/GSK3β, representa un punto estratégico de intervención para romper el círculo vicioso que sostiene la inflamación crónica y el deterioro celular progresivo.

En este contexto, el estudio reciente de Félix et al. (2024) proporciona una evidencia crucial sobre los efectos sistémicos derivados de una exposición precoz a κ-CGN. En su modelo

experimental ratones jóvenes de dos meses de edad fueron expuestos durante 15 días a una dosis elevada de κ-CGN (540 mg/kg/día), representativa de escenarios de ingesta máxima en población infantil. Los resultados fueron reveladores: los animales presentaron niveles elevados de ansiedad, alteraciones comportamentales indicativas de estrés, deterioro de la función inmunitaria innata y un aumento significativo de biomarcadores de estrés oxidativo e inflamación sistémica. Estas alteraciones persistieron a lo largo de la vida, incluso en la vejez, y se asociaron con una reducción significativa de la longevidad respecto a los controles. En definitiva, estos hallazgos parecen indicar que la exposición temprana a κ-CGN no solo altera de forma duradera la homeostasis fisiológica, sino que también favorece el desarrollo de un fenotipo de envejecimiento prematuro, definido por disfunciones inmunológicas y alteraciones redox-inflamatorias persistentes.

El estudio de Félix et al. (2024) evidenció un dimorfismo sexual progresivo en la respuesta a κ-CGN. Mientras que en etapas tempranas no se observaron diferencias relevantes, a partir de los siete meses las hembras mostraron mayor reactividad inmunológica y ansiedad. En la vejez, estas diferencias se intensificaron, con un deterioro conductual más acusado en hembras, aunque acompañado de una mejor preservación de la capacidad antioxidante. Estos datos sugieren una evolución diferencial del envejecimiento inducido por κ-CGN, posiblemente modulada por factores hormonales e inmunometabólicos**.** Sin embargo, aunque los resultados de Félix et al. (2024) demostraron disfunciones fisiológicas sistémicas tras la exposición a κ-CGN, los mecanismos moleculares subyacentes en órganos clave permanecen escasamente caracterizados. Tejidos como el hígado y el corazón podrían constituir dianas vulnerables al daño inducido por κ-CGN, reflejando una afectación sistémica que trasciende la mucosa intestinal (Bhattacharyya et al., 2012; Wang et al., 2022). Considerando todo lo anteriormente comentado, el objetivo de este trabajo fue profundizar en la caracterización de las rutas de inflamación y oxidación en órganos (hígado y corazón) de ratones tanto machos como hembras alimentados durante 15 días con κ-CGN (540 mg/kg/día), con el propósito de dilucidar los posibles mecanismos mediante los cuales esta exposición temprana al aditivo alimentario podría comprometer la homeostasis tisular y sistémica.

3. Objetivos

Con el fin de comprender los mecanismos moleculares subyacentes al impacto de la exposición a CGN en órganos clave como el hígado y el corazón, se plantean los siguientes objetivos.

3.1. Objetivo general

- Analizar el estado de activación de los factores de transcripción claves de las vías de inflamación y oxidación (Nf-κb y Nrf2) en hígado y corazón de ratones jóvenes expuestos a κ-CGN.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar la actividad de los reguladores principales de las vías antioxidante (Nrf2/Keap1) e inflamatoria (Nf-κb) así como analizar la expresión de varios efectores de ambas vías (G6pd/Akr1c3 y Il-1β).
- Determinar el estado de activación de los nodos principales de comunicación entre la vía de inflamación y oxidación (GSK3β y Akt).
- Evaluar el posible dimorfismo sexual de las vías de la inflamación y la oxidación tras la ingesta de κ-CGN.

4. Metodología

4.1. Animales y diseño experimental

Se emplearon ratones macho y hembra jóvenes de la cepa Swiss (2 meses de edad) para evaluar el efecto de la ingesta de κ-CGN sobre las vías de inflamación (NF-κB) y oxidación (NRF2) en distintos órganos (hígado y corazón). Esta cepa, de carácter genéticamente heterogéneo, facilita la extrapolación de resultados a modelos fisiológicos complejos, proporcionando una aproximación robusta a los mecanismos de homeostasis y desregulación celular (Klöting et al., 2003). Los animales fueron mantenidos en condiciones ambientales controladas (22±2 °C, 50–60 % de humedad relativa, ciclo luz-oscuridad invertido de 12 h/12 h, con luces apagadas a las 08:00 AM), con el fin de minimizar las fluctuaciones circadianas. Se garantizó un estado nutricional homogéneo mediante acceso *ad libitum* a agua y dieta estándar A04 (Panlab S.L., Barcelona, España), siguiendo las recomendaciones del *American*

Institute of Nutrition para roedores de laboratorio. El protocolo seguido en este trabajo fue aprobado por el Comité Ético de la Universidad Complutense de Madrid, así como por la Consejería de Medio Ambiente, Agricultura e Interior de la Comunidad de Madrid (PROEX 224.0/21). Todos los animales fueron tratados de acuerdo con la directiva del Consejo de la Comunidad Europea (ECC/566/2015).

Los ratones macho y hembra se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos experimentales (N=10 por grupo):

- Grupo control: recibieron agua *ad libitum*.
- Grupo κ-CGN: recibieron 540 mg/kg/día de κ-CGN disuelto en 200 µL de agua mineral, administrado por micropipeta durante 15 días.

La dosis administrada se basó en estimaciones de exposición máxima en humanos (Younes et al., 2018). Finalizado el tratamiento, los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical, y se extrajo el hígado y el corazón para su análisis posterior.

4.2. Preparación de muestras de tejido

Los órganos extraídos fueron lavados con PBS frío y congelados a -80 °C hasta su procesamiento. Para la extracción proteica, los tejidos fueron homogeneizados en tampón RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 0.5 % deoxicolato de sodio, 0.1 % SDS), complementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas (SIGMAFAST, Sigma-Aldrich). La homogeneización se realizó en hielo manualmente. Posteriormente, las muestras fueron incubadas 30 minutos a 4 °C con agitación manual y centrifugadas a 12.000 rpm durante 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante se recuperó y almacenó a -80 °C para su análisis.

4.3. Cuantificación de proteínas

La concentración proteica se determinó mediante el ensayo del ácido bicincronínico (BCA *assay*, Thermo Scientific), utilizando albúmina sérica bovina (BSA, Sigma-Aldrich) como proteína patrón. Las absorbancias se midieron a 562 nm en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).

4.4. Electroforesis y transferencia

Se prepararon extractos proteicos a una concentración de 30–50ug de proteína (dependiendo el estudio) para su posterior separación mediante una electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) utilizando el sistema Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad). Dado el diferente tamaño molecular de las proteínas de estudio (desde 30 a 110 KDa), las muestras se desarrollaron en geles del 8 y 12% con el objetivo de poder determinar la correcta expresión de las mismas. La electroforesis se llevó a cabo a 90 V en la fase de apilamiento y 120 V en la fase de separación. Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa a 110 V durante 1 hora a 4 °C.

4.5. Inmunodetección

Las membranas fueron bloqueadas con TBS-T (0.1 % Tween-20) suplementado con 5 % de leche desnatada durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubaron toda la noche a 4 °C con los anticuerpos primarios: NRF2 (1:1000, Cell Signaling Technology), KEAP1 (1:1000, Cell Signaling Technology), G6PD (1:1000, Cell Signaling Technology), AKR1C3 (1:1000, Cell Signaling Technology, NF-κB p65 (1:1000, Cell Signaling Technology), GSK3β (1:1000, Cell Signaling Technology), p- Gsk3β (1:1000, Cell Signaling Technology) IL-1β (1:1000, Cell Signaling Technology). Como control de carga se utilizó β-actina (1:5000, Cell Signaling Technology).

Tras 3 lavados en TBS-T (3 × 10 minutos), se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con HRP (*horseradish peroxidase*) según la especie en la que se obtuvo el anticuerpo primario (anti-rabbit IgG, 1:5000, Cell Signaling Technology; anti-mouse IgG, 1:5000) durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas fueron lavadas nuevamente con TBS-T (3x10 minutos) y preparadas para su revelado.

4.6. Revelado y análisis de resultados

Las proteínas fueron visualizadas mediante quimioluminiscencia (ECL, Thermo Scientific) en un sistema ChemiDoc MP (Bio-Rad). La cuantificación de las bandas se realizó mediante el empleo del software ImageJ (NIH, USA), normalizando la densidad de cada proteína de interés respecto al control de carga β-actina o la proteína total en el caso de las proteínas fosforiladas. Las ratios de Il-1b madura/Il-1b precursor fueron calculadas tras su normalización.

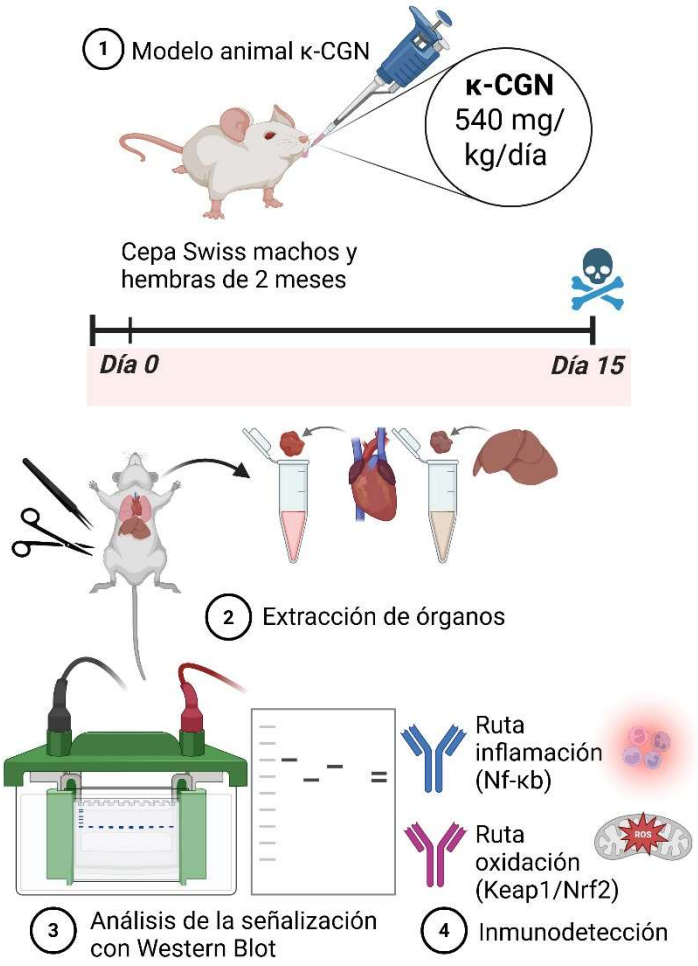

Figura 2. Metodología experimental. Esquema del flujo experimental para el estudio del efecto del κ-CGN en ratones Swiss jóvenes. **(1)** Administración oral diaria de κ-CGN a una dosis de 540 mg/kg durante 15 días en machos y hembras de 2 meses. **(2)** Extracción de órganos (hígado y corazón) tras el periodo de exposición. **(3)** Análisis de la señalización celular mediante Western blot para evaluar las rutas inflamatoria (Nf-κb) y oxidativa (Keap1/Nrf2). **(4)** Inmunodetección de marcadores específicos para caracterizar la respuesta inflamatoria y oxidativa. Creado con BioRender.com.

4.7. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el software GraphPad Prism v9. Para evaluar las diferencias entre los grupos control y tratados con κ-CGN, se utilizó el t-test de Student para muestras independientes, asumiendo distribución normal de los datos (mediante el test de Shapiro-Wilk) y varianzas iguales (mediante el test de Levene). Los datos de expresión proteica fueron previamente relativizados frente a β-actina y posteriormente normalizados frente a la media del grupo control, expresándose como porcentaje relativo ± error estándar de la media (SEM). En cada comparación, GraphPad Prism calculó el estadístico *t*, los grados de libertad (df) y el valor *p* correspondiente. Se consideraron estadísticamente significativos aquellos

resultados con $p < 0.05$. La significación se representó gráficamente mediante el sistema de asteriscos convencional donde: *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$.

5. Resultados

5.1. Estudio de la expresión proteica hepática

5.1.1. Proteínas asociadas a la vía Nrf2 tras tratamiento con κ-CGN

La cuantificación de las proteínas Nrf2, G6pd, Keap1 y Akr1c3 en tejido hepático de ratones hembra reveló patrones de expresión diferenciales tras la administración de κ-CGN.

En hembras, Nrf2 mostró una mayor expresión, siendo esta significativa en el grupo tratado respecto al control (*$t = 4.576, p = 0.010$*), lo que podría indicar una activación robusta de la respuesta antioxidante mediada por este factor de transcripción. Consecuentemente, G6pd, efector de la vía de Nrf2, presentó una tendencia similar a la previamente observada en el regulador principal de la vía de señalización (Nrf2), esto es, una mayor expresión de esta proteína en el grupo tratado en comparación con los animales control (*$t = 2.65, p = 0.038$*), sugiriendo una potenciación de la vía de las pentosas fosfato y, por ende, del metabolismo antioxidante asociado. Sin embargo, el regulador negativo de Nrf2, Keap1, no presentó diferencias significativas entre ambos grupos experimentales (*$t = 0.70, p = 0.513$*), aunque se observó una tendencia leve al alza en el grupo tratado. Finalmente, la expresión de Akr1c3 fue similar en ambos grupos experimentales (*$t = 0.60, p = 0.569$*), manteniendo un perfil de expresión relativamente homogéneo frente al tratamiento (**Figura 3**).

En machos, ninguna de las proteínas analizadas mostró diferencias estadísticamente significativas tras el tratamiento con κ-CGN. Nrf2 *($t = 0.67, p = 0.527$)*, Keap1 (*$t = 1.16, p = 0.289$*), G6pd (*$t = 0.45, p = 0.669$*) y Akr1c3 (*$t = –0.66, p = 0.537$*) presentaron niveles medios similares entre los grupos control y tratado, sin evidencia de activación ni represión detectables atribuibles al tratamiento (**Figura 4**).

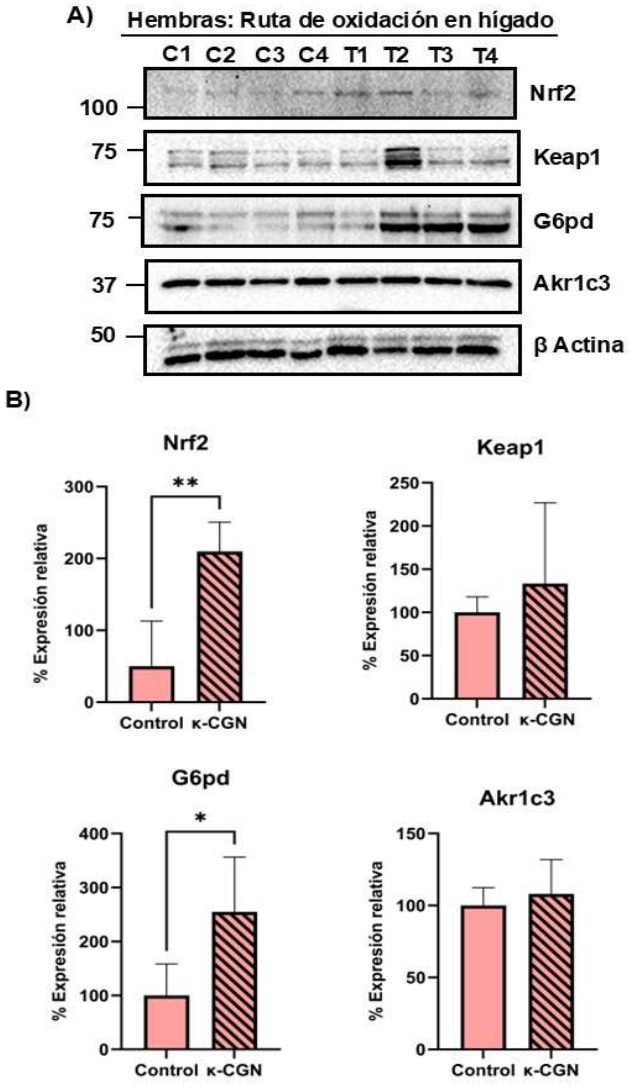

Figura 3. Análisis de la expresión hepática de la señalización celular de la vía Nrf2 en ratones hembra. (A) Expresión proteica de Nrf2, Keap1, G6pd y Akr1c3 en hígado de ratones hembra jóvenes tras la exposición a κ-CGN, mediante Western blot. Se empleó β-actina como control de carga. **(B)** Cuantificación densitométrica de la expresión relativa de cada proteína respecto al grupo control, expresada como media ± error estándar de la media (SEM). N=4. Las comparaciones estadísticas se realizaron mediante t-test de Student para muestras independientes. *$p < 0.05$. ** $p < 0.01$.

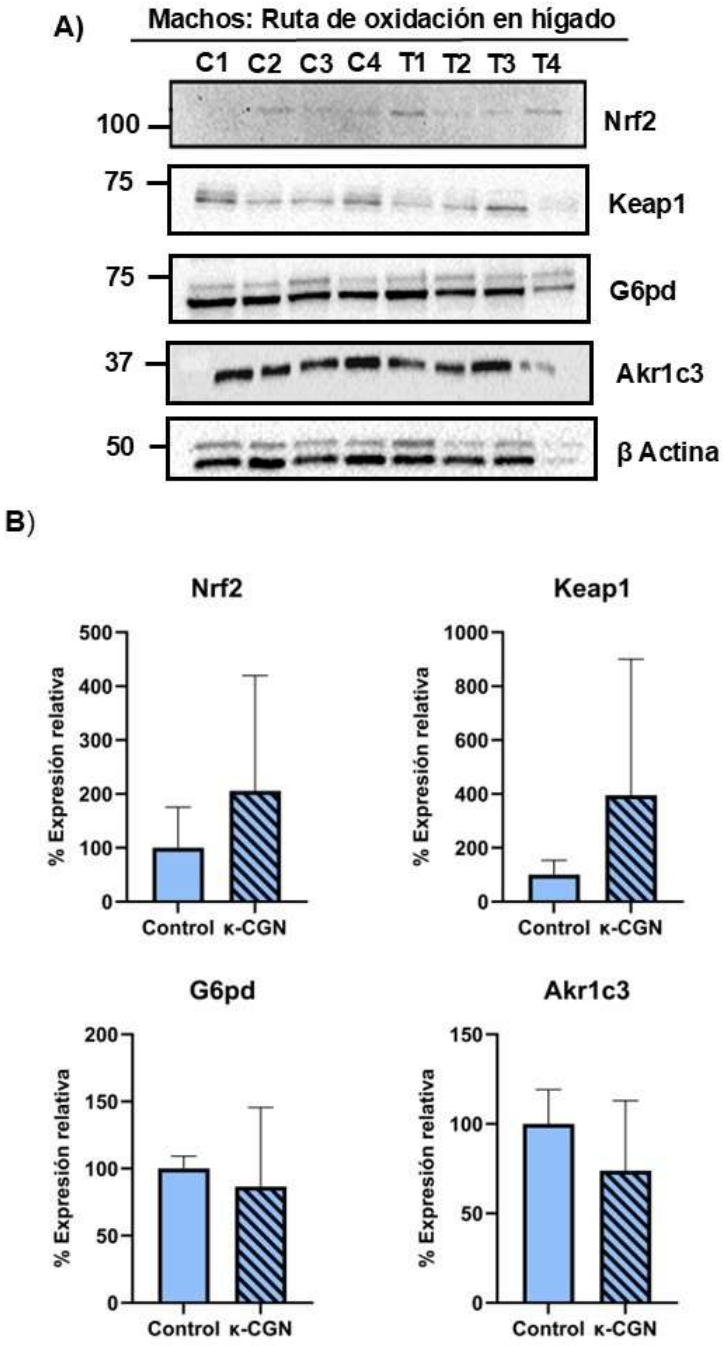

Figura 4. Análisis de la expresión hepática de la señalización celular de la vía Nrf2 en ratones macho. (A) Expresión proteica de Nrf2, Keap1, G6pd y Akr1c3 en hígado de ratones macho tras la exposición a κ-CGN, mediante Western blot. Se empleó β-actina como control de carga. **(B)** Cuantificación densitométrica de la expresión relativa de cada proteína respecto al grupo control, expresada como media ± error estándar de la media (SEM). N=4. Las comparaciones estadísticas se realizaron mediante t-test de Student para muestras independientes.

En conclusión, los resultados apuntan a que las hembras tratadas con κ-CGN presentan una activación de la vía antioxidante acusada y estadísticamente consistente. Estas observaciones podrían sugerir una posible sensibilidad diferencial al tratamiento en función del sexo, reflejando variaciones en la capacidad adaptativa frente al estrés oxidativo inducido por κ-CGN.

5.1.2. Mediadores inflamatorios tras tratamiento con κ-CGN

La evaluación de proteínas implicadas en la respuesta inflamatoria, como NF-Kb total (t-NF-κB) y el cociente Il-1β madura/inmadura, reveló patrones de expresión diferenciales entre sexos tras la administración de κ-CGN.

En hembras, t-Nf-κb no mostró diferencias estadísticamente significativas entre grupos (*t = 1.228, p = 0.2654*), aunque se observó una ligera elevación de la media en los animales tratados. Sin embargo, el cociente Il-1β madura/inmadura presentó una mayor expresión en el caso de las hembras tratadas con κ-CGN (*t = 2.837, p = 0.047*), hecho que podría estar reflejando un mayor procesamiento de esta en estos animales (**Figura 5B**).

Por su parte, los niveles de t-Nf-κb en machos se mantuvieron de forma similar en ambos grupos experimentales (*t = –1.23, p = 0.265*). Además, el cociente Il-1β madura/inmadura no mostró una modulación significativa por efecto del tratamiento (*t = –1.04, p = 0.356*), pese a una mayor dispersión de los valores observados (**Figura 6B**).

Los resultados indican una modulación parcial de la vía inflamatoria tras el tratamiento con κ-CGN, siendo esta más pronunciada en hembras. En particular, se observa un mayor procesamiento de la citocina Il-1β en el hígado de hembras, lo que sugiere una activación inflamatoria más marcada en este sexo, posiblemente condicionada por diferencias hormonales o del sistema inmunitario. Por otro lado, no se detectó un aumento significativo en la expresión del factor de transcripción Nf-κB en ninguno de los sexos, mientras que los machos no mostraron alteraciones relevantes en la vía inflamatoria tras la ingesta de κ-CGN.

5.1.3. Ratio p-Akt/t-Akt tras tratamiento con κ-CGN

La cuantificación de la ratio Akt fosforilado (p-Akt)/Akt total (t-Akt) en hígado de ratones hembra y macho permitió evaluar la activación de la vía de señalización Akt tras la exposición a κ-CGN.

En hembras, se observó un aumento significativo de esta ratio en el grupo tratado respecto al control (*t = 2.649, p = 0.0381*), indicando una activación de la vía Akt como posible mecanismo de respuesta frente al tratamiento. Este resultado podría sugerir un papel activo de la fosforilación de Akt en la modulación intracelular del estrés inducido por κ-CGN en tejido hepático femenino (**Figura 5D**).

Por el contrario, en machos, no se observaron diferencias significativas entre los grupos experimental y control (*t = 0.999, p = 0.374*), a pesar de una dispersión elevada en los valores del grupo tratado (**Figura 6D**).

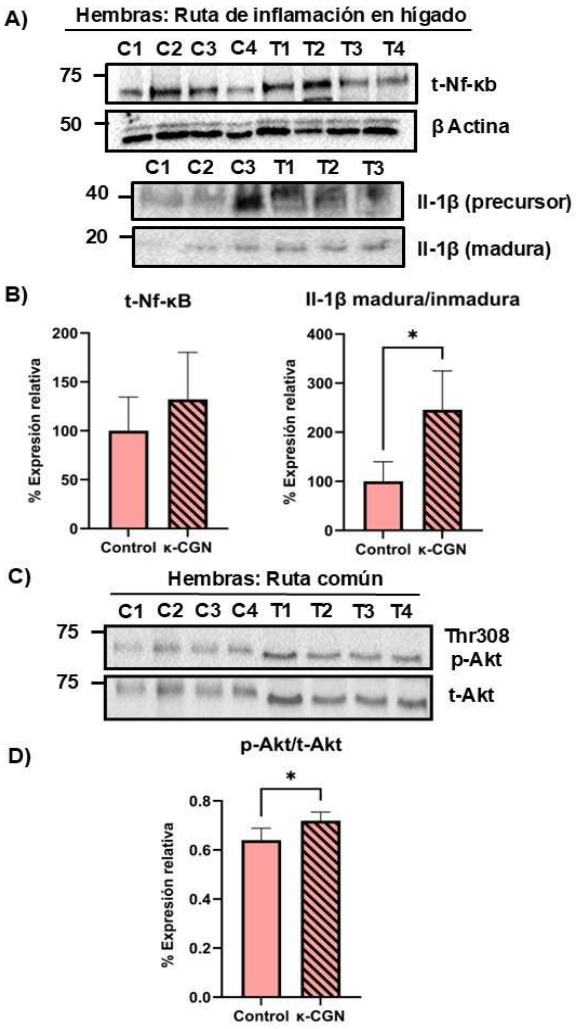

Figura 5. Análisis de la expresión hepática de mediadores inflamatorios y de la ratio p-Akt/t-Akt en ratones hembra. (A, C) Expresión proteica de t-NF-κB e IL-1β (formas precursora y madura) y de p-Akt/t-Akt en corazón de ratones hembra tras la exposición a κ-CGN, mediante Western blot. Se empleó β-actina como control de carga para t-NF-κB. **(B, D)** Cuantificación densitométrica de la expresión relativa de t-NF-κB, del cociente IL-1β madura/inmadura y de p-Akt/t-Akt respecto al grupo control, expresada como media ± error estándar de la media (SEM). N≥3. Las comparaciones estadísticas se realizaron mediante t-test de Student para muestras independientes. **p* < 0.05.

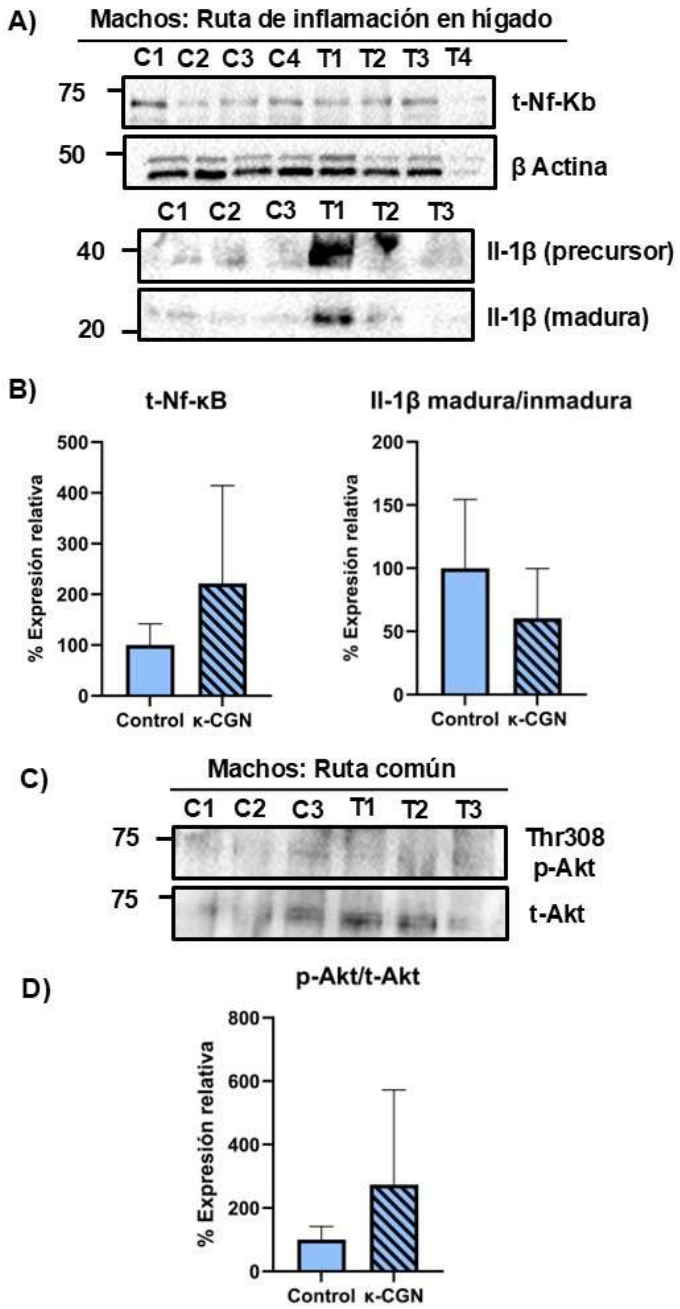

Figura 6. Análisis de la expresión hepática de mediadores inflamatorios y de la ratio p-Akt/t-Akt a las vías en ratones macho. (A-C) Expresión proteica de t-NF-κB e IL-1β (formas precursora y madura) y la ratio p-Akt/t-Akt en hígado de ratones macho tras la exposición a κ-CGN, mediante Western blot. Se empleó β-actina como control de carga para t-NF-κB. **(B-D)** Cuantificación densitométrica de la expresión relativa de t-NF-κB y del cociente IL-1β madura/inmadura y de la ratio p-Akt/t-Akt respecto al grupo control, expresada como media ± error estándar de la media (SEM). N≥3. Las comparaciones estadísticas se realizaron mediante t-test de Student para muestras independientes.

5.2. Estudio de la expresión proteica cardiaca

5.2.1. Proteínas asociadas a la vía Nrf2 tras tratamiento con κ-CGN

De forma similar a lo previamente observado en el caso del hígado, la cuantificación de las proteínas Nrf2, G6pd, Keap1 y Akr1c3 en tejido cardíaco de ratones hembra y macho reveló patrones de expresión dispares tras la administración de κ-CGN.

A diferencia de tejido hepático, en hembras la mayoría de las proteínas analizadas presentaron niveles de expresión similares entre ambos grupos experimentales. Nrf2 aunque mostró una ligera elevación en el grupo tratado, ésta no fue significativa ($t = 0.577$, $p = 0.595$). De forma similar, Keap1 presentó valores similares entre condiciones ($t = 0.20$, $p = 0.853$). Sólo G6pd reveló una mayor expresión proteica significativa en el tejido cardiaco del grupo tratado ($t = 2.938$, $p = 0.0425$) en comparación con los ratones control. En el caso de Akr1c3, este efector también mostró una tendencia, aunque no significativa ($t = 2.68$, $p = 0.055$), a aumentar en el grupo expuesto a κ-CGN (**Figura 7**).

Por su parte, en machos, solo Akr1c3 alcanzó significación estadística, con una mayor expresión en el grupo tratado respecto al control ($t = 6.78$, $p = 0.0025$), hecho que podría sugerir una inducción sostenida de esta enzima tras la exposición a κ-CGN. Por el contrario, Nrf2 ($t = 1.52$, $p = 0.203$), Keap1 ($t = 2.12$, $p = 0.101$) y G6pd ($t = 0.69$, $p = 0.526$) no mostraron diferencias significativas entre grupos, si bien Nrf2 y Keap1 presentaron una posible tendencia al alza (**Figura 8**).

Por tanto, los resultados parecen indicar que tanto en el tejido cardiaco de hembras como de machos existe una mayor expresión de efectores relacionados con la vía de oxidación consecuencia de la ingesta de κ-CGN. No obstante, los efectores son diferentes (G6pd en hembras versus Akr1c3 en machos), hecho que podría estar indicando un dimorfismo sexual en la forma de contrarrestar un presumible aumento de ROS por la ingesta de κ-CGN.

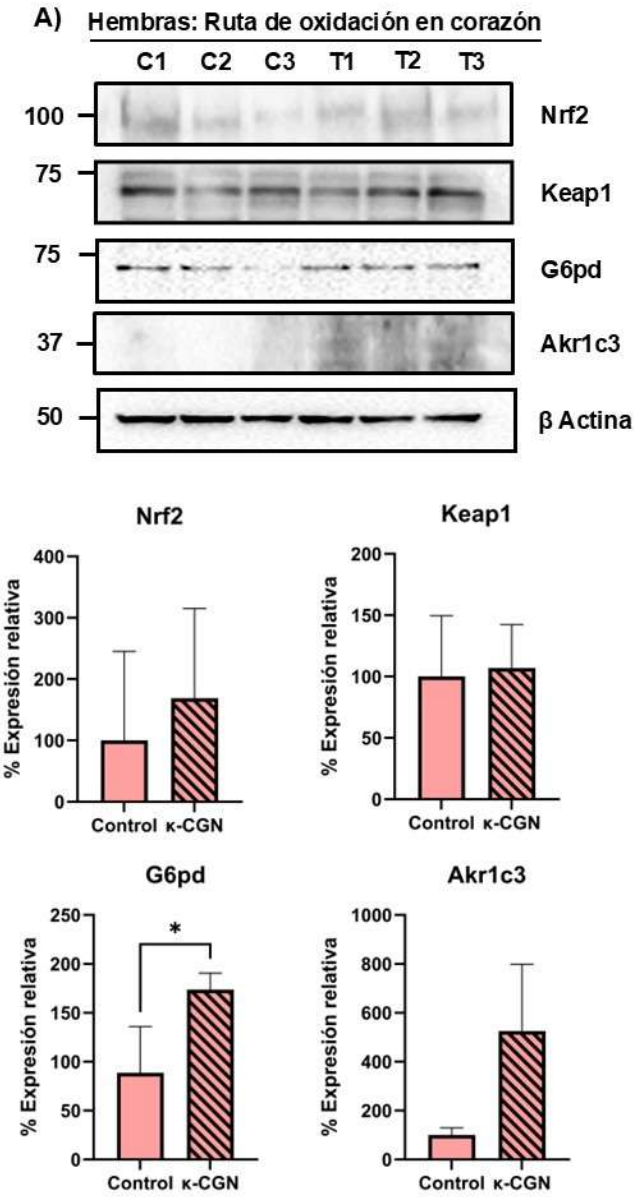

Figura 7. Análisis de la expresión cardiaca de mediadores de la vía de Nrf2 en ratones hembra. (A) Expresión proteica de Nrf2, Keap1, G6pd y Akr1c3 en corazón de ratones hembra jóvenes tras la exposición a κ-CGN, mediante Western blot. Se empleó β-actina como control de carga. **(B)** Cuantificación densitométrica de la expresión relativa de cada proteína respecto al grupo control, expresada como media ± error estándar de la media (SEM). N ≥3. Las comparaciones estadísticas se realizaron mediante t-test de Student para muestras independientes. *$p < 0.05$.

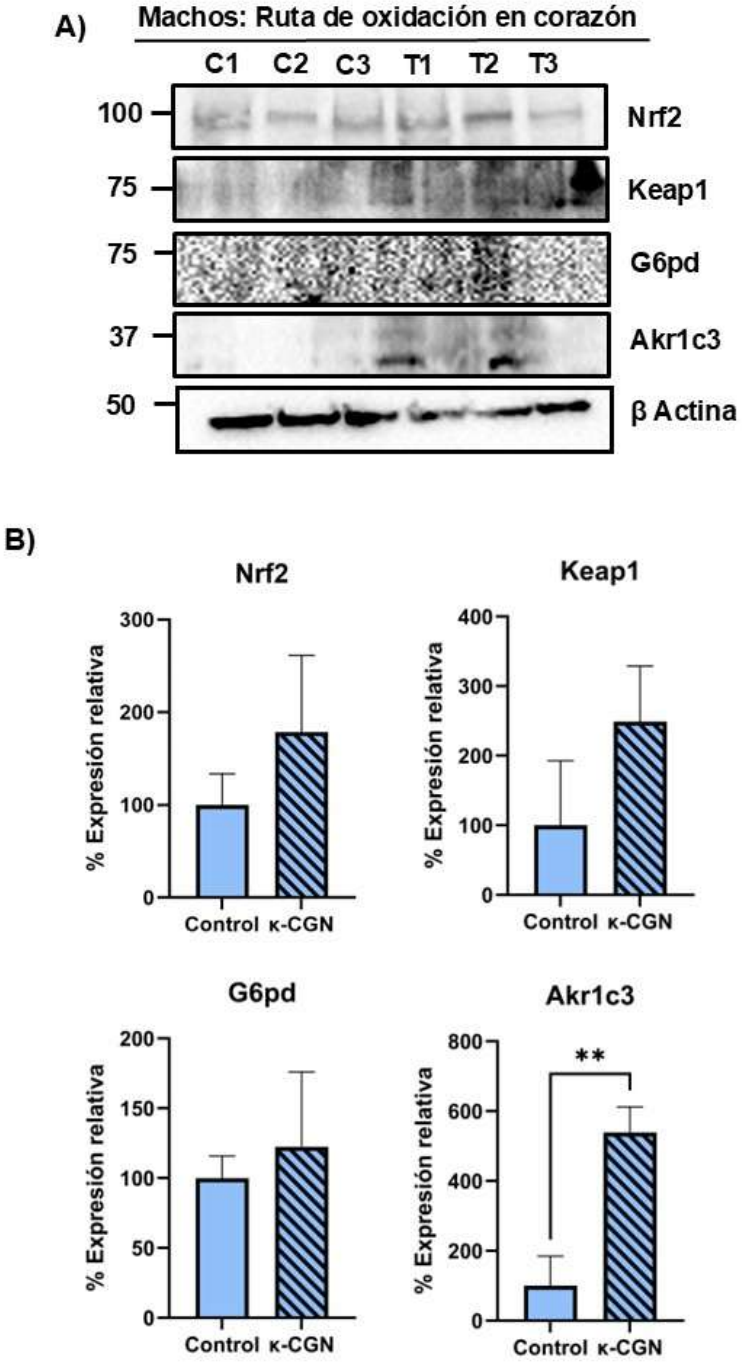

Figura 8. Análisis de la expresión cardiaca de mediadores de la vía de Nrf2 en ratones macho. **(A)** Expresión proteica de Nrf2, Keap1, G6pd y Akr1c3 en corazón de ratones macho jóvenes tras la exposición a κ-CGN, mediante Western blot. Se empleó β-actina como control de carga. **(B)** Cuantificación densitométrica de la expresión relativa de cada proteína respecto al grupo control, expresada como media ± error estándar de la media (SEM). N≥3. Las comparaciones estadísticas se realizaron mediante t-test de Student para muestras independientes. $^{**}p < 0.01$.

5.2.2. Mediadores inflamatorios tras tratamiento con κ-CGN

En el tejido cardiaco de hembras no se observaron diferencias significativas en la expresión de Nf-κB ni del precursor Il-1β tras la exposición a κ-CGN (*t = –0.404, p = 0.707* y *t = 0.182, p = 0.864*, respectivamente). Los niveles medios se mantuvieron relativamente estables entre condiciones, sin indicios de activación inflamatoria detectable en los marcadores analizados (**Figura 9B**).

De forma similar, en machos, Nf-κB y el precursor de Il-1β tampoco presentaron diferencias estadísticamente significativas tras el tratamiento (*t = 0.83, p = 0.452* y *t = 1.81, p = 0.144*, respectivamente), aunque en el caso de este último efector (Il-1β) se observó una tendencia ascendente no significativa en el grupo tratado (**Figura 10B**).

Por tanto, los resultados indican que la ingesta de κ-CGN no afecta a la vía inflamatoria en el tejido cardiaco tanto de ratones jóvenes hembra como macho.

5.2.3. Ratio p-Gsk3β/t-Gsk3β tras tratamiento con κ-CGN

La cuantificación de la ratio p-GSK3β/t-GSK3β en corazón de ratones hembra reveló una diferencia significativa entre los grupos experimental y control tras la administración de κ-CGN (*t = 2.90, p = 0.044*). El aumento en la expresión de GSK3β fosforilado en el grupo tratado sugiere una activación de esta vía intracelular, que podría estar implicada en la respuesta adaptativa o inflamatoria inducida por el tratamiento (**Figura 9D**).

En el caso de los ratones macho, no se dispone de datos para este marcador, por lo que no ha sido posible evaluar si la activación observada en hembras está también presente en este sexo.

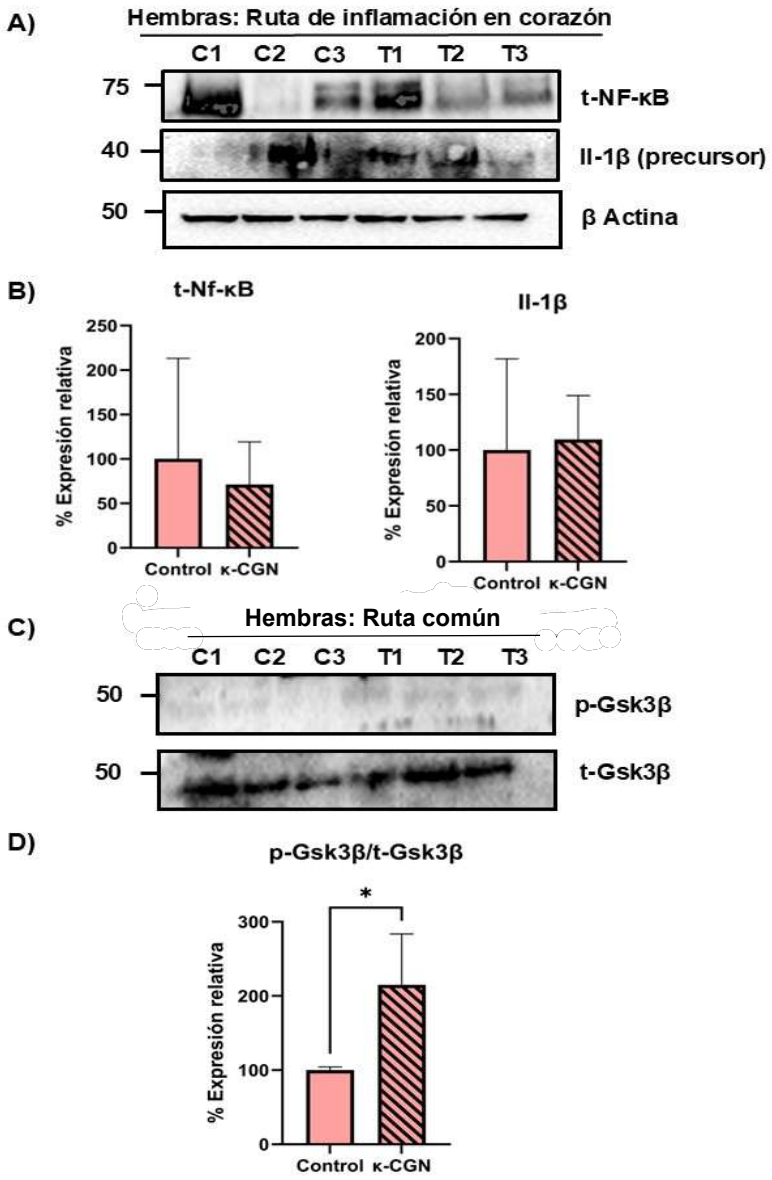

Figura 9. Análisis de la expresión cardiaca de mediadores inflamatorios y comunes a las vías en ratones hembra. (A-C) Expresión proteica de t-NF-κB, Il-1β precursor y la ratio p-GSK3β/t-GSK3β en corazón de ratones hembra tras la exposición a κ-CGN, mediante Western blot. Se empleó β-actina como control de carga. **(B-D)** Cuantificación densitométrica de la expresión relativa de cada proteína respecto al grupo control, expresada como media ± error estándar de la media (SEM). N=3. Las comparaciones estadísticas se realizaron mediante t-test de Student para muestras independientes. *$p < 0.05$.

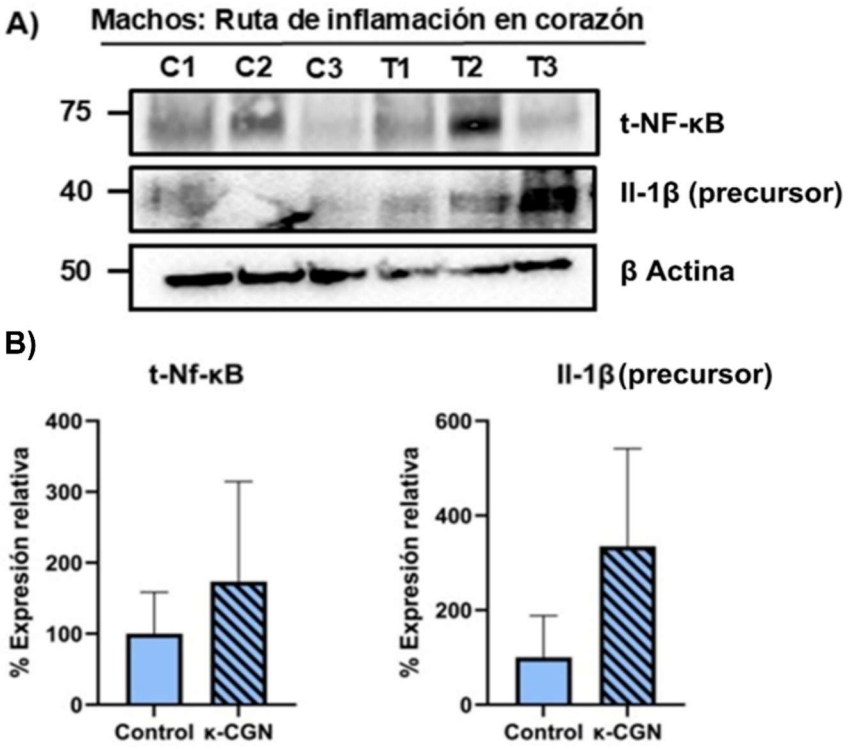

Figura 10. Análisis de la expresión cardiaca de mediadores inflamatorios en ratones macho. (A) Expresión proteica de t-NF-κB e Il-1β precursor en corazón de ratones macho jóvenes tras la exposición a κ-CGN, mediante Western blot. Se empleó β-actina como control de carga. **(B)** Cuantificación densitométrica de la expresión relativa de t-Nf-κB e Il-1β respecto al grupo control, expresada como media ± error estándar de la media (SEM). N=3. Las comparaciones estadísticas se realizaron mediante t-test de Student para muestras independientes.

5.3. Integración en los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS)

Este estudio profundiza en el impacto molecular del κ-CGN sobre vías inflamatorias y de estrés oxidativo, procesos clave en enfermedades crónicas que afectan la salud pública, contribuyendo al ODS 3: Salud y Bienestar. La identificación de diferencias sexuales en la respuesta amplía la comprensión necesaria para enfoques preventivos personalizados y equitativos, vinculándose además con el ODS 10: Reducción de las Desigualdades.

Asimismo, la investigación apoya la mejora en la calidad y seguridad alimentaria, en línea con el ODS 2: Nutrición Adecuada, al evidenciar la necesidad de revisar el uso de aditivos en alimentos procesados. Los hallazgos impulsan prácticas de producción y consumo

responsables, promoviendo el ODS 12, fomentando una industria alimentaria sostenible y consciente.

Con este trabajo se establece un puente entre ciencia, salud pública y sostenibilidad, aportando un conocimiento esencial para avanzar hacia sociedades más saludables, justas y sostenibles, una perspectiva más detallada a lo largo del Prólogo en el Anexo TFG *OneHealth*.

6. Discusión

El κ-CGN es un polisacárido sulfatado extraído de algas rojas, ampliamente utilizado como aditivo alimentario (E-407) por sus propiedades gelificantes y estabilizantes. A pesar de su uso extendido, existe un debate científico persistente en torno a su seguridad. Por un lado, estudios regulatorios y ensayos bajo condiciones de Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) han concluido que el κ-CGN de alto peso molecular, tal y como se emplea en la industria alimentaria, no se absorbe ni se degrada significativamente en el tracto gastrointestinal, y por tanto, no induciría efectos inflamatorios ni sistémicos relevantes tras su ingesta oral (Weiner & McKim, 2019). Estos autores subrayan que gran parte de la controversia se origina en la confusión metodológica entre el κ-CGN y su forma degradada, el *poligeenan*, esta última con un peso molecular inferior y conocido por su potencial tóxico, pero que no está autorizado como aditivo alimentario. No obstante, numerosos estudios preclínicos y algunos ensayos en humanos han aportado evidencia de que la exposición prolongada a κ-CGN, incluso en formas alimentarias, podría inducir activación de vías proinflamatorias como la regulada por NF-κB, alterar el equilibrio redox intracelular y comprometer la integridad de barreras epiteliales, especialmente en condiciones de susceptibilidad individual o microbiota alterada (Tobacman, 2001; Bhattacharyya et al., 2008; van de Vyver, 2023; Fernandes et al., 2024; van de Vyver, 2023). En este contexto, el κ-CGN representa un aditivo que, si bien ha superado evaluaciones de seguridad convencionales, merece una reevaluación crítica en función de la duración de la exposición, la dosis acumulada y la interacción con factores huésped que podrían modular su bioactividad.

Tal como se comentó en la introducción de este trabajo, uno de los mecanismos mediante los cuales el κ-CGN podría inducir efectos adversos es la activación sostenida de rutas proinflamatorias, especialmente la vía del factor nuclear kappa B (NF-κB), eje clave de la respuesta inmunitaria frente a señales de daño. Bhattacharyya et al. (2008) demostraron que el κ-CGN, incluso en ausencia de infección, activa de forma mantenida esta vía a través del

TLR4 y la proteína Bcl10, estableciendo un bucle que perpetúa la expresión de citocinas como IL-8. Por su parte, Borthakur et al. (2012) confirmaron que esta activación prolongada genera un entorno inflamatorio persistente, cuestionando la aparente inocuidad del aditivo, sobre todo en condiciones fisiológicas vulnerables. Nuestros resultados refuerzan esta hipótesis: en el tejido hepático de hembras jóvenes alimentadas durante 15 días con κ-CGN se observó el aumento significativo de la ratio Il-1β madura/Il-1b precursor, resultado que sugiere una activación funcional de la vía, posiblemente postraduccional. La ausencia de cambios en los niveles de expresión total de Nf-κb no excluye su implicación, ya que su actividad se regula principalmente mediante fosforilación, liberación de IκBα y translocación nuclear. Por este motivo, y con el objetivo de determinar el papel relevante de este factor de transcripción en el efecto mediado por el κ-CGN sobre Il-1β, sería interesante en un futuro considerar la determinación de la expresión de esta proteína fosforilada. Además, la mayor ratio Il-1β madura/Il-1β precursor observada solo en hembras parece apuntar a un dimorfismo sexual, el cual podría estar condicionado por variables hormonales o inmunológicas, situando al hígado como un tejido diana especialmente sensible en contextos de exposición temprana a κ-CGN.

Se ha planteado que fragmentos de κ-CGN podrían atravesar la barrera intestinal y alcanzar el hígado vía circulación portal, activando de esta forma el TLR4 de las células de Küpffer y desencadenando la inflamación local previamente comentada (Wagner et al., 2024). Esta hipótesis contrasta con estudios *in vitro*, como los realizados por McKim et al. (2016) en los que no se detectaron ni absorción ni reactividad inflamatoria tras 24 horas de exposición a κ- o λ-CGN. Esta disparidad puede atribuirse a la falta de complejidad de los modelos celulares, los cuales no reproducen variables clave como la función ejercida de la microbiota sobre el κ-CGN, el epitelio funcional o la cronicidad del estímulo. Además, es importante evidenciar que la exposición al aditivo en humanos tiene un efecto acumulativo, por lo que, hasta dosis pequeñas pero continuadas parecen redundar en efectos patológicos a largo plazo. En este sentido, los experimentos realizados por Félix et al. (2024) parecen ser contundentes, ya que la ingesta durante 15 días de κ-CGN en ratones hembra y macho a la edad de 2 meses promueve cambios en la edad adulta y la vejez de estos individuos.

Interesantemente, mientras los ensayos *in vitro* emplean concentraciones bajas y exposiciones breves, los modelos animales evidencian que dosis realistas pero continuadas inducen alteraciones inmunometabólicas sostenidas. En este sentido, Bhattacharyya et al. (2012) describieron que la administración crónica de κ-CGN en ratones activaba Nf-κb en

hígado, aumentando la fosforilación de IκBα y desencadenando resistencia a insulina, la cual fue atribuida a la modificación de IRS-1 en la serina 307 (Ser^307) promovidas por el κ-CGN. Estos hallazgos, junto con los obtenidos en este estudio, respaldan el papel del κ-CGN como inductor de inflamación sistémica en condiciones fisiológicas. De hecho, la capacidad para modular respuestas inmunitarias hepáticas de bajo grado por el κ-CGN refuerza la necesidad de reevaluar sus efectos en contextos de exposición prolongada. En modelos de inflamación aguda se ha descrito que el κ-CGN puede inducir daño hepático directo mediado por células inmunitarias. En un estudio en ratones, Abe et al. (2002), demostraron que una única inyección intraperitoneal de λ-CGN activaba de forma secuencial células NK y NKT en hígado, provocando necrosis masiva y elevación de transaminasas. La depleción experimental de células NK atenuó notablemente el daño, señalando a estos linfocitos innatos como mediadores clave de la hepatotoxicidad. A nivel mecanístico, se evidenció una interacción directa entre el CGN y las células NK, con liberación de IFN-γ y activación de la vía perforina, responsable del daño celular observado.

Por su parte, aunque la mayoría de estudios sobre los efectos cardiovasculares del κ-CGN se han centrado en contextos agudos, como la trombosis inducida por inyección de este aditivo, los mecanismos implicados siguen siendo relevantes en escenarios de exposición oral. En modelos murinos, la administración intravascular de κ-CGN ha inducido trombosis venosa asociada a daño endotelial oxidativo, mediado por la activación de Nf-κb en células endoteliales y leucocitos tras su unión a TLR4, generando citocinas y moléculas de adhesión que promueven la interacción plaqueta-leucocito y la formación de coágulos (Wang et al., 2022; Ni et al., 2025). No obstante, en el presente estudio, tras la exposición oral durante 15 días, no se observaron alteraciones significativas en los niveles de Nf-κb ni de Il-1β en tejido cardíaco, ni en machos ni en hembras. Esta ausencia de activación inflamatoria clara podría deberse a la diferencia en la vía de administración, al tipo de exposición (sostenida pero no aguda), o a un umbral tisular más elevado de reactividad en el miocardio. Cabe destacar, sin embargo, una tendencia ascendente de Il-1β en machos y un aumento significativo de p-Gsk3β en hembras, lo que sugiere que el tejido cardíaco podría responder a κ-CGN a través de mecanismos compensatorios que estén respondiendo activamente al daño, en este caso de índole oxidativo, al favorecer la vía antioxidante de Nrf2. Es lógico pensar que al tratarse de ratones jóvenes el daño se esté combatiendo activamente y que todavía no se observe una respuesta inflamatoria tisular exacerbada.

La inflamación hepática inducida por κ-CGN suele establecerse sobre el establecimiento de un estrés oxidativo, en el que la activación de NF-κB y la disrupción del sistema antioxidante actúan de forma sinérgica. Diversos estudios han evidenciado que esta respuesta inflamatoria depende de una reducción sostenida de los niveles de glutatión (GSH) y de la sobreproducción de ROS, indicadores de un entorno redox alterado. Martínez et al. (2012) y Mizokami et al. (2016) documentaron un aumento local de ROS y una marcada depleción de GSH tras exposición a CGN, mientras que modelos murinos más recientes han confirmado la coactivación de TLR4 y Nf-κb junto con una disminución de enzimas antioxidantes hepáticas, reflejo de una disrupción funcional del eje Nrf2/Keap1. En línea con esta evidencia, nuestros resultados muestran una activación significativa de la vía Nrf2 en hígado de hembras tras la exposición oral a κ-CGN, con incrementos robustos en la expresión de Nrf2 y de G6pd, enzima clave en la generación de NADPH y en el mantenimiento del equilibrio redox (Nóbrega-Pereira et al., 2016). Este patrón sugiere una respuesta antioxidante activa y funcional, capaz de detectar y contrarrestar el insulto oxidativo generado por el aditivo. Aunque el efector Akr1c3 no mostró diferencias significativas, su perfil al alza apunta a una posible activación complementaria en fases más avanzadas de la respuesta. Es importante considerar que esta proteína es una Aldo-ceto reductasa, íntimamente relacionada con la detoxificación de la peroxidación lipídica, consecuencia del establecimiento de un estrés oxidativo (Zimta et al., 2019). Por tanto, tal vez el mantenimiento de la ingesta de este aditivo durante periodos más largos podría promover la activación de esta enzima la cual respondería a las consecuencias del establecimiento del estrés oxidativo mediado por el κ-CGN. Por su parte, la ausencia de cambios en machos contrasta con la intensidad de la respuesta observada en hembras, reforzando la idea de un dimorfismo en la capacidad hepática de adaptación frente al estrés oxidativo inducido por el aditivo. Esta divergencia podría estar modulada por diferencias hormonales, metabólicas o inmunológicas, y sugiere que, ante una misma exposición, los sexos activan programas defensivos distintos con distinta eficacia.

De forma coherente con nuestros hallazgos, un estudio reciente realizado en ratones alimentados con κ-CGN (540 mg/kg/día durante dos semanas) reveló alteraciones inmunitarias y oxidativas en células peritoneales, acompañadas de una hiperactivación de leucocitos y acumulación de ROS. Los autores relacionaron estos efectos con cambios en la microbiota intestinal y la liberación de metabolitos citotóxicos bacterianos, lo que apuntaría a la existencia de un eje intestino-hígado funcionalmente comprometido (Bellanco et al., 2024). Este tipo de toxicidad indirecta podría explicar por qué, incluso en ausencia de daño intestinal manifiesto,

se observan respuestas oxidativas y defensivas en el hígado. En este contexto, la activación coordinada de Nrf2 y G6pd observada en hembras representa un efector fisiológico para restaurar la homeostasis colaborando en la reposición de poder reductor en la célula. A diferencia del hígado, el tejido cardíaco mostró una activación más discreta de la vía Nrf2 tras la exposición a κ-CGN. En hembras, aunque la mayoría de las proteínas analizadas no presentaron diferencias significativas, la expresión de G6pd en las hembras tratadas fue significativamente mayor en comparación con los controles, lo que podría reflejar una activación incipiente de la respuesta antioxidante, dada la función clave de esta enzima glicolítica en la producción de NADPH (Nóbrega-Pereira et al., 2016). En el caso de los machos, se observó una elevación significativa de Akr1c3, más achacable a un fallo en la metodología experimental que a una respuesta fisiológica de la vía antioxidante. Aunque no existe evidencia directa de lesión miocárdica inducida por estrés oxidativo tras exposición a κ-CGN, la extrapolación desde otros modelos tisulares permite considerar efectos indirectos sobre el corazón. El desequilibrio redox sistémico generado por este aditivo, especialmente si la activación de Nrf2 es incompleta o disfuncional, podría afectar negativamente al endotelio coronario o a los miocitos cardíacos. En tales escenarios, la incapacidad para sostener la respuesta antioxidante podría traducirse en disfunción endotelial, inflamación subclínica o mayor susceptibilidad a daño isquémico. Estudios previos en modelos inflamatorios agudos han mostrado que la ausencia de Nrf2 exacerba la respuesta inflamatoria y prolonga la agresión tisular en órganos altamente vascularizados, subrayando su papel protector (Itoh et al., 2004).

En coherencia con este escenario, los resultados del presente estudio respaldan la implicación activa del eje Akt/Gsk3β en la modulación de la respuesta tisular a κ-CGN, funcionando como nodo regulador entre las rutas de inflamación y oxidación. En hígado de hembras, el aumento significativo en la fosforilación de Akt sugiere una activación compensatoria dirigida a inhibir Gsk3β y mitigar la inflamación, al tiempo que favorece la estabilización de Nrf2 y la inducción de genes antioxidantes como *G6pd*, también elevados en este grupo. Esta coactivación de p-Akt y Nrf2 refleja una arquitectura de respuesta celular coordinada, donde la inflamación incipiente no se desliga de mecanismos de citoprotección. Por su parte, en el tejido cardiaco de hembras, la elevación significativa de p-Gsk3β (indicador de su forma inactiva) podría estar ejerciendo un efecto similar, inhibiendo la degradación de Nrf2 y conteniendo la activación de Nf-κb. Aunque la fosforilación de Akt no fue analizada en este tejido, la inhibición de Gsk3β sugiere que rutas reguladoras alternativas podrían estar contribuyendo a preservar la homeostasis ante un entorno oxidativo emergente (**Figura 10**).

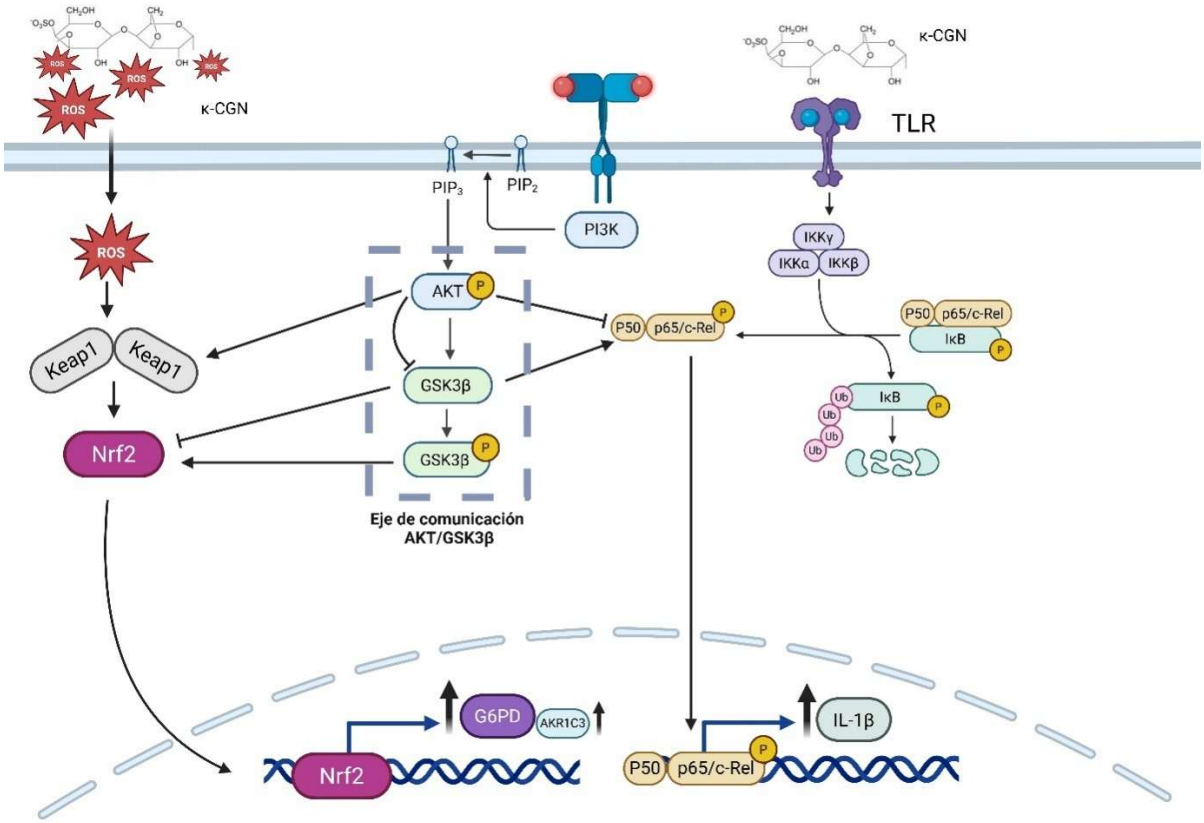

Figura 10. Eje de comunicación intracelular entre la vía de oxidación (Nrf2) y vía de inflamación (Nf-κb). A la izquierda, el estrés oxidativo inducido por ROS derivados del κ-CGN favorece la disociación del complejo Keap1–Nrf2, permitiendo la estabilización y translocación nuclear de Nrf2, donde activa la expresión de genes citoprotectores. Paralelamente, la activación de la vía PI3K/AKT conduce a la fosforilación e inhibición de GSK3β, lo que favorece tanto la estabilización de Nrf2 como la represión de la vía inflamatoria. A la derecha, el reconocimiento del κ-CGN por los receptores tipo *Toll* (TLR) activa el complejo IKK, promoviendo la fosforilación y degradación de IκB, con la consiguiente liberación y translocación del dímero NF-κB (p65/p50) al núcleo, donde induce la transcripción de genes proinflamatorios. GSK3β no fosforilado favorece la activación de NF-κB y la degradación de Nrf2, consolidando un entorno inflamatorio y oxidante. Creado con BioRender.com.

Por otro lado, la ausencia de estas modulaciones en los tejidos de machos refuerza el dimorfismo funcional observado: mientras que en hembras se activa un eje regulador bidireccional que conecta inflamación y oxidación, en machos las respuestas parecen más limitadas, posiblemente reflejando una menor capacidad adaptativa inicial. Los resultados obtenidos en este estudio se alinean con la evidencia previa que apunta a una respuesta diferencial entre sexos frente a la exposición al κ-CGN. En particular, el trabajo de Félix et al. (2024) demostró que esta divergencia se acentúa con la edad, manifestándose en las hembras como una mayor reactividad inmunológica acompañada de una preservación más eficaz del sistema antioxidante, lo que se observó en una mayor actividad fagocítica y de células NK, junto con una menor proporción Tnfα/Il-10, lo que sugiere una inflamación más finamente

regulada. Con el avance de la edad, estas diferencias se intensificaron, observándose un deterioro conductual más marcado en las hembras. Si bien este estudio no exploró las vías mecanísticas que subyacen a estos procesos, nuestros resultados comulgan con el dimorfismo sexual observado en la ingesta de κ-CGN por Félix et al. (2024) incluso en etapas tempranas del desarrollo.

Por tanto, los resultados de este estudio evidencian que la exposición oral al aditivo alimentario κ-CGN durante dos semanas es capaz de modular vías moleculares clave implicadas en inflamación y estrés oxidativo en hígado y corazón de ratones jóvenes, con un claro dimorfismo sexual en la respuesta tisular. En hígado de hembras se observó una activación concomitante de la vía Nf-κb y del eje antioxidante Nrf2/Keap1, junto con una fosforilación significativa de Akt, lo que sugiere una respuesta integrada de tipo adaptativo frente al insulto. En el corazón, la modulación fue más discreta pero no ausente, destacando la inhibición de Gsk3β en hembras y el aumento de Akr1c3 en machos como posibles indicadores de un estrés oxidativo incipiente. Estos hallazgos apuntan a que el κ-CGN, lejos de ser inerte en contextos sistémicos, podría inducir respuestas celulares complejas incluso en tejidos extraintestinales, especialmente bajo condiciones de desarrollo y exposición continuada. La activación de rutas de defensa en hembras sugiere una mayor capacidad de detección del daño, aunque también una posible vulnerabilidad a su acumulación con el tiempo. En conjunto, este estudio contribuye a caracterizar los mecanismos moleculares tempranos de respuesta frente al κ-CGN, identificando al eje Akt/Gsk3β como punto estratégico de cruce entre inflamación y citoprotección, y subrayando la importancia de considerar el sexo como variable biológica crítica en toxicología alimentaria.

7. Conclusiones

- La exposición oral a κ-CGN durante 15 días induce alteraciones moleculares en vías de inflamación y estrés oxidativo en tejidos extraintestinales.
- Se observa activación parcial de la vía inflamatoria Nf-κb, especialmente en hígado de hembras, con evidencia de procesamiento proinflamatorio; en corazón, la activación es leve o subclínica.
- La vía antioxidante Nrf2/Keap1 se activa significativamente en hígado de hembras, mientras que en machos y en corazón la respuesta es menor o limitada.
- El eje Akt/Gsk3β regula diferencialmente la respuesta tisular, mostrando activación citoprotectora en hembras.
- Existe un marcado dimorfismo sexual, con hembras presentando una respuesta molecular más amplia y coordinada.
- El modelo murino Swiss joven es adecuado para estudiar efectos sistémicos de aditivos alimentarios y el papel del sexo como variable biológica.

8. ANEXO TFG *OneHealth*

8.1. Prólogo

El κ-carragenano (κ-CGN) constituye uno de los aditivos más empleados en la industria alimentaria contemporánea, integrado sistemáticamente en productos procesados como agente gelificante y estabilizante. Su aparente inocuidad, respaldada por su origen natural, ha sostenido durante décadas su presencia constante en la dieta diaria. Sin embargo, múltiples estudios en modelos animales señalan al κ-CGN como un compuesto capaz de desregular el estatus oxidativo e inflamatorio del organismo, mecanismos que operan silenciosamente en la progresión de múltiples patologías metabólicas, neurodegenerativas y tumorales. La creciente acumulación de evidencia científica sugiere una necesidad urgente de revisar este compuesto, especialmente atendiendo a la población vulnerable, cuya fisiología puede amplificar los efectos de una exposición continuada.

Desde un abordaje biomédico, y con el objetivo de estudiar las alteraciones inducidas por la ingesta de κ-CGN a nivel sistémico, se ha desarrollado un modelo murino basado en la administración oral de este compuesto durante 15 días a ratones hembra y machos de la cepa Swiss de dos meses de edad. A partir de esta exposición controlada, se ha llevado a cabo el análisis molecular de órganos diana —concretamente, hígado y corazón— mediante la técnica de Western Blot, evaluando la expresión de mediadores clave implicados en las rutas de inflamación (Nf-κb) y respuesta antioxidante (Nrf2). Este diseño experimental ha permitido explorar de forma integrada el estatus oxidativo e inflamatorio generado por el κ-CGN, con el propósito de esclarecer sus efectos en órganos periféricos y sentar las bases para nuevas líneas de investigación centradas en su impacto sobre la fisiopatología asociada a la dieta.

Desde la perspectiva dietético-nutricional, se identifican los alimentos en los que se encuentra presente el CGN, así como los grupos de población con mayor nivel de exposición y los posibles efectos que su consumo podría tener sobre la salud humana. Para responder a estos tres objetivos de investigación, se ha realizado una búsqueda sistemática de estudios desarrollados en humanos, con diseños de cohorte, ensayos clínicos aleatorizados y estudios transversales, publicados entre los años 2003 y 2025. Se han excluido los estudios *in vitro*, en modelos animales y aquellos ensayos de intervención no controlados. Finalmente, se ha llevado a cabo una síntesis crítica de los resultados extraídos de la literatura seleccionada, con el fin de establecer posibles correlaciones entre el consumo de CGN y la aparición de sintomatología o biomarcadores inflamatorios.

Desde el enfoque farmacéutico, se ha analizado el uso de los distintos tipos de carragenanos empleados como excipientes en medicamentos, así como las concentraciones utilizadas en diversas formas farmacéuticas comercializadas a nivel nacional e internacional. Se presta especial atención a los medicamentos destinados a la población pediátrica, dada su mayor susceptibilidad a agentes bioactivos. A partir de los datos recopilados, se proponen alternativas al uso de κ-CGN, entre ellas la pectina, considerando tanto su perfil de seguridad como su viabilidad tecnológica. Se han desarrollado experimentalmente distintas formas farmacéuticas —entre ellas, comprimidos elaborados con κ-CGN y su respectiva alternativa con pectinas a diferentes concentraciones—, empleando, además, tecnología de bioimpresión 3D para evaluar comparativamente sus propiedades fisicoquímicas.

Este trabajo nace de la necesidad de interrogar con rigor científico los efectos de sustancias sistemáticamente normalizadas en la alimentación y en la formulación de productos farmacéuticos contemporáneos. El κ-CGN, más que un simple aditivo, emerge como un modulador potencial de estados celulares inflamatorios y oxidativos, cuyas implicaciones deben ser comprendidas a fondo si aspiramos a reconfigurar las bases de una nutrición verdaderamente segura y sostenible, especialmente en una sociedad que aún no ha delimitado con precisión los efectos acumulativos de su dieta industrializada.

8.2 Conclusiones

El abordaje multidisciplinar de esta investigación desarrollada en el seno de este TFG OneHealth ha permitido concluir:

● En un modelo animal de corta duración y de 2 meses de edad, la exposición oral a κ-CGN modula al alza la expresión de proteínas implicadas en las rutas de inflamación y estrés oxidativo, ocasionando alteraciones moleculares detectables en órganos periféricos clavecomo el hígado y el corazón.

● El consumo de CGN en humanos disminuye los niveles de colesterol total y LDL, y no tiene efecto en otros parámetros de riesgo cardiometabólico.

● A nivel intestinal, el consumo de CGN a corto plazo no induce modificaciones en la composición de la MI en humanos, aunque podría incrementar la permeabilidad intestinal.

● En sujetos con colitis ulcerosa, el consumo de CGN se asocia con un mayor número de brotes.

● El mayor consumo de CGN se asocia con mayor riesgo de cáncer de mama y diabetes tipo 2.

● Los alimentos en los que se encuentra el CGN con mayor frecuencia son los postres lácteos (flanes, natillas, etc.), los batidos lácteos, los postres gelificados, las leches de continuación, las carnes procesadas, quesos y fórmulas líquidas de nutrición enteral.

● Los grupos de población con un mayor nivel de exposición al CGN son los niños de 12-3meses de edad y los individuos con enfermedad de Crohn.

● Los comprimidos con pectina demuestran una mayor dureza mecánica, así como una superior capacidad de disgregación en condiciones de pH intestinal en comparación con el κ-CGN.

● Los geles formulados con pectina presentan similar viscosidad al CGN y características ventajosas en términos de desempeño en formulaciones sólidas.

● La pectina se propone como alternativa tecnológica prometedora frente a los CGN, particularmente en el contexto de medicamentos destinados a la población pediátrica, donde las propiedades de disgregación, textura y seguridad del excipiente son de gran importancia.

9. Bibliografía

Abe, T., Kawamura, H., Kawabe, S., Watanabe, H., Gejyo, F., & Abo, T. (2002). Liver injury due to sequential activation of natural killer cells and natural killer T cells by carrageenan. *Journal of Hepatology*, 36(5), 614–623. https://doi.org/10.1016/s0168-8278(02)00022-3

Adinolfi, S., Patinen, T., Jawahar Deen, A., Pitkänen, S., Härkönen, J., Kansanen, E., Küblbeck, J., & Levonen, A. L. (2023). The KEAP1-NRF2 pathway: Targets for therapy and role in cancer. *Redox Biology*, 63, 102726. https://doi.org/10.1016/j.redox.2023.102726

Bhattacharyya, S., Dudeja, P. K., & Tobacman, J. K. (2008). Carrageenan-induced NFkappaB activation depends on distinct pathways mediated by reactive oxygen species and Hsp27 or by Bcl10. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1780(7-8), 973–982. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.03.019

Bhattacharyya, S., Gill, R., Chen, M. L., Zhang, F., Linhardt, R. J., Dudeja, P. K., & Tobacman, J. K. (2008). Toll-like receptor 4 mediates induction of the Bcl10-NFkappaB-interleukin-8 inflammatory pathway by carrageenan in human intestinal epithelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(16), 10550–10558. https://doi.org/10.1074/jbc.M708833200

Bhattacharyya, S., O-Sullivan, I., Katyal, S., Unterman, T., & Tobacman, J. K. (2012). Exposure to the common food additive carrageenan leads to glucose intolerance, insulin resistance and inhibition of insulin signalling in HepG2 cells and C57BL/6J mice. *Diabetologia*, 55(1), 194–203. https://doi.org/10.1007/s00125-011-2333-z

Bhattacharyya, S., Shumard, T., Xie, H., Dodda, A., Varady, K. A., Feferman, L., Halline, A. G., Goldstein, J. L., Hanauer, S. B., & Tobacman, J. K. (2017). A randomized trial of the effects of the no-carrageenan diet on ulcerative colitis disease activity. *Nutrition and Healthy Aging*, 4(2), 181–192. https://doi.org/10.3233/NHA-170023

Bitra, V. R., Moshapa, F., Adiukwu, P. C., & Rapaka, D. (2024). Nrf2-mediated signaling as a therapeutic target in Alzheimer's disease. *The Open Neurology Journal*, 18, e1874205X319474. https://doi.org/10.2174/011874205X319474240611070113

Cuzzocrea, S., Crisafulli, C., Mazzon, E., Esposito, E., Muià, C., Abdelrahman, M., Di Paola, R., & Thiemermann, C. (2006). Inhibition of glycogen synthase kinase-3beta attenuates the development of carrageenan-induced lung injury in mice. *British Journal of Pharmacology*, 149(6), 687–702. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706902

EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS), Younes, M., et al. (2018). Re-evaluation of carrageenan (E 407) and processed Eucheuma seaweed (E 407a) as food additives. *EFSA Journal*, 16(4), e05238. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5238

Félix, J., Bellanco, A., Díaz-Del Cerro, E., Martínez-Cuesta, M. C., Requena, T., & De la Fuente, M. (2024). High exposure to carrageenan in young mice may impair behavior, immunity, redox and inflammatory states throughout the aging process. *Food Research International*, 197(Pt 1), 115143. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.115143

Fernandes, Q., Inchakalody, V. P., Bedhiafi, T., Mestiri, S., Taib, N., Uddin, S., Merhi, M., & Dermime, S. (2024). Chronic inflammation and cancer; the two sides of a coin. *Life Sciences*, 338, 122390. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2023.122390

Itoh, K., Mochizuki, M., Ishii, Y., Ishii, T., Shibata, T., Kawamoto, Y., Kelly, V., Sekizawa, K., Uchida, K., & Yamamoto, M. (2004). Transcription factor Nrf2 regulates inflammation by mediating the effect of 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2. *Molecular and Cellular Biology*, 24(1), 36–45. https://doi.org/10.1128/MCB.24.1.36-45.2004

Klöting, I., Nitschke, C., & van den Brandt, J. (2003). Impact of genetic profiles on experimental studies: outbred versus wild rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 189(1), 68–71. https://doi.org/10.1016/s0041-008x(03)00099-1

McKim, J. M., Jr, Baas, H., Rice, G. P., Willoughby, J. A., Sr, Weiner, M. L., & Blakemore, W. (2016). Effects of carrageenan on cell permeability, cytotoxicity, and cytokine gene expression in human intestinal and hepatic cell lines. *Food and Chemical Toxicology*, 96, 1–10. https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.07.006

Moloney, J. N., & Cotter, T. G. (2018). ROS signalling in the biology of cancer. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 80, 50–64. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.05.023

Nóbrega-Pereira, S., Fernandez-Marcos, P. J., Brioche, T., Gomez-Cabrera, M. C., Salvador Pascual, A., Flores, J. M., Viña, J., & Serrano, M. (2016). G6PD protects from oxidative damage and improves healthspan in mice. *Nature Communications*, 7, 10894. https://doi.org/10.1038/ncomms10894

Orellana, A. M., Vasconcelos, A. R., Leite, J. A., de Sá Lima, L., Andreotti, D. Z., Munhoz, C. D., Kawamoto, E. M., & Scavone, C. (2015). Age-related neuroinflammation and changes in AKT-GSK-3β and WNT/β-CATENIN signaling in rat hippocampus. *Aging*, 7(12), 1094–1111. https://doi.org/10.18632/aging.100853

Pangestuti, R., & Kim, S.-K. (2014). Biological activities of carrageenan. *Advances in Food and Nutrition Research*, 72, 113–124. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800269-8.00007-5

Penning, T. M. (2017). Aldo-Keto Reductase (AKR) 1C3 inhibitors: a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 27(12), 1329–1340. https://doi.org/10.1080/13543776.2017.1379503

Rupert, R., Rodrigues, K. F., Thien, V. Y., & Yong, W. T. L. (2022). Carrageenan From Kappaphycus alvarezii (Rhodophyta, Solieriaceae): Metabolism, Structure, Production, and Application. *Frontiers in Plant Science*, 13, 859635. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.859635

Tobacman, J. K. (2001). Review of harmful gastrointestinal effects of carrageenan in animal experiments. *Environmental Health Perspectives*, 109(10), 983–994. https://doi.org/10.1289/ehp.01109983

Udo, T., Mummaleti, G., Mohan, A., Singh, R. K., & Kong, F. (2023). Current and emerging applications of carrageenan in the food industry. *Food Research International*, 173(Pt 2), 113369. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113369

van de Vyver, M. (2023). Immunology of chronic low-grade inflammation: Relationship with metabolic function. *The Journal of Endocrinology*, 257(1), e220271. https://doi.org/10.1530/JOE-22-0271

Wagner, R., Buettner, J., Heni, M., Fritsche, L., Kullmann, S., Wagmüller, M., Peter, A., Preissl, H., Machann, J., Jumpertz von Schwartzenberg, R., Birkenfeld, A. L., Pape, U. F., van Hall, G., Plomgaard, P., Häring, H. U., Fritsche, A., Thompson, K. N., Klein, R., & Stefan, N. (2024). Carrageenan and insulin resistance in humans: a randomised double-blind cross-over trial. *BMC Medicine*, 22(1), 558. https://doi.org/10.1186/s12916-024-03771-8

Wang, P., Tan, F., Mu, J., Chen, H., Zhao, X., & Xu, Y. (2022). Inhibitory Effect of Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus KSFY07 on Kappa-Carrageenan-Induced Thrombosis in Mice and the Regulation of Oxidative Damage. *Cardiovascular Therapeutics*, 2022, 4415876. https://doi.org/10.1155/2022/4415876

Zhou, F., Yao, L., Lu, X., Li, Y., Han, X., & Wang, P. (2022). Therapeutic Targeting of GSK3β-Regulated Nrf2 and NFκB Signaling Pathways by Salvianolic Acid A Ameliorates Peritoneal Fibrosis. *Frontiers in Medicine*, 9, 804899. https://doi.org/10.3389/fmed.2022.804899

Zimta, A. A., Cenariu, D., Irimie, A., Magdo, L., Nabavi, S. M., Atanasov, A. G., & Berindan-Neagoe, I. (2019). The Role of Nrf2 Activity in Cancer Development and Progression. *Cancers*, 11(11), 1755. https://doi.org/10.3390/cancers11111755