



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

**Efecto de flavonoides sobre un modelo de
obesidad en ratones db/db.**

D^a. Olga María García Molina

2013



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. FRANCISCO JOSÉ GÓMEZ GARCÍA. PROFESOR ASOCIADO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA DEL DEPARTAMENTO DE OFTALMOLOGÍA, OPTOMETRÍA, OTORRINOLARINGOLOGÍA Y ANATOMÍA PATOLÓGICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA.

AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada: “**Efecto de flavonoides sobre un modelo de obesidad en ratones db/db**”, realizada por D^a OLGA MARÍA GARCÍA MOLINA, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para optar el grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

Murcia, a 28 de mayo de 2013.

Fdo. Dr. D. Francisco José Gómez García



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D^a NURIA GARCÍA CARRILLO, RESPONSABLE DE SALUD ANIMAL
DEL SERVICIO DE APOYO A LA INVESTIGACIÓN DE LA
UNIVERSIDAD DE MURCIA.

AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada: “**Efecto de flavonoides sobre un modelo de obesidad en ratones db/db**”, realizada por D^a OLGA MARÍA GARCÍA MOLINA, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para optar el grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

Murcia, a 28 de mayo de 2013.

Fdo. Dra. D^a. Nuria García Carrillo



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. NICOLAS ISSALY, SCIENTIFIC MANAGER NATUREX S.L.

AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada: **“Efecto de flavonoides sobre un modelo de obesidad en ratones db/db”**, realizada por D^a OLGA MARÍA GARCÍA MOLINA, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para optar el grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

Murcia, a 28 de mayo de 2013.

Fdo. Dr. D. Nicolas Issaly



INSTITUTO UNIVERSITARIO DE INVESTIGACIÓN
EN ENVEJECIMIENTO

**“Efecto de flavonoides sobre un modelo de obesidad
en ratones db/db”**

D^a OLGA MARÍA GARCÍA MOLINA

2013

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos

A lo largo del desarrollo de esta tesis he recibido la ayuda de mucha gente, que me han brindado sus conocimientos y que han compartido conmigo los buenos y no tan buenos momentos. Lo que tengo claro, es que se trata de un trabajo en equipo y por ello quiero destacar a las personas que, por su especial colaboración en este trabajo, merecen mi más profundo agradecimiento:

Al Dr. V. Vicente, por brindarme la oportunidad de llevar a cabo este proyecto en su departamento, GRACIAS.

A la Dra. Nuria García, mi directora de tesis, sin tu ayuda no lo habría conseguido, jamás podré agradecértelo lo suficiente, no se puede expresar con palabras..., sabes que siempre me tendrás para lo que necesites y espero que sigamos en el mismo camino porque aún nos quedan muchas cosas por hacer juntas.

Al Dr. Francisco J. Gómez, mi director de tesis, que a pesar de tu joven edad y tu corta trayectoria, creo que eres un gran profesional y una gran persona, mil gracias por tu enorme paciencia, no cambies nunca.

Al Dr. Nicolas Issaly, de la empresa Naturex S. L., mi director de tesis, por aportarme tu conocimiento en el campo de los polifenoles y contribuir en el desarrollo de este proyecto.

A los compañeros del departamento de Anatomía patológica: Víctor, M^a José, Manolo y como no, a ti Violeta, que entre las dos nos hemos apoyado y ayudado mutuamente en esta "batalla".

Agradecimientos

A los compañeros del animalario de la Universidad de Murcia: Carmen, Enrique, Yolanda, Manolo...

Al Dr. Julián Castillo, de la empresa Nutrafur S. L. por su cooperación en este trabajo.

Al Dr. Manuel Canteras, por su valiosa colaboración en el análisis estadístico e interpretación de los datos.

A la Dra. Fara Sáez, del Servicio de Análisis de Imagen de la Universidad de Murcia por su colaboración en este trabajo.

Al Dr. Joaquín Cerón y Susana, del laboratorio de Análisis Clínicos de veterinaria, por su contribución en esta tesis y su amabilidad, siempre con una sonrisa, ha sido un placer trabajar con vosotros, ojalá os hubiéramos conocido antes.

A mi jefa, Amelia, por inculcarme la importancia de desarrollar la tesis doctoral, sino fuera por eso, seguramente no estaría escribiendo estas palabras, gracias por confiar en mí y apoyarme en todo momento.

A mis compañeros del Servicio de Farmacia de la Arrixaca, por escuchar mis historias de los ratones y compartir mis penas y alegrías durante todo este tiempo, chicos, va por vosotros.

A mi familia, mis hermanas, M.Elena, Elisa y Noelia, por escucharme, por estar siempre ahí. A la persona que más me quiere en este mundo, mi madre, por cuidarme como lo hace, y soportarme en los duros momentos. A mi padre, que aunque ya no estés entre nosotros, he heredado de ti, tu cabezonería, y gracias a eso, soy lo que soy, no encuentro barreras, y no hay nada que empiece que no acabe.

A mis buenas amigas, Susi y Fani, por escucharme en todo momento y darme ánimos cuando más lo necesitaba, sabéis que sois para mí como dos hermanas más, no sé que sería mi vida sin vosotras.

Y por último, y no por ello, menos importante, al motor de mi vida, Javi.

A los que se me olvidan....

Finalmente, decir, que el desarrollo de esta tesis ha supuesto para mí un gran esfuerzo, que al principio parecía incompatible poder compaginar la residencia y una tesis experimental en la Universidad, muchas noches sin dormir, muchas horas de trabajo, mucha falta de vida social... pero puedo decir, por la satisfacción personal que ahora mismo siento, que ha merecido la pena.

ÍNDICE

| | |
|--|-----|
| I. Introducción | 1 |
| II. Antecedentes | 5 |
| Fisiopatología de la obesidad..... | 7 |
| Modelos animales experimentales..... | 72 |
| 1. Modelos espontáneos..... | 72 |
| 2. Modelos inducidos | 78 |
| Polifenoles..... | 81 |
| 1. Flavonoides..... | 82 |
| 2. Flavonoides en la dieta..... | 86 |
| 3. Flavonoides y sus efectos saludables..... | 88 |
| 4. Especies vegetales a estudio: Extracto de Fresno, Extracto de Spergularia, Extracto de Granada y Citrolive..... | 95 |
| III. Objetivos | 107 |
| IV. Material y métodos | 111 |
| A. Materiales..... | 113 |
| 1. Animales de experimentación..... | 113 |
| 2. Aparatos..... | 114 |
| 3. Agentes de tratamiento..... | 116 |
| B. Métodos..... | 121 |
| V. Resultados | 137 |
| 1. Variables morfológicas..... | 139 |
| 2. Determinación del perfil lipídico..... | 150 |
| 3. Determinación de marcadores relacionados con la obesidad..... | 161 |
| 4. Parámetros cardiovasculares..... | 165 |
| 5. Parámetros relacionados con la resistencia a la insulina..... | 174 |
| VI. Discusión | 183 |
| VII. Conclusiones | 209 |
| VIII. Bibliografía | 213 |

I. INTRODUCCIÓN

La prevalencia de la obesidad a nivel mundial ha crecido exponencialmente en las últimas décadas. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que en 2008, 1400 millones de adultos tenían sobrepeso ($IMC \geq 25$) y dentro de este grupo, más de 200 millones de hombres y cerca de 300 millones de mujeres eran obesos ($IMC \geq 30$) (OMS, 2012). La obesidad en España está alcanzando cada vez cifras más preocupantes, y en estudios comparativos con otros países europeos de nuestro entorno se nos sitúa a la cabeza, (Berghöfer 2008) con cifras de prevalencia de alrededor del 25%.

Son bien conocidas las consecuencias que el exceso de peso produce sobre la salud pública, debido al riesgo de desarrollar enfermedades asociadas como la diabetes, hipertensión, enfermedades cardiovasculares, alteraciones inflamatorias, aumento del riesgo de padecer cáncer, insuficiencia respiratoria y osteoartritis.

Clásicamente, la medicina tradicional ha utilizado extractos de plantas en el tratamiento de numerosas enfermedades, desde las enfermedades inflamatorias al cáncer.

Por otra parte, numerosos estudios indican la importancia de la ingesta de dietas ricas en productos vegetales en la prevención de múltiples patologías, entre las cuales están, el cáncer (García-Closas, 1999; Hillman, 2001; Gates, 2009), la diabetes tipo II (Scalbert, 2005), las enfermedades cardiovasculares (Berkow, 2007; Benavente-García, 2008; Grassi, 2009), las enfermedades neurodegenerativas (Scalbert, 2005; Letenneur, 2007), enfermedades inflamatorias crónicas y alergias (Kim, 2004; Rahman, 2006).

Introducción

Aunque hay numerosas moléculas implicadas en estos efectos saludables, probablemente el grupo más importante sea el de los flavonoides (Chun, 2005). Los flavonoides presentes en las frutas y verduras muestran propiedades beneficiosas para la salud que incluyen: efectos antidiabéticos, antihipertensivos, cardioprotectores y antiobesidad (Yamamoto, 2006; Vroegrijk, 2011).

El Extracto de Fresno (E. Fresno), Extracto de Granada (E. Granada), Extracto de Spergularia (E. Spergularia) y Citrolive han mostrado efectos beneficiosos sobre la salud en estudios previos (Jouad, 2000; Jouad, 2003; Eddouks, 2005; Bai, 2010; Mohan, 2010; Ibarra, 2011;).

Por todo ello, elegimos estas moléculas para estudiar el posible efecto beneficioso que ejercen en un modelo experimental obeso y diabético sobre la obesidad y sus comorbilidades asociadas.

II. ANTECEDENTES

FISIOLOGÍA DE LA OBESIDAD.

1. DEFINICIÓN DE OBESIDAD

La OMS (Organización Mundial de la Salud) define la obesidad como la acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud; definiendo como **sobrepeso** aquellos que presentan un IMC (Índice de Masa Corporal) igual o superior a 25 y **obesidad** a aquellos con IMC igual o superior a 30 (OMS, 2012).

Otra definición de obesidad es la considerada como una condición patológica caracterizada por un excesivo acúmulo de grasa en el tejido adiposo, con un aumento en el volumen de los adipocitos y en algunos casos también con el aumento del número de los mismos, y que ocasiona el consiguiente incremento desproporcionado o exagerado del peso corporal. Aunque se suele considerar como equivalente al aumento de peso corporal, no hay que confundir el concepto de obesidad con el de sobrepeso que está motivado por un exceso de masa muscular (Harrinson, 2006).

Antecedentes

La función primordial del adipocito es la de almacenar con eficacia el exceso de energía en forma de triglicéridos y liberarlo en forma de depósitos como ácidos grasos libres para ser utilizados como fuente de energía en otros órganos. Este sistema fisiológico permite al ser humano sobrevivir a la inanición incluso durante varios meses (Harrison, 2006). Sin embargo no es ésta su única función, puesto que el tejido adiposo es un órgano endocrino que juega un papel fundamental en la homeostasis energética del organismo y la sensibilidad a la insulina (Havel, 2002).

Desde el punto de vista clínico, la obesidad es un síndrome, es decir, un conjunto de síntomas y signos que se manifiestan conjuntamente en un mismo individuo y cuya etiología es variada.

La consideración de la obesidad como factor de riesgo cardiovascular, en el contexto del síndrome metabólico, ha convertido a esta patología en uno de los principales capítulos de la medicina clínica en los países desarrollados (Jara, 2001).

2. HISTORIA DE LA OBESIDAD

Antropológicamente, se puede pensar que la obesidad ha existido siempre, prueba de ello son las primeras manifestaciones artísticas de la Edad de Piedra como parece representar la Venus de Willendorf, 25.000 años a.C., así como las alusiones a esta enfermedad recogidas en la obra de Hipócrates, donde ya se hablaba de restricción en la dieta, aumento del ejercicio y disminución en la cantidad de horas de sueño como medidas para garantizar la salud de los individuos. La revisión de la historia de la obesidad, tiene notable interés para poder valorar los aspectos sociales y culturales de la obesidad a través del tiempo con el fin de dirigir los esfuerzos de la medicina en las distintas épocas para intentar mejorarlo a través de diversas técnicas terapéuticas.

➤ Prehistoria

El ser humano durante la mayor parte del tiempo de su existencia en la Tierra ha vivido como cazador-recolector y ha debido resistir los frecuentes períodos de carencia de alimentos. Hace unos 12.000 años algunos grupos humanos cambiaron el hábito cazador-recolector para iniciar la producción de alimentos. Este cambio requirió la domesticación de plantas y animales (Brown, 1987). Esta transformación económica, conocida como revolución neolítica, puede ser considerada como el suceso más importante en la historia humana y el lejano antecedente de las sociedades modernas que favorecen la obesidad, ya que permitió el crecimiento de la población y la evolución hacia sociedades sedentarias complejas y civilizadas. La única constatación que tenemos de la existencia de la obesidad en tiempos prehistóricos proviene de estatuas de la edad de piedra representando la figura femenina con exceso de volumen en sus formas. La más conocida es la Venus de Willendorf, una pequeña estatua de la edad

Antecedentes

de piedra que tiene una antigüedad aproximada de 25.000 años y que está expuesta en el museo de Historia Natural de Viena. La estatua, con un gran abdomen y voluminosas mamas péndulas, representa probablemente un símbolo de maternidad y fecundidad (Bray, 1990).

➤ **Grecia: Hipócrates y Platón**

Hipócrates, la gran figura de la Medicina griega (siglo V a.C.), en relación a la obesidad señala que «la muerte súbita es más frecuente en los obesos que en los delgados», y que la obesidad es una causa de infertilidad en las mujeres. Aparte de los interesantes datos aportados por la inteligente observación de los síntomas de los pacientes, Hipócrates desarrolló varias teorías sobre el funcionamiento del cuerpo basadas en los elementos y humores. La salud era un estado en el cual había un adecuado balance entre estos humores, mientras que en la enfermedad se producía un estado de desequilibrio (Bray, 1990). Algunos consejos en relación con el tratamiento de la obesidad vienen condicionados por la teoría de los humores, como: «El obeso con laxitud muscular y complexión roja debido a su constitución húmeda necesita comida seca durante la mayor parte del año». En cambio, algunos otros consejos apuntan en el correcto sentido de la importancia del ejercicio: «Los obesos y aquellos que desean perder peso deberían llevar a cabo unos fuertes ejercicios antes de la comida». El gran filósofo Platón (siglo V-IV a.C.) proclama una certera observación sobre la alimentación y la obesidad al señalar que la dieta equilibrada es la que contiene todos los nutrientes en cantidades moderadas y que la obesidad se asocia con la disminución de la esperanza de vida.

➤ **Egipto**

La consideración de que la corpulencia u obesidad era un signo de ahorro de energía y de poder, y por tanto, un estado deseable, no está ausente en las culturas antiguas. Así, en el Antiguo Testamento, el Faraón agradecido promete a José «toda la grasa de la Tierra»; también señala que «el virtuoso florecerá como el árbol de la palma... ellos traerán abundante fruto en la edad avanzada: ellos serán gordos y florecientes» (Salmos XCII, 13) (Jeffcoale, 1998)

➤ **Roma: Galeno**

Galeno (siglo II a.C.), identifica dos tipos de obesidad: moderada e inmoderada. La primera la considera como natural y la segunda como mórbida. En su libro *De Sanite Tuenda*, Galeno expone que: «El arte higiénico promete mantener en buena salud a aquellos que lo obedecen, pero no así a aquellos que no lo hacen ». Galeno veía, por tanto, la obesidad en relación a un estilo de vida inadecuado. Algunos de sus consejos van dirigidos a intentar corregir esta desviación mediante el ejercicio.

➤ **Cultura cristiana**

La obesidad era infrecuente en esta época y, por tanto, no se solía relacionar con la glotonería durante este período, pero esta conexión se estableció posteriormente a medida que la disponibilidad de alimentos aumentó (Stunkard, 1998).

Antecedentes

➤ **Edad Media: Medicina árabe**

El representante más importante de esta Medicina fue Avicenna (siglos X-XI), que describe las recomendaciones para tratar la obesidad: 1) Procurar un rápido descenso de los alimentos por el estómago y el intestino con objeto de evitar su completa absorción por el mesenterio. 2) Tomar alimentos voluminosos pero poco nutritivos. 3) Tomar un baño, a menudo, antes de comer. 4) Ejercicio intenso.

➤ **Edad Moderna. Siglo XV: Estigmatización de la glotonería y de la obesidad en la cultura cristiana**

Como ya se ha comentado, la glotonería era claramente condenada en la cultura cristiana antigua, de tal modo que San Agustín en el siglo V y Gregorio I en el siglo VII, incorporaron la gula entre los siete pecados capitales. En Europa, al comienzo de la Edad Moderna, a fines del siglo XV, había mayor disponibilidad de comida y la glotonería ya se relacionaba claramente con la obesidad (Stunkard, 1998). La obesidad es claramente estigmatizada al identificarse la gula con un sujeto obeso que come y bebe sin medida.

➤ **Siglo XVIII**

En la primera mitad del siglo XVIII tuvieron gran auge y difusión las enseñanzas del médico holandés Herman Boerhaave (1668- 1738). Creía que la salud dependía de una adecuada interacción de los vasos y los fluidos. La enfermedad, por el contrario, dependía de una inadecuada interacción y el tratamiento debía abrir los vasos o bien restaurar los fluidos para recuperar un adecuado balance. Algunos de los factores causales de enfermedad, citados por Boerhaave, pueden ser considerados válidos en el momento actual: tipo de aire respirado; tipo y cantidad de alimento y fluidos que ingerimos; tipo de

evacuaciones; cantidad de reposo y ejercicio; estado emocional de la mente; y cantidad y calidad del sueño. Estos factores deberían depender del control individual. Así, en cuanto a la obesidad, la glotonería era una alteración con una responsabilidad individual, una atribución moral del paciente.

Durante el siglo XVIII se publicaron al menos 34 tesis doctorales en relación con la obesidad, lo que demuestra un gran interés por este tema en esta época. Además, en 1727 se publicó la primera monografía escrita en inglés sobre la obesidad, debida a Thomas Short: *Discourse on the causes and effects of corpulency together with the method for its prevention and cure*. Short afirma que la «corpulencia» (término de la época para denominar la obesidad) es un estado mórbido, recuperando así un concepto hipocrático. La obesidad es claramente estigmatizada por Short, ya que queda en buena parte vinculada a la pereza y a la glotonería (Bray, 1990).

En el año 1760 se publica una segunda monografía sobre la obesidad, original de Malcolm Flemyng, miembro de la escuela de Edimburgo: *A discourse on the nature, causes and cure of corpulency*. Flemyng, como Short, consideraba la obesidad severa como una enfermedad, ya que limita las funciones del cuerpo, y acorta la vida a través de la producción de peligrosas alteraciones. Flemyng señala cuatro causas de la obesidad. La primera ligada al exceso de comida, especialmente de tipo graso, aunque describe, con acierto, que no todos los obesos son grandes comedores. Las otras tres causas de la obesidad, condicionadas por teorías vigentes en la época, eran una alteración en la textura de la membrana celular, un anormal estado de la sangre que facilitarían el depósito de la grasa y una «evacuación defectuosa».

Antecedentes

Fleming, en la citada monografía, da consejos terapéuticos para combatir la «corpulencia » de acuerdo con las causas que él creía responsables del proceso. En el primero de estos grupos de consejos relacionados con la alimentación, establece una serie de recomendaciones, en general juiciosas, de modo que algunas de las mismas siguen vigentes en la actualidad. Así, señala que la dieta debería ser moderada en cantidad y que los individuos deberían levantarse de la mesa sin haber saciado totalmente el apetito. También recomienda comer pan moreno en vez de pan blanco, raíces, verduras y otros suculentos vegetales, pero con uso escaso de la mantequilla. En relación con la segunda y tercera causas de la obesidad (la alteración de la membrana celular y el anormal estado de la sangre), Fleming insiste en el consejo de una pobre ingesta de grasa y recomienda el ejercicio y los baños fríos. La cuarta causa de la obesidad era la «evacuación defectuosa». Pese a esta absurda teoría y a la de que el aceite debía abandonar el cuerpo a través del sudor, la orina o las heces, los consejos para corregir este defecto eran parcialmente válidos, ya que, junto a otras inadecuadas recomendaciones, aconsejaba fuertemente el ejercicio (Bray, 1990).

➤ ***Edad Contemporánea: Siglo XIX. Medicina francesa***

Después de la revolución francesa, a inicios del siglo XIX, el principal y más prestigioso foco de la enseñanza de la Medicina se trasladó de Edimburgo a París. Durante las tres primeras décadas del siglo, la Escuela Clínica de París gozó de un gran prestigio. Cuatro claros avances caracterizan a dicha Escuela. El primero es la unificación de la cirugía y la medicina interna para constituir un único curriculum de educación médica. El segundo es que el hospital se convierte en el centro de la práctica clínica y de la investigación médica. El tercero es la introducción de nuevos métodos para la exploración médica y el diagnóstico. Y, finalmente, el cuarto e

importante avance es la introducción de la anatomía patológica como fuente de conocimiento en Medicina (Bray, 1990). Figuras eminentes de esta época fueron Bichat, con su teoría tisular de la enfermedad, y Laennec, con sus estudios sobre la auscultación y su descubrimiento del estetoscopio. De hecho, el examen físico del aparato respiratorio, tal como hoy día lo conocemos, basado en la percusión y la auscultación mediante el estetoscopio, se inicia en estos años en los hospitales de París. Durante esta época el interés por la obesidad o polisarcia (como era también denominada la acumulación adiposa en este período).

➤ **Siglo XX**

En España, Gregorio Marañón (1887- 1960), el creador de la Endocrinología en nuestro país, se ocupó de la obesidad, entre otros textos, en su monografía «*Gordos y flacos*» (1926) (Marañón, 1936). En esta obra, Marañón repasa los conocimientos etiopatogénicos acerca de la obesidad de la época. Admite la multifactorialidad, aunque da demasiada importancia al factor endocrino, influido por el prestigio de la reciente especialidad. Entre sus agudas intuiciones clínicas hace una casi descripción del síndrome metabólico (diabetes, gota, arteriosclerosis), enfatiza la importancia para la salud de perder unos pocos kilos (4 o 5) e insiste en el interés de la prevención dada la gran dificultad del tratamiento. Así, dice: «El obeso adulto, constituido, debe tener en cuenta que un adelgazamiento no será obra de un *plan médico*, sino de un *cambio total de régimen de vida*».

Antecedentes

En Francia, en relación al tema de la obesidad, destaca la figura del endocrinólogo Jean Vague, quien realizó una precisa descripción del que muchos años después sería más conocido como síndrome X, metabólico o plurimetabólico, vinculado a la distribución topográfica androide o central de la grasa. La descripción inicial se realizó en 1947 en la *Presse Médicale* en el trabajo: *La différentiation sexuelle, facteur déterminant des formes de l'obésité* (Vague, 1947).

Durante la segunda mitad del siglo XX se ha hecho un mantenido y creciente esfuerzo para mejorar los resultados terapéuticos en la necesaria lucha para tratar la obesidad. Los consejos alimentarios y el aumento del ejercicio siguen siendo las recomendaciones indispensables para tratar la obesidad. La cirugía bariátrica para tratar casos seleccionados de obesidad mórbida ha tenido un creciente auge, paralelo al aumento de prevalencia de obesidad, en las dos décadas del siglo XX y en este inicio del siglo XXI.



Imagen 1. Venus de Willendorf. Figura de piedra de 11 cm descubierta en 1908 en una excavación paleolítica de Austria. Forma parte de la colección del Naturhistorisches Museum de Viena.

En el año 1994 la revista *Nature* publica el artículo *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue*, debido al grupo liderado por J. Friedman de la Rockefeller University (Zhang, 1994). En esta publicación se describe el gen *ob* en el ratón, la proteína que codifica, la leptina, y el gen homólogo en el ser humano. El ratón *ob/ob* con el gen *ob* mutado y carente de leptina padece obesidad, hiperfagia, dislipemia, hiperinsulinemia y diabetes. Esta situación es reversible mediante la administración de leptina a estos animales. Las esperanzas de que este importante descubrimiento fuera útil en el tratamiento de la obesidad humana se desvanecieron pronto al descubrirse que los pacientes obesos cursan con hiperleptinemia. El descubrimiento de la leptina produjo una extraordinaria avalancha de publicaciones, una auténtica “leptinomanía”, que permitió avanzar no sólo en el conocimiento de los efectos reguladores de la leptina sobre el apetito en el ser humano, sino también, y especialmente, en el conocimiento de su función de señal de déficit nutricional y del nivel suficiente de reservas energéticas para poner en marcha la activación del eje hipotálamo- hipófiso-gonadal en la pubertad.

El descubrimiento del grupo de Friedman estimuló de forma ingente la investigación en biología molecular y en genética en relación a la obesidad, lo que ha permitido aumentar nuestros conocimientos sobre la genética de la obesidad, la regulación del peso corporal y las funciones hormonales de la célula adiposa.

Antecedentes

En los últimos años, desde el año 1994 en que se descubrió el gen *ob* y la leptina, se han producido enormes avances en nuestro conocimiento sobre la genética de la obesidad. De unos pocos genes vinculados a la acumulación adiposa conocidos en 1994, se ha pasado al conocimiento de más de cuatrocientos genes que pueden tener relación con la predisposición a la obesidad (Snyder, 2004). Este espectacular avance ha sido producido por estudios de genes candidatos y de escaneo genómico en humanos y en roedores, y también en modelos animales de obesidad espontánea y tras manipulación genética.

En el momento actual se han podido identificar algunos casos, muy infrecuentes, de obesidad monogénica en el hombre y precisar las regiones genómicas, cuyas mutaciones pueden condicionar la mayor tendencia a la acumulación adiposa en la obesidad poligénica común. Como ya se sospechaba a lo largo de la historia, el componente genético que condiciona una mayor o menor tendencia a la obesidad varía en los distintos individuos y, en general, es mucho más importante en los pacientes que padecen obesidad mórbida.

➤ ***La epidemia del siglo XXI***

En este inicio del siglo XXI los datos relativos al incremento de la prevalencia de la obesidad resultan preocupantes. En España, igual que ocurre en otros países de nuestro entorno, la prevalencia de la obesidad aumenta en la población adulta, y lo que es peor, también lo hace en la población infantil. Este hecho conlleva un incremento de las comorbilidades asociadas, especialmente la DM tipo 2, con el consiguiente aumento de los costos sanitarios y económicos. Por los citados motivos, la OMS ha considerado a la obesidad como «una epidemia del siglo XXI» y lidera junto a diversas instituciones y

sociedades científicas una llamada internacional para luchar contra el sobrepeso y la obesidad (Foz, 1999).

Una esperanza en estos inicios del siglo XXI es que los avances científicos, especialmente en genética, puedan contribuir en el futuro a la indispensable lucha contra la obesidad. Es muy dudoso que la terapia génica pueda aportar en un plazo razonable un progreso significativo, entre otras razones por la excepcionalidad de las formas monogénicas de obesidad, pero quizás el conocimiento de la alteración génica pueda facilitar la elección de las mejores estrategias relativas a la distribución de los componentes de la dieta y a la mayor o menor importancia de la actividad física. Otra esperanza, quizás más previsible, es que el mejor conocimiento de los mecanismos de regulación del peso corporal pueda contribuir al futuro desarrollo de medicamentos más eficaces de los que hemos podido disponer hasta ahora para el tratamiento de la obesidad.

3. CLASIFICACIÓN DE LA OBESIDAD

Existen distintas formas para establecer el grado de obesidad. Para facilitar la realización de estudios epidemiológicos, permitiendo la comparación entre distintas poblaciones e identificar individuos con riesgo de morbimortalidad, el método más aceptado es el índice de masa corporal (IMC). El IMC, se calcula dividiendo el peso, expresado en kilogramos, entre la estatura elevada al cuadrado, expresada en metros. Según la clasificación de la OMS se define la obesidad si el IMC es igual o superior a 30 Kg/m².

| Clasificación | IMC (kg/m ²) |
|----------------------------------|--------------------------|
| Delgadez o desnutrición calórica | < 18,5 |
| Normopeso | 18,5-24,9 |
| Sobrepeso | 25-29,9 |
| Obesidad grado I | 30-34,9 |
| Obesidad grado II | 35-39,9 |
| Obesidad grado III | > 40 |

Tabla 1: Clasificación de la obesidad según la OMS (2012).

En España, también se utiliza la clasificación propuesta por la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO) en el año 2007, presentando mínimas diferencias con la anterior.

| Clasificación | IMC (kg/m ²) |
|-------------------------------------|--------------------------|
| Peso insuficiente | < 18,5 |
| Normopeso | 18,5-24,9 |
| Sobrepeso grado I | 25-26,9 |
| Sobrepeso grado II (preobesidad) | 27-29,9 |
| Obesidad de tipo I | 30-34,9 |
| Obesidad de tipo II | 35-39,9 |
| Obesidad de tipo III (mórbida) | 40-49,9 |
| Obesidad de tipo IV (extrema) | > 50 |

Tabla 2: Clasificación de la obesidad según la SEEDO 2007.

CLASIFICACIÓN DE ACUERDO A LA DISTRIBUCIÓN DE LA GRASA CORPORAL

Distinguimos tres grandes tipos de obesidad atendiendo a la distribución del tejido adiposo:

- Obesidad **androide o central o abdominal** (en forma de manzana): el exceso de grasa se localiza preferentemente en la cara, el tórax y el abdomen. Se asocia a un mayor riesgo de dislipemia, diabetes, enfermedad cardiovascular y de mortalidad en general. Consenso SEEDO (2000). Para definir obesidad abdominal o ginoide utilizamos el siguiente parámetro:
 - Cociente cintura-cadera: perímetro cintura (cm)/ perímetro cadera (cm). Valores > 0.9 en mujer y >1 en hombre es un indicador para padecer complicaciones vasculares y metabólicas (Jara, 2001). Para calcularlo únicamente hace falta una cinta métrica para medir el perímetro de la

Antecedentes

cintura (a nivel de la línea media entre el margen costal inferior y la espina ilíaca antero-superior) y de la cadera (la mayor circunferencia a la altura de los trocánteres) y dividir una por otra.

- Obesidad **ginoide o periférica** (en forma de pera): la grasa se acumula básicamente en la cadera y en los muslos. Este tipo de distribución se relaciona principalmente con problemas de retorno venoso en las extremidades inferiores (varices) y con artrosis de rodilla (genoartrosis). Consenso SEEDO (2000). La relación cintura/ cadera es < 1 en el hombre y $< 0,9$ en la mujer. (Jara, 2001).
- Obesidad de **distribución homogénea**: es aquella en la que el exceso de grasa no predomina en ningún área anatómica concreta (Jara, 2001).

CLASIFICACIÓN DE ACUERDO A LA CELULARIDAD DEL TEJIDO ADIPOSO

- Hiperplásica: Se caracteriza por al aumento del número de células adiposas (Harrinson, 2006).
- Hipertrófica: Aumento del volumen de los adipocitos. (Harrinson, 2006). Semiológicamente, este tipo de obesidad suele caracterizarse por una acumulación troncular de la grasa.

4. EPIDEMIOLOGÍA DE LA OBESIDAD

PREVALENCIA DE OBESIDAD A NIVEL MUNDIAL

La prevalencia de la obesidad a nivel mundial ha crecido exponencialmente en las últimas décadas como demuestran recientes estudios que estiman un aumento medio del índice de masa corporal (IMC) de $0,4\text{Kg/m}^2$ por década desde 1980 (Finucane, 2011). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que en 2008, 1400 millones de adultos tenían sobrepeso ($\text{IMC} \geq 25$) y dentro de este grupo, más de 200 millones de hombres y cerca de 300 millones de mujeres eran obesos ($\text{IMC} \geq 30$) (OMS, 2012). Estudios recientes alertan que este aumento de peso se está produciendo cada vez con más frecuencia en niños (Rocchini 2002).

Este aumento en la incidencia de obesidad, suele atribuirse principalmente a la coexistencia de una sobrealimentación y un estilo de vida sedentario, produciendo un balance energético positivo, en donde la ingesta alimentaria supera al gasto producido tanto por el metabolismo basal como por la actividad física provocando la aparición de depósitos de grasa, que pueden provocar manifestaciones adversas para la salud debido a la aparición de la obesidad. En Estados Unidos, cerca de un tercio de los adultos entre los 20 y los 74 años son considerados obesos (Ogden, 2006).

PREVALENCIA DE OBESIDAD EN ESPAÑA

La prevalencia de obesidad en la población adulta española entre 25 y 64 años, de acuerdo a los resultados del estudio DORICA (Aranceta, 2004), se estima en un 15,5%, con una prevalencia más elevada en mujeres (17,5%) que en hombres (13,2%), registrándose una mayor proporción de obesos en las regiones del Noroeste, Murcia, Sur y Canarias.

El 0,79% de los hombres y el 3,1% de las mujeres entre 25 y 60 años presentan una obesidad tipo II (IMC 35-39) y el 0,3% de los varones y el 0,9% de las mujeres una obesidad mórbida (IMC \geq 40 kg/m²). Datos del estudio DRECE (Dieta y Riesgo de Enfermedades Cardiovasculares en España) han puesto de manifiesto un incremento del 34,5% en la prevalencia de obesidad en 14 años, pasando de un 17,4% en 1992 a un 24% en 2006 (Rubio, 2006).

Por las connotaciones terapéuticas que conlleva la aproximación a la obesidad mórbida, merece la pena resaltar la elevada prevalencia de este segmento de obesidad en las regiones de Canarias, Sur y Este.

Para la población mayor de 65 años se estima una prevalencia de obesidad del 35%; 30,9% en hombres y 39,8% en mujeres. Esta prevalencia es mayor (36%) en el caso de población anciana no institucionalizada (Gutiérrez-Fisac, 2004) que en ancianos institucionalizados (21%) (Aranceta-Batrina, 2005).

Los resultados del estudio Kid (Aranceta, 2004) pusieron de manifiesto que la obesidad en la población española en edad infantil y juvenil está adquiriendo dimensiones que merecen una atención especial. La prevalencia de obesidad según este estudio es más importante en la población en edad escolar, especialmente en los años que preceden al brote puberal.

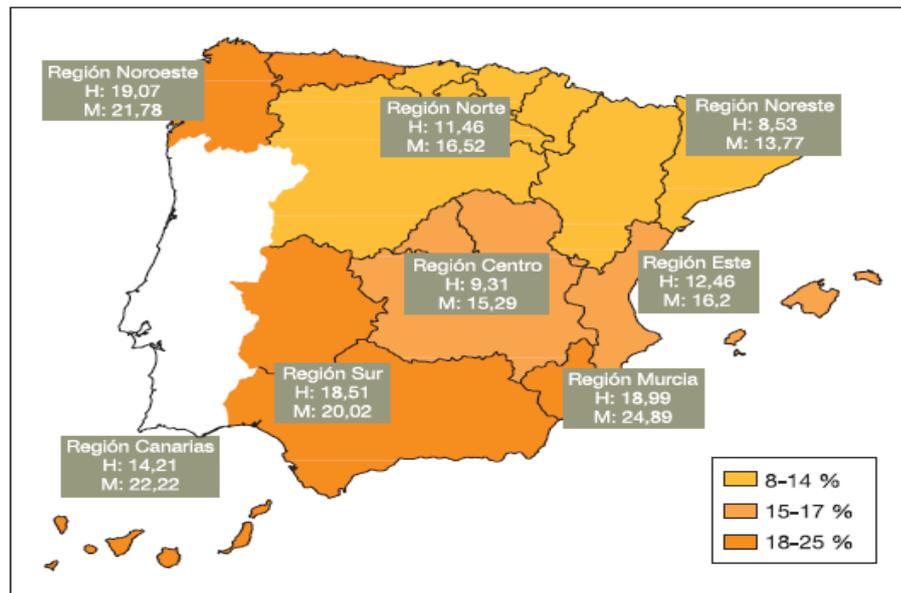


Figura 1. Distribución de la prevalencia de obesidad (%) por áreas geográficas y sexo. Estudio DORICA (Aranceta, 2004).

5. ETIOLOGÍA DE LA OBESIDAD

La obesidad es una enfermedad heterogénea y compleja que afecta cada día a un mayor número de individuos, primordialmente de los países desarrollados. Se ha invocado como causa de su creciente incidencia el cambio en el estilo de vida que conlleva el desarrollo tecnológico, que implica una menor actividad física y por lo tanto un menor gasto energético, a una dieta no balanceada por excesiva ingesta de productos de comida rápida, ricos en grasas y pobres en componentes nutritivos. Sin embargo, cada vez es más evidente que existe agregación familiar, no sólo por compartir los mismos hábitos de vida, sino también por compartir los mismos genes y con ello la misma actividad metabólica (Pérusse, 1988; Simonen, 2002).

FACTORES MEDIOAMBIENTALES

Es frecuente observar familias enteras obesas y la heredabilidad del peso corporal es similar a la propia estatura. Sin embargo, la herencia no suele ser mendeliana y es difícil establecer donde acaba la intervención de los genes y donde comienza la de los factores ambientales. En relación con la obesidad, los hijos adoptivos suelen parecerse más a sus padres biológicos que a los adoptivos, lo que respalda claramente la importancia de la influencia genética. Sea cual sea la participación genética, está claro también que el ambiente desempeña un papel esencial en la obesidad, como se demuestra el hecho de que la hambruna impide la obesidad, incluso en las personas con mayor predisposición a ella. Sin duda, los genes influyen en la predisposición a la obesidad, cuando se conjugan con unas condiciones inadecuadas de alimentación que conllevan a una ingesta calórica mayor a la necesaria de manera prolongada.

Hasta hace dos décadas, se entendía a la obesidad como una enfermedad de la élite socioeconómica pero, a partir de estudios epidemiológicos más recientes, se puede constatar cómo este hecho está cambiando.

Un boletín publicado por la OMS en diciembre de 2004, centrado en estudios realizados en poblaciones adultas de los países en desarrollo y publicados entre 1989 y 2003, presenta un panorama distinto de la relación entre clase social y obesidad que resume en tres conclusiones:

- ✓ No se puede considerar a la obesidad en el mundo como una enfermedad de la élite social.
- ✓ La carga de la obesidad de cada país en desarrollo tiende a desplazarse hacia los grupos de menor estatus socioeconómico a medida que aumenta el Producto Nacional Bruto (PNB) de dichos países.
- ✓ El desplazamiento de la obesidad hacia las mujeres de clase social baja ocurre antes que en los hombres conforme avanza el grado de desarrollo económico.

Las clases muy bajas, con dificultad para conseguir alimentos, con niveles muy altos de pobreza, con alto gasto energético derivado de las actividades que genera esa misma pobreza, no sufren de obesidad. Pero las personas de clase social baja o media-baja, tanto de países en desarrollo como de países desarrollados, presentan los mayores incrementos en sobrepeso y obesidad.

SÍNDROMES GENÉTICOS ASOCIADOS A LA OBESIDAD

Se ha podido demostrar la existencia de síndromes genéticos específicos en los roedores donde se sabe que la obesidad se debe a mutaciones distintas transmitidas por el genoma. Mutaciones de un solo gen producen dos tipos de acciones: hiperfagia y disminución del gasto energético. La identificación del gen ob en los ratones genéticamente obesos (ob/ob) fue un paso importante (Ingalls, 1950); estos ratones desarrollan obesidad severa con resistencia a la insulina, hiperfagia, infertilidad e hipotermia. El producto de este gen ob es la leptina. Este gen ob existe en el hombre y da lugar a síndromes de obesidad mórbida de comienzo precoz debido a mutaciones que inactivan la leptina o generan resistencia a su acción pero, por el momento, no queda claro que sus mutaciones o polimorfismos desempeñen un papel importante en las formas habituales de obesidad.

Otro gen importante como causa de obesidad es el db/db, descubierto poco tiempo después de la identificación de los ratones ob, cuyo producto es el receptor situado en las membranas celulares para recibir a la leptina. Aunque sus mutaciones también producen obesidad parece que, al igual que para con el gen ob/ob, no juega un gran papel en la obesidad habitual en humanos.

SÍNDROMES ESPECÍFICOS VINCULADOS A LA OBESIDAD

Algunos de los síndromes que se relacionan con la obesidad son los que siguen:

- ✓ CENTRALES: Prader-Willi, Laurence-Moon- Bield, Ahlstrom, Cohen, Carpenter, etc.
- ✓ SD. DE CUSHING: que reúne en su definición a la obesidad central, hipertensión e intolerancia a la glucosa.

- ✓ HIPOTIROIDISMO: gran parte del sobrepeso de estos enfermos se debe al mixedema que presentan.
- ✓ INSULINOMA: estos pacientes suelen engordar a consecuencia de la sobrealimentación que realizan para evitar los síntomas de la hipoglucemia; el aumento del sustrato junto con los elevados niveles de insulina estimulan el almacenamiento de la energía en forma de grasa.
- ✓ CRANEOFARINGIOMA y otros trastornos hipotalámicos como tumores, inflamaciones o traumatismos tienen un papel importante. Un ejemplo de la importancia del normal funcionamiento del hipotálamo es que hormonas como la hormona de crecimiento (GH), que tiene actividad lipolítica, disminuye en la obesidad y aumenta con el adelgazamiento.

OBESIDAD YATROGÉNICA

Se han descrito fármacos que por distintos motivos causan obesidad: bien por aumentar el apetito y frenar la lipólisis, bien por propiciar la insulinoresistencia y la hiperinsulinemia que a su vez conlleva una mayor captación de glucosa por el tejido graso donde se convertirá en grasa.

Son muchos los fármacos (Enríquez, 1996) capaces de poseer estos efectos secundarios entre los cuales se encuentran: los hipotensores (betabloqueantes y diuréticos tiazídicos, principalmente), los antidepresivos tricíclicos y neurolépticos, los glucocorticoides, los esteroides sexuales, los antidiabéticos como la sulfonilurea y la insulina, los antihistamínicos de tipo I como la flunarizina y cinarizina, los antiepilépticos como el valproato, los antituberculosos como la isoniacida y los antimigrañosos del tipo antiserotoninérgicos.

FACTORES NEURALES

Los mecanismos básicos que regulan la ingestión de alimentos (sensación de apetito/saciedad) están localizados en el sistema nervioso central. Diversos neurotransmisores y neuropéptidos están implicados en el comportamiento alimentario. Así los tumores hipotalámicos pueden provocar la aparición de polifagia, hiperplasia de los islotes de Langerhans e hiperinsulinismo. En diferentes tipos de obesidad experimental se han descrito alteraciones del contenido de neuropéptidos cerebrales (incrementos de noradrenalina en áreas hipotalámicas, aumentos de triptófano y serotonina). Se han encontrado concentraciones elevadas de endorfinas β , así como que la administración de naloxona inhibe la ingestión de alimentos en ratones genéticamente obesos (ob/ob). Algunos de los marcadores implicados específicamente en el control de la ingesta son: neuropéptido Y, leptina, POMC, CCK. El papel del neuropéptido Y es esencial en la regulación de la sensación de hambre y/o saciedad, así cuando disminuye la síntesis hipotalámica de dicho neuropéptido, disminuye la ingesta de alimentos, es decir se produce sensación de saciedad. Otros neuropéptidos controlan la regulación de la termogénesis (receptores adrenérgicos beta 2 y 3, proteínas desacoplantes); y otros expresan distintas vías de señalización para la adipogénesis.

Aparte de los ya mencionados, otros mecanismos fisiológicos donde subyace la carga genética para el desarrollo de obesidad pueden ser una baja tasa de metabolismo basal, la disminución en la oxidación de macronutrientes y un bajo contenido en masa magra corporal (Varo, 2002)

6. COMPLICACIONES DE LA OBESIDAD

Se ha calculado que la obesidad es la causante, en países como EE.UU., de más de 300.000 muertes anuales producidas, sobre todo, por el aumento de la incidencia de la diabetes mellitus, de las enfermedades cardiovasculares, de la hipertensión arterial y de algunos tipos de cáncer. Son bien conocidas las consecuencias del exceso de peso sobre el sistema cardiovascular, respiratorio, digestivo, osteoarticular, reproductor y endocrino-metabólico, así como la relación entre obesidad y algunos tipo de cáncer. (Figura. 2)

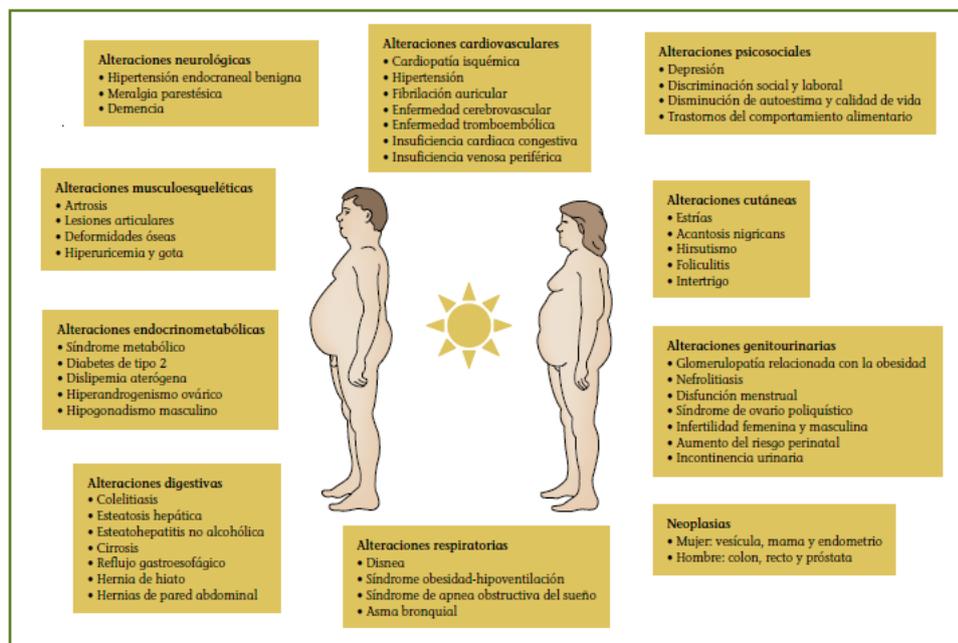


Figura 2: Comorbilidades asociadas a la obesidad.

Como norma general conviene tener en cuenta que las mayores complicaciones corresponderán a los mayores sobrepesos (obesidad mórbida y superobesidad) y que también influye la edad, la duración del exceso ponderal y la distribución de la grasa adicional, puesto que la obesidad androide/visceral/abdominal se acompaña del llamado síndrome de resistencia a la insulina, que cursa con hipertensión arterial, dislipemia, intolerancia hidrogenada y alteraciones

Antecedentes

cardiovasculares que en su conjunto aportaran una mayor morbi-mortalidad. A continuación se desarrollan algunos de los principales problemas de salud consecuencia de la obesidad:

ALTERACIONES ENDOCRINAS Y METABÓLICAS

- SÍNDROME METABÓLICO

El concepto de síndrome metabólico ha evolucionado mucho desde su introducción en la década de los años 1920 hasta la actualidad. Aunque los distintos organismos y grupos de expertos científico-médicos no coinciden exactamente en su definición ni en sus componentes, atendiendo a criterios clínicos y epidemiológicos, la mayoría conviene en considerarlo como un desorden metabólico que agrupa toda una serie de alteraciones metabólicas y funcionales estrechamente relacionadas entre sí, incluyendo como principales: obesidad de distribución central, resistencia a la insulina, hiperglucemia, dislipidemia aterogénica, con elevación de triglicéridos y disminución de colesterol-HDL e hipertensión.

Desde que fue descrito por primera vez por Kylin en los años 1920 como la agrupación de hipertensión, hiperglucemia y gota, el concepto de síndrome metabólico ha evolucionado, incluyendo la obesidad con acumulación excesiva de tejido adiposo en la parte superior del cuerpo como la anomalía metabólica más frecuente relacionada con la diabetes de tipo 2 y la enfermedad cardiovascular (Zimmet, 2001). Posteriormente, se han acuñado otras denominaciones para este síndrome, como síndrome X (Reaven, 1988), síndrome de resistencia a la insulina (De Fronzo, 1991), o “cuarteto de la muerte” (Kaplan, 1989), si bien estos conceptos no han sido coincidentes en cuanto a las anomalías metabólicas que englobaban.

Aunque el término de síndrome metabólico se ha ido afianzando y ha sido finalmente aceptado por la comunidad científica como el más utilizado pese a la existencia de controversias, hasta 1998 no se produjo una iniciativa clara para desarrollar una definición reconocida internacionalmente de este síndrome y de sus manifestaciones clínicas y epidemiológicas. En este sentido, distintos grupos de expertos han propuesto definiciones, siendo las más aceptadas las desarrolladas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), el European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR) y el National Cholesterol Education Program-Third Adult Treatment Panel (Tabla. 3).

Todas ellas coinciden en señalar como sus componentes esenciales obesidad, definida como un índice de masa corporal (IMC \geq 30), resistencia a la insulina, dislipidemia e hipertensión.

| | OMS 1999 | EGIR 1999 | NCEP 2001 |
|--|---|---|---|
| | Diabetes o ITG o RI | RI o hiperinsulinemia (en no DM) | Tres de los siguientes |
| | Más dos de los siguientes | Más dos de los siguientes | |
| Alteración del metabolismo de la glucosa | | GBA > 110 mg/dl | GBA > 110 mg/dl |
| Dislipemia | TG > 150 mg/dl y/o HDL • < 35 mg/dl (hombres) • < 38,7 mg/dl (mujeres) | TG > 175 mg/dl y/o HDL • < 38,7 mg/dl o dislipemia tratada | TG > 150 mg/dl y/o HDL • < 40 mg/dl (hombres) • < 50 mg/dl (mujeres) |
| PA elevada | PA > 140/90 mmHg y/o necesidad de medicación | PA > 140/90 mmHg y/o necesidad de medicación | PA > 130/85 mmHg y/o necesidad de medicación |
| Obesidad | IMC > 30 y/o • ICC > 0,9 (hombres) • ICC > 0,85 (mujeres) | Obesidad central Perímetro cintura • > 94 cm (hombres) • > 80 cm (mujeres) | Obesidad central Perímetro de cintura • > 102 cm (hombres) • > 88 cm (mujeres) |
| Otros | Microalbuminuria | | |

ITG: intolerancia a la glucosa; RI: resistencia a insulina; GBA: glucemia basal alterada; TG: triglicéridos; PA: presión arterial; ICC: Índice cintura cadera.

Tabla 3. Criterios definitorios del síndrome metabólico según 3 organizaciones (Artola, 2009).

- **DIABETES MELLITUS**

La obesidad es el factor etiológico más directamente relacionado con la aparición de la diabetes mellitus tipo 2. De forma global, el 90% de los diabéticos son diabéticos tipo 2 y de esos, el 90% presenta o sobrepeso u obesidad (OMS, 2012). Pequeños aumentos del IMC y del tamaño de los adipocitos se asocian con un incremento significativo del riesgo de desarrollar diabetes mellitus. Se ha calculado que, en población de 20 a 45 años, el riesgo se incrementa casi en 4 veces a partir de un IMC mayor de 27,8 para los varones y de 27,3 para las mujeres (Forga, 2002). Inversamente, la pérdida de peso aumenta la sensibilidad a la insulina en los diabéticos (Girousse, 2013). Parece que el mecanismo clave que relaciona la obesidad con la diabetes mellitus tipo 2 es la insulinoresistencia; otro hecho importante, es el tiempo de evolución de la obesidad que es un factor de riesgo independiente y además constituye el factor modificable más importante para la diabetes. La mayoría de los pacientes con DM2 son obesos y la epidemia de obesidad en todo el mundo explica el progresivo aumento de la incidencia y prevalencia de DM2, incluso en niños y adolescentes, (Tirosh, 2011) y la previsión es que este ascenso continúe de forma exponencial en los próximos años.

Se han propuesto tres mecanismos que relacionan la obesidad con resistencia a la insulina y el desarrollo de diabetes:

- Aumento de producción de adipocinas y citocinas.
- Depósitos de grasa ectópica, especialmente en el hígado.
- Disfunción mitocondrial, evidente por el descenso de la cantidad/función mitocondrial, lo que puede contribuir, por un lado, a disminuir la sensibilidad a la insulina y, por otro, a afectar a la función de la célula beta.

Por otra parte, la relación entre obesidad e hiperinsulinemia está descrita desde hace unos 50 años. Se sabe que en individuos obesos normoglucémicos existe un mecanismo de compensación, bien aumentando la función o la masa de células beta. La pérdida de este efecto compensatorio, que puede estar condicionado por factores genéticos o epigenéticos, lleva a una intolerancia a la glucosa y a una posterior DM2.

- **DISLIPEMIAS**

La obesidad se vincula con un perfil lipídico aterógeno (Forga, 2002). Las anomalías lipídicas más prevalentes en la obesidad son: Aumento del colesterol total, de los triglicéridos, de las partículas VLDL (lipoproteínas de muy baja densidad), del colesterol LDL (lipoproteínas de baja densidad) y descenso del colesterol HDL (lipoproteínas de alta densidad).

La regulación de los niveles de colesterol en plasma incluye factores de regulación a nivel intra y extracelular. Las dos principales enzimas que intervienen en su regulación son: HMG-CoA reductasa (3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA) y ACAT (acyl CoA:cholesterol O-acyltransferase). Los inhibidores de HMG-CoA son muy efectivos para reducir los niveles de colesterol en plasma en humanos (Amin, 1993). ACAT mediante la catalización por esterificación celular del colesterol interviene en la absorción, secreción y acumulación del colesterol en la pared vascular (Helgerud, 1981; Suckling, 1985).

Se cree que la clave de todas estas alteraciones esté en el aumento de la producción de las VLDL el cual está, a su vez, estrechamente relacionada con la insulinemia y el porcentaje de grasa corporal, en especial la grasa visceral. En la obesidad existe un excedente de ácidos grasos libres que no puede ser metabolizado por

Antecedentes

el tejido graso en su totalidad y pasa al hígado. La producción de estas VLDL se ve aumentada debido a esta mayor afluencia de ácidos grasos libres, lo que terminará condicionando un aumento de las LDL.

- ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

La asociación entre obesidad y diferentes formas de enfermedad cardiovascular es compleja, probablemente debido a los diferentes mecanismos fisiopatológicos que involucran gran cantidad de factores e interactúan de una manera enmarañada (figura. 3).

La obesidad puede causar aterosclerosis coronaria a través de mecanismos bien descritos y aceptados, tales como dislipemia, hipertensión y diabetes mellitus tipo 2 (Narkiewicz, 2005; Poirier, 2006). Sin embargo, se ha demostrado que la asociación entre obesidad y enfermedad cardiovascular (Romero-Corral, 2006) podría incluir muchos otros factores, como inflamación subclínica, activación neurohormonal con aumento del tono simpático (Sierra-Johnson, 2008) altas concentraciones de leptina e insulina (Romero-Corral, 2008), AOS (apnea obstructiva del sueño) e intercambio aumentado de ácidos grasos libres, y también debido al depósito de grasa en áreas específicas del cuerpo con función directa en la patogenia de la aterosclerosis coronaria, como la grasa subepicárdica (Chaowalit, 2008).

El riesgo cardiovascular puede ser más alto cuando se tienen antecedentes familiares de enfermedad cardiovascular prematura y en sujetos con colesterol HDL bajo, triglicéridos elevados, intolerancia a la glucosa y elevaciones de la proteína C-reactiva, del fibrinógeno y de la homocisteína.

La **homocisteína** es un aminoácido de gran importancia en el metabolismo celular el cual se ha considerado como factor aterogénico en diversas patologías tales como las enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, por lo que se considera un importante factor predictivo para evaluar enfermedad cardiovascular. El rango de referencia se estima entre 5-15 μ mol/L, valores por encima están asociados con trastornos cardiovasculares.

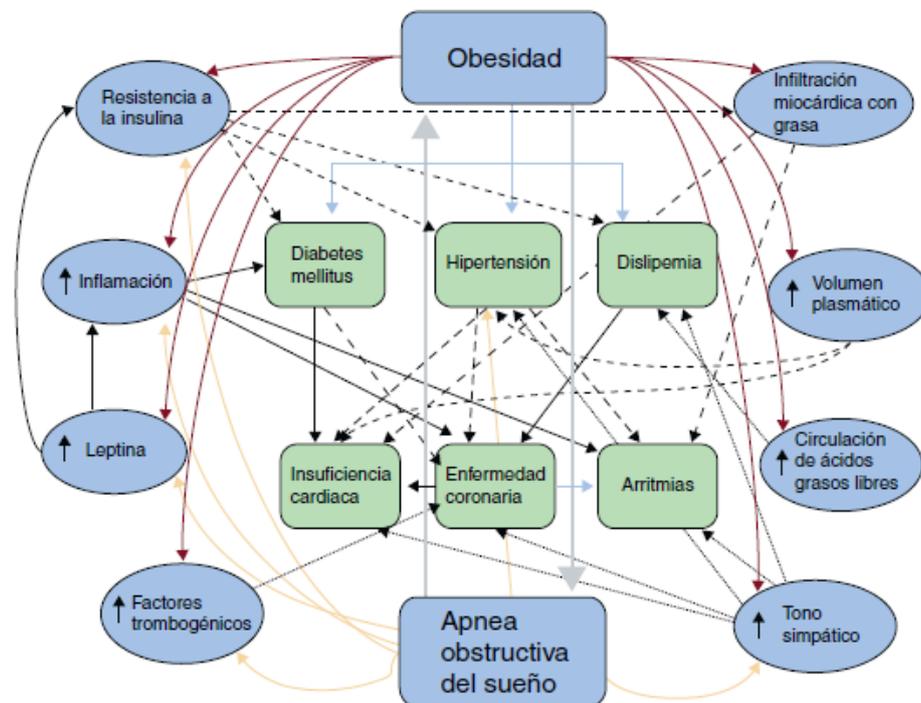


Figura 3. Fisiopatología de la obesidad y la enfermedad cardiovascular (López-Jiménez, 2011).

La obesidad es la primera causa de **hipertensión arterial** adquirida. Existe asociación entre el aumento del peso corporal y los niveles de presión arterial (Wilson, 2002; Meigs, 2003). En el estudio NHANES III, el 36% de los individuos con sobrepeso y más del 60% de los que presentaban un IMC > 35 fueron diagnosticados de HTA. Son muchos los mecanismos que parecen estar implicados, alguno de los cuales, explica esta asociación por el aumento de la concentración de la insulina que suele acompañar a la obesidad. Esta situación de

Antecedentes

hiperinsulinemia tiene como consecuencias a nivel renal un aumento, a su vez, de la reabsorción tubular de sodio, lo que conlleva un aumento de la resistencia vascular periférica para compensar el aumento del flujo sanguíneo.

La hiperleptinemia y el aumento de ácidos grasos libres, asociados en ambos casos a la obesidad, parecen contribuir también, induciendo la activación del sistema nervioso simpático y la vasoconstricción periférica. A su vez, esta activación del simpático podría generar más retención de sodio a nivel renal, empeorando esta situación (Antic, 2003).

En la hipertensión sin obesidad, el corazón sufre una hipertrofia concéntrica con engrosamiento de las paredes ventriculares. En presencia de obesidad, se produce una dilatación excéntrica con aumento de la precarga y del trabajo necesario para la contracción. La combinación de obesidad e hipertensión conduce a un engrosamiento de la pared ventricular con un mayor volumen cardíaco y así a una mayor posibilidad de fallo cardíaco (He, 2001).

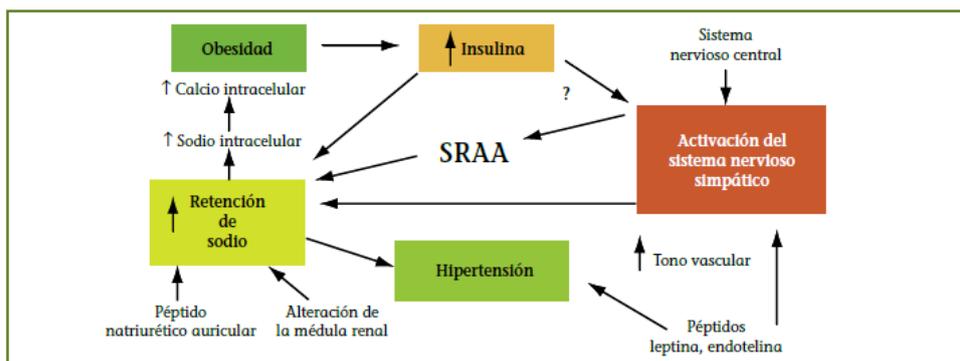


Figura 4: Mecanismos etiopatogénicos de la hipertensión en los pacientes con obesidad. SRAA: sistema renina-angiotensina-aldosterona.

En la obesidad se produce en ambos sexos un aumento de la mortalidad por cardiopatía. Las personas con obesidad tienen el doble de riesgo de sufrir insuficiencia cardiaca que los sujetos con un IMC normal (Krum, 2009). Los pacientes con grados avanzados de obesidad que sufren insuficiencia cardiaca sin una causa identificable de disfunción del ventrículo izquierdo son diagnosticados de cardiomiopatía por obesidad (Wong, 2004).

- **ENFERMEDADES GASTROINTESTINALES: ESTEATOSIS HEPÁTICA**

La presencia de obesidad hace que la grasa se acumule en el citoplasma de los hepatocitos formando vesículas de triglicéridos y en ocasiones se acompaña de infiltrado inflamatorio lobular y portal, necrosis y abalonamiento hepatocitario con eventuales cuerpos de Mallory y fibrosis progresiva hasta llegar al estadio de cirrosis y hepatocarcinoma.

Los hepatocitos son activamente involucrados en el metabolismo de la glucosa y los lípidos (incluyendo colesterol y lipoproteínas), síntesis de proteínas plasmáticas y la producción de proteínas inflamatorias tales como la proteína C reactiva (PCR); por tanto es fácil suponer que una alteración del metabolismo hepático tenga consecuencias graves en el resto del organismo. La obesidad está asociada con esteatosis, una acumulación patológica de lípidos dentro de los hepatocitos. La enfermedad del hígado graso no asociada al consumo de alcohol (NAFLD) es la forma más común de enfermedad hepática crónica. Esta entidad se caracteriza por el depósito de grasa en el parénquima hepático, que aborda un gran espectro de patologías hepáticas que podríamos resumir según la Asociación Estadounidense de Gastroenterología (AGA) en:

Antecedentes

- Esteatosis simple sin datos de inflamación, conocida como hígado graso.
- Depósito de grasa acompañada de inflamación, conocido como esteatohepatitis no alcohólica (EHNA).
- Fibrosis hepática.

En un estado tardío de la enfermedad esta puede progresar a inflamación hepática convirtiéndose en esteatohepatitis (NASH) y culminar con fibrosis o cirrosis.

La obesidad es, sin duda, el principal factor asociado a este depósito de grasa a nivel hepático, siendo seis veces más frecuente la EHNA en pacientes obesos que en pacientes no obesos.

En la obesidad, citocinas inflamatorias (IL-1 β , TNF α y IL-6) y adiponectinas liberadas del tejido adiposo visceral llegan al hígado a través de la vena portal y pueden directamente interferir con las funciones hepáticas. En un estado inflamatorio, TNF α puede inducir apoptosis del hepatocito y la activación de la respuesta fibrogénica, mientras IL-6 está implicada en la inducción de la respuesta de fase aguda por aumento de la PCR. A diferencia de las citocinas, la adiponectina tiene efectos protectores en el hígado. Administración de adiponectina mejora la esteatosis, probablemente por inhibición de la vía de señalización del TNF- α (Pagano, 2005).

7. TEJIDO ADIPOSO COMO ÓRGANO ENDOCRINO

Tradicionalmente, los adipocitos se han considerado depósitos de energía que almacenaban los triglicéridos durante la alimentación y liberaban ácidos grasos durante el ayuno, para proporcionar energía a los tejidos. La clonación y descripción del gen de la leptina (Zhang, 1994) supuso el mayor impulso en el estudio del tejido adiposo como parte activa y reguladora del metabolismo. Sin embargo durante la última década se han identificado diferentes proteínas secretadas por los adipocitos, que se conocen con el nombre de adipocinas y que actúan sobre otros tejidos, como el músculo, el páncreas, el hígado y el sistema nervioso central (Figura 5). Estos factores secretados por el tejido adiposo tienen un papel central en el control de la homeostasis ya que intervienen en la regulación de procesos fisiológicos tales como la ingesta de alimento, el balance energético, la acción de la insulina, el metabolismo lipídico y glucídico, la angiogénesis, el remodelado vascular, la presión sanguínea y la coagulación. La función del tejido adiposo como un órgano endocrino tiene importantes implicaciones para comprender las relaciones fisiopatológicas entre el exceso de grasa corporal y los estados patológicos como la resistencia a la insulina y la diabetes tipo 2 (Kahn, 2000; Wajchenberg, 2000).

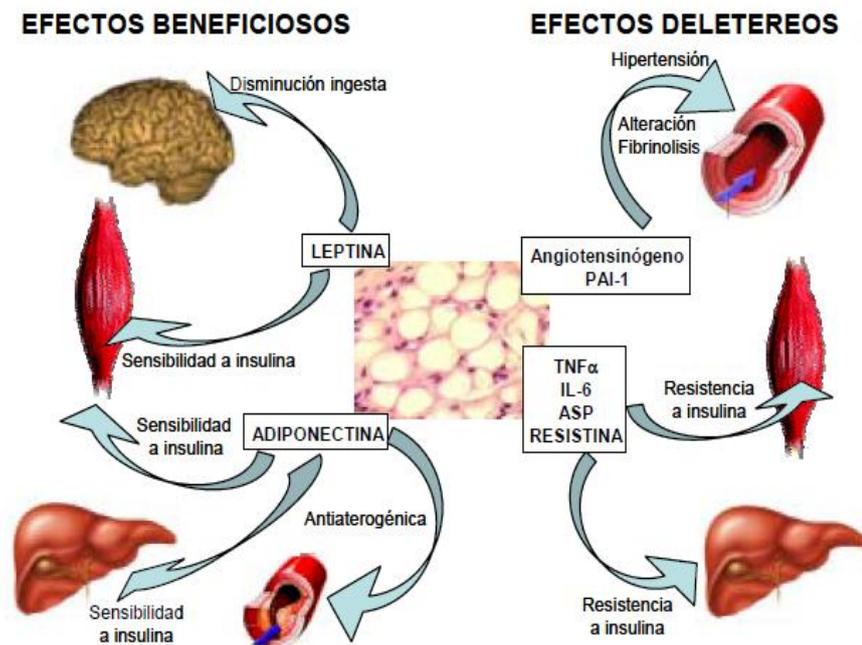


Figura 5. Factores secretados por el tejido adiposo implicados en la homeóstasis energética, sensibilidad a insulina y la homeóstasis vascular.

En individuos obesos hay una producción excesiva de ASP (proteína estimuladora de la acilación), TNF α (factor alfa de necrosis tumoral), IL-6 (interleuquina-6) y resistina, los cuales disminuyen la acción de la insulina en hígado y músculo esquelético. A nivel vascular, el angiotensinógeno y PAI-1 (inhibidor 1 del activador del plasminógeno) favorecen la hipertensión. En cambio, la adiponectina protege de la formación de ateromas. La leptina, sensibiliza a la insulina y regula el balance energético disminuyendo la ingesta. En individuos obesos, la leptina está incrementada pero presentan resistencia a esta hormona. La adiponectina estimula la sensibilidad a insulina a nivel periférico y esta disminuida en la obesidad.

La lista de adipoquinas descritas ha ido creciendo en los últimos años. Algunas de las adipoquinas, tales como el angiotensinógeno y el PAI-1 están implicadas en la homeóstasis vascular. Otras adipoquinas como la adiposina, la ASP, el TNF- α , la IL-6 y la resistina están asociados con la aparición y mantenimiento de la resistencia a insulina. Por el contrario, adipoquinas como la leptina y la adiponectina están asociadas a una mayor sensibilidad a insulina. Recientemente ha sido descrita la visfatina, una hormona secretada en el tejido adiposo que es capaz de unirse al receptor de la insulina y estimular la señalización de esta vía (Fukuhara, 2005; Hug, 2005).

Posteriormente se describen algunas de las adipoquinas específicas del tejido adiposo más relevantes en el papel de la obesidad:

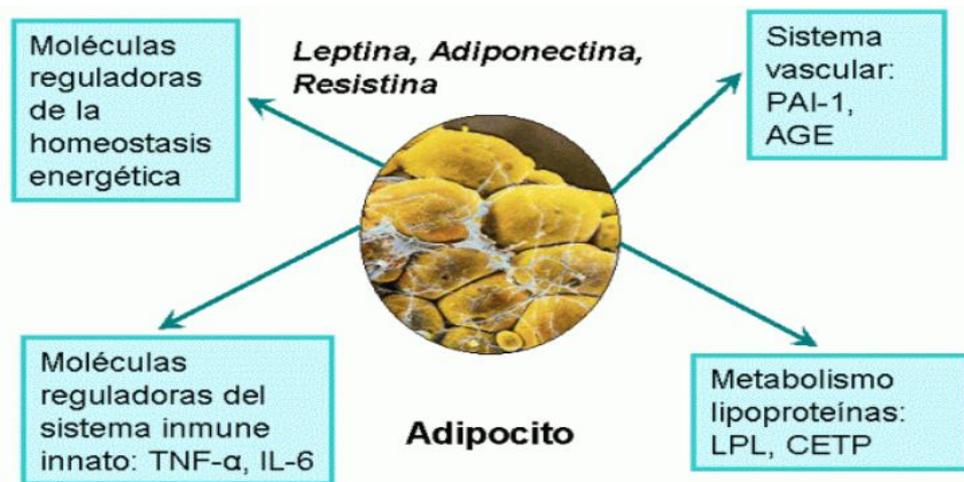


Figura. 6: Principales adipoquinas en el papel de la obesidad. TNF- α (Factor α de necrosis tumoral), IL-6 (Inteleuquina 6), PAI-1 (inhibidor 1 del activador del plasminógeno), AGE (ácidos grasos esenciales), LPL (lipoproteína lipasa), CETP (proteína transportadora de ésteres de colesterol).

ADIPONECTINA

La adiponectina fue clonada y descrita durante los años 1995 y 1996 por cuatro grupos independientes utilizando técnicas diferentes, por ello, es conocida con distintos nombres según su origen sea humano, *apM1* (Maeda, 1996) y GPB28 (Nakano,1996), o de ratón, Acrp30 y adipoQ (Hu,1996). El *locus* del gen de la adiponectina humana (*apM1*) se localiza en el cromosoma 3q27. La *apM1* consta de 2 intrones y 3 exones que codifican para una proteína de 244 aminoácidos (247 aminoácidos en ratón) que consiste en 4 dominios: un péptido señal de 20 aminoácidos, una región N-terminal variable sin homología conocida, una región colágena y un dominio globular C terminal (Beltowski, 2003; Chandran, 2003).

De los factores producidos por el tejido adiposo implicados en el control de la homeostasis energética, la adiponectina es el único que es exclusivamente sintetizado y secretado por dicho tejido (Hu, 1996; Maeda, 1996). Se trata de una hormona de 30 kDa, la cual se le ha atribuido el rol de antidiabético, antiinflamatorio y antiaterogénico. La adiponectina circula en plasma en concentraciones entre 5 y 30 µg/ml y representa el 0,01% del total de las proteínas plasmáticas (Beltowski, 2003; Phillips, 2003). Su concentración en el plasma depende del sexo, ya que es menor en los varones que en las mujeres, y también de la edad o la etnia (Hanley, 2003; Snehalatha; 2003;). En la Figura 7 se puede ver los factores que afectan a la concentración de adiponectina plasmática.

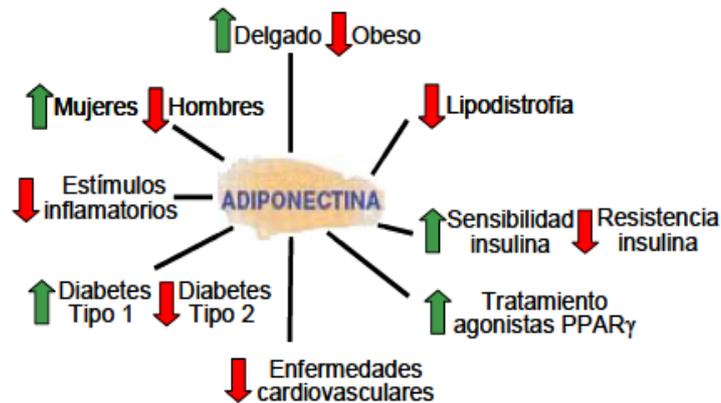


Figura. 7: Factores o estados patológicos que afectan a los niveles adiponectina. Resumen de las diferentes condiciones o enfermedades que están asociadas a niveles altos (flecha verde) o niveles bajos (flecha roja) de adiponectina. Esquema adaptado de (Trujillo, 2005).

Recientemente se ha realizado un estudio en una población de adolescentes obesos, con sobrepeso y de peso normal y se vio una asociación inversa significativa entre la proporción de adiponectina, cintura-cadera total, IMC, triglicéridos y la presión arterial sistólica y una asociación positiva significativa con la lipoproteína de alta densidad (HDL) (McCourt, 2013).

La adiponectina ejerce sus acciones en el organismo mediante la interacción con sus receptores específicos. Se han identificado dos receptores para esta molécula: adipoR1 y adipoR2, con una amplia distribución en el organismo. El adipoR1 presenta una mayor afinidad por la fracción globular de la adiponectina. El adipoR2 se expresa fundamentalmente en el hígado, y manifiesta una mayor afinidad por la forma de estructura completa (Kadowaki, 2005). También se ha demostrado la expresión de ambos receptores en células β pancreáticas, con valores de expresión parecidos o superiores a los descritos en el hígado o el músculo esquelético, respectivamente (Yamauchi, 2003a). Los efectos fisiológicos que se obtienen de la unión de esta adipocitoquina a sus receptores son, por un lado, favorecer la sensibilidad a la insulina, mediante el aumento de la captación de glucosa y de la oxidación de AGL, y mediante la reducción de la

Antecedentes

gluconeogénesis, y por otro lado, ejercer un efecto antiinflamatorio que mantiene un equilibrio con otras citoquinas segregadas por el tejido adiposo. En la Figura 8 muestra el mecanismo de acción de la adiponectina:

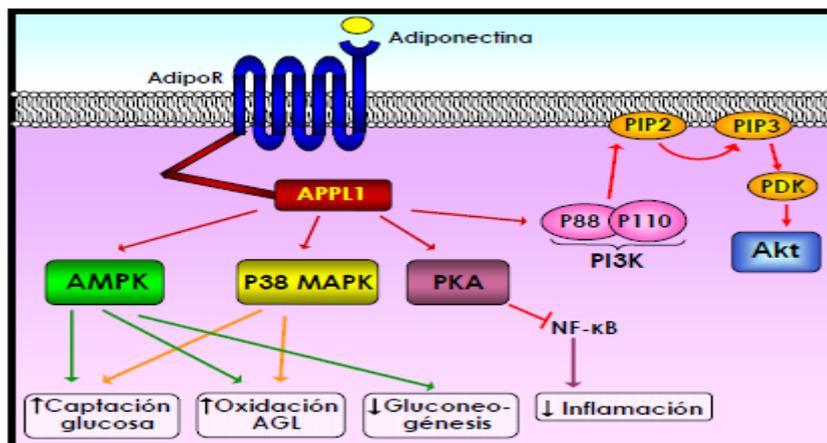


Figura 8. Efectos de la adiponectina mediados por sus receptores. APPL1, proteína adaptadora que contiene un dominio de homología pleckstrin, un dominio de unión a fosfotirosina (PTB) y un motivo zipper de leucina; MAPK, protein quinasa activada por mitógeno; NF-κB, factor nuclear κB; PDK, protein quinasa dependiente de fosfoinosítido; PI3K, fosfatidil inositol 3-quinasa; PIP2, fosfatidil-inositol bifosfato; PIP3, fosfatidil-inositol trifosfato; PKA, protein quinasa A o protein quinasa dependiente de AMPc.

Existen numerosas evidencias que sugieren que son necesarios ciertos niveles de adiponectina para mantener la homeostasis energética y prevenir enfermedades metabólicas. Se ha demostrado que bajos niveles de adiponectina se asocian de forma independiente con el síndrome metabólico, siendo dicha asociación incluso más fuerte que la que presentan otros marcadores inflamatorios (Matsushita 2006). También se ha observado que la administración exógena de adiponectina a individuos obesos aumenta la sensibilidad a la insulina, efecto asociado a una disminución de los niveles plasmáticos de AGL y triglicéridos (Fruebis, 2000; Hotta, 2001). Esta disminución del nivel de AGL es consecuencia de la activación de la AMPK en músculo esquelético por la adiponectina globular y en el hígado por la molécula completa (Yamauchi 2002). Este grupo de investigación realizó

distintos estudios con el fin de identificar las vías por las que la adiponectina ejerce sus efectos beneficiosos en estos desórdenes metabólicos, llegando a la conclusión de que esta adipocitoquina es capaz de activar la fosforilación de la AMPK, inhibiendo con ello la actividad de la ACC2 (Acetil Co-A carboxilasa) y por lo tanto aumentando la oxidación de AGL, con el consiguiente descenso de los niveles de éstos en plasma. También demostraron que siguiendo la misma ruta, la adiponectina aumenta la captación de glucosa, ya que es capaz de reducir la fosforilación de los restos de serina del IRS-1 provocada por los elevados niveles de mediadores inflamatorios mediante la activación de la kinasa encargada de fosforilar/activar a la AMPK, LKB1. Como consecuencia de esta activación se producen además el incremento de la producción de lactato y la reducción de la expresión de moléculas implicadas en la gluconeogénesis en el hígado (Combs, 2001). Además de las acciones metabólicas mediadas por la AMPK, la adiponectina posee un potente efecto antiinflamatorio y antiaterogénico que la convierten en uno de los mejores aliados del organismo para combatir los desequilibrios metabólicos propios del síndrome metabólico (Okamoto, 2002; Yamauchi, 2003b).

a) Adiponectina y Obesidad

Una de las características más importantes de la adiponectina es que, a diferencia de otras adipocitocinas, su expresión en el tejido adiposo y su concentración plasmática se reducen en individuos con sobrepeso y obesidad (Arita, 1999; Beltowski, 2003; Ouchi, 2003).

Esto también se ha observado en diferentes modelos de obesidad animal, como por ejemplo en ratones deficientes en leptina (ob/ob), ratones resistentes a leptina (db/db), ratones alimentados con dietas ricas en grasas (Beltowski, 2003) y monos que desarrollan espontáneamente obesidad y con frecuencia resistencia a la insulina y diabetes tipo 2 (Hotta, 2001). El mecanismo por el que la secreción de

Antecedentes

adiponectina está reducida en los individuos obesos es desconocido. Dado que la adiponectina se estimula por la insulina y se inhibe por el TNF- α , la resistencia a la insulina y el incremento en la expresión de TNF- α podrían contribuir a este efecto. Por el contrario, la reducción del peso corporal mediante dietas hipocalóricas o el tratamiento quirúrgico de la obesidad mórbida provocan una elevación de la adiponectina en el plasma (Beltowski, 2003; Ouchi, 2003).

La pérdida de peso corporal en ratones obesos también supone un incremento de la expresión de adiponectina, aunque éste sólo se produce en la adiposidad visceral, no en la subcutánea (Ouchi, 2003). La concentración de adiponectina en el plasma, además de correlacionarse negativamente con el índice de masa corporal y el porcentaje de grasa corporal (Ouchi, 2003; Tesauro, 2012; McCourt, 2013) lo hace también negativamente con la concentración de triglicéridos (Comuzzie, 2001; McCourt, 2013) y apolipoproteína B (Havel, 2004) en el plasma, mientras que es proporcional al colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad (cHDL) (Hotta, 2000; Beltowski, 2003; McCourt, 2013).

Asimismo, se ha demostrado que la adiponectina reduce los valores plasmáticos de ácidos grasos libres y triglicéridos en modelos animales de obesidad e hiperlipemia (Beltowski, 2003). Este efecto se produce por un aumento en el catabolismo lipídico derivado de una estimulación de la expresión de enzimas implicadas en el transporte y el metabolismo de los ácidos grasos en el músculo esquelético y el hígado, como por ejemplo la acil-CoA oxidasa y la 5'-AMP cinasa (AMPK) (Yamauchi, 2001).

Los estudios realizados con ratones Agouti Yellow Ay/a han demostrado que la administración de adiponectina no modifica la ingestión de alimentos en estos animales (Masaki, 2003). Puesto que la

regulación de la ingesta requiere la intervención del sistema nervioso central, Masaki y colaboradores sugirieron que la adiponectina no podría traspasar la barrera hematoencefálica debido a su elevado peso molecular y, por tanto, no podía ejercer ninguna acción sobre la ingesta (Masaki , 2003). No obstante, Qi y colaboradores han demostrado que la adiponectina sí traspasa la barrera hematoencefálica y actúa en el cerebro para reducir el peso corporal (Qi, 2004). Esta discrepancia se podría explicar porque la fuente de adiponectina recombinante fue diferente en los 2 estudios: en el primer caso fue expresada en bacterias (Masaki , 2003), mientras que en el segundo lo fue en células de mamíferos (Qi, 2004).

Estudios en primates sugieren que la adiponectina circulante disminuye con la ganancia de peso a medida que el animal se va haciendo obeso (Hotta, 2001). Esta situación es reversible, ya que la pérdida significativa de peso produce un incremento en la expresión de adiponectina, tal y como se ha observado en pacientes humanos tras someterse a cirugía bariátrica (Yang, 2001; Faraj, 2003; Pender, 2004). Además, esta recuperación de la concentración de adiponectina circulante va acompañada de una mejora en la sensibilidad a la insulina (Yang, 2001). De la misma manera, los niveles de adiponectina circulante, así como la sensibilidad a la insulina, pueden incrementar en personas obesas que se someten a un control estricto de la dieta (Bruun, 2003; Lihn, 2004).

En un estudio en ratones normales y obesos C57/BL6 se comparó el aporte de flavonoides en la dieta y se vio como el grupo de ratones tratados con flavonoides tanto en el grupo tratado con alto % en grasa (obesos) y con bajo % en grasa (normales) presentaban mayor nivel de adiponectina tras 24 semanas de tratamiento con flavonoides (Shabrova, 2011).

b) Adiponectina y resistencia a la insulina

Aunque tradicionalmente se ha considerado al músculo esquelético como el lugar principal de resistencia a insulina, hoy está ampliamente aceptado que el sitio primario de ésta es en realidad el tejido adiposo (Sánchez-Recade 2001; Arner, 2003).

Se ha postulado que la adiponectina estimula la sensibilidad a insulina disminuyendo la producción hepática de glucosa, contribuyendo así, a una mejor regulación de la glucemia. Estudios en humanos correlacionan los niveles de adiponectina y la supresión basal de la producción de glucosa mediada por insulina (Stefan, 2003). Además, la hipoadiponectinemia está asociada en humanos con la resistencia a la insulina (Weyer, 2001; Kern, 2003), a la resistencia a la insulina en diabetes gestacional (Ranheim, 2004), a diabetes asociada a lipodistrofia (Kosmiski, 2003) y a diabetes tipo 2 (Hotta, 2000). Un factor a destacar es que los niveles de adiponectina son bajos en individuos resistentes a la insulina independientemente de que sean obesos (Abbasi, 2004). Estos datos sugieren que la hipoadiponectinemia contribuye a los cambios en la regulación de la homeostasis de la glucosa y al descenso en la sensibilidad hepática a la insulina observado durante la diabetes. Estas evidencias de la relación de la hipoadiponectinemia con el desarrollo de resistencia a insulina y diabetes vienen además confirmadas por estudios genéticos.

En ellos, se han asociado diferentes polimorfismos que provocan hipoadiponectinemia con el desarrollo de resistencia a la insulina y diabetes. El locus donde se codifica la adiponectina se ha asociado con la diabetes (Vasseur, 2003). Además, estudios más recientes demuestran que los niveles bajos de adiponectina predicen el riesgo de padecer diabetes tipo 2, incluso en ausencia de otros marcadores de resistencia a insulina (Lindsay, 2002; Spranger, 2003). Otras

evidencias de la clara relación entre adiponectina y sensibilidad a la insulina son los efectos de la insulina sobre los niveles de adiponectina circulante. Se ha demostrado *in vivo* que la insulina disminuye los niveles de adiponectina tanto en humanos como en ratones (Combs, 2001; Yu, 2002). Resultados similares se han obtenido al tratar con insulina adipocitos *in vitro* (Halleux, 2001; Fasshauer, 2002). Por otro lado, se ha encontrado que los pacientes diabéticos tipo 1 presentan niveles mayores de adiponectina (Imagawa, 2002). Así pues, estos datos sugieren que la hiperinsulinemia podría tener un impacto negativo en los niveles de adiponectina circulante lo cual llevaría a resistencia a la insulina. Sin embargo, y debido a que la hiperinsulinemia suele ir acompañada de resistencia a la insulina *in vivo*, es difícil establecer por separado cuál es la contribución de los niveles de adiponectina y de insulina en el desarrollo de resistencia a la insulina. En cualquier caso, estudios en primates indican que el descenso en los niveles de adiponectina precede al desarrollo de la hiperinsulinemia (Hotta, 1998; Hotta, 2001) indicando que el descenso en los niveles de adiponectina puede ser una causa y no una consecuencia de la hiperinsulinemia.

Los factores que intervienen en el descenso de los niveles de adiponectina no son del todo conocidos. Se ha descrito que el tratamiento con tiazoladinedionas (TZDs), que son potentes agonistas de PPAR γ , incrementa los niveles de adiponectina circulante tanto en humanos como en ratones (Combs, 2002). Este efecto de la TZDs sobre la producción de adiponectina podría ser directo en el tejido adiposo. Sin embargo, se desconoce si este efecto es debido a un incremento en la diferenciación de los adipocitos (Combs, 2003) o a la unión con elemento de respuesta a PPAR γ que se encuentra en el promotor de la adiponectina (Iwaki, 2003).

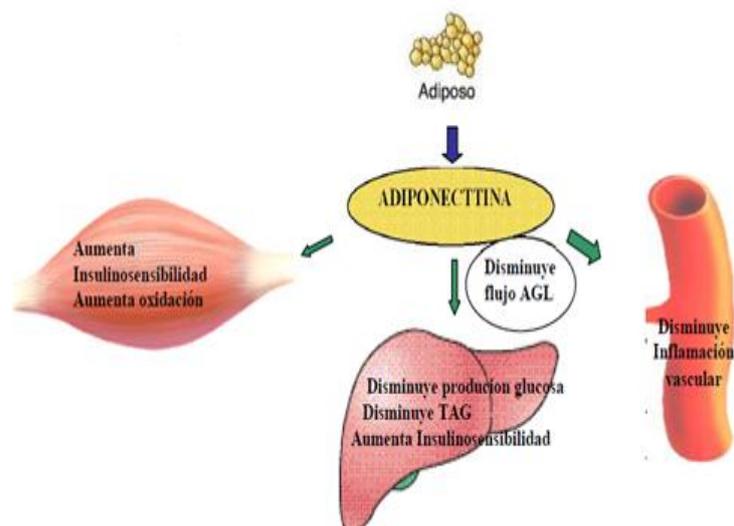


Figura 9: Acciones de la adiponectina en el hígado, músculo esquelético y a nivel vascular. AGL (ácidos grasos libres), TAG (triacilglicéridos).

c) adiponectina y efecto cardiovascular

Estudios clínicos demuestran que los niveles de adiponectina están correlacionados inversamente con los niveles en sangre de triglicéridos y de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y positivamente con las lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Hotta, 2000; Kazumi, 2002; McCourt, 2013). Así, por ejemplo, en la enfermedad coronaria arterial se han detectado valores plasmáticos bajos de adiponectina (Shimada, 2004) y una disminución de los niveles de adiponectina se ha relacionado con un aumento de la tensión arterial (Tesauro, 2012). El mecanismo de acción por el que la adiponectina reduce el proceso aterogénico:

1. Inhibe la expresión de moléculas de adhesión y evita la adhesión de monocitos;
2. Impide la captación y acumulación de lipoproteínas de baja densidad modificadas en macrófagos por inhibición del receptor SR-A1, y
3. Reduce la capacidad proliferativa de células musculares lisas y macrófagos TNF- α .

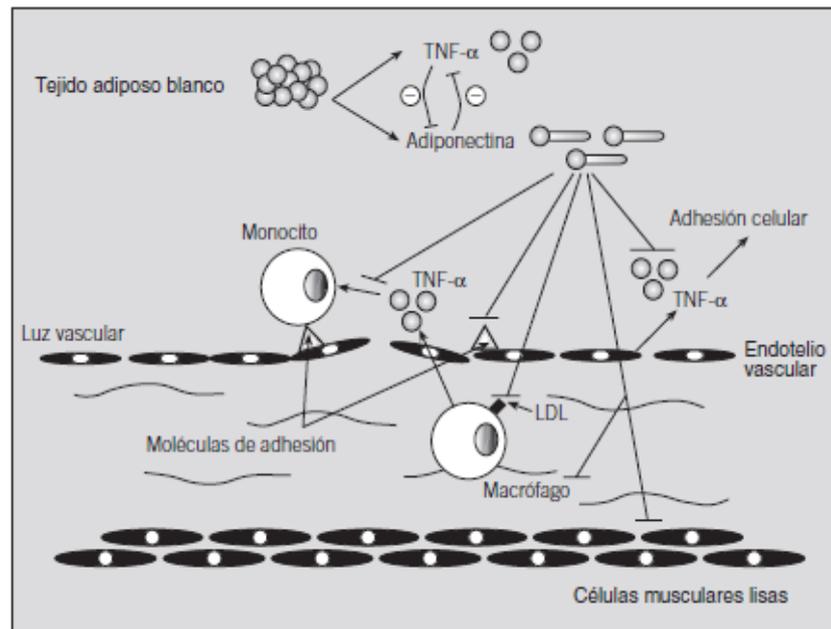


Figura 10: Efectos antiaterogénicos de la adiponectina.

d) adiponectina y propiedades antiinflamatorias

Algunos estudios epidemiológicos han revelado que la obesidad y otras enfermedades relacionadas, como la aterosclerosis, la resistencia a la insulina y la diabetes mellitus, están altamente asociadas con un estado inflamatorio crónico, aunque de menor intensidad que la reacción de fase aguda (Moller, 2001; Ouchi, 2003).

Antecedentes

Ello es debido a la secreción de diferentes adipocitocinas (IL-6, TNF- α , leptina, adiponectina), que son determinantes tanto en la regulación del proceso aterogénico como en la resistencia a la insulina (Moller, 2001). La adiponectina y el TNF- α parecen inhibir mutuamente su producción en el tejido adiposo y, además, la adiponectina puede contrarrestar los efectos proinflamatorios de TNF- α en células vasculares (Kappes, 2000). Por tanto, la resistencia a la insulina inducida por TNF- α podría explicarse parcialmente por la inhibición de la secreción de adiponectina (Beltowski, 2003).

LEPTINA

Otra de las adipocitocinas que interviene en la regulación de la homeostasis energética es la leptina. La leptina es un péptido de 167 aminoácidos con una secuencia señalizadora de 21 aminoácidos, que se escinde antes de pasar al torrente circulatorio, resultando una proteína madura de 146 aminoácidos y 16 Kilodaltons (kDa) de peso molecular con una estructura terciaria parecida a la de las citoquinas clásicas de hélice larga, como la interleukina 2 (Madej, 1995). Su descubrimiento en 1994 (Zhang, 1994), logró la clonación del gen *ob* e identificaron a su producto como la leptina.

La administración de leptina en los diferentes modelos de obesidad en el ratón demostró como en el ratón *ob/ob* presentaba una disminución del peso, por un descenso del porcentaje de grasa corporal, por reducción de la ingesta y por aumento del gasto energético (Halaas, 1995). El ratón obeso y el ratón normal tenían una respuesta similar, pero menos intensa. En cambio, el ratón *db/db* no presentaba ningún cambio; esto apoyaba la teoría de que el gen *db* podría ser el codificador del receptor de la leptina, y de esta manera se explicaría la resistencia a la leptina que se da en este tipo de ratón. La administración de leptina intracerebral a nivel del ventrículo lateral del cerebro en ratones *db/db*, tampoco tenía ningún efecto, quizás porque

el defecto se daba a nivel del receptor de la leptina en la transmisión de la señal post-receptor (Campfield, 1995). Su descubrimiento abrió las puertas a toda una serie de investigaciones acerca de los factores derivados del tejido adiposo y su papel en el mantenimiento de la homeostasis energética. Aunque es producida y secretada principalmente por el tejido adiposo, puede proceder de otros tejidos como la placenta, la mucosa gástrica y el epitelio mamario (Masuzaki, 1997).

Los niveles plasmáticos de esta molécula guardan una relación directa con la masa de tejido adiposo y el IMC. En individuos delgados sanos, la mayor parte de la leptina que circula en el plasma lo hace unida a proteínas, siendo ésta la forma más propicia para ser captada por los tejidos y desempeñar su función. Se calcula que los niveles séricos normales de leptina en personas con normopeso oscilan en el rango de 1-15 ng/ml, siendo en hombres: $8.9 \text{ ng/ml} \pm 4.8$ y en mujeres: $17.1 \text{ ng/ml} \pm 10.5$, en individuos con $\text{IMC} > 30$ se pueden encontrar valores de 30 ng/ml o superiores, (Pisabarro, 1999)

Inicialmente se creía que las acciones de la leptina eran exclusivamente centrales, pero el descubrimiento de la presencia de sus receptores, OB-R, con sus distintas isoformas (Ob-Ra, Ob-Rb, Ob-Rc, Ob-Rd, Ob-Re y Ob-Rf) en prácticamente todos los tejidos del organismo determinó que se le atribuyeran numerosas funciones fisiológicas (Frühbeck-Schultes, 2002).

La ausencia o el mal funcionamiento de este receptor es lo que provoca el fenotipo de obesidad que presentan los modelos animales de nuestro estudio, los ratones *db/db* o su similar en ratas, las ratas Zucker *fa/fa* (Chua, 1996).

Antecedentes

La mutación en el gen de la diabetes en el ratón db/db da lugar a obesidad y diabetes. Un receptor de la leptina se expresa de forma importante en el hipotálamo, y es anormal en el ratón db/db (C57 BL/Ks). La proteína mutante está perdida en la región citoplasmática y es defectuosa en la transducción de la señal. Esto sugiere que los efectos de la leptina sobre el descenso de peso se deben a una señal que se transduce a nivel de su receptor en el hipotálamo (Lee, 1996).

Los principales efectos que se le pueden atribuir a la leptina son:

- control del balance energético del organismo.
- la modulación del sistema inmunitario.
- el control de la reproducción y el desarrollo sexual.

Entre ellos, el que nos ocupa en este caso es el mantenimiento de la homeostasis energética. En este sentido, la leptina, al ser secretada por el tejido adiposo en cantidades proporcionales a la masa del mismo, actúa como un indicador del estado de la reserva energética del organismo completo. En consecuencia, en caso de reserva abundante de energía (elevado IMC), los niveles de leptina se encuentran aumentados (Isaganaitis, 2005). Este control se lleva a cabo tanto a nivel periférico como central. En el primer caso, la regulación se realiza mediante la activación de diferentes rutas, destacando la activación de la enzima 5'-AMPK. Se ha observado que la leptina es capaz de activar de forma directa e independiente de AMP, en parte mediante estimulación simpática, la subunidad $\alpha 2$ de la AMPK en tejidos periféricos, lo que conlleva un aumento del gasto energético mediante la activación de la oxidación de glucosa y de AGL (Minokoshi, 2002; Ceddia, 2005).

En la regulación central de la homeostasis energética la leptina actúa transmitiendo información acerca de la reserva energética desde

el resto del organismo hasta el hipotálamo, ejerciendo la modulación del apetito (Jéquier, 1999; Niswender, 2004). En una situación de acumulación de tejido adiposo, se produce un aumento de la concentración de leptina, aportando al hipotálamo el mensaje de abundancia que se traduce en una reducción del apetito y un aumento de la actividad catalítica en los tejidos efectores. Por el contrario, en el caso de que se produzca una reducción del nivel de leptina motivada por un ayuno de 12 horas o más, o por una pérdida de masa grasa, la señal interpretada por el hipotálamo es de escasez, lo que conduce a un aumento del apetito y a la disminución del gasto energético (Niswender, 2001; Isaganaitis, 2005).

Los pacientes obesos suelen presentar una leptinemia muy elevada, acompañada de un incremento de la relación leptina libre/leptina unida a proteínas (Houseknecht, 1996), que, paradójicamente, no conduce a la pérdida de peso ni ejerce control alguno sobre la ingesta o el gasto energético. Esta alteración característica de la obesidad se conoce como resistencia a la leptina (Cumin, 1996). De hecho, en la obesidad los mecanismos de control del apetito que ejercen la insulina y la leptina resultan ineficaces. El sistema nervioso central se resiste a su efecto pese a que los niveles de ambas hormonas se encuentran muy elevados, lo que resulta en una percepción equivocada de escasez energética (Isaganaitis, 2005). Esta resistencia se debe a la conjunción de varios mecanismos:

- A nivel central se produce una reducción del transporte de las hormonas a través de la barrera hemato-encefálica y una disminución de la señalización intracelular. Lo primero se justifica porque los transportadores de la barrera son saturables y en situación de obesidad, dados los elevados niveles de leptina e insulina, no son capaces de introducir cantidades

Antecedentes

suficientes para llevar al hipotálamo la información real de la situación energética y obtener un efecto (Morrison, 2008).

- En individuos sanos, la leptina es capaz de aumentar la sensibilidad a la insulina y ejercer sus acciones beneficiosas en el metabolismo lipídico mediante la activación de la AMPK en tejidos periféricos. Pero en individuos obesos, al igual que sucede en el hipotálamo, estos efectos se pierden y aparece la resistencia a la leptina, por la anulación de la activación de PI3K (fosfatidil inositol 3-kinasa) por el mismo mecanismo. Además, este obstáculo en la señalización en tejidos periféricos provoca también resistencia a la insulina, que a su vez se verá agravada por la resistencia a la leptina. Por tanto en el punto de cruce entre las cascadas de señalización de insulina y leptina encontramos una posible explicación a la aparición de la resistencia a ambas hormonas (Huang, 2004). Se ha llegado a hipotetizar que, en el síndrome metabólico, la resistencia a la insulina podría ser secundaria a la resistencia a la leptina, e incluso podría tratarse de un mecanismo compensatorio (Unger, 2003).

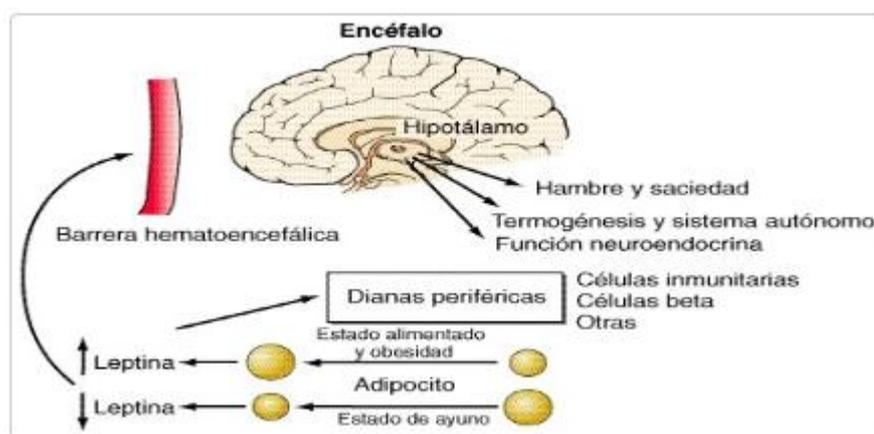


Figura 11: Sistema fisiológico regulado por la leptina. La elevación o el descenso de las concentraciones de leptina actúan a través del hipotálamo para regular el apetito, el gasto energético y la función neuroendocrina y a través de localizaciones periféricas para influir en sistemas como el inmunitario.

8. PAPEL DEL TEJIDO ADIPOSO EN LA INFLAMACIÓN ASOCIADO A LA OBESIDAD

La obesidad frecuentemente se asocia con resistencia a la insulina (RI) y ésta es la alteración central del síndrome metabólico (SM) (Reaven, 1988). La alteración de la función de la insulina parece ser consecuencia de un estado de inflamación sistémica de bajo grado (Festa, 2000).

El tejido adiposo, clásicamente considerado como un reservorio de energía, además de sus funciones metabólicas, constituye un órgano con una gran capacidad de recibir y generar información de su medio ambiente. Se ha demostrado que los adipocitos poseen funciones similares a diversas células inmunitarias, como la activación del complemento y producción de citoquinas. Los precursores de adipocitos tienen capacidad de fagocitar y pueden transformarse en células parecidas a los macrófagos en respuesta a diferentes estímulos (Charriere, 2003).

La fisiopatología de la generación de señales por el tejido adiposo tiene una importancia capital en el impacto deletéreo que un exceso de grasa puede ejercer sobre el organismo humano. El tejido adiposo es un órgano secretor activo que elabora una gran variedad de moléculas, conocidas como adipocitoquinas, incluyendo el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), interleuquina-6 (IL-6), leptina, adiponectina y resistina que pueden mediar muchos de los cambios metabólicos del SM (Wajchenberg, 2000).

Mediante la producción de estas moléculas, el tejido adiposo posee la capacidad de influenciar la biología local del adipocito y la del organismo. De esta forma, parece que la relación del adipocito con la resistencia a la insulina es independiente de la función del tejido

Antecedentes

adiposo como depósito de energía. La obesidad tiene una correlación positiva con la RI y el aumento de concentración de marcadores inflamatorios vasculares (Ziccardi, 2002). Unas concentraciones elevadas de varias citoquinas proinflamatorias, como las IL-6, IL-18, TNF- α , resistina, así como de Proteína C reactiva (PCR) se han asociado con indicadores de aumento de masa grasa: peso, índice de masa corporal (IMC) y con factores de riesgo cardiovascular, sugiriendo que el tejido adiposo contribuye a la producción de estas citoquinas (Yudkin, 1999; Esposito, 2003). También se ha propuesto que el tejido adiposo como modulador de sustancias antiinflamatorias, como la adiponectina (Maeda, 1996).

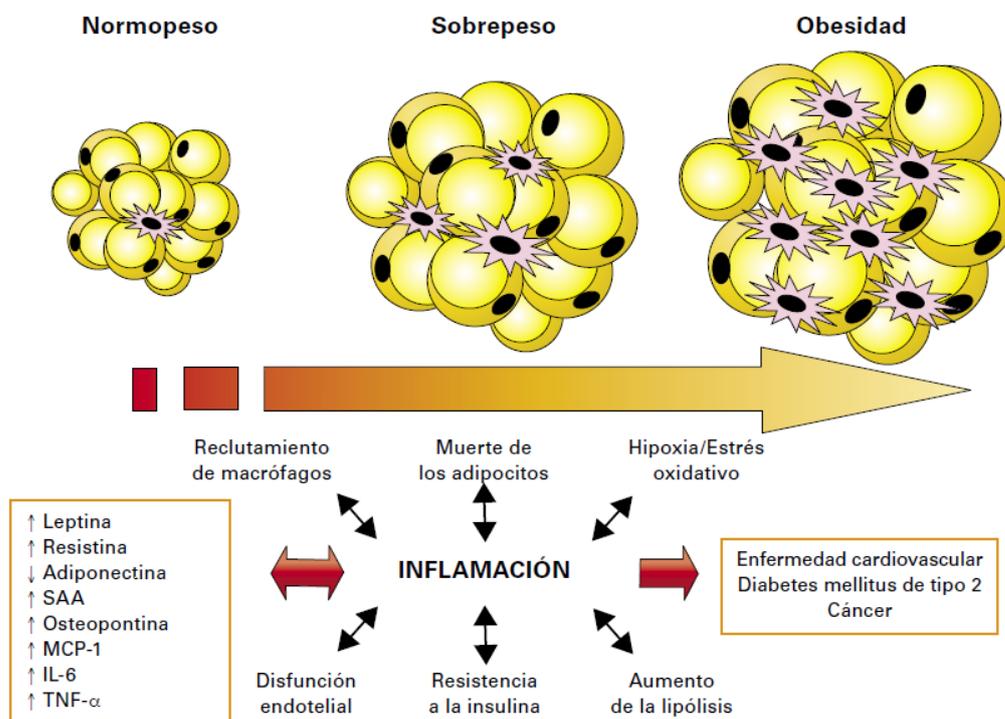


Figura 12. Relación entre la expansión del tejido adiposo y el incremento del estado proinflamatorio. IL-6 (interleucina 6); MCP-1 (proteína quimioatrayente de monocitos-1); SAA (amiloide sérico A); TNF- α (factor de necrosis tumoral α).

A medida que aumenta el tejido adiposo, se modifica la producción de adipocinas y se desencadenan una serie de procesos fisiopatológicos relacionados con la inflamación que van a conducir a un incremento del riesgo de sufrir enfermedad cardiovascular, diabetes mellitus de tipo 2 y cáncer, entre otras comorbilidades.

Uno de los procesos que tienen lugar en la inflamación es la infiltración en los tejidos inflamados de células del sistema inmune tales como neutrófilos, eosinófilos y macrófagos. La hipertrofia de los adipocitos que tiene lugar en la obesidad (Figura 12) conlleva un aumento en la producción por parte de los mismos y de otras células presentes en el tejido adiposo (fracción estromo-vascular) de una serie de adipocinas/quimiocinas/citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6, amiloide sérico A (SAA), resistina, proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1) e inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1), entre otros (Frühbeck, 2004; Hotamisligil, 2006; Catalán, 2007). El aumento en la producción de estas moléculas desencadena efectos locales a nivel del endotelio que conducen a un incremento en la producción de moléculas de adhesión (VCAM e ICAM) y en la permeabilidad vascular que, en última instancia, se traducen en un aumento en la infiltración de monocitos y la acumulación de macrófagos. A su vez, dichos macrófagos producen más factores quimiotácticos atrayentes de otros macrófagos, lo que se convierte en un auténtico círculo vicioso que perpetuará el estado proinflamatorio (Shoelson, 2007; Nishimura, 2008; Surmi, 2008).

La elevación de las citocinas proinflamatorias que tiene lugar en la obesidad origina un aumento de la lipólisis y una disminución de la capacidad del tejido adiposo para acumular triglicéridos. Esto se traduce en un aumento de los ácidos grasos libres circulantes y su depósito en forma de triglicéridos en el músculo, lo que agrava el

Antecedentes

estado proinflamatorio y contribuye significativamente al aumento de la resistencia a la insulina (Guilherme, 2008).

El aumento en la acumulación de macrófagos en el tejido adiposo desempeña un papel determinante en el incremento de mediadores de inflamación que, con el mayor grado de estrés oxidativo, hipoxia, lipólisis y resistencia a la insulina, junto a la alteración en el perfil secretor de adipocinas, tendrá como posible consecuencia la aparición de enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus de tipo 2 y cáncer, entre otras patologías. De todos los productos que el tejido adiposo es capaz de producir, a continuación vemos a describir los productos pro-inflamatorios más relevantes en el papel de la obesidad relacionado con la inflamación: el TNF- α e IL-6.

- **TNF- α**

El TNF- α es una citoquina producida principalmente por monocitos, linfocitos, tejido adiposo y músculo. El TNF- α señala a través de dos receptores de membrana bien conocidos (TNFR): TNFR1 (p60) y TNFR2 (p80) (Tartaglia, 1992; Smith, 1994). Las fracciones solubles de estos receptores sTNFR1 y sTNFR2 resultan de la proteólisis de la porción extracelular del receptor cuando el TNF- α se une a él (Nopfar, 1990; Aderka, 1992).

La relación que existe entre las citoquinas proinflamatorias y la acción de la insulina en obesidad y diabetes tipo 2 fue reconocida por primera vez al observar la elevada producción de TNF- α en el tejido adiposo de individuos obesos (Hotamisligil, 1993). El TNF- α es una proteína de 17 kDa secretada como trímero de 51 kDa que toma su nombre de su identificación inicial como factor proapoptótico en células tumorales. La evidencia directa de la participación de esta citoquina en la resistencia a la insulina se obtuvo al observar que la infusión aguda de TNF- α inhibía la disponibilidad de glucosa estimulada por la insulina

tanto en roedores obesos (Hotamisligil, 1994a; Hotamisligil, 1995) como en humanos sanos (Plomgaard, 2005). La inhibición de la señalización del TNF- α o su neutralización mediante el uso de receptores solubles restauró la sensibilidad a la insulina en ratas obesas Zucker (Hotamisligil, 1994b), pero no fue efectiva en humanos tratados durante 6 semanas (Ofei, 1996).

Estudios in vivo han demostrado que el tejido adiposo de roedores obesos con RI (Hotamisligil, 1993) y de humanos obesos (Hotamisligil, 1995; Kern, 1995a) produce significativamente mayor cantidad de TNF- α y la neutralización de éste en roedores con RI produce un aumento de la captación de glucosa en respuesta a la insulina (Hotamisligil, 1993). Los sujetos obesos al perder peso presentan una disminución de los niveles de TNF- α (Kern, 1995b; Kern, 2001).

La producción de TNF- α fue en un principio atribuida a los adipocitos del tejido adiposo. Actualmente se ha puesto de manifiesto que cuando existe obesidad se produce una gran infiltración de macrófagos en dicho tejido (Weissberg, 2003; Ferrante, 2007), siendo estos la principal fuente productora de ésta y otras citoquinas (Weissberg, 2003). Los macrófagos en individuos obesos se encuentran en un estado proinflamatorio caracterizado por aumentar la activación del NF- κ B, disminuir el inhibidor del NF- κ B (I κ B), y por aumentar la transcripción de genes proinflamatorios como TNF- α (Weissberg, 2003; Ghanim, 2004). Los mecanismos que median este estado proinflamatorio aun no han sido plenamente dilucidados, pero estudios recientes sugieren que los AGL desempeñan un papel esencial.

Antecedentes

El TNF- α es capaz a su vez de activar rutas lipolíticas en el tejido adiposo (Zhang, 2002), provocando una liberación masiva de AGL al torrente circulatorio. Este hecho contribuye a generar resistencia a la insulina así como a la retroalimentación de la producción de esta citoquina, que también puede desencadenar resistencia a la insulina de forma directa, por su capacidad para fosforilar un resto de serina del IRS mediante la activación de JNK e I κ B/NF κ B (Arkan, 2005; Cai, 2005), inhibiendo la cascada de señalización de la insulina. Además, el TNF- α causa alteraciones metabólicas en tejidos afectados por la resistencia a la insulina como hígado y músculo esquelético.

Aunque el mecanismo exacto aún no se conoce completamente, dichas alteraciones parecen estar relacionadas con un descenso de la tasa de oxidación de AGL, fenómeno descrito y asociado a la presencia de obesidad, que podría originarse como consecuencia de la inhibición que el TNF- α causa en la protein-kinasa activada por 5'-AMP (AMPK) (Steinberg, 2007). El TNF- α reduce la actividad de esta enzima al incrementar la expresión de la fosfatasa encargada de desfosforilar e inactivar a la AMPK, la proteína-fosfatasa 2C (PP2C) (se ha observado que la inhibición de esta fosfatasa evita los efectos del TNF- α sobre la AMPK) (Steinberg, 2007). Como consecuencia de la inhibición de la AMPK, se activa la acetil-CoA carboxilasa 2 (ACC2), que actúa inhibiendo la oxidación de AGL (Hardie, 2003).

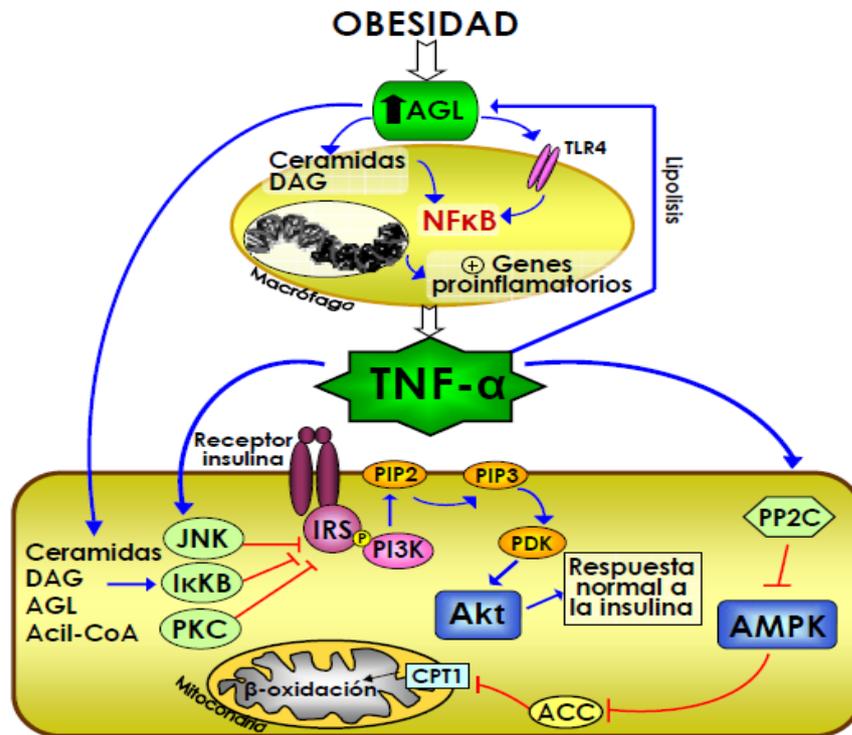


Figura 13: Mecanismos implicados en los efectos metabólicos del TNF- α . ACC, acetil Co-A carboxilasa; AMPK, protein quinasa activada por AMP; CPT1: carnitina palmitoiltransferasa; DAG: diacilglicerol; I κ B: inhibidor de la quinasa del NF- κ B; IRS, sustrato del receptor de insulina; PDK, protein quinasa dependiente de fosfoinosítido; PDK, protein quinasa dependiente de fosfoinosítido; PI3K, fosfatidil inositol 3-quinasa; PIP2, fosfatidilinositol bifosfato; PIP3, fosfatidil-inositol trifosfato; PKC: protein quinasa C; PP2C: proteína fosfatasa 2C.

El TNF- α parece jugar un papel en la fisiopatología de la hipertensión (HTA) asociada a la obesidad. El TNF- α estimula la producción de endotelina 1 (Kahaleh, 1997) y angiotensinógeno (Brasier, 1996) *in vitro*. En el modelo de rata espontáneamente hipertensa, la síntesis y secreción de TNF- α en respuesta al lipopolisacárido (LPS) se halla significativamente aumentada en relación al control no hipertenso (Nyui, 1997).

Antecedentes

También se ha encontrado una asociación entre la concentración circulante de TNF- α y la tensión arterial sistólica en sujetos con un rango de adiposidad corporal amplio (Zinman, 1999). El TNF- α además parece tener un papel en las alteraciones lipídicas asociadas a la resistencia a la insulina. El TNF- α en situación de infección/inflamación, incrementa la concentración de triglicéridos mediante la estimulación de la producción de lipoproteínas VLDL (Grunfeld, 1992). En sujetos aparentemente sanos se ha descrito una correlación positiva entre la concentración de TNF- α y triglicéridos y entre el colesterol total y LDL-colesterol (Fernández-Real, 1999).

- **INTERLEUQUINA 6 (IL-6)**

La IL-6 es una citoquina multifuncional, intermediaria en procesos inflamatorios y de estrés, producida por diferentes tipos celulares. Entre éstos se encuentran los adipocitos, de los que procede la tercera parte de su concentración (Prentice, 1989). La síntesis a partir de la grasa visceral, es tres veces superior respecto a la subcutánea y existe una correlación entre los niveles plasmáticos y la masa corporal (Fried, 1998) además de una asociación significativa con el IMC y otros parámetros de adiposidad. La obesidad se asocia con un aumento plasmático de las concentraciones de IL-6 que puede contribuir a inflamación sistémica y resistencia a la insulina; sin embargo los ratones carentes de IL-6 desarrollan obesidad a edades avanzadas. Hay autores que han publicado que niveles elevados de la IL-6 podrían ser predictores del desarrollo de una diabetes mellitus o de infarto de miocardio (Pradhan, 2001). Parece que aumenta la concentración de ácidos grasos libres por aumento de la secreción hepática de triglicéridos, mecanismo por el cual podría ser coadyuvante de la resistencia a la insulina. Asimismo, se ha encontrado que disminuye la síntesis de adiponectina, contribuyendo así a incrementar más la insulinoresistencia.

9. TRATAMIENTO DE LA OBESIDAD

Los objetivos terapéuticos de la pérdida de peso están dirigidos a mejorar o eliminar las comorbilidades asociadas a la obesidad y disminuir el impacto de las futuras complicaciones médicas relacionadas con el exceso de peso. Es necesario modificar los hábitos de conducta, como el cambio de los hábitos alimentarios y el incremento del ejercicio físico.

Bajo estas premisas, los objetivos de pérdida de peso no deben centrarse en alcanzar el peso ideal, sino en conseguir pequeñas pérdidas de peso (entre un 5-10% del peso inicial) pero mantenidas a largo plazo. Las herramientas disponibles a nuestro alcance incluyen:

- Alimentación y ejercicio.
- Tratamiento farmacológico.
- Cirugía y balón gástrico.

En el tratamiento de la obesidad, el plan de alimentación y la actividad física son pilares fundamentales para conseguir un balance energético negativo.

- TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO.

En el informe de la Organización Mundial de la Salud sobre obesidad, publicado en el año 2000, se recomienda el tratamiento farmacológico de la obesidad en todos los casos cuando el IMC sea igual o superior a 30 kg/m², o en aquellos con IMC entre 27 y 30 kg/m² y con comorbilidades susceptibles de mejorar al mejorar la obesidad.

Antecedentes

En España, el documento de consenso publicado el año 2007 (Salas-Salvadó, 2007) establece como criterios de utilización de fármacos en el tratamiento de la obesidad los siguientes:

- No debe utilizarse como tratamiento aislado, si no de forma complementaria a los tratamientos básicos de plan de alimentación, actividad física y cambios en el estilo de vida.
- Su indicación está limitada a pacientes con IMC mayor de 30 kg/m², o mayor de 27 kg/m² si se asocian comorbilidades mayores y cuando no se han alcanzado los objetivos de pérdida de peso únicamente con los cambios en el estilo de vida.

Después de la inestimable pérdida que para el tratamiento de la obesidad supuso la retirada del mercado farmacéutico español e internacional en el año 2008 de la molécula rimonabant (Acomplia®), volvemos a estar, por lo que respecta a número y diversidad de fármacos antiobesidad, en una situación realmente precaria. Hoy por hoy volvemos a tener sólo dos fármacos autorizados internacionalmente para el tratamiento de la obesidad: la sibutramina (Reductil®) y el orlistat (Xenical®).

❖ SIBUTRAMINA (Reductil®)

Introducida en el mercado farmacológico español a finales de 1999, se trata de un fármaco de acción central, con mecanismo de acción doble, que consigue aumentar la sensación de saciedad y simultáneamente evitar la caída del gasto energético. En enero de 2010, la European Medicines Agency (EMA), basándose en los resultados del estudio *SCOUT*, recomendó la suspensión de la autorización de comercialización de sibutramina. Simultáneamente, el mismo día 21 de enero de 2010, la Agencia Española de

Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) ordenó la suspensión cautelar de la comercialización de Reductil® en España.

En humanos produce una pérdida significativa de peso, dosis-dependiente por aumento de la sensación de saciedad y disminución del apetito, contando con una buena tolerancia con las dosis habituales de 10 y 15 mg/día.

❖ ORLISTAT (Xenical®)

El orlistat (Xenical®) está disponible en el mercado farmacéutico español desde el año 1999. Se trata de un fármaco de acción periférica que actúa localmente a nivel del intestino delgado reduciendo la absorción de la grasa alimentaria.

La absorción sistémica del orlistat es inferior al 1% de la dosis administrada por vía oral y se elimina en casi su totalidad inalterado por vía digestiva con la deposición. La posología habitual es de 60-120mg/8h.

❖ TOPIRAMATO (Topamax®)

Este medicamento no está aprobado por la FDA ni por la EMEA para el tratamiento de la obesidad.

El topiramato (Topamax®) es una sustancia desarrollada y comercializada como antiepiléptico que, ya desde los primeros ensayos clínicos como anticonvulsivo, demostró que era capaz de producir disminución del peso.

Su mecanismo de acción no está del todo claro, aunque se sabe que actúa bloqueando los canales del calcio. Además, antagoniza los

Antecedentes

receptores del glutamato y aumenta la actividad del ácido gammaaminobutírico (GABA). El glutamato es un agente orexígeno y el bloqueo de su receptor conllevaría la disminución del apetito. En estudios clínicos realizados en adultos (Wilding 2004; Toplak, 2007) con un seguimiento de seis meses, se demuestra una pérdida de peso de 6,6 kg en el grupo de tratamiento en contra de sólo 2,8 kg en el grupo de placebo. Alrededor del 50% de los pacientes en tratamiento con topiramato pierden el 5% del peso inicial durante el periodo de 6 meses, en contraste con el 19% en el grupo placebo. Concomitantemente se ha observado una mejoría de las cifras de tensión arterial y de las concentraciones plasmáticas de colesterol. Se han realizado también ensayos clínicos en pacientes con trastorno por atracón que demuestran una reducción significativa de la frecuencia de los episodios de atracón.

- CIRUGIA

La cirugía bariátrica es un método eficaz y seguro de pérdida de peso en pacientes con obesidad mórbida o con obesidad y comorbilidades, como la enfermedad coronaria (López- Jiménez, 2005)

Algunos estudios indican que la cirugía bariátrica puede inducir mejoras significativas en la presión arterial, la glucemia, las concentraciones lipídicas y la calidad de vida. Más del 70% de los pacientes con hipertensión notaron mejoría o resolución de los valores de presión arterial (Carson, 1994). Cerca de la mitad de los pacientes diabéticos que se someten a cirugía bariátrica pueden normalizar la HbA1c e incluso pueden dejar de usar insulina o medicamentos hipoglucemiantes (Batsis, 2008a). Los pacientes sometidos a cirugía bariátrica experimentan una reducción significativa en el riesgo cardiovascular estimado y algunos estudios indican disminución en la mortalidad después de la cirugía bariátrica (Batsis, 2008b).

Las complicaciones quirúrgicas más frecuentes e inherentes a la propia cirugía bariátrica incluyen la dehiscencia de suturas, úlcera marginal, comunicación gastrogástrica, estenosis de la anastomosis gastroyeyunal o eventración (25-50%) en cirugías abiertas. Entre las complicaciones médicas se encuentran los vómitos, diarreas, síndrome de dumping y aquellas relacionadas con la malabsorción de proteínas y vitaminas. Por ello, el seguimiento de las pautas alimentarias y la suplementación diaria de complejos de vitaminas y minerales (en especial hierro, calcio y vitaminas B12 y D) deben conformar parte de la educación nutricional que necesariamente deben recibir estos pacientes tras la cirugía y la monitorización analítica periódica para ajustar los tratamientos (Bloomberg, 2005).

- BALÓN GÁSTRICO

El balón intragástrico consiste en la colocación endoscópica de un balón relleno de suero salino o aire en la cavidad gástrica, con la finalidad de reducir sensiblemente la capacidad para la ingestión de alimentos y en consecuencia se alcanzan pérdidas promedio de 15 a 20 kg durante un período temporal de 6 meses (Mathus-Vliegen, 2005). La ausencia de datos disponibles a largo plazo, una vez retirado el balón y los posibles efectos secundarios y complicaciones descritas, relegan esta técnica a casos excepcionales, de aplicación limitada en el tiempo, donde han fracasado medidas intensivas dietéticas y farmacológicas y al mismo tiempo las opciones quirúrgicas pueden representar un riesgo no asumible por el paciente (Alfalah, 2006)

MODELOS ANIMALES EXPERIMENTALES

Es importante la utilización de modelos animales que mimeticen las diferentes patologías como la obesidad y la consiguiente resistencia a la insulina. De esta manera, se pueden estudiar los mecanismos patogénicos que intervienen en el desarrollo de la enfermedad e intentar aprender más sobre la enfermedad humana. Los modelos animales de enfermedades pueden generarse espontáneamente, o bien, ser inducidos experimentalmente en diversas especies. En algunos casos, para la obtención del modelo animal de la patología, se pueden combinar ambas situaciones. El conocimiento de las obesidades animales establece puntos de referencia y comparación con las humanas, ya que al igual que éstas también pueden acompañarse de insulino-resistencia, hiperinsulinemia, diabetes y trastornos lipídicos.

1. MODELOS ESPONTÁNEOS

La obesidad animal al igual que la humana, puede ser consecuencia de la expresión de un solo gen (monogénicas) como en el caso de los ratones *ob/ob* y *db/db* o las ratas *fa/fa* o de varios genes (poligénicas) como en el caso del ratón obeso New Zealand (NZO) y del hámster chino (Bray, 1971).

| MUTACIÓN | | MODELO |
|------------|------------|--|
| GEN ÚNICO | DOMINANTE | Ratón amarillo (Ay) Ratón adiposo (Ad) |
| | RECESIVO | Ratón obeso (ob) Ratón diabético (db) Ratón fat (fat) Ratón tubby (tub) Rata Zucker (fa) Rata corpulenta (SHR/N-cp) |
| POLIGÉNICA | ESPONTÁNEA | Ratón New Zealand (NZO) Ratón japonés (KK) Ratón negro Paul Bailey(PBB/Ld) Ratón Wellesley(C3HF1) Ratón NH |
| | AMBIENTAL | Ratón A/St Ratón C3H Ratón Spiny Rata BHE Rata Osborne-Mendel Rata de la arena (rata Sand) |

Tabla. 4: Modelos genéticos de obesidad en roedores (Frühbeck, 1997)

Las características de algunos de estos animales se describen a continuación:

- **Ratón amarillo (Ay):** Es monogénico de herencia dominante. Una alteración autosómica en el cromosoma 2 expresa el gen obesógeno llamado agouti. Este gen codifica una proteína de 163 aminoácidos (agouti) que actúa localmente, antagonizando a la hormona melanocitoestimulante en la unión con su receptor. Debido a que estos ratones producen de manera intermitente la proteína agouti, su pelo presenta una alternancia de bandas negras y amarillas, aunque no son obesos. La mutación del gen agouti produce un ratón totalmente amarillo, debido a la sobreexpresión en la piel de la proteína agouti y además obeso, pues en estos casos también se sintetiza ectópicamente, en tejidos donde normalmente el gen no es expresado (Chua, 1997). La hiperfagia y el aumento de la eficiencia metabólica que adquieren estos animales, son consecuencia de la interacción de la proteína agouti ectópica con

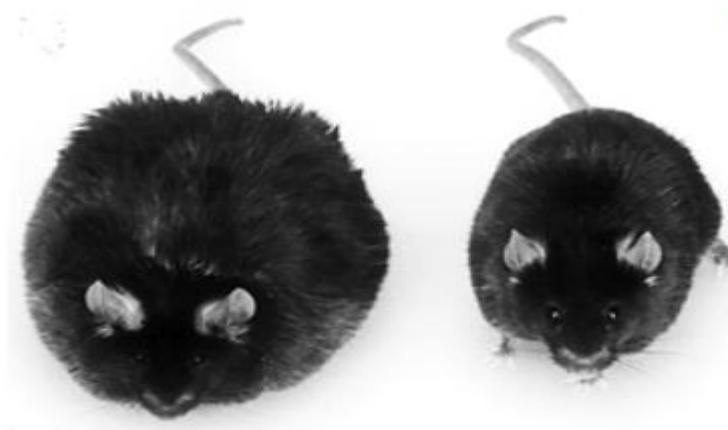
Antecedentes

algún receptor cerebral, posiblemente el receptor de la melanocortina. El ratón amarillo al mes de vida desarrolla hiperfagia, hiperinsulinemia y obesidad (más tardía que en los ratones ob y db) e intolerancia a la glucosa y diabetes. También a diferencia de las mutaciones ob y db, presenta un incremento de la masa magra (Chua, 1997).

- **Ratón obeso ob/ob ($Lep^{ob/ob}$):** Los ratones ob/ob son portadores de la mutación en el gen de la leptina. Presenta una mutación de tipo recesivo. El cromosoma defectuoso es el número 6. En estos animales, el gen lep, que sólo se expresa en el tejido adiposo, sufre una mutación llamada ob (Rosebaum, 1997). El producto del gen lep, es la proteína llamada leptina (de leptos: delgado). Normalmente la leptina se une a receptores denominados OB-R, localizados en el sistema nervioso central. Debido a la mutación, estos ratones no producen leptina y se vuelven obesos en las primeras semanas de vida debido a un aumento de la ingesta y a una reducción del gasto energético (Chua, 1997). Estos animales presentan una disminución de los receptores $\beta 1$ y $\beta 3$ revelando un defecto metabólico además del componente alimentario. El suministro de leptina corrige el peso y disminuye el apetito. Una cepa de ratones mutantes de abundante masa grasa, denominada C57BL/6J, sintetiza gran cantidad del ARNm que codifica la leptina, hecho que apoya la hipótesis que la expresión de este gen es proporcional al tamaño de los depósitos adiposos (Friedman, 1994). No obstante, la producción de leptina no sólo está en relación con la masa grasa, también otras influencias como el frío, el ayuno, dormir y otras hormonas pueden modificarla. El suministro de leptina reduce la ingesta e incrementa el gasto energético en los ratones ob/ob (leptinopénicos), mientras que es inefectiva en los ratones obesos db/db y en la rata fa/fa, que son insensibles a su acción o sea leptinoresistentes (Arion, 2010).

- **Ratón diabético db/db ($LepR^{db/db}$):** El gen de la diabetes (db) se transmite de modo autosómico recesivo. El gen alterado se localiza en el cromosoma 4 y codifica una mutación puntual (G a T) en el gen del receptor de la leptina, dando lugar a un déficit de señalización de dicha hormona adipocitaria (Chua, 1996). Presentan características metabólicas similares al ratón $Lep^{ob/ob}$: obesidad, hiperinsulinemia, hiperglucemia y altos niveles de colesterol HDL, su principal diferencia es que éstos debido a la mutación en el receptor de la leptina presenta altas concentraciones de leptina en sangre que son proporcionales al grado de adiposidad, en cambio los ratones $Lep^{ob/ob}$ presentan un déficit de leptina en sangre (Arion, 2010).

La mutación *db/db* muestra muchas de las características de la DM2 humana (Sharma, 2003) Los ratones db son insensibles al suministro de leptina exógena (Campfield, 1996). Estos animales primero sufren obesidad precoz con hiperinsulinemia, posteriormente desarrollan diabetes y finalmente fallo pancreático y muerte por diabetes descompensada. En estos especímenes la hipersecreción de insulina es un hecho común, por lo menos en el comienzo. Luego desarrollan insulino-resistencia muscular y finalmente disminuye la producción pancreática de insulina por una degeneración de las células β de los islotes (Like, 1972).



Antecedentes

- **Rata Zucker fa/fa:** También llamada ZDF (*Zucker Diabetic Fatty Rat*). La mutación “fatty” (*fa*) fue publicada por Zucker and Zucker en 1961 (Zucker, 1961). Los animales homocigotos para el alelo *fa* (receptor de la leptina no funcionante) son perceptiblemente obesos a las 3 a 5 semanas de vida. Para la semana 14, su composición corporal consta de más de un 40% de lípidos. La obesidad se hereda de modo recesivo y los animales son hiperlipidémicos, hipercolesterolémicos e hiperinsulinémicos, y desarrollan hipertrofia e hiperplasia adipocitaria, semejando la obesidad humana, por ello el modelo de la rata Zucker es el mejor conocido y más ampliamente usado como modelo genético de obesidad humana de comienzo precoz.

La rata ZDF presenta tanto resistencia a la insulina (como resultado del receptor mutado de leptina, que causa obesidad), como inadecuada compensación por parte de la célula β . Esto último parece depender de un defecto transcripcional en la célula β , que se hereda independientemente de la mutación del receptor de la leptina y la resistencia a la insulina (Griffen 2001). Las ratas con genotipos homocigoto dominante (+/+) y heterocigoto (*fa*/+) no presentan obesidad ni hiperglicemia.

La rata Zucker no ha sido utilizada tan extensamente como modelo de DM2, probablemente porque, a diferencia de los ratones *db/db* y *ob/ob*, su hiperglicemia es discreta, existiendo variaciones entre ellas. Sin embargo, presenta algunas complicaciones similares a la DM tipo 2 humana (Lash, 1989), así como hiperinsulinemia secundaria a resistencia periférica a la insulina, la cual es especialmente marcada en el músculo e hígado. En los mutantes *ob*, *db* y *fa* coinciden al menos cuatro hechos: hiperfagia, termogénesis reducida, disminución de la actividad física y obesidad

(Chua, 1997), además de la perturbación en su sistema de señalización dependiente de la leptina.

- **Ratón fat/fat:** Originado hace 20 años debido a una mutación recesiva espontánea en el cromosoma 8. El gen alterado se expresa en el cerebro y otros tejidos. A diferencia de los ob y db no presentan hiperfagia, la ganancia de peso se produce gradualmente desde la pubertad (los ratones ob y db, lo hacen tempranamente) y no desarrollan hipercortisolismo. La mutación fat altera la enzima carboxipeptidasa E. Esta enzima interviene en la transformación de prohormonas en hormonas, lo que ocasiona un aumento de la proinsulina con un déficit en la producción de insulina. La sensibilidad a la insulina se conserva, a pesar de la marcada obesidad del animal. La falta de actividad de la carboxipeptidasa E también afectaría la producción de otras proteínas como el neuropéptido Y, la proopiomelanocortina, el glucagon péptido 1, la colecistoquinina. En los humanos hasta el momento un sólo individuo ha sido identificado como portador de una mutación homóloga a la fat en los ratones. (Chua, 1997).
- **Ratón tub:** presenta una obesidad mediana de comienzo tardío, el gen alterado es el número 7 (Rosembaum, 1997) que expresa en el cerebro una proteína denominada tub. Como consecuencia de esta mutación se altera la síntesis de la enzima fosfodiesterasa (Rosembaum, 1997). A diferencia de los mutantes ob, db y fa no son hiperfágicos (Chua, 1997).

2. MODELOS INDUCIDOS EXPERIMENTALMENTE.

➤ MANIPULACIÓN GENÉTICA.

Además de los modelos espontáneos existen los, producidos por ingeniería genética, llamados transgénicos. En uno de ellos se consiguió sobreexpresar el GLUT 4 en el tejido adiposo, mientras que en otro modelo se consiguió anular el gen para el receptor a la serotonina (5HT_{2C}). En ambos casos se obtuvieron animales obesos, aunque en el primero de ellos no se produjo hiperfagia. En un tercer modelo artificial se produjo la ablación genética del tejido adiposo pardo (productor de calor). Como era de esperar estos animales presentaron un defecto en su termogénesis, aunque luego inesperadamente desarrollaron hiperfagia, sugiriendo que existe alguna relación entre estos dos componentes del balance energético.

Los tipos de manipulaciones que afectan a un gen específico y que pueden interesar para producir un modelo son:

- Sobreexpresión, da lugar a ratones llamados transgénicos.
- Reemplazo (con una forma alterada): da lugar a ratones llamados “Knock in”.
- Eliminación: da lugar a ratones llamados “knock-out”.

Los ratones genosuprimidos (*knock-out*): A través de la delección dirigida de genes implicados en el desarrollo de obesidad y diabetes se pueden generar animales que simulen la enfermedad humana. En general, los modelos animales genosuprimidos con alteraciones monogénicas en la acción de la insulina han permitido estudiar el papel potencial de las moléculas de señalización de la insulina en la resistencia a la hormona a nivel específico de tejido. Un ejemplo de estos animales es el animal genosuprimido total para el

receptor de la insulina (IR). Este animal presenta diabetes severa y muerte postnatal a los 3-7 días del nacimiento (Bruning, 1997). En cambio, la disrupción específica de este gen en un tejido concreto tendrá efectos diferentes. En músculo, la disrupción del gen IR produce un incremento del tejido adiposo, triglicéridos y ácidos grasos (Bruning, 1998; Kim, 2000). La falta de IR en hígado provoca intolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia y alteración en la función hepática. En célula β altera la secreción de insulina y desarrolla progresivamente intolerancia a la glucosa (Kulkarni, 1999). La delección del gen de IR en cerebro provoca resistencia a insulina, un incremento del tejido adiposo y de leptina e hipogonadismo hipotalámico (Bruning, 2000).

➤ INDUCCIÓN MEDIANTE DIETA RICA EN LÍPIDOS.

Existe una amplia relación entre la dieta, la obesidad y el desarrollo de resistencia a la insulina y DM tipo 2. Cuando ratas o ratones son alimentados con una dieta de alto contenido lipídico desarrollan rápidamente resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, hiperglucemia, y en cepas genéticamente susceptibles, también diabetes (Storlien, 1986). La utilización de animales alimentados con dieta alta en lípidos es un modelo de interés ya que permitirán estudiar los mecanismos que conducen a la resistencia a la insulina en individuos obesos con tolerancia a la glucosa alterada o DM tipo 2. Sin embargo, debe tenerse en cuenta la respuesta heterogénea de los animales a la dieta alta en lípidos (Burcelin, 2002). No obstante, nos encontramos ante un modelo bien descrito y ampliamente utilizado para el estudio de la obesidad, la resistencia a la insulina y la diabetes de tipo 2.

En nuestro trabajo hemos elegido el modelo espontáneo de ratón LepR^{db/db} porque a partir de las cuatro semanas de edad, los

Antecedentes

animales están hiperglucémicos, hiperinsulinémicos, hiperfágicos y obesos, y representan un buen modelo para estudiar la diabetes y la obesidad, lo contrario de los modelos ob/ob que se trata de animales obesos con una incidencia de diabetes relativamente baja.

COMPARACIÓN DE OBESIDAD GENÉTICA EN ANIMALES Y HUMANOS

Los cromosomas alterados en la obesidad animal tienen su homología en los humanos. Estas similitudes se expresan con datos concretos a continuación (Rosembaum, 1997):

| GEN | MUTACIÓN | PRODUCTO DEL GEN | CROMOSOMA AFECTADO EN EL ANIMAL | HOMÓLOGOS EN HUMANOS |
|--------|----------------|------------------------|---------------------------------|----------------------|
| Lep | ob | Leptina | 6 (ratón) | 7q31.3 |
| LepR | db fa | Receptor de la leptina | 4 (ratón) 5 (rata) | 1p32 |
| Cpe | fat | Carboxipeptidasa E | 8 (ratón) | 11p15 |
| Tub | tub | Fosfodiesterasa | 7 (ratón) | 4q32 (?) |
| Agouti | A ^y | Proteína agouti | 2 (ratón) | 20q11.2 |

Tabla.5: Principales genes implicados en la obesidad en humanos y animales.

POLIFENOLES

Los compuestos polifenólicos constituyen uno de los grupos más numerosos y ampliamente distribuidos del reino vegetal, con una lista de más de 8000 estructuras que sigue en continuo crecimiento (Benavente-García 2008). Existen numerosas clasificaciones, pero normalmente se agrupan según el número de anillos fenólicos que contienen y en función de cómo se unen entre sí. Se distinguen dos grandes grupos de moléculas, polifenoles flavonoides y no flavonoides, siendo el primero el más numeroso (ver Tabla 6). Los polifenoles también se pueden clasificar en función del número de átomos de carbono de la cadena alifática que se encuentra sustituyendo el núcleo bencénico. Sus estructuras van desde moléculas muy simples, como los ácidos fenólicos, hasta otras altamente polimerizadas, como los taninos. Suelen encontrarse en la naturaleza unidos a un resto de azúcar, que principalmente es la glucosa.

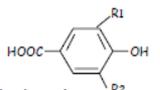
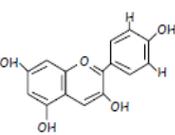
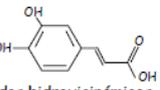
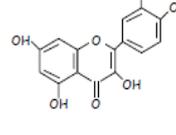
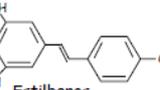
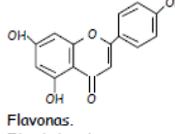
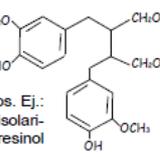
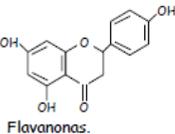
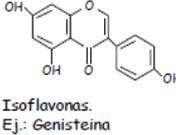
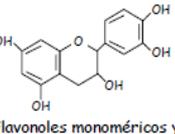
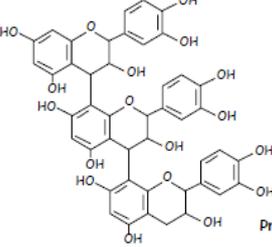
| POLIFENOLES | |
|---|--|
| No flavonoides | Flavonoides |
|  <p>Ácidos benzóicos. Ej.: R₁= R₂= OH = Ác. Gálico</p> |  <p>Antocianinas. Ej.: Pelargonidina</p> |
|  <p>Ácidos hidroxicinámicos. Ej.: Ác. Caféico</p> |  <p>Flavonoles. Ej.: Quercetina</p> |
|  <p>Estilbenos. Ej.: Resveratrol</p> |  <p>Flavonas. Ej.: Apigenina</p> |
|  <p>Lignanos. Ej.: Secoisolariciresinol</p> |  <p>Flavanonas. Ej.: Naringenina</p> |
| |  <p>Isoflavonas. Ej.: Genisteina</p> |
| |  <p>Flavonoles monoméricos y poliméricos. Ej.: Epicatequina</p> |
| |  <p>Proantocianidinas</p> |

Tabla 6: Clasificación de los polifenoles.

1. FLAVONOIDES

Clásicamente, la medicina tradicional ha utilizado extractos de plantas en el tratamiento de numerosas enfermedades, desde el cáncer a las enfermedades inflamatorias. Por otra parte, numerosos estudios indican la importancia de la ingesta de dietas ricas en productos vegetales en la prevención de múltiples patologías, entre las cuales están, el cáncer (García-Closas, 1999; Hillman, 2001), la diabetes tipo II (Scalbert, 2005), las enfermedades cardiovasculares (Berkow, 2007; Benavente-García, 2008), las enfermedades neurodegenerativas (Scalbert, 2005; Letenneur, 2007), enfermedades inflamatorias crónicas y alergias (Kim, 2004; Rahman, 2006). Por todo ello, en los últimos tiempos, se han llevado a cabo numerosos estudios para descubrir las moléculas responsables de las propiedades saludables de los vegetales. Se han identificado numerosos compuestos, como los micronutrientes, la fibra o el licopeno (Berkow, 2007); sin embargo, podemos destacar de entre todos ellos el grupo de los flavonoides (Chun, 2005). Los flavonoides se consideran fitoquímicos, al contrario que las vitaminas y otros micronutrientes, ya que no son esenciales para el bienestar a corto plazo, y son metabolizados en el organismo como si fueran xenobióticos (Crozier, 2009).

Las sustancias fitoquímicas son productos orgánicos constituyentes de alimentos de origen vegetal (frutas y hortalizas y alimentos derivados de ellas), que no son nutrientes y que pueden proporcionar al alimento unas propiedades fisiológicas que van más allá de las nutricionales propiamente dichas. Dentro de este término genérico, se incluyen sustancias de diversas familias químicas, como son los *polifenoles*, entre los que se incluyen los flavonoides.

Los flavonoides son compuestos polifenólicos que constan de 15 C, su estructura básica es una benzo-y-pirona (dos anillos aromáticos unidos por un puente de 3C, es decir, C6-C3-C6) (Figura 14) (Benavente-García, 2008; Crozier, 2009). Según la conexión entre los

anillos B y C, el estado de oxidación y los grupos funcionales del anillo C se pueden clasificar principalmente en: flavonoles, flavonas, flavan-3-ol, antocianidinas, flavanonas, isoflavanonas (Crozier, 2009).

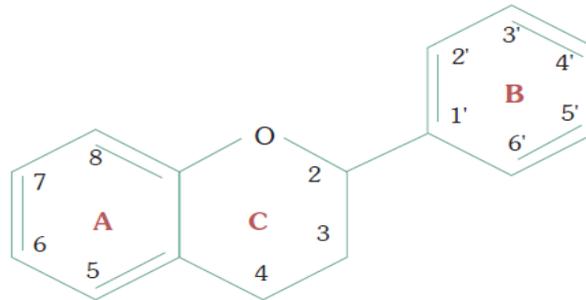


Figura 14. Esqueleto estructural de los flavonoides

Desde el punto de vista bioquímico, los flavonoides se caracterizan por poseer una elevada reactividad que se expresa en su afinidad por unirse a proteínas, a otras macromoléculas biológicas (hormonas, ácidos nucleicos) y a iones divalentes de metales, así como por su capacidad para catalizar el transporte de electrones y captar radicales libres. Estas propiedades pueden dar lugar a efectos fisiológicos muy diversos, muchos de los cuales sólo han podido ser puestos de manifiesto en ensayos *in vitro*: inhibición de enzimas, actividad antioxidante, efectos antiinflamatorios, acción antibacteriana y antiviral, secuestro de metales, actividad vascular, etc. (Chung, 1998). Todos estos posibles efectos hacen de los flavonoides un grupo de sustancias con un importante potencial terapéutico, y de hecho entran ya a formar parte de numerosas formulaciones farmacéuticas comercializadas. Por las mismas razones, ha aumentado su interés como componentes de los alimentos y justifica su inclusión dentro del término genérico de fitoquímicos y su papel dentro de alimentos funcionales.

El centro de atención sobre los flavonoides ha estado dirigido últimamente a su actividad antioxidante, dada su reconocida capacidad

Antecedentes

de atrapar radicales libres, quelar metales y por poseer un bajo potencial rédox. Un número importante de especies de oxígeno altamente reactivas como el oxígeno singlete O_2 y O_2^- , OH^- , NO^- y radicales libres alquil-peroxilo se producen regularmente en nuestro organismo. Estos pueden dañar a lípidos, proteínas y ADN e intervenir en procesos de patogénesis y envejecimiento. De forma general, los sistemas de defensa fisiológica frente al daño generado por estos radicales se clasifican en tres categorías:

- Antioxidantes, que previenen la formación de radicales libres.
- Antioxidantes captadores de radicales libres, que inhiben la iniciación del proceso oxidativo o bien interfieren en el proceso de propagación.
- Antioxidantes, que actúan revirtiendo el proceso de oxidación.

La ingestión dietética de flavonoides junto con otros antioxidantes naturales de eficacia comprobada, como las vitaminas C y E y carotenoides, coadyuvan en esos procesos de defensa. Los flavonoides se encontrarían dentro de las dos primeras categorías, es decir, son capaces de prevenir la formación de radicales libres o bien actúan como captadores de estos radicales una vez formados (Rice-Evans, 1995; Scalbert, 2005).

En la relación estructura-actividad existen una serie de características que determinan la efectividad de las moléculas como antioxidantes:

1. La presencia de sustituyentes con capacidad donadora de hidrógeno/electrones, y con apropiados potenciales de reducción (Bors, 1990).
2. La capacidad para deslocalizar el radical resultante (Bors, 1990).

3. El potencial de quelación de metales de transición, que depende de la naturaleza y disposición de los grupos funcionales en la molécula (Paganga, 1996).
4. La accesibilidad del antioxidante al lugar de acción, que viene definido por el carácter lipofílico o hidrofílico o coeficiente de reparto (Niki, 1996).
5. La interacción de los radicales con otras moléculas antioxidantes (Niki, 1996).

En el caso de los *flavonoides* se cumplen los dos primeros requisitos: son antioxidantes hidrogeno-donadores, en virtud de las propiedades reductoras de los múltiples grupos hidroxilos sustituyentes de los anillos aromáticos y además tienen capacidad para deslocalizar el radical resultante dentro de su estructura (Rice-Evans, 1999).

Existen numerosos trabajos experimentales para dilucidar, tanto *in vitro* como *in vivo*, los efectos de los flavonoides en cantidades próxima a las aportadas por la dieta o superiores. Estos estudios han demostrado que los flavonoides que contienen numerosos efectos biológicos como antioxidantes, antimutagénicos, hipoglicémicas, antihepatotóxica, fotoprotectores, eliminadores de radicales libres, antiinflamatorios, antivirales, antiteratógenos, inhibidores de la agregación plaquetaria, anticancerígenos, estimuladores del sistema inmune y resultan poco tóxicos (Patel, 2007; Benavente-García, 2008; Alcaraz, 2009; Sánchez- Campillo, 2009;)

2. FLAVONOIDES EN LA DIETA

La gran mayoría de los estudios observacionales correlacionan la dieta mediterránea con un menor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares e inflamatorias (Benavente-García, 2000). Inicialmente se observó que una relación desfavorable de ácidos grasos poliinsaturados frente a los monoinsaturados contribuía significativamente con otros factores de riesgo conocidos como la presión sanguínea, la edad, el colesterol sérico, el tabaquismo sobre la incidencia de la muerte cardiovascular. Aunque se demostró una asociación con la dieta, no se pudieron establecer los mecanismos moleculares subyacentes relacionados con la patología ateromatosa.

Posteriormente, estudios observacionales, señalaron una posible relación entre vitaminas antioxidantes y la reducción de la mortalidad cardiovascular (Khaw, 2001).

Las principales fuentes de flavonoides en la dieta son las frutas y verduras (cebollas, uvas, manzana, legumbres), el chocolate negro y las bebidas como el café, el té (negro o verde) y el vino tinto (Manach, 2004; Somerset, 2008; Crozier, 2009). Algunas frutas como las manzanas o las peras pueden contener de 2 a 4 gramos/ Kg de peso de polifenoles (Crozier, 2009).

Sin embargo, los alimentos que proporcionan las mayores cantidades de flavonoides en la dieta puede ser muy variada según el país, así como en Japón la fuente fundamental de flavonoides es el té, en Finlandia lo son las frutas y verduras, en EEUU y Australia lo son los cítricos y el té (Chun, 2007). También existe variación dentro de un mismo país, así en Italia, en los pueblos del norte los flavonoides proceden principalmente de frutas, ensaladas y sopas de verduras (mientras que en el resto proceden del vino tinto).

Además, las concentraciones de flavonoides pueden variar entre las diferentes variedades de una misma especie o zonas del vegetal; por ejemplo el tomate cherry presenta hasta 6 veces más de quercetina que otras variedades de tomates (Manach, 2004). También la época del año puede afectar a los niveles de flavonoides en algunas especies, pudiendo multiplicarse por 5-7 en verano; así como la exposición a cambios de temperatura y la luz, lo que explica que plantas cultivadas en España puedan contener 4-5 veces más de flavonoides que aquellas que crecen en el Reino Unido. También se ha visto que la forma de preparación los vegetales puede afectar a su concentración en los alimentos (Bergquist, 2005).

La ingesta diaria de flavonoides ha ido variando a lo largo de los años, así en los años 70, en EEUU, era de aproximadamente 1g/día (16% de flavonoles, flavonas y flavononas; 17% de antocianidinas; 20% de catequinas y 45% de biflanonas). Años después la ingesta media estimada en Occidente fue de 100-150mg/día (Beecher, 2003; Manach, 2004). Diversos estudios en diferentes países proponen valores medios de flavonoides en la dieta muy distintos. Así como en EEUU el consumo es de 190 mg/día aproximadamente (Chun, 2007); en Finlandia y Japón los valores son más bajos, $24,2 \pm 26,7$ mg/día (Knekt, 2002) y 63 mg/día (Arai, 2000) y en Australia los valores llegan hasta 454 mg/día (Johannot, 2006).

El consumo de los diferentes tipos de flavonoides también se ve influenciado por los factores culturales. En Asia, donde se consume una dieta rica en soja, se consume de 25-40 mg/día de isoflavonas (Arai, 2000), versus a España, donde se consume de 18-31 mg/día de flavonoles y en Italia donde se consume de 5-1250 mg/día (Manach, 2004).

3. FLAVONOIDES Y SUS EFECTOS SALUDABLES

FLAVONOIDES Y OBESIDAD

La obesidad supone una grave amenaza para la salud pública, debido al riesgo a desarrollar enfermedades asociadas como la diabetes, hipertensión, enfermedades cardiovasculares, alteraciones inflamatorias, aumento del riesgo de padecer cáncer, insuficiencia respiratoria y osteoartritis, entre otras, y por el elevado coste sanitario que se deriva de las mismas (Ballesta, 2006).

Algunos de los flavonoides más estudiados en el tratamiento de la obesidad son los extraídos del té (Chin-Lin, 2008) Los compuestos mayoritarios del te son las catequinas, principalmente (-)-epicatequina (EC), (-)-epicatequina-3-gallato (ECG), (-) epigalocatequina (EGC) y (-)-epigalocatequina-3-galato (EGCG) (Lin, 2006). Los extractos de hojas del te mostraron una importante actividad hipolipemiente en ratas después de 63 semanas de tratamiento (Lin, 1998). Los efectos de las catequinas purificadas sobre el peso de las ratas también fueron estudiados (Kao, 2000). Cabe destacar que solamente la inyección intraperitoneal de EGCG, y no de las otras catequinas (EC, EGC y ECG), causó una pérdida de peso corporal en ratas de ambos sexos en un periodo comprendido entre 2 y 7 días de tratamiento.

Los mismos resultados se obtuvieron suplementando la dieta con EGCG en ratones alimentados con una dieta rica en grasa (Klaus, 2005). En este último estudio, los animales control ganaron el doble de peso que los animales tratados con EGCG, aunque la ingesta de comida no mostro diferencias entre grupos. La pérdida de peso se debió exclusivamente a una reducción en la cantidad de grasa corporal (Klaus, 2005).

Los mecanismos moleculares encontrados muestran que los polifenoles del té estimulan la absorción de glucosa acompañada de un reducción en la translocación del transportador de glucosa 4 (GLUT4) en el tejido adiposo, mientras que en el musculo esquelético el aumento de absorción de glucosa se acompaña de un aumento en la translocación de GLUT4 a la membrana celular. En resumen, los polifenoles del té muestran efectos biológicos en la prevención de la obesidad modulando la absorción de glucosa en el tejido adiposo y en el músculo esquelético y suprimiendo la expresión de factores de transcripción relacionados con la adipogénesis (Ashida, 2004).

Otros estudios se centran en la modulación de la actividad de la lipasa pancreática (LP) (De la Garza, 2011). Este enzima, sintetizado en los humanos por el gen PNLIP, posee una función clave en la digestión de los triglicéridos. La LP se secreta al duodeno y es la responsable de la hidrólisis del 50-70% de la grasas ingeridas (Birari, 2007). Este enzima se utiliza a menudo para evaluar el potencial de eficacia de productos naturales como agentes antiobesidad (Sugiyama, 2007). El Orlistat® es uno de los fármacos aprobados en Europa que se utiliza en el tratamiento de la obesidad. Esta molécula inhibe la actividad de la LP reduciendo la absorción de triglicéridos. Muchos polifenoles como los flavanoles, taninos y calconas inhiben la LP (Birari, 2007; Slanc, 2009). Un flavonoide con actividad inhibitoria de la LP es la hesperidina, obtenida de la cascara de *Citrus unshiu* (Kawaguchi, 1997). Las proantocianidinas reducen la concentración plasmática de triglicéridos bloqueando la absorción de lípidos de la dieta (Quesada, 2009) e inhiben enzimas digestivos como la tripsina, la amilasa y la lipasa.

FLAVONOIDES Y ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

Existen estudios que demuestran que el consumo de flavonoides disminuye el riesgo de mortalidad y morbilidad de enfermedades cardiovasculares (Grassi, 2009). Los polifenoles han recibido una gran atención en la prevención de enfermedades cardiovasculares, derivada en parte de la llamada paradoja francesa, que se ha justificado en principio debido a la protección antioxidante que ofrecen los polifenoles presentes en el vino y las verduras. Tal vez el compuesto más estudiado en este contexto es el resveratrol. Se ha demostrado que el resveratrol ejerce efectos protectores en el modelo de ratones deficientes en la apolipoproteína E (Do, 2008), actuando en la concentración sanguínea de lípidos y sobre el desarrollo de la placa aterosclerótica.

El mecanismo parece ser, al menos en parte, antiinflamatorio, ya que disminuye la expresión de ICAM-1 (intercelular adhesión molecul 1) y VCAM-1 (vascular cell adhesión molecul 1) en los vasos sanguíneos. Sin embargo, el resveratrol no afectó a los niveles sanguíneos de lípidos en conejos hipercolesterolémicos (Wilson, 1996) o en ratas normales (Turrens, 1997), aunque mejora la concentración lipídica en sangre en ratas Zucker, un modelo animal de obesidad que, en avanzada edad, muestran algunas alteraciones similares a las observadas en la diabetes tipo II (Rivera, 2009). Esta molécula también reduce la infiltración celular, la fibrosis y la expresión de citoquinas inflamatorias en un modelo de miocarditis autoinmune (Yoshida, 2007). Otros polifenoles como la miricetina y la fisetina reducen la oxidación de las LDL (lipoproteínas de baja densidad) y disminuyen la expresión de CD36 (Lian, 2008). Ambas acciones favorecen la reducción de la formación de células espumosas y por lo tanto son considerados protectores frente a la aterosclerosis.

Otra forma que tienen los flavonoides de evitar la oxidación de las LDL es mediante el bloqueo de mieloperoxidasa de los neutrófilos. Este efecto es menos importante en los metabolitos de los flavonoides (Loke, 2008a), que por lo general son menos bioactivos que sus precursores en forma de aglicona intacta (Loke, 2008b). Cabe señalar también que los macrófagos ubicados en las placas de aterosclerosis pueden absorber conjugados de quercetina y convertirlos de nuevo a quercetina activa (Kawai, 2008a). El mismo mecanismo (prevención de la oxidación de las LDL y reducción de la expresión de CD36) se ha descrito para ECG que, curiosamente, parece ejercer esta acción específicamente en las lesiones ateroscleróticas (Kawai, 2008b). Lo mismo ocurre con el kaempferol y la rhamnocitrina (Tu, 2007), la quercetina (Terao, 2008), e incluso la quercetina-3-glucuronido (Kawai, 2008). Otros mecanismos de protección incluyen la activación del ABCA1 (ATP-binding cassette, member 1), lo que posiblemente aumente la concentración sanguínea de las HDL; la menor producción de NADPH oxidado (Romero, 2009) actividades antiaterotrombóticas (Jin, 2008) e inhibición de la proteína C reactiva (Kaur, 2007).

La quercetina ha demostrado disminuir el riesgo de morir por isquemia cardíaca y un consumo elevado de flavonoles y flavonas previene la muerte por enfermedades coronarias o el infarto de miocardio (Hirvonen, 2000). Es probable que parte de estos efectos protectores se deban a las acciones de estas moléculas sobre los niveles de colesterol plasmático (Arai, 2000), donde se ha visto una correlación inversa entre el total de flavonoides en la dieta y las concentraciones plasmáticas de colesterol total y colesterol LDL.

FLAVONOIDES Y ENFERMEDAD DEL HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO (NAFLD)

El hígado es el principal órgano metabólico y lleva a cabo una gran variedad de funciones bioquímicas necesarias para la homeostasis metabólica. Este órgano es sensible a muchos procesos patológicos, siendo la NAFLD la causa más común de disfunción hepática (Vinaixa, 2010).

La NAFLD describe una condición clínico patológica mayoritariamente asintomática, caracterizada por una significativa acumulación de lípidos en forma de vesículas en los hepatocitos del parénquima del hígado y en ausencia de un consumo de alcohol significativo (Neuschwander, 2003; Kleiner, 2012).

Estudios recientes demuestran que algunos polifenoles (Baur, 2006; Mulvihill, 2009) o extractos de polifenoles (Feillet-Coudray, 2009; Xu, 2009) pueden impedir, al menos parcialmente, la esteatosis hepática inducida por dietas ricas en grasa. De hecho, los polifenoles pueden actuar sobre el metabolismo lipídico incidiendo en la actividad del enzima desaturasa. Por ejemplo, algunos polifenoles reducen la expresión del gen de la Δ -9 desaturasa (estearoil-CoA desaturasa 1; SCD1) 68,133 y de la Δ -6 desaturasa¹³⁴. Los polifenoles también pueden actuar sobre las vías de señalización del metabolismo lipídico, incluyendo la síntesis y degradación de estos.

Diferentes estudios (Hou 2008; Paur, 2008) demostraron que niveles elevados de glucosa inhiben la actividad de la AMPK y la fosforilación de la acetil-CoA carboxilasa, aumentando por lo tanto el contenido de lípidos en los hepatocitos. Sin embargo, la administración de polifenoles revirtió la inhibición de la actividad de la AMPK y la fosforilación de la acetil-CoA carboxilasa (Zang, 2006).

Por otra parte, se ha demostrado que los polifenoles estimulan la AMPK y evitan la acumulación de lípidos en los hepatocitos, probablemente mediante la activación de sirtuina-1 deacetilasa (Hou, 2008). Como las mitocondrias son un orgánulo clave en el metabolismo lipídico y la principal fuente de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en los hepatocitos, se postulan como candidatas para desempeñar un papel central en la progresión de la esteatosis a esteatohepatitis no alcohólica y cirrosis. Algunos polifenoles también han demostrado capacidad para modificar la actividad mitocondrial y aumentar la mitocondriogénesis (Csiszar, 2009). Este efecto puede aumentar el catabolismo de lípidos mitocondrial y por lo tanto, atenuar la acumulación hepática de ácidos grasos. La activación de AMPK puede considerarse una diana terapéutica adecuada para tratar esta enfermedad, y los polifenoles son compuestos naturales que actúan directamente sobre esta proteína.

FLAVONOIDES Y DIABETES

Hay una gran evidencia epidemiológica de que las dietas ricas en frutas y verduras pueden reducir la incidencia de las enfermedades no transmisibles como la diabetes. Estos efectos protectores se atribuye, en parte, a los metabolitos fenólicos secundarios (Crozier, 2009).

Se ha postulado que la suplementación con compuestos antioxidantes dietéticos, tales como ácido ascórbico y vitamina E puede ofrecer algo de protección contra las complicaciones que provoca la diabetes (retinopatía, nefropatía y enfermedad coronaria) a través de su papel como inhibidores de la glicosilación y como captadores de radicales libres. Comenzaron a existir intereses en la utilización de sustancias antioxidantes que no fuesen vitaminas tales como flavonoides y polifenoles en la reducción del efecto

Antecedentes

negativo del estrés oxidativo y los radicales libres en pacientes diabéticos.

Muchas plantas han sido tradicionalmente utilizadas en el tratamiento de la diabetes. Los polifenoles contenidos en estas plantas pueden explicar parte de su actividad terapéutica. Los polifenoles pueden afectar la glucemia a través de diferentes mecanismos, incluyendo la inhibición de la absorción de glucosa en el intestino o de su absorción por los tejidos periféricos. Los efectos hipoglucemiantes de las antocianinas diacetiladas en una dieta a una dosis de 10 mg/kg se observaron con maltosa como fuente de glucosa, pero no con sacarosa o glucosa (Matsui, 2002). Esto sugiere que estos efectos son debidos a una inhibición de la α -glucosidasa en la mucosa intestinal. La inhibición de la α -amilasa y de la sacarasa en ratas por catequina en una dosis de aproximadamente 50 mg/kg de dieta o superior también se observó. La inhibición de glicosidasas intestinales y transportador de glucosa por los polifenoles se ha estudiado in vitro. (Gee, 2000).

Los polifenoles no sólo podrían inhibir la absorción de glucosa en el intestino delgado, sino que también podrían limitar su reabsorción en el riñón (Matsui, 2002).

4. ESPECIES VEGETALES A ESTUDIO

❖ EXTRACTO DE FRESNO (E. FRESNO)

El Extracto de Fresno proviene del polvo de la planta *Fraxinus excelsior* L. Pertenece a la familia de las *Olanaceas*, también conocida como fresno común o fresno europeo. El extracto esta caracterizado por diferentes tipos de componentes incluyendo secoiridoides, glucósidos, cumarinas, flavonoides, feniletanoides, benzoquinonas, derivados del indol y compuestos fenólicos simples.



Los ingredientes activos contenidos en el E. Fresno son los sercoiridoidies, nuzhenida y GI3. El E. Fresno fue notificado con éxito como un ingrediente alimentario para su uso en complementos dietéticos en la Unión Europea.

Descripción botánica y usos en la medicina herbal tradicional

La planta *F. excelsior* L. de la familia *Olanacea*, también es conocida como fresno común o fresno europeo, es distribuido a lo largo de las zonas templadas de Asia, Europa y de la región del sudeste de Marruecos (Tafilalet) (Bai, 2010). Se trata de un árbol caduco que puede crecer entre 20 y 35 pies de altura y cuyas hojas están dispuestas en forma pinnada y agrupadas en grupos de 9 o 13 (Wright,

Antecedentes

2007). Tradicionalmente, las semillas de *Fraxinus excelsior* L. se han consumido como frutos encurtidos y como condimentos en la Unión Europea. Extractos de las semillas y las hojas de *Fraxinus excelsior* también han sido usadas en la medicina popular en Marruecos por sus propiedades antihiper glucémicas (Eddouks, 2004; Eddouks, 2007). Los extractos de las semillas son caracterizados por diferentes clases de compuestos incluyendo glucósidos secoiridoideos, cumarinas, flavonoides, feniletanoides, benzoquinonas, derivados del indol y compuestos fenólicos simples (Bai, 2010).

Farmacología in vitro e in vivo

El E. Fresno se estudia para su uso en el manejo de los factores de riesgo asociados con el síndrome metabólico, como la obesidad, hiperglucemia y la hipertensión. También para aumentar la pérdida de peso en personas con sobrepeso por la inhibición de la diferenciación de adipocitos y por la inhibición del metabolismo de los lípidos a través del aumento de la modulación de la vía de señalización del PPAR α , la cual está involucrada en la regulación del metabolismo de lípidos y la homeostasis energética (Bai, 2010). Se ha propuesto que el E. Fresno posee un efecto de disminución de los niveles de glucosa en sangre en individuos hiperglucémicos; el mecanismo de acción actualmente se desconoce, pero puede estar implicado en la reabsorción renal de la glucosa (Ibarra, 2011). Según el estudio de Eddouks et al., podemos observar que el E. Fresno tiene un efecto de disminución de los niveles de glucosa en sangre, particularmente en pacientes con hipertensión. Este resultado puede surgir, al menos, en parte como consecuencia del efecto diurético que posee dicho producto (Eddouks, 2005).

❖ EXTRACTO DE SPERGULARIA (E. SPERGULARIA)

Spergularia purpurea es una planta lisa, sin hojas o pubescente, perteneciente a la familia *Caryophyllaceae*. Es originaria de Asia, Europa y Marruecos. Se encuentra en bordes de caminos, céspedes, en todo caso en lugares despejados, arenosos, soleados, sin vegetación alta en su entorno. Florece a final de primavera y en verano.



Descripción botánica y usos en la medicina tradicional

Es una plantita endeble, rastrera y derecha, con pelillos glandulosos en tallos, hojas y cáliz, pequeña, entre 6-15 cm de altura, ramosa, enmarañada, con numerosos tallos que se originan radialmente desde la cepa. Cespitosa y se multiplica con gran facilidad. Numerosas flores casi desde la base de los tallos. Es muy delicada, y sus flores se cierran con facilidad. Flor con 5 pétalos redondeados, de color púrpura rosado, de 3-6 mm de longitud, iguales o más largos que los sépalos, estos de color verdoso con bordes escariosos, translúcidos y con pelillos glandulosos. Tiene 10 o menos estambres con antera amarilla y 3 estilos. El fruto es una cápsula que se abre fácilmente, de arriba abajo por 3 valvas. Dentro hay una piña con numerosas semillas aplanadas, con borde alado, de 0,3-0,5 mm de diámetro, de color pardo oscuro al madurar. Hojas lineares, carnosas, de sección ovalada, con pelillos y de 3-7 mm de longitud, en hacecitos alrededor de nudos, con

Antecedentes

estípulas triangulares plateadas. Tallos muy endebles, con pelillos y numerosos nudos (Bruno, 2002)

Existe documentación en la cual se habla de la utilización del E. *Spergularia purpurea* en la medicina tradicional marroquí; se prepara en extracto acuoso a partir de toda la planta y se utiliza en el tratamiento de la enfermedad renal, hipotensión, y la diabetes (Jouad, 2001a; Eddouks, 2002), y también se utiliza tradicionalmente como antiséptico, diurético, el apoyo del sistema nervioso y sedante.

Farmacología in vitro e in vivo

El extracto de E. *Spergularia purpurea* de Naturex S.L se ha probado in vitro en diversos ensayos, lo que ha permitido demostrar su actividad (22% del extracto y 16% de fenofibrato, la droga más fuerte de referencia). PPAR- α y PPAR- γ son receptores nucleares relacionados con el control de la lipemia, colesterolemia y glucemia. Se ha demostrado que el E. *Spergularia purpurea* puede promover la secreción de glucagón similar al péptido-1 (GLP-1) en las células STC-1 (células neuronales murinas enteroendocrinas) de una manera dependiente de la dosis. Las células que se incubaron con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de E. *Spergularia* mostraron un incremento del 40% en la producción de GLP-1, comparadas con las células que no fueron expuestas a la E. *Spergularia*.

Los estudios in vivo han demostrado que el E. *Spergularia*, administrado a 10 mg/kg, reduce significativamente la glucosa en sangre en ayunas ($p < 0,01$) y reduce significativamente el peso corporal ($p < 0,01$), el 4% en ratas normales y el 16% en ratas a las cuales se les había inducido la diabetes después de 15 días de tratamiento (Jouad, 2000). Además, se ha encontrado una actividad reductora de colesterol del E. *Spergularia purpurea* en ratas normales y en ratas con diabetes reciente (Jouad, 2003).

El glucagón como el péptido-1 (GLP-1) es una hormona gastrointestinal, secretada principalmente después de las comidas, lo que aumenta la glucosa inducida por la secreción de insulina e induce la saciedad (Rotella, 2005). GLP-1 también estimula la utilización de glucosa por aumento de sensibilidad a la insulina e inhibe la liberación de glucagón, inhibiendo con ello la vía de glucogénesis (Holst, 2008). Esta vía podría ayudar a explicar las disminuciones significativas en los niveles de glucosa en sangre observados previamente (Jouad, 2000). La capacidad del *E. Spergularia* para secretar GLP-1 podría explicar, en parte, el efecto reductor de la glucemia observado en ratas normales y ratas a las que se le ha inducido la diabetes por la administración oral (Jouad, 2000), reducción de colesterol (Jouad, 2003), y la reducción del peso corporal en ratas (Jouad, 2000).

Además, en otro estudio se administró el *E. Spergularia purpurea* y placebo a ratas normales, observando que el volumen de orina fue significativamente mayor en 4 semanas de tratamiento, demostrando el efecto diurético del *E. Spergularia* (Jouad, 2001b). Asimismo, los efectos antihipertensivos y diuréticos de los flavonoides extraídos del *E. Spergularia purpurea* Pers. (SP) fueron estudiados ambos en ratas normotensas (NTR) y en ratas espontáneamente hipertensas (SHR). La administración oral diaria de la mezcla de flavonoides (5 mg/kg durante una semana) mostró una disminución significativa de la presión arterial con el coeficiente de variación (Δ) de 20mmHg en las ratas SHR y de 11mmHg en las ratas NTR. La presión arterial sistólica y diastólica se redujo significativamente y respectivamente con un 17 y 24% en las ratas SHR y un 11 y 16% en las ratas NTR (Jouad, 2001c). También se observó un efecto diurético adicional.

Por lo tanto, el *E. Spergularia* es un buen candidato para controlar los efectos negativos del síndrome metabólico, tales como la hiperglucemia, hipertensión y niveles altos de colesterol.

❖ EXTRACTO DE GRANADA (E. GRANADA)

El Extracto de Granada se obtiene de la corteza de *Punica granatum*. Son ricos en polifenoles, especialmente taninos, taninos elágicos, antocianinas, catequinas y ácidos gálico y elágico. El E. Granada tiene un largo historial de consumo humano como tal, como jugo o añadido como componentes de complementos alimenticios o dietéticos.



El ácido púnico (PUA), también conocido como ácido trichosanico, es un trieno conjugado de ácido graso que se encuentra naturalmente en altas concentraciones en la semilla de *Punica granatum* (Sassano, 2009) y *Trichosanthes kirilowii* (Joh, 1995). PUA constituye 64-83% de los el aceite de semilla de granada (Kaufman, 2007). Además de PUA, el E. Granada también contiene en menor cantidad isómeros de ácido linoleico incluyendo el ácido eleosteárico (ESA) y ácido catalpico (CAT) (Sassano, 2009). Los fitosteroles (beta-sitosterol, campesterol y estigmasterol) también se encuentran en una alta concentración en el E. Granada (4089-6205 mg/kg de E. Granada) (Kaufman, 2007), todos estos compuestos puede contribuir al espectro general de los beneficios de salud observados.

Descripción botánica

Se trata un atractivo arbusto o árbol pequeño, de 20 o 30 pies (6 o 10 metros) de alto, el árbol de Granada es muy ramificado, más o menos espinosos y con una vida muy larga, algunos especímenes en Versalles se sabe que han sobrevivido por dos siglos.

Las hojas son perennes o caducas, opuestas o en verticilos de 5 o 6, de tallo corto, oblongo-lanceoladas, de unos 10 cm de largo. En la punta de las ramas se encuentran flores vistosas, solas o en racimos de hasta 5 flores. Las flores son de unos 3 cm de ancho y se caracteriza por el espesor, cáliz tubular, de 5-8 sépalos carnosos y puntiagudas formando un jarrón del que emergen los 3 a 7 plisados, pétalos de color rojo, blanco o abigarrado que encierra el numerosos estambres. La fruta tiene una piel dura en forma de cáscara, con el fondo de color más o menos amarillo y rojo profundo. El interior está separado por paredes membranosas y el tejido blanco esponjoso en compartimentos llenos de bolsas transparentes llenas de sabroso, carnosos y pulpa jugosa. En cada saco, hay una semilla de color blanco o rojo, angular, blando o duro. Las semillas representan aproximadamente 52% del peso de la fruta entera.

Punica granatum y la medicina tradicional

Antes de que sus propiedades medicinales fueran descritas, el E. Granada era considerado sagrado por muchas de las principales religiones del mundo. El E. Granada representa la vida, la regeneración y el matrimonio en la mitología griega, la invencibilidad de la mitología persa, y la esencia de la influencia favorable en el arte budista. El E. Granada simboliza la fertilidad, la abundancia y la prosperidad en Japón y el arte chino, así como entre los beduinos de Oriente Medio, la resurrección y la vida eterna en el arte cristiano. El E. Granada

Antecedentes

pertenece a los jardines celestiales del paraíso descrito en el Corán y sus frutos decoran los pilares del templo del rey Salomón y los trajes e insignias de los reyes judíos y sacerdotes. En la medicina tradicional, el pericarpio del E. Granada se utiliza para el tratamiento de bronquitis, fiebre, enfermedades gastrointestinales, menorragia, infecciones del tracto respiratorio, erupciones cutáneas, infecciones vaginales y lombrices. Su uso, tal como se describe en las farmacopeas, cubre el tratamiento oral de la diarrea crónica, la disentería, la gingivitis y parásitos intestinales sobre plantas medicinales seleccionadas.

Farmacología in vitro e in vivo

In vivo, los E. Granada han demostrado actividad antioxidante, el óxido nítrico protege de la destrucción oxidativa y reducción de estrés oxidativo de los macrófagos (Gil, 2000; Cerda 2003b; Ignarro, 2006; Li, 2006; Rozenberg, 2006; Aviram, 2008). Otros estudios demostraron que el E. Granada puede retardar la proliferación de células de cáncer de próstata (Malik, 2005; Pantuck, 2006; Malik, 2006) a través de la inhibición de CYP1B1 (Kasimsetty, 2009) así como células de cáncer de colon (Kasimsetty, 2010). Se ha sugerido que los efectos antioxidantes / antiaterogénicos ejercidos por el jugo de Granada podría ser debido a la presencia de azúcares complejos únicos y / o azúcares fenólicos (Rozenberg, 2006). Las punicalaginas fueron sugeridas como los activos de los elagitanos anoméricos responsables de más del 50% del potencial antioxidante del jugo (Cerda, 2003a).

Estudios recientes han mostrado que el E. Granada produce una disminución en la ganancia de peso y resistencia a la insulina en ratones (Vroegrijk, 2011). De acuerdo con estos resultados, otros estudios han mostrado mejorar la tolerancia a la glucosa y supresión de la obesidad relacionada con la inflamación (Hontecillas, 2009). En este estudio se demostró que algunos de los efectos beneficiosos del

E. Granada están mediados por la activación de PPAR γ (Hontecillas, 2009). Otros estudios han encontrado que el E. Granada inhibe el TNF- α inducido por hiperactivación de neutrófilos y protege de la inflamación colónica experimental en ratas (Boussetta, 2009). El E. Granada mejora la inflamación inducida por cáncer colorrectal en ratas (Kohno, 2004a) y la ESA (ácido eleosteárico) rica en aceite de semilla de calabaza amarga aminora carcinogénesis colónica y regula positivamente la expresión de PPAR γ en ratas (Kohno, 2004b). El ácido catalpico disminuye la grasa abdominal, mejora la tolerancia a la glucosa y tejido adiposo PPAR γ en dos modelos de ratón de la obesidad (Hontecillas, 2008). Los ácidos grasos conjugados tales como el ácido linoleico y ácido linolénico han atraído recientemente importante atención debido a sus beneficios para la salud en una variedad de modelos de enfermedades inflamatorias y metabólicas crónicas. El ácido linoleico ejerce sus acciones sensibilizantes a la insulina y anti-inflamatorias a través un mecanismo dependiente de la activación de la proliferación de PPAR γ (Moya-Camarena, 1999; Bassaganya-Riera, 2004). El ácido linoleico está presente en el E. Granada (Sassano, 2009).

Otros estudios en animales se han centrado en el efecto de la granada en la hipertensión y la función arterial. En ratas Wistar diabéticas, una administración crónica del E. Granada (100 mg/kg y 300 mg/kg; durante 4 semanas) redujo la presión sanguínea arterial media y revirtió los cambios bioquímicos inducidos por la diabetes y angiotensina II, probablemente por la inhibición de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) (Mohan, 2010). En ratas Zucker obesas, la suplementación con E. Granada disminuyó significativamente la expresión de marcadores de inflamación vascular, trombospondina y citoquinas TGF β 1 ($p < 0,05$) y aumentó la expresión de la óxido nítrico sintasa endotelial. El nitrato del plasma y los niveles de nitrito se incrementaron de manera significativa por los

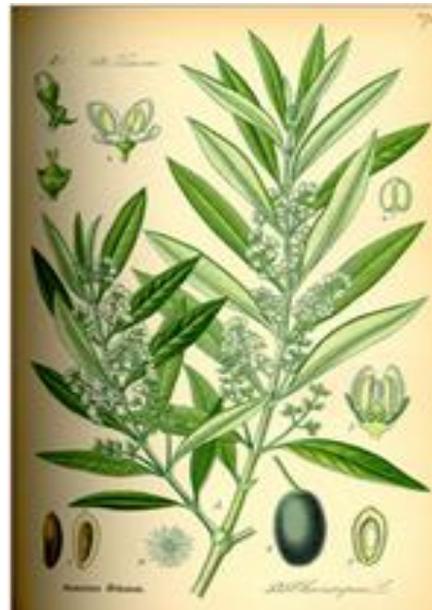
Antecedentes

extractos de fruta del E. Granada. Este estudio concluyó diciendo que E. Granada pueden ejercer efectos beneficiosos sobre la presión arterial en ratas Zucker obesas (de Nigris, 2007). Estudios realizados en ratones ateroscleróticos que fueron alimentados con E. Granada o jugo a unos niveles de 200 µg de equivalente de ácido gálico al día durante 3 meses mostraron una disminución de tamaño de la lesión aterosclerótica sin efectos significativos en los niveles séricos de colesterol, triglicéridos y glucosa. Además, el zumo de E. Granada disminuye el colesterol sérico y la peroxidación lipídica y aumenta los niveles séricos de paraoxonasa en ratones. La captación de LDL se redujo en 27% en los macrófagos peritoneales de ratones en comparación con ratones tratados con placebo (Aviram, 2008).

Extractos de granada también han demostrado efectos beneficiosos sobre las funciones cardiovasculares (Larrosa, 2010). Varios estudios en humanos se llevaron a cabo de forma segura utilizando zumo de E. Granada, lo que demuestra sus efectos beneficiosos sobre el tiempo de coagulación (Polagruto, 2003), los niveles de LDL (Esmailzadeh, 2004), isquemia inducida por esfuerzo (Sumner, 2005), la oxidación lipídica (Guo, 2008; Rock, 2008), la fuerza muscular esquelético (Trombold, 2010) y la hipertensión (Aviram, 2001; Aviram, 2004). Los E. Granada han demostrado potencial quimiopreención en varios estudios in vivo e in vitro sobre el cáncer de colon (Kasimsetty, 2010), el cáncer de mama (Khan, 2009), así como el cáncer de próstata (Malik, 2005; Malik, 2006; Pantuck, 2006; Kasimsetty, 2009).

❖ CITROLIVE

Es un extracto combinado de frutos cítricos y hojas de olivo, *Olea Europaea*, que contienen isoflavonas y flavononas, que combina las propiedades antioxidantes, hipolipidémicas y antiaterogénicas de los principios activos contenidos en estas plantas.



Los principales principios activos de Citrolive son hidroxitirosol y oleuropeína. Numerosos estudios realizados tanto en animales como en voluntarios humanos han demostrado la capacidad de Citrolive para reducir los niveles plasmáticos de triglicéridos y LDL-Colesterol oxidado, mejorando el perfil lipídico y disminuyendo el índice aterogénico. Además nuestros estudios de toxicidad aguda han demostrado la seguridad del producto incluso cuando se ingiere en elevadas dosis (Nutrafur S. L).

El principal componente activo del extracto de hoja de olivo es la oleuropeína, un producto natural del grupo secoiridoides. Es el responsable del sabor amargo que se encuentra en la pulpa de las aceitunas verdes y en las hojas de los olivos. En la hidrólisis, la oleuropeína puede producir otras sustancias bioactivas como el ácido elenoico y 3,4-hidroxifenil (hidroxitirosol). Los estudios han demostrado que la oleuropeína posee una gran variedad de propiedades farmacológicas en las que se pueden incluir antioxidante, antitrombótico, antiarrítmico, espasmolítico, inmunoestimulante,

Antecedentes

cardioprotector, hipotensor y efectos anti-inflamatorios (Hamden, 2009; Jemai, 2009; Omar, 2010).

Las hojas de Olivo (*Olea Europaea* L.) han sido ampliamente utilizadas en los remedios tradicionales en los países europeos y mediterráneos como Grecia, España, Italia, Francia, Turquía, Israel, Marruecos y Túnez. Se han utilizado en la dieta humana como un extracto, un té de hierbas, y un polvo, y que contienen muchos compuestos potencialmente bioactivos que pueden tener propiedades antioxidantes, antihipertensivos, antiaterogénicas, propiedades anti-inflamatorias, hipoglucemiantes y hipocolesterolémico. Uno de estos compuestos potencialmente bioactivos es la oleuropeína secoiridoides, que puede constituir hasta un 6-9% de la materia seca en las hojas. Otros componentes bioactivos que se encuentran en las hojas del olivo son secoiridoides relacionados, flavonoides y triterpenos.

III. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este trabajo ha consistido en analizar el efecto de cuatro clases de compuestos fenólicos: E. Fresno, E. Granada, E. Spergularia y Citrolive en un modelo experimental de ratón obeso y diabético LepR^{db/db}.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para la obtención de dicho propósito nos propusimos los siguientes objetivos específicos a través de:

- 1) Estudio de las variables morfológicas, mediante:
 - Valoración de la evolución del peso corporal.
 - Estimación del índice de conversión alimenticio.
 - Peso relativo de los órganos al sacrificio.

- 2) Determinación del perfil lipídico:
 - Parámetros plasmáticos bioquímicos: colesterol total, C-HDL, ácidos grasos libres y triglicéridos.
 - Estudio histológico del hígado.

- 3) Determinación plasmática de marcadores relacionados con la obesidad:
 - Factor necrosis tumoral alfa (TNF- α).
 - Adiponectina.

Objetivos

- 4) Parámetros cardiovasculares:
 - Presión arterial sistólica, diastólica y media.
 - Determinación plasmática de homocisteína.

- 5) Parámetros relacionados con la resistencia a la insulina:
 - Glucosa.
 - Hemoglobina glicosilada.
 - Insulina.
 - Parámetro HOMA-IR.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

A. MATERIAL

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Para el desarrollo del estudio se utilizaron 60 ratones BKS mouse strain hembras homozygous *db/db* (*Lepr^{db}* / *Lepr^{db}*), procedentes de Jackson Laboratorios, de cinco semanas de vida y un peso medio al comienzo de los experimentos de 30g. Estos animales poseen un gen alterado que se localiza en el cromosoma 4 y codifica una mutación puntual (G a T) en el gen del receptor de la leptina, dando lugar a un déficit de señalización de dicha hormona adipocitaria. La mutación *db/db* muestra muchas de las características de la DM2 humana. El gen de la diabetes (*db*) se trasmite de modo autosómico recesivo. Los ratones *db* son insensibles al suministro de leptina exógena. Estos animales primero sufren obesidad precoz con hiperinsulinemia, posteriormente desarrollan diabetes y finalmente fallo pancreático y muerte por diabetes descompensada. En estos especímenes la hipersecreción de insulina es un hecho común, por lo menos en el comienzo.

Los animales fueron alojados en grupos de 5 ratones en cajas de 480 x 270 x 200 cm en rack ventilado y utilizados siguiendo las normas de la UE para la protección de animales utilizados en experimentación (86/609/CEE). Las condiciones ambientales se mantuvieron de manera constante a lo largo de todo el estudio, consistiendo en ciclos de 12 horas de luz y 12 de oscuridad, temperatura estable entre 22-24°C, humedad constante entre 55%-10%, en el Servicio de Animales de Laboratorio del Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de Murcia. Cada ratón fue identificado mediante numeración en las orejas.

Material y métodos

Todos los experimentos fueron aprobados por el comité ético local y en todos los procedimientos se respetó la normativa sobre la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (R.D. 1201/2005).



2. APARATOS

- Glucómetro: “Sistema de monitorización de glucemia”, ACCU-CHEK, Compact Plus, Laboratorio: Roche, Mannheim, Alemania.
- Tiras reactivas: Para la determinación de la glucosa, Sólo para ACCU-CHEK, Compact Plus, Laboratorio: Roche, Mannheim, Alemania.
- Balanza de peso Scout Pro, de 0-400g.
- Tubos para la extracción de sangre capilar: Microvette ® CB 300 SARSTEDT
- Rack ventilador: “Touch Slim Plus”, Laboratorio: Tecniplast, Buguggiate, Italia.
- Medidor de Presión Arterial Indirecta “Panlab Harvard” Barcelona, constituido por:
 - Equipo de medición LE5001.
 - Manguito& Transductor LE5160M para ratón y rata hasta 150g.
 - Cepo para ratones LE5016.
 - Calentador/conmutador automático para 6 ratones o ratones. LE56506.

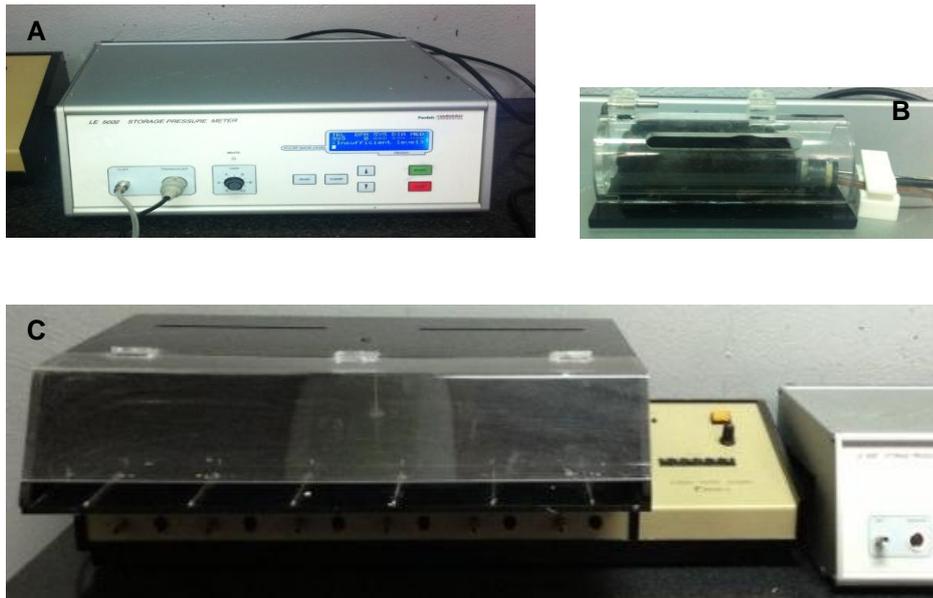


Imagen 2: Medidor de presión indirecta. Equipo de medición LE5001 (A), cepo y manguito transductor para ratón (B) y Calentador/Conmutador para 6 ratones/ratas (C).

- Kit de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) (Zelesse Diagnostic, ETYCA RESEARCH, Barcelona) para la determinación de Ácidos grasos libres, adiponectina, TNF- α e insulina.
- Espectrofotómetro OMEGA BMG LabTech Alemania.
- Centrifugadora Spectrafuge Mini Labnet International, Inc, Barcelona
- Microscopio óptico (Servicio Universitario de Microscopía, SAI, Universidad de Murcia): Leica DM 6000B, Laboratorio: Leica Microsystems AG., Solms, Alemania.
- Cámara del microscopio (Servicio Universitario de Microscopía, SAI, Universidad de Murcia): Leica DFC280, Laboratorio: Leica Microsystems AG., Solms, Alemania.
- Programa de medida (Servicio Universitario de Microscopía, SAI, Universidad de Murcia): Leica QWINV3, (V 2.5.0 R1). Laboratorio: Leica Microsystems AG., Solms, Alemania.

3. AGENTES DE TRATAMIENTO

- Extracto de Fresno (E. Fresno): Corteza de la semilla del fresno, Laboratorio Naturex S.L, Avignon, Francia.
- Extracto de Spergularia (E.Spergularia): Spergularia Purpurea, Laboratorio Naturex S. L, Avignon, Francia.
- Extracto de Granada: Punica granatum, Laboratorio Naturex S. L, Avignon, Francia.
- Citrolive®: Extracto combinado de frutos cítricos y hojas de olivo, Laboratorio Nutrafur S. L, Alcantarilla, Murcia, España

EXTRACTO DE FRESNO (E. FRESNO)

El E. Fresno es un extracto acuoso natural producido por las semillas de *Fraxinus excelsior* L. (o semillas de fresno europeo) de Marruecos (planta: extractos de relación entre 5:1 y 7:1). Es un polvo de color entre beis y marrón claro y con un sabor característico. El E. Fresno se compone de secoiridoides, principalmente nuzhenida (>7%) y GI3 (>4%) y son los ingredientes activos. La estructura química de los dos principales componentes se presentan a continuación:

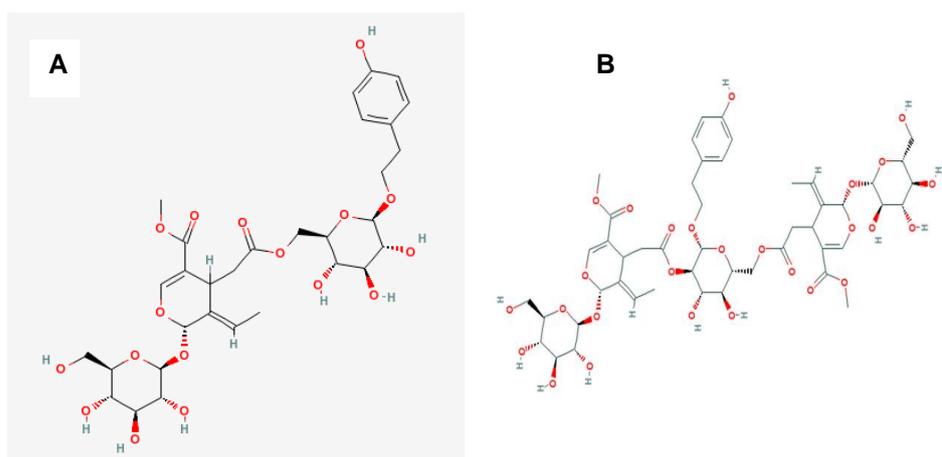


Figura. 15 Estructura química: **Nuzhenida** (A) y estructura química: **GI3** (B).

EXTRACTO DE SPERGULARIA (E. SPERGULARIA)

Spergularia purpurea es una planta lisa, sin hojas o pubescente, perteneciente a la familia *Caryophyllaceae*. Es originaria de Asia, Europa y Marruecos. Se encuentra en bordes de caminos, céspedes, en todo caso en lugares despejados, arenosos, soleados, sin vegetación alta en su entorno. Florece a final de primavera y en verano.

EXTRACTO DE GRANADA (E. GRANADA)

El E. Granada se obtiene a partir de la corteza de *Púnica granatum* L. (planta: relación extracto entre 5:1 y 7:1). La extracción del disolvente contiene 70% de etanol / 30% de agua. Los polifenoles del E. Granada, en particular elagitaninos, taninos hidrolizables que liberan ácido elágico en el tracto gastrointestinal pueden estar implicados en los beneficios cardiovasculares de los E. Granada (Espin, 2007). Punicalaginas son elagitaninos específicos del E. Granada. El zumo de E. Granada puede contener 2020-2660 mg/L de elagitaninos y ácido elágico, y 1500-1900 mg/L de punicalaginas (Gil, 2000; Larrosa, 2010). La punicalagina es única para la fruta del E. Granada y puede ser utilizado como un marcador de control de calidad para el jugo o extracto (Zhang, 2009).

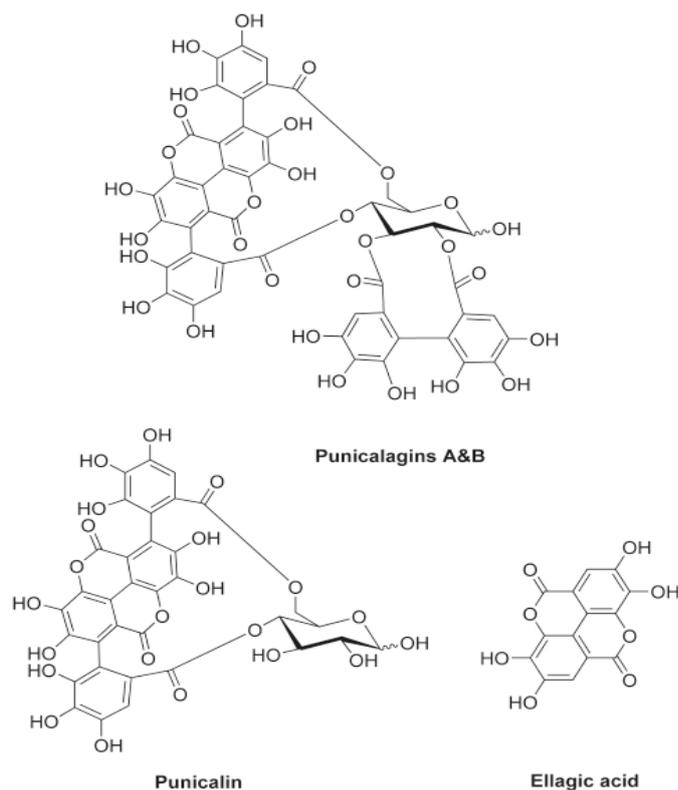


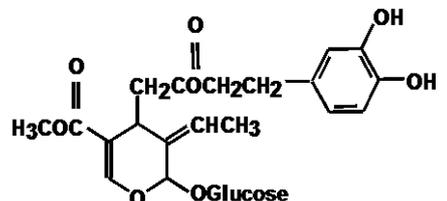
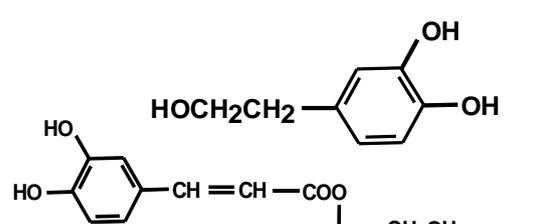
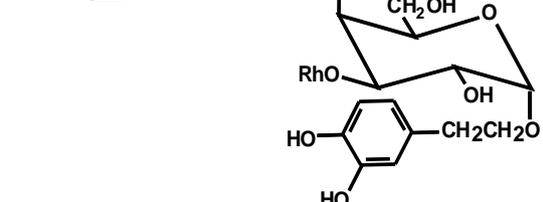
Figura.16 Estructuras químicas de los compuestos del E. Granada.

CITROLIVE®

Citrolive® contiene cuatro grupos de compuestos principalmente: oleuropeos (oleuropeína y verbascósido); flavanonas (naringina, neohesperidina, neoeriocitrin y hesperidina), flavonas (luteolina-7-glucósido, apigenina-7-glucósido, diosmetina-7-glucósido, luteolina y diosmetina) y fenoles sustituidos (tirosol, hidroxitirosol, ácido vinílico y ácido cafeico). Para la cuantificación de compuestos fenólicos en extracto Citrolive, el compuesto se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) en la proporción de 5 mg / ml, esta solución se filtró a través de una membrana de nylon 0,45 μm . La abundancia (contenido absoluto) de los compuestos principales en Citrolive® se determinó por HPLC y se muestran en la tabla 7.

| Compuestos fenólicos | % Absoluto |
|-------------------------|------------|
| Hydroxytyrosol | 0.84 |
| Tyrosol | 0.24 |
| Caffeic acid | 0.21 |
| Vanillic acid | 0.35 |
| Neohesperidin | 0.41 |
| Luteolin 7-O-glucoside | 0.52 |
| Verbascoside | 0.62 |
| Naringin | 3.89 |
| Hesperidin | 0.61 |
| Neohesperidin | 1.93 |
| Apigenin 7-O-glucoside | 0.82 |
| Diosmetin 7-O-glucoside | 0.31 |
| Oleuropein | 15.74 |
| Luteolin | 0.15 |
| Diosmetin | 0.04 |

Tabla 7: Abundancia de los principales compuestos fenólicos presentes en el extracto Citrolive®.

| Compuesto fenólico / contenido promedio (%) | Estructura química |
|---|--|
| Oleuropein/12-16 |  |
| Hydroxytyrosol/0-1 |  |
| Verbascoside/0-1 |  |

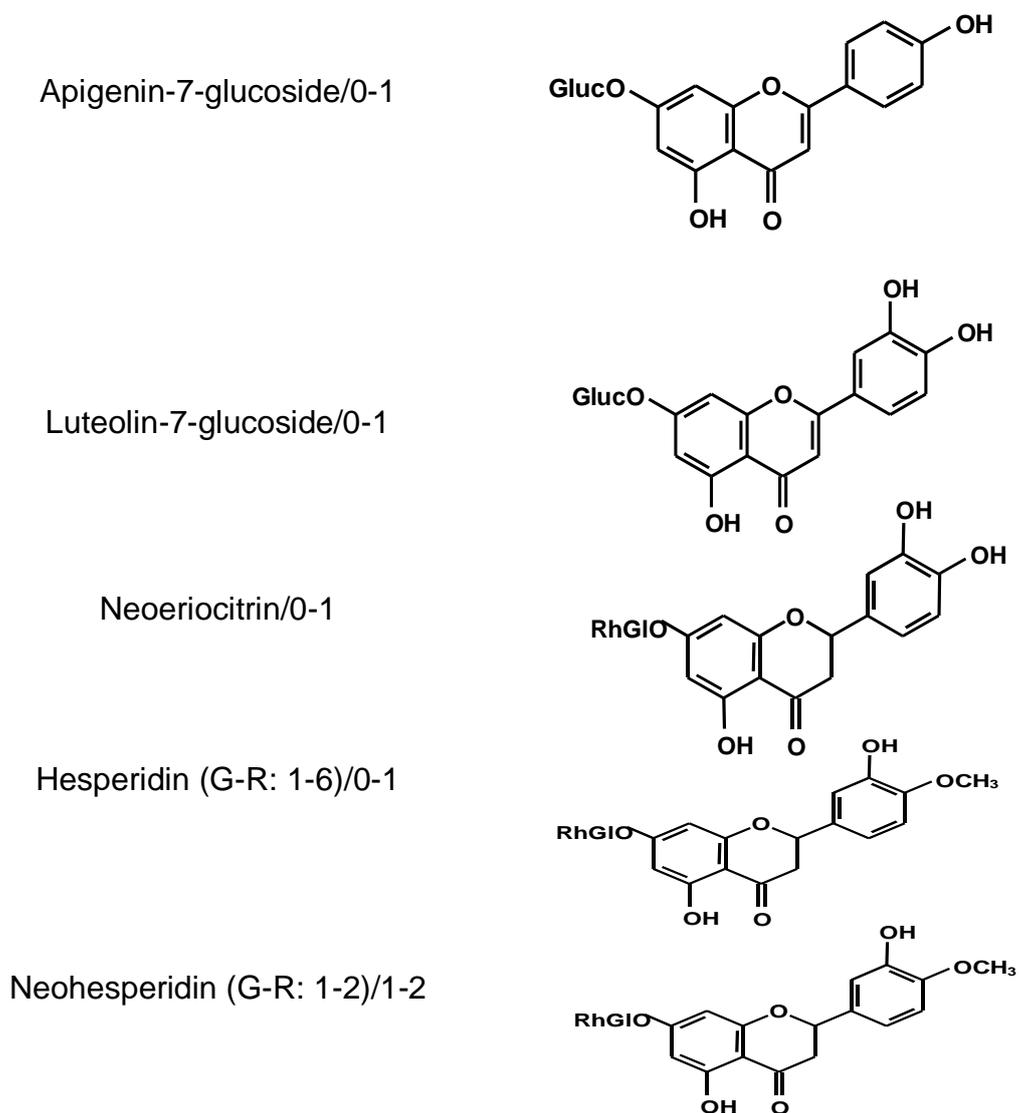


Figura 18. Estructuras químicas de los más abundantes compuestos polifenólicos de Citrolive®.

B. MÉTODOS

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Los 60 ratones hembras utilizados se repartieron en seis grupos: cinco grupos con tratamiento (II, III, IV, V y VI) y un grupo control (I). Todos los grupos recibieron el agua y la comida ad libitum.

- **Grupo I:** Control: agua y comida ad libitum (n= 10). Los animales del grupo I no recibieron ningún tipo de tratamiento.
- **Grupo II:** Grupo E. Fresno: Se administró E. Fresno en la comida ad libitum (n=10). La dosis fue 0,715 g de producto/ kg de pienso preparado para ratón.
- **Grupo III:** Grupo E. Spergularia: Se administró E. Spergularia en la comida ad libitum (n=10). La dosis fue 0,5 g de producto/ kg de pienso preparado para ratón.
- **Grupo IV:** Grupo E. Granada: Se administró E. Granada en la comida ad libitum (n=10). La dosis fue 2,6 g producto/kg de pienso preparado para ratón.
- **Grupo V:** Grupo PO-Citrolive: Se administró Citrolive® en el agua de bebida ad libitum (n= 10), se administró una concentración de 1mg/ml y se calculó una media de bebida/día/ratón de 5ml, por lo que se estimó una dosis diaria de Citrolive oral 5mg/día/ ratón.
- **Grupo VI:** Grupo SC-Citrolive: El principio activo de Citrolive® se diluyó con suero fisiológico 0,9% a una concentración de 1mg/ml y se administró intraperitoneal alterno con subcutáneo (n=10) a una dosis diaria de 1mg/día/ratón.

Material y métodos

La duración del experimento fue de 7 meses, tras los cuales los ratones fueron sacrificados por la administración de CO₂ inhalado.

En el momento del sacrificio se le extrajo la máxima sangre posible que fue centrifugada para separación de suero y fue congelado en diferentes alícuotas a -20°C hasta su utilización. A continuación, se procedió, a la autopsia de los animales con la extracción de corazón, pulmón, ojos, hígado, riñón y páncreas. Los ojos, el corazón, el páncreas y un fragmento de hígado se fijaron en formol neutro tamponado al 10% hasta su procesamiento para estudio histopatológico. Finalmente el resto de los órganos se congelaron en nitrógeno líquido tras la extracción y se mantuvieron a -80°C hasta el momento de su utilización.



Imagen 3: Ratón en el momento del sacrificio inhalando CO₂ a dosis letales.

1. DETERMINACIÓN DE LAS VARIABLES MORFOLÓGICAS

▪ DETERMINACIÓN DEL PESO

Una vez a la semana se determinó el peso de cada ratón mediante balanza equilibrada, se realizó la media de peso por grupo para valorar la evolución del peso en cada mes de tratamiento.

▪ DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE CONVERSIÓN ALIMENTICIO

Para determinar el índice de conversión alimenticio primero fue necesario medir el alimento ingerido.

La ingesta de alimento se determinó por animales separados en diferentes jaulas (5 ratones/jaula). La cantidad de comida ingerida por animal se obtuvo de la diferencia entre la cantidad inicialmente adicionada y la cantidad remanente transcurrida una semana dividido entre la cantidad de ratones por jaula. El resultado se expresó como la ingesta de alimento en gramos por día y animal.

Se calculó el índice de conversión alimenticio en función del peso y de la ingesta. Este parámetro expresa la mayor o menor eficiencia del alimento en su transformación en carne. Cuanto más bajo resulte mejor es el comportamiento del grupo, ya que significará que comiendo más engordaran proporcionalmente menos. Se puede hablar del índice de conversión acumulado (el más utilizado) o el que corresponda a un período determinado.

$$\text{Índice de conversión alimenticio} = \frac{\text{incremento de peso mensual (g)}}{\text{ingesta diaria (g) x 30 días}}$$

Dicho parámetro se calculó por grupo en función del incremento de peso del grupo (gramos) al mes y de la ingesta media diaria.

▪ DETERMINACIÓN DEL PESO RELATIVO DE LOS ÓRGANOS

En el momento del sacrificio se pesó al animal y los diferentes órganos a estudio: corazón, hígado y páncreas para valorar cambios morfológicos entre los distintos grupos. Se determinó el peso relativo de los órganos, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Peso Relativo} = \frac{\text{peso del órgano a estudio (g)}}{\text{peso corporal del animal (g)}} \times 100$$

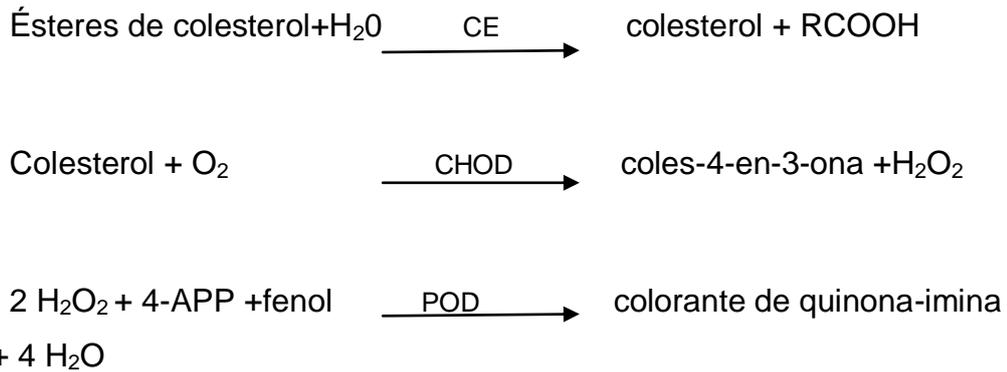
2. DETERMINACIÓN DEL PÉRFIL LIPÍDICO

▪ PARÁMETROS BIOQUÍMICOS

Se determinaron las concentraciones plasmáticas de triglicéridos, colesterol total, colesterol-HDL y ácidos grasos libres a los 3, 5 y 7 meses. La máxima sangre extraída en cada extracción era de 400µl, para no superar el 10% del volumen de sangre total del animal (volumen total de sangre aproximado de 2.5ml). La obtención de suero se obtenía pinchando al ratón en la vena coccígea del pómulo del ratón y recogiendo la sangre mediante capilar. Inmediatamente después la sangre se centrifugaba a 2500 rpm a 10°C durante 15 minutos para obtener el suero, que se separaba en diferentes alícuotas y se congelaba a -20°C hasta el momento de su utilización. Todas estas determinaciones, excepto los AGL, que se realizaron por técnicas de ELISA, fueron llevadas a cabo por el Laboratorio de Análisis Clínicos de Veterinaria (Facultad de Veterinaria de Murcia) del Dr. José Joaquín Cerón.

COLESTEROL TOTAL

El colesterol total se determinó mediante método enzimático colorimétrico. Los ésteres de colesterol se desdoblan por la acción de la colesterol esterasa (CE) a colesterol libre y ácidos grasos. La colesterol oxidasa (CHOD) cataliza entonces la oxidación de colesterol a colest-4-en-3-ona y peróxido de hidrógeno. En presencia de peroxidasa (POD), el peróxido de hidrógeno formado produce la unión oxidativa del fenol y la 4-aminofenazona para formar un colorante rojo de quinona-imina.



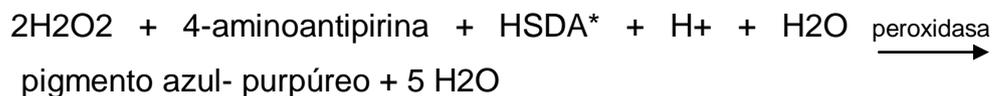
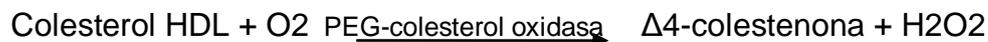
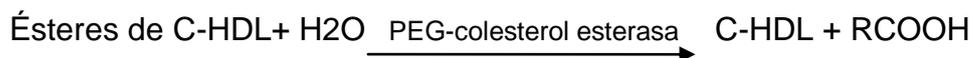
La intensidad cromática del colorante formado es directamente proporcional a la concentración de colesterol. El colorante de quinona-imina roja puede cuantificarse espectrofotométricamente a 540-600nm como incremento de absorbancia.

COLESTEROL HDL

Se determinó la concentración de colesterol-HDL mediante test colorimétrico enzimático homogéneo. En presencia de iones de magnesio, el sulfato de dextrano forma complejos hidrosolubles, selectivamente con LDL, VLDL y quilomicrones resistentes contra las enzimas modificadas con polientilenglicol (PEG).

La concentración del colesterol HDL se determina enzimáticamente mediante la colesterol esterasa y la colesterol oxidasa acopladas con PEG a los grupos amínicos (aprox. 40%). La colesterol esterasa provoca el desdoblamiento de los ésteres de colesterol a colesterol libre y ácidos grasos. Bajo la acción catalítica de la peroxidasa, el peróxido de hidrógeno formado reacciona con 4-aminoantipirina y HSDA para formar un colorante purpúreo azul. La intensidad del colorante es directamente proporcional a la concentración de colesterol que se mide fotométricamente.

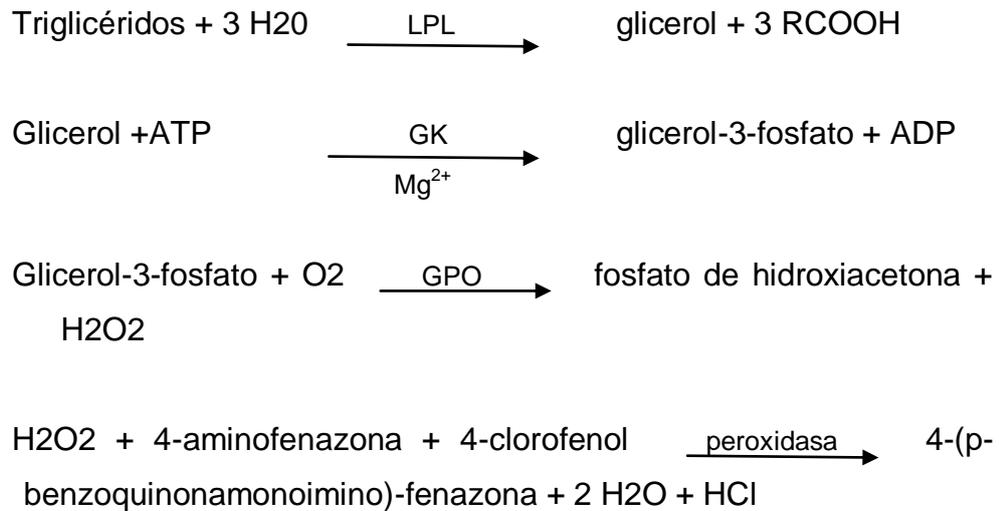
Material y métodos



*HSDA = N-(2-hidroxi-3-sulfopropilo)-3,5-dimetoxianilina sódica

TRIGLICÉRIDOS.

Los triglicéridos se determinaron mediante método enzimático colorimétrico. Este procedimiento se basa en una serie de reacciones enzimáticas combinadas. Los triglicéridos de la muestra se hidrolizan combinando lipasas microbianas (LPL) para obtener glicerol y ácidos grasos. El glicerol se fosforilata con trifosfato de adenosina (ATP) en presencia de glicerolcincasa (GK) para producir glicerol-3-fosfato. Este glicerol-3-fosfato se oxida mediante oxígeno molecular en presencia de oxidasa de glicerolfosfato (GPO) para producir peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y fosfato de dihidroxiacetona. El H_2O_2 generado reacciona con 4-aminofenazona, N, N-bis(4-sulfobutil)-3,5-dimetilanilina y sal disódica (MADB) en presencia de peroxidasa (POD) para producir un cromóforo, que se somete a una lectura a 660/800nm. El aumento de la absorbancia hasta 660-880nm es proporcional al triglicérido contenido en la muestra.



ÁCIDOS GRASOS LIBRES

La determinación se llevó a cabo mediante Kit de ELISA para ratones Mouse Free Fatty Acids (FFA) ELISA Kit (Zelesse Diagnostic, ETYCA RESEARCH Barcelona) con un rango del análisis de 0,1 mmol/L-4,5mmol/L. La muestra era diluida a 1:5, por lo que solo se necesitaba un volumen de 10 µl por muestra. El resultado final se multiplicaba x 5 (factor de dilución).

Las etapas para la realización en la técnica de ELISA fueron las siguientes:

1. Tapizado del pocillo con el anticuerpo.
2. Adición de la muestra problema con la mezcla de antígenos.
3. Unión del antígeno al anticuerpo tapizado en el pocillo.
4. Lavado del pocillo para eliminar el exceso de antígeno o anticuerpo no unido
5. Adición del anticuerpo secundario marcado con la enzima.
6. Unión del anticuerpo secundario al antígeno o anticuerpo.
7. Lavado del pocillo para eliminar el exceso de enzima no unida.
8. Adición del substrato.

Material y métodos

9. Unión del sustrato a la enzima.

10. Desarrollo del color.

11. Lectura colorimétrica del producto final coloreado mediante lector de placas, obteniendo los valores de absorbancia o densidad óptica en espectrofotómetro a 450 nm de longitud de onda, y determinando la concentración mediante regresión lineal tras multiplicar el resultado por el factor de dilución.

▪ ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO DEL HÍGADO

Para complementar los parámetros bioquímicos en el perfil lipídico, se estudió la esteatosis hepática.

El hígado fue fijado en formol neutro tamponado al 10% al menos durante 48 horas, a continuación fueron incluidas en parafina, cortadas a 4 μm de espesor y teñidas con hematoxilina y eosina según el método habitual empleado por la Cátedra de Anatomía Patológica de la Universidad de Murcia.

A nivel microscópico se estudiaron los hepatocitos para analizar la acumulación de grasa (esteatosis) que se manifiestan como gotas lipídicas que pueden ser de gran tamaño y existir pocas (célula en anillo de sello, más característico de situaciones crónicas) o ser pequeñas y abundantes (célula espumosa, más típico de situaciones agudas).

Las imágenes se capturaron a una magnificación de 450x utilizando un microscopio Leica DM6000B acoplado a una cámara Leica DFC280 que a su vez está conectada a un PC con el programa de captura Leica Application Suite (V 2.5.0 R1). Posteriormente, las imágenes se procesaron y analizaron mediante el software de libre distribución ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

El área fue determinada por análisis de imagen con MO de campo claro y un objetivo de 20x. El área total por cada sección fue de $217.775 \mu^2$. Se tomaron en el MO 10 muestras de diferentes partes de un mismo corte y se estimó la media de ellas. Se determinaron las gotas de grasas y segmentados de esteatosis por nivel de color en las mismas condiciones para todos los grupos.

➤ DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE ESTEATOSIS

Las imágenes se transformaron de RGB a 8-bits (imagen gris) y se calibraron para obtener una equivalencia entre píxel y micrómetros. Después, duplicamos la imagen, la filtramos con un filtro Gaussiano de sigma 20 y la imagen resultante se resta a la original, obteniendo así un background uniforme para todas las imágenes. En esta imagen mejorada seleccionamos las zonas de esteatosis de forma automática mediante la aplicación de un umbral de nivel de gris que da lugar a una imagen binaria. Es decir, sólo seleccionamos los píxeles comprendidos entre los valores (149 y 255) que serán los que finalmente usará el programa para calcular el área de afectación. Se determinó el área de grasa y se dividió por el área total ($217.775 \mu^2$) y el resultado fue expresado por porcentaje de grasa. Se clasificó el grado de esteatosis de acuerdo con la clasificación propuesta por Kleiner (Kleiner, 2012):

- ✚ Grado 0 (< 5% de esteatosis)
- ✚ Grado 1 (5-33% de esteatosis)
- ✚ Grado 2 (34-66% de esteatosis)
- ✚ Grado 3 (> 67% de esteatosis)

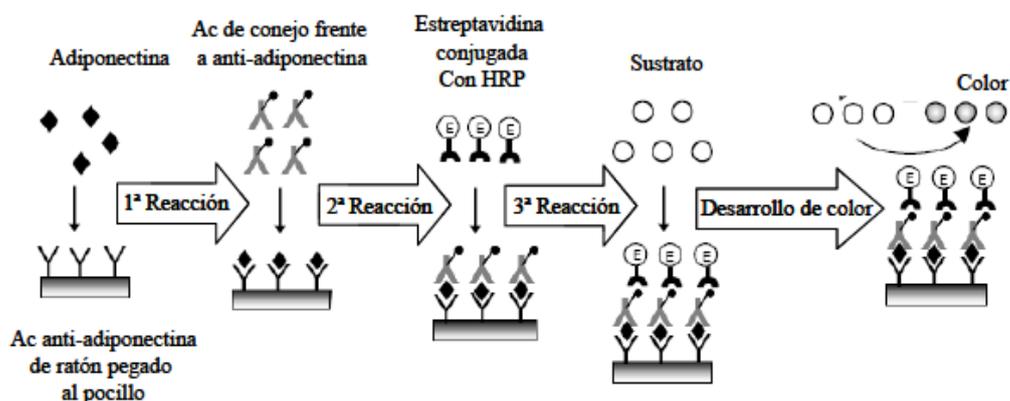
➤ DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE GOTAS DE GRASA

El protocolo fue similar al anterior, pero el nivel de gris usado fue diferente (156, 255) y la imagen binaria sufrió varias operaciones de erosión y dilatación para conseguir que las gotas se separaran entre sí. La herramienta de ImageJ analyze particles nos devolvió el número de gotas por campo con un factor de forma circular >0.8 , de forma que nos aseguramos de que siempre estábamos tomando elementos de forma circular.

3. DETERMINACIÓN DE MARCADORES RELACIONADOS CON LA OBESIDAD

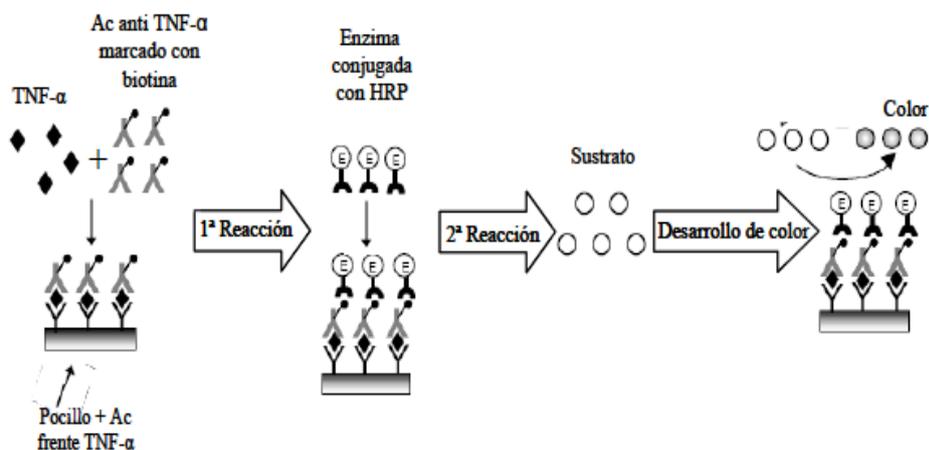
▪ DETERMINACIÓN DE ADIPONECTINA PLASMÁTICA.

Para conocer el estado inflamatorio de los animales tratados con flavonoides, como marcador del tejido adiposo se midió la concentración de adiponectina en los meses 3,5 y 7. Se determinó en el suero con un kit de ELISA para ratón: Mouse Adiponectin (ADP) ELISA Kit (Zelesse Diagnostic) con un rango del análisis de $0,93 \mu\text{g/ml}$ - $100 \mu\text{g/ml}$. La muestra fue diluida 1:5, por lo que solo se necesitó un volumen de $10 \mu\text{l}$ por muestra y el resultado final se obtenía tras multiplicar el resultado por el factor de dilución (x5). El esquema de la reacción es el siguiente:



▪ DETERMINACIÓN DEL TNF- α PLASMÁTICO

Los valores de TNF- α se determinaron en el suero del ratón en el mes 3, 5 y 7 mediante Kit de ELISA para ratones Mouse Tumor Necrosis Factor α ELISA kit (ETYCA SL. Barcelona) con un rango del análisis de 2,5 pg/ml-50pg/ml. La muestra fue diluida 1:5, y el resultado se obtenía tras multiplicar por el factor de dilución (x5). La reacción esquematizada se muestra a continuación:



4. PARÁMETROS CARDIOVASCULARES

▪ DETERMINACIÓN DE PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA, DIASTÓLICA Y MEDIA

A mitad del experimento se hizo una medida basal de la presión arterial sistólica (PAS), presión arterial diastólica (PAD) y presión arterial media (PAM) y posteriormente cada 2 semanas se determinaron los valores de presión arterial hasta final del estudio.

Material y métodos

La presión arterial se midió en la cola del ratón mediante pletismografía. Una vez obtenido los valores de la PAS y PAD el sistema calculó automáticamente la PAM mediante la siguiente fórmula:

$$PAM = PAD + 0.33 (PAS - PAD)$$

El sistema utilizado consta de un manguito de presión, acoplado a una unidad de insuflado semiautomática y a la unidad transductora del pletismógrafo, a la que se conecta un sensor neumático en la cola del ratón. La unidad transductora está conectada, a su vez, a la unidad de registro visual del pletismógrafo (LE 5001 "Panlab Harvard" Barcelona).

Antes de realizar la medida, el ratón era metido en un cepo cilíndrico transparente para ratón e introducido en un calentador que incluye un conmutador para vasodilatar hasta 6 animales a la vez con temperatura ajustable a 37 °C, durante 15-20 minutos, para favorecer la dilatación de los vasos de la cola. En cada determinación se realizaban entre 8 y 10 medidas de presión a cada ratón, calculando la media aritmética de los 5 últimos valores obtenidos con una desviación estándar menor de 5 mmHg. Las medidas de presión se llevaron a cabo por la tarde, a la misma hora para todos los grupos. A lo largo del estudio se determinaron un total de 7 determinaciones por grupo.

▪ DETERMINACIÓN DE HOMOCISTEINA

La concentración de homocisteína plasmática se calculó en el 7^o mes mediante inmunoensayo competitivo. Se determinó mediante Kit de homocisteína IMMULITE, con un rango de análisis de 2-50 $\mu\text{mol/L}$. Este procedimiento se basa en una serie de reacciones donde la homocisteína de la muestra va a ser reducida a homocisteína libre y posteriormente, será transformada a S-adenosil-homocisteína (SAH). La S-adenosil-cisteína (SAC) conjugada, añadida al comienzo de la reacción, va a competir con la SAH de la muestra en la unión a los anticuerpos Anti-SAH unido a las partículas de poliestireno. En presencia de SAH o no hay agregación o sólo hay una agregación muy débil de partículas. En ausencia de SAH ocurre una agregación de partículas de poliestireno por medio de SAC conjugada. Cuanto más alto es el contenido de SAH en la mezcla de la reacción, más pequeña va a ser la señal de luz dispersada. Dicha determinación fue llevada a cabo por el Laboratorio de Análisis Clínicos de Veterinaria (Facultad de Veterinaria de Murcia) del Dr. José Joaquín Cerón.

5. PARÁMETROS RELACIONADOS CON LA RESISTENCIA A LA INSULINA

▪ DETERMINACIÓN DE GLUCOSA SANGUINEA

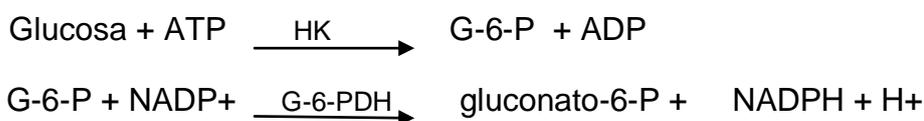
La glucosa circulante se determinó semanalmente por la tarde a la misma hora partir de una gota de sangre (5 μL) procedente de la cola de los ratones, mediante el sistema Glucometer ACCU-CHEK, Compact Plus, Laboratorio: Roche, Mannheim, Alemania.

Los niveles de glucosa hasta el cuarto mes fueron determinadas mediante glucometer. Pero a partir del quinto mes los ratones presentaban una glucosa superior a 600mg/dl y no podía ser detectada por Glucometer por lo que se realizó extracción sanguínea del pómulo y se obtuvo el suero tras la centrifugación de la sangre a 2500 rpm

Material y métodos

durante 15 minutos a 4°C al quinto, sexto y séptimo mes. Para obtener unos valores dentro de los límites de detección se hizo una dilución del suero 1:5. Dichas determinaciones fueron llevadas a cabo por el Laboratorio de Análisis Clínicos de Veterinaria (Facultad de Veterinaria de Murcia) del Dr. José Joaquín Cerón.

La técnica empleada fue mediante test por radiación ultravioleta. La glucosa se fosforila con hexocinasa (HK) en presencia de trifosfato de adenosina (ATP) e iones de magnesio para producir glucosa-6-fosfato y difosfato de adenosina (ADP). La 6-fosfato de glucosa deshidrogenasa (G6P-DH) oxida específicamente el 6 fosfato de glucosa y produce 6-fosfato de gluconato con la correspondiente reducción de NAD⁺ a NADH. El aumento de la absorbancia hasta 340nm es proporcional a la concentración de glucosa en la muestra.



- DETERMINACIÓN DE LA INSULINA PLASMÁTICA

La determinación de los niveles de insulina se estimaron en el 7º mes mediante Kit de ELISA para ratones Mouse Insulin (Zelesste Diagnostic) con un rango del análisis de 0,3 mU/L-15mU/L. La muestra fue diluida 1:5, por lo que solo se necesitaba un volumen de 10 µl por muestra y el resultado final se multiplicaba x 5 (factor de dilución).

- DETERMINACIÓN HEMOGLOBINA GLICOSILADA (HbA1c)

La determinación de los niveles de HbA1c se estimó en el 7º mes. El examen directo de HbA1c es un ensayo enzimático en el cual muestras enteras de sangre a las cuales se les realiza un proceso de lisis se someten a una digestión extensa de proteasas mediante el *Bacillus sp* proteasa. Este proceso libera los aminoácidos, incluyendo las valinas glicosiladas de las cadenas beta de la hemoglobina. Las valinas glicosiladas sirven luego de sustrato para la enzima recombinante, valina fructosil oxidasa (FVO), producida en la *E. Coli*. El recombinante FVO específicamente corta el terminal N de las valinas y produce peróxido de hidrógeno. Éste, a su vez, se mide usando una reacción catalizada de peroxidasa de rábano blanco (POD) y una sustancia cromógena adecuada. En este ensayo enzimático directo de HbA1c no se requiere una medida separada para la hemoglobina total (Hb). Esta determinación fue llevada a cabo por el Laboratorio de Análisis Clínicos de Veterinaria (Facultad de Veterinaria de Murcia) del Dr. José Joaquín Cerón.

- DETERMINACIÓN DEL PARÁMETRO HOMA-IR

El parámetro HOMA-IR se estimó en el 7º mes. El HOMA-IR (*Homeostasis Model Assessment*) es un modelo matemático presentado por Matthews y cols. (1985) que permite realizar estimaciones de resistencia insulínica y función de las células beta mediante las concentraciones de la glucosa y la insulina plasmáticas en ayunas. Para el cálculo se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{HOMA-IR} = \frac{\text{insulina } (\mu\text{U/ml}) \times \text{glucosa } (\text{mg/dl})}{405}$$

Material y métodos

De acuerdo con este modelo, un elevado índice de HOMA-IR significa una baja sensibilidad a la insulina y por lo tanto una mayor resistencia a la insulina.

En humanos un índice HOMA-IR > 2 indicaría insulinoresistencia. Si una persona tiene un índice HOMA-IR > 3, existe una muy elevada posibilidad (> 90%) de tener resistencia a la insulina.

6. MÉTODO ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis estadístico descriptivo de las variables observadas para medir la distribución de las frecuencias entre los grupos. En los casos de variables cuantitativas, se calcularon parámetros característicos: media, desviación típica, máximo y mínimo.

Para determinar el grado de asociación estadística entre las variables en estudio, se aplicó el análisis de la varianza de una vía, complementando con el contraste de igualdad de pares de medias, con el método de la mínima diferencia significativa y con la corrección de Bonferroni. Se consideraron significativos valores iguales o menores a 0,05 ($p \leq 0,05$). El procesamiento estadístico de los datos se llevó a cabo mediante el programa estadístico ANOVA SPSS v 21.

V. RESULTADOS

EFFECTOS DEL TRATAMIENTO CON FLAVONOIDES EN RATONES LEPR^{DB/DB}

1. VARIABLES MORFOLÓGICAS

▪ EVOLUCIÓN DEL PESO CORPORAL

La obesidad es una de las principales características que definen este modelo animal, la desarrollan ya desde edades tempranas, estando completamente instaurada hacia el cuarto-quinto mes y aumenta a lo largo de la vida hasta los 5 o 6 meses que empieza a descender, pudiendo llegar a alcanzar los 60g. Al inicio del experimento el peso de los ratones era de 28 ± 3 g.

La administración crónica del **E. Fresno** produjo cambios en el peso final del tratamiento, aunque no significativos, logrando que los animales tratados ganaran menos peso que los controles (Figura 19A).

El tratamiento con **E.Spergularia** provocó cambios significativos a partir del cuarto mes hasta final del experimento en el peso de los animales, logrando que los animales tratados con E.Spergularia ganaran menos peso que los controles ($p < 0,05$) (Figura 19B).

Al inicio del experimento existía una diferencia significativa entre los grupos control y **E. Granada**, presentando un mayor peso corporal el grupo de E. Granada ($p < 0,05$), aún así como puede verse en la Figura 19C, al final del experimento, el grupo E. Granada presentó menor peso respecto al grupo control ($p=0,061$).

A lo largo del experimento se apreció un aumento significativo del peso corporal en el grupo **PO-Citrolive** respecto a los otros dos grupos, manteniéndose con el menor peso el grupo **SC-Citrolive**. Al final del experimento se apreció una reducción significativa del grupo

Resultados

SC-Citrolive de un 15% y de un 23% respecto al grupo Control y el grupo PO-Citrolive respectivamente ($p < 0,05$) (Figura 19D).

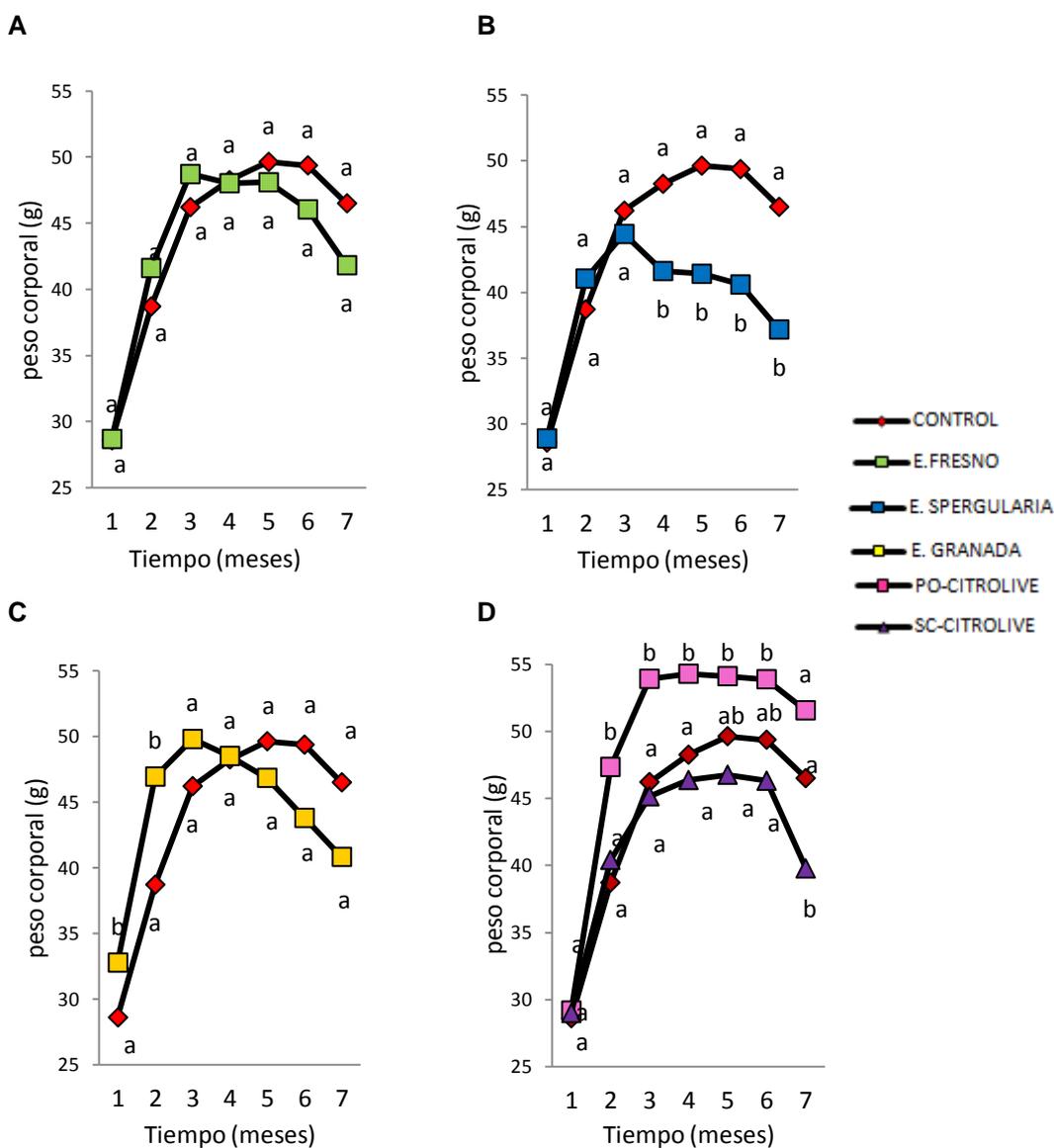


Figura 19. Evolución del peso corporal de los animales del grupo control y de los grupos tratados que recibieron tratamiento con E. Fresno (A), E.Spergularia (B), E. Granada (C) y PO-Citrolive o SC-Citrolive (D). Los valores están expresados como media aritmética ($n = 7-10$). Los valores para un mismo tiempo con distinta letra, presentan diferencia significativa ($p < 0,05$), los valores ab no presentan diferencia significativa ni con a ni con b.

▪ **ÍNDICE DE CONVERSIÓN ALIMENTICIO**

Como objetivo de estudiar la hiperfagia característica de este modelo se calculó el índice de conversión alimenticio (IC). Para ello se midió la ingesta media de pienso diaria de cada ratón (Tabla 8) y su evolución en la ganancia de peso mensual (Figura 19).

| GRUPO | Ingesta media (g/ratón/día) | | | | | | |
|----------------------|-----------------------------|------|------|------|------|------|------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| CONTROL | 5,37 | 5,47 | 5,33 | 5,64 | 4,8 | 4,19 | 4,18 |
| E.FRESNO | 7,05 | 7,44 | 7,56 | 6,63 | 7,39 | 6,82 | 6,79 |
| E.SPERGULARIA | 8,77 | 8,29 | 7,61 | 7,53 | 7,27 | 7,12 | 6,58 |
| E.GRANADA | 7,27 | 8,16 | 7,4 | 7,38 | 7,55 | 6,99 | 6,32 |
| PO-CITROLIVE | 5,33 | 5,28 | 5,19 | 5,04 | 5,09 | 5,52 | 5,53 |
| SC-CITROLIVE | 5,37 | 5,28 | 5,19 | 5,6 | 5,09 | 6,22 | 6,23 |

Tabla 8: Ingesta media de comida en los grupos control y de tratamiento durante los 7 meses de duración del experimento. Los valores están expresados como media (n = 7-10).

Resultados

El grupo tratado con **E. Fresno** ganó menos peso que el grupo control a partir del cuarto mes (Figura 19A). A pesar de comer más (Tabla 8), engordaron proporcionalmente menos, esto se ve reflejado en el menor índice de conversión alimenticio en el grupo de E. Fresno ($p < 0,05$), (Figura 20A).

Los animales tratados con **E.Spergularia** ganaron menos peso que los del grupo control a partir del tercer mes, con una ingesta media de pienso diario menor respecto al grupo control ($p < 0,05$) (Tabla 8). Engordaron proporcionalmente menos, con un índice de conversión alimenticio significativamente inferior en el grupo de E.Spergularia, donde se apreciaron diferencias significativas a lo largo de todo el experimento ($p < 0,05$), (Figura 20B).

Se observó cómo el grupo tratado con **E. Granada** presentó un peso significativamente superior al principio del experimento (Figura 19C), pero a partir del cuarto mes, los animales ganaron menos peso que el grupo control, presentando una hiperfagia significativamente mayor como se ve en la tabla 8, lo que se ve reflejado en el menor índice de conversión alimenticio en el grupo del E. Granada, donde se apreciaron diferencias significativas a lo largo de todo el experimento ($p < 0,05$), (Figura 20C).

Los animales que ingirieron PO-**Citrolive** engordaron más y los del grupo SC-Citrolive menos (Figura 19D), pero cuando se evaluó el índice de conversión alimenticio los datos son significativamente favorables para ambos grupos de Citrolive, ($p < 0,05$) (Figura 20D).

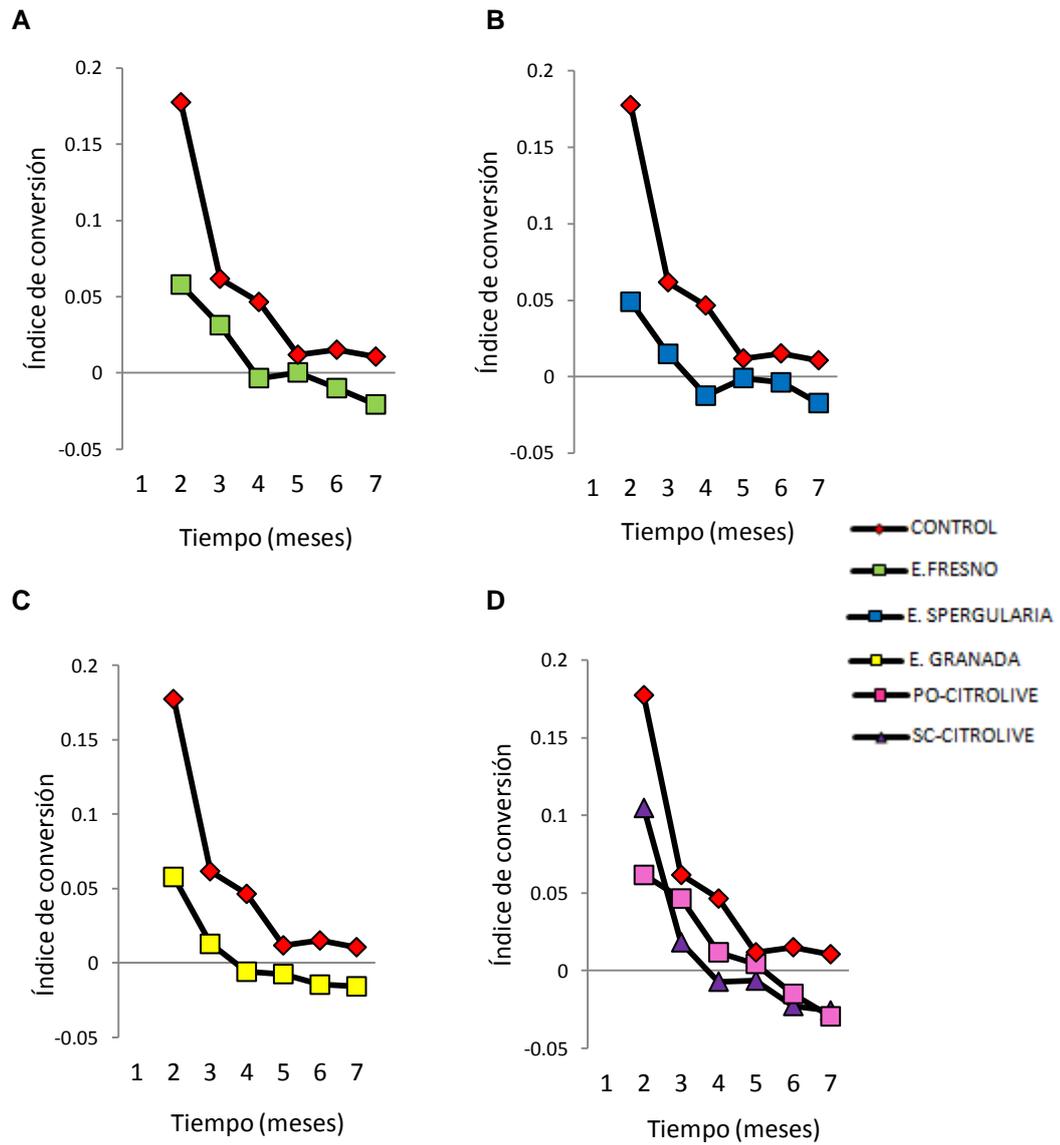


Figura 20. Índice de conversión alimenticio del grupo E. Fresno (A), E.Spergularia (B), E. Granada (C), PO- Citrolive y SC-Citrolive (D). Los valores están expresados como media aritmética (n = 7-10).

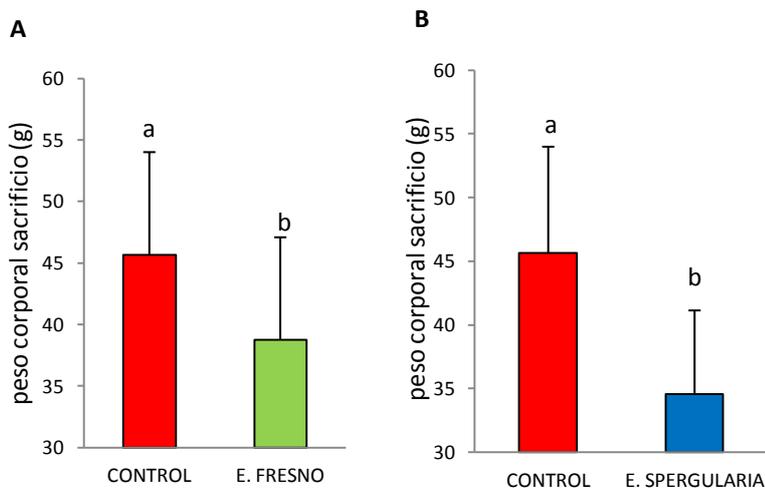
Resultados

▪ PESO RELATIVO DE ÓRGANOS

➤ PESO EN EL MOMENTO DEL SACRIFICIO

El peso de los ratones en el momento del sacrificio fue significativamente menor en los grupos que recibieron E. Fresno, E. Spergularia y E. Granada ($p < 0,05$) respecto al grupo control (Figura 21).

En los grupos de tratamiento de Citrolive no se encontraron diferencias en el peso corporal entre ambos grupos de Citrolive y el grupo control, sin embargo sí hubo diferencias entre ambos grupos de Citrolive, siendo el peso del grupo SC-Citrolive un 17% menos respecto al grupo PO-Citrolive ($p < 0,05$) (Figura 21D).



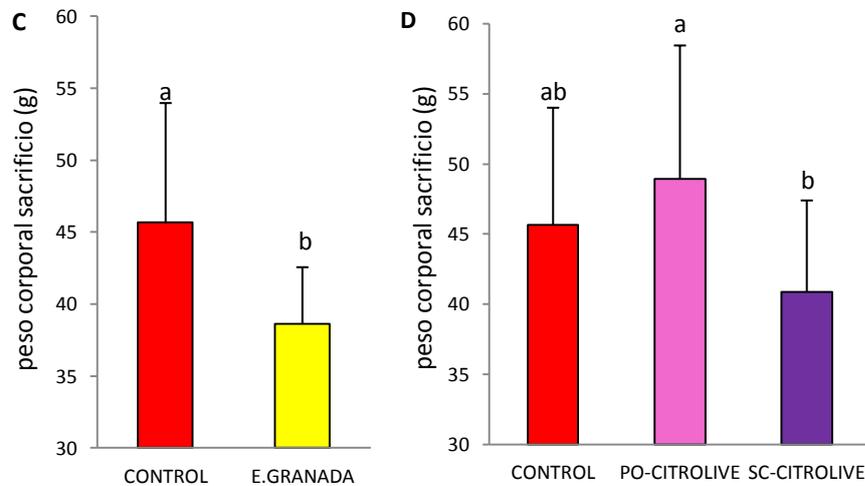


Figura 21. Peso de los ratones en el momento del sacrificio (g), grupo E. Fresno (A), E.Spergularia (B), E. Granada (C), PO-Citrolive y SC-Citrolive (D). Los valores están expresados como media \pm DE (n = 7-10). Entre los valores que presentan letras distintas, existe diferencia significativa ($p < 0,05$), los valores ab no presentan diferencia significativa ni con a ni con b

➤ PESO DE LOS CORAZONES

El tratamiento con E. Fresno, E.Spergularia, E. Granada y PO-Citrolive no produjo cambios significativos en el tamaño del corazón. Sin embargo, la administración de SC-Citrolive redujo significativamente un 27% el tamaño del corazón respecto al grupo control (Figura 22D).

Resultados

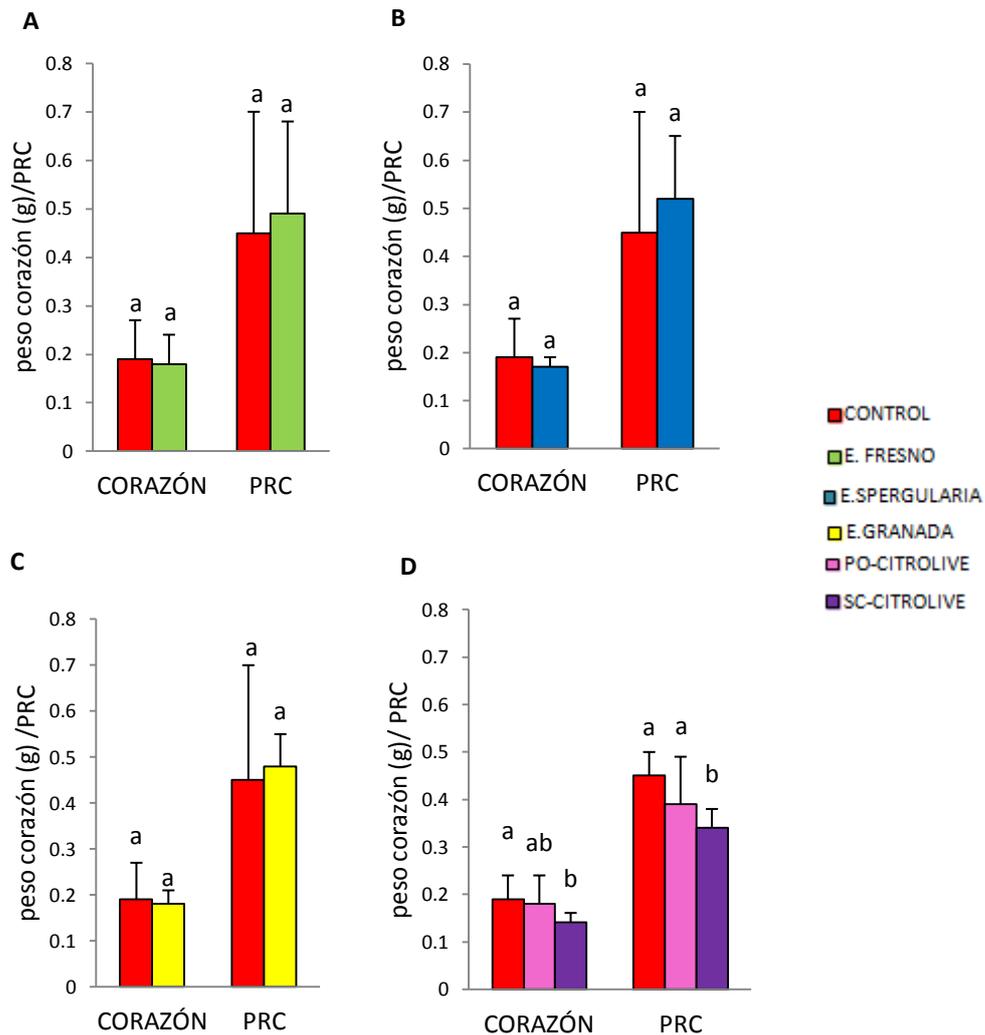
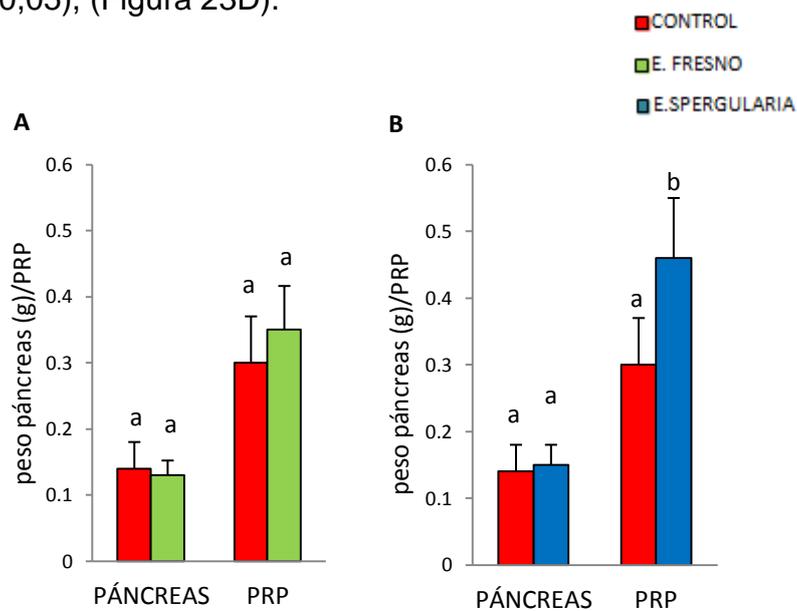


Figura 22. Peso del corazón y peso relativo del mismo con respecto al peso corporal, grupo E. Fresno (A), E. Spergularia (B), E. Granada (C), PO- Citrolive y SC- Citrolive (D). Los valores están expresados como media \pm DE (n = 7-10). Entre los valores que presentan letras distintas, existe diferencia significativa ($p < 0,05$), los valores ab no presentan diferencia significativa ni con a ni con b. PRC: Peso relativo del corazón.

➤ PESO DE LOS PÁNCREAS

El tratamiento con E. Fresno, E.Spergularia y E. Granada no produjo ninguna variación en el tamaño del páncreas, sin embargo al calcular el PRP, si observamos que los animales tratados en el tratamiento con E.Spergularia y E. Granada mostraron un valor mayor estadísticamente significativo respecto al grupo control.

En los grupos de Citrolive se observó una diferencia significativa mayor de un 23% y un 28% del grupo PO-Citrolive respecto al grupo control y SC-Citrolive respectivamente ($p < 0,05$), (Figura 23D).



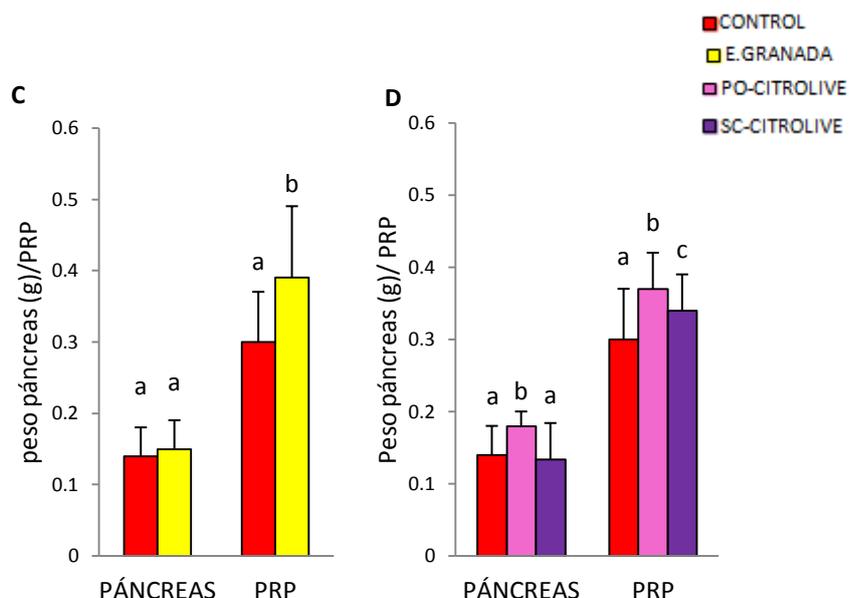


Figura 23. Peso del páncreas y peso relativo del mismo con respecto al peso corporal, grupo E. Fresno (A), E. Spargularia (B), E. Granada (C), PO- Citrolive y SC-Citrolive (D). Los valores están expresados como media \pm DE (n = 7-10). Entre los valores que presentan letras distintas, existe diferencia significativa ($p < 0,05$), los valores ab no presentan diferencia significativa ni con a ni con b. PRP: Peso relativo del páncreas.

➤ PESO DE LOS HÍGADOS

El grupo tratado con E. Fresno presentó un menor peso del hígado de aproximadamente un 18% ($p=0,069$), el grupo del E. Spargularia un 21% menos ($p < 0,05$) y el grupo del E. Granada un 17% menos en relación con el grupo control (Figura 24).

Los ratones que recibieron PO-Citrolive presentaron un incremento no significativo en el peso del hígado de aproximadamente un 13% en relación con el grupo control y un incremento significativo de un 32% respecto al grupo SC-Citrolive (Figura 24D).

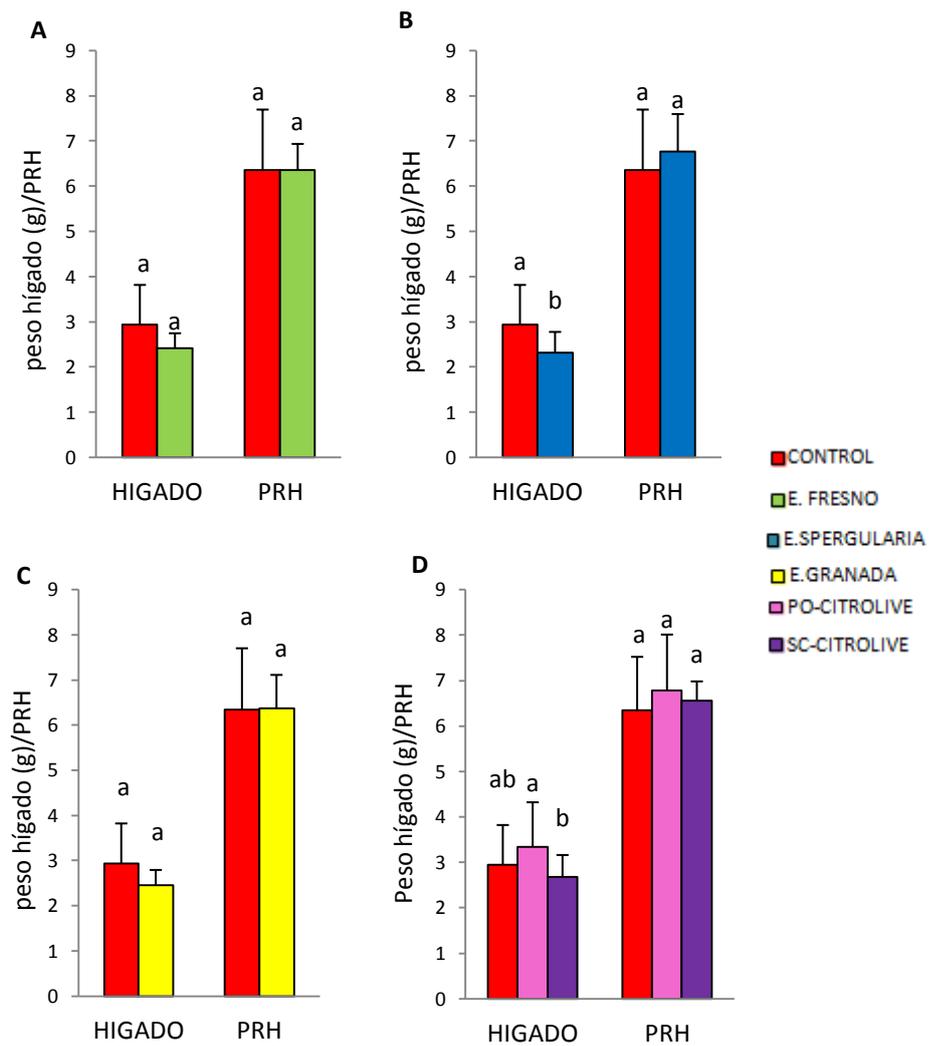


Figura 24. Peso del hígado y peso relativo del mismo con respecto al peso corporal, grupo E. Fresno (A), E. Spergularia (B), E. Granada (C), PO- Citrolive y SC-Citrolive (D). Los valores están expresados como media \pm DE (n = 7-10). Entre los valores que presentan letras distintas, existe diferencia significativa ($p < 0,05$), los valores ab no presentan diferencia significativa ni con a ni con b. PRH: Peso relativo del hígado.

2. DETERMINACIÓN DEL PERFIL LIPÍDICO

▪ PARÁMETROS BIOQUÍMICOS PLASMÁTICOS

➤ COLESTEROL TOTAL PLASMÁTICO

En el grupo del **E. Fresno**, los niveles de colesterol total se vieron reducidos en un 8% desde el 3^{er} al 7^o mes, siendo esta disminución más pronunciada en el 5^o mes. Por el contrario, en el grupo control se observó un aumento de un 5%, siendo también mayor el aumento en el 5^o mes. Se obtuvo una concentración plasmática de colesterol mayor en el grupo control respecto al grupo E. Fresno ($p < 0,05$) en el 5^o mes, sin embargo al principio y al final del experimento no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (Figura 25A).

Los niveles de colesterol total se vieron reducidos en un 10 % desde el 3^o al 7^o mes con el tratamiento de **E.Spergularia**, siendo esta disminución más pronunciada en el 5^o mes, por lo contrario en el grupo control se observó un aumento de un 5%, siendo también mayor el aumento en el 5^o mes. Hubo una mayor diferencia entre ambos grupos a mitad del experimento ($p = 0,067$), pero no se puede apreciar diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos a lo largo del experimento (Figura 25B).

El grupo de **E. Granada** presentó menores niveles plasmáticos de colesterol que el grupo control y permanecieron constantes a lo largo del experimento, todo lo contrario que el grupo control, cuyos niveles aumentaron, especialmente a mitad del estudio. Se obtuvieron mayores niveles de colesterol en el grupo control respecto al grupo E. Granada aunque sin diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos a lo largo del experimento (Figura 25C).

Los grupos de tratamiento con **Citrolive** presentaron menores concentraciones plasmáticas de colesterol a lo largo del estudio. El tratamiento con SC-Citrolive logró reducir un 14% respecto al grupo control en el 5º mes los niveles de colesterol ($p < 0,05$). No se apreciaron diferencias entre los dos grupos de Citrolive (Figura 25D).

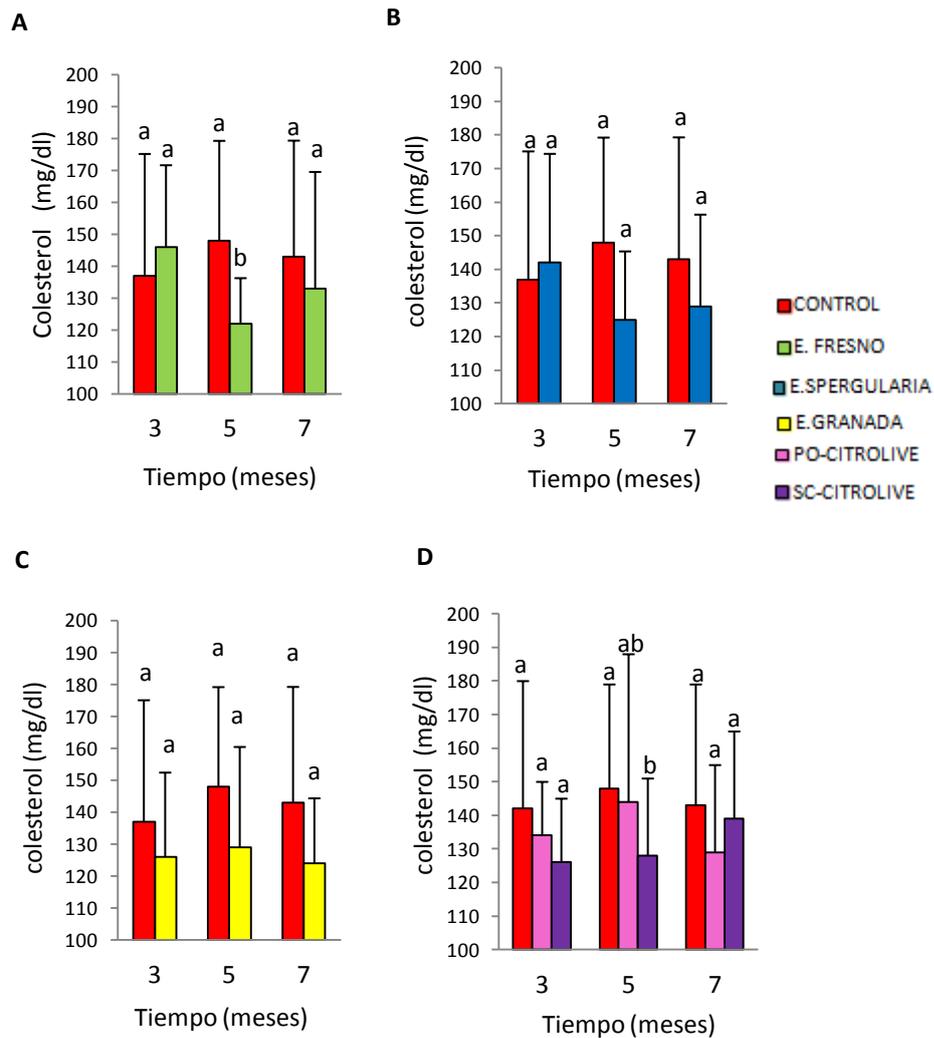


Figura 25. Niveles plasmáticos de colesterol total a diferentes tiempos, en grupo E. Fresno (A), E.Spergularia (B), E. Granada (C), PO-Citrolive y SC-Citrolive (D). Los valores están expresados como media \pm DE ($n = 7-10$). Entre los valores que presentan letras distintas, existe diferencia significativa ($p < 0,05$), los valores ab no presentan diferencia significativa ni con a ni con b.

Resultados

➤ COLESTEROL HDL PLASMÁTICO

En el grupo del **E. Fresno** se apreciaron diferencias significativas a lo largo del experimento en los niveles plasmáticos de C-HDL con una evolución lineal ($p < 0,05$). Los niveles de C-HDL se vieron aumentados en un 50% en el grupo E. Fresno respecto un 17% en el grupo control, pero no se apreciaron diferencias significativas entre ambos grupos (Figura 26A).

Pudimos ver que los niveles de colesterol-HDL en el grupo del **E.Spergularia** fueron superiores respecto el grupo control, aunque sólo se encontraron diferencias significativas a los 3 meses ($p < 0,05$), siendo en este periodo un 27% superior el grupo de E.Spergularia respecto el grupo control (Figura 26B).

El tratamiento con **E. Granada** no supuso ninguna relevancia estadística en los niveles de colesterol-HDL, en ambos grupos aumentaron al final del estudio, obteniendo el mismo nivel de colesterol-HDL al final del experimento para el grupo control y el grupo E. Granada (Figura 26C).

Los niveles de HDL-C en el 3^{er} mes en el grupo PO-**Citrolive** fueron un 23% significativamente mayor respecto al grupo control, sin apreciar diferencias con el grupo SC-Citrolive. Al final del experimento el grupo SC-Citrolive presentó un 28% y un 46% más de HDL-C respecto al grupo control y grupo PO-Citrolive respectivamente ($p < 0,05$).

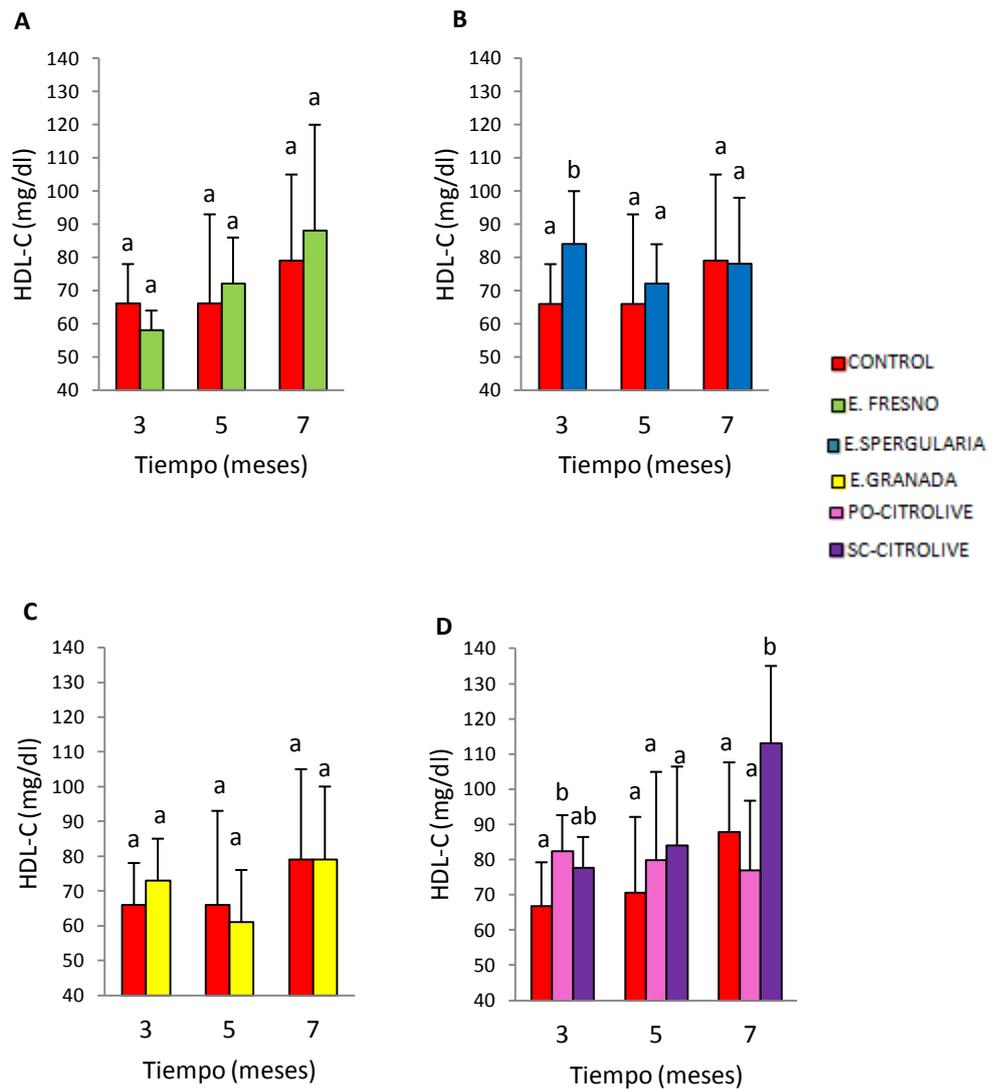


Figura 26. Niveles plasmáticos de colesterol- HDL (lipoproteínas de alta densidad) a diferentes tiempos, en grupo E. Fresno (A), E.Spergularia (B), E. Granada (C), PO- Citrolive y SC-Citrolive (D). Los valores están expresados como media \pm DE (n = 7-10). Entre los valores que presentan letras distintas, existe diferencia significativa ($p < 0,05$), los valores ab no presentan diferencia significativa ni con a ni con b.

Resultados

➤ TRIGLICÉRIDOS PLASMÁTICOS

En el grupo del **E. Fresno** los niveles de TGR (triglicéridos) se vieron reducidos al final del experimento en un 25%, al contrario que el grupo control que presentó un aumento del 27% ($p < 0,05$) (Figura 27A)

En la primera determinación de triglicéridos en el grupo del **E.Spergularia** existía una diferencia significativa respecto al grupo control, siendo superior los niveles de TGR en el grupo de E.Spergularia, pero desde el 3^{er} mes al 7^o mes el grupo E.Spergularia experimentó un descenso del 18%, por el contrario el grupo control siguió un aumento lineal, con un aumento del 27% en el mismo periodo. Al final del experimento el grupo control presentó unos niveles de triglicéridos un 17% superior respecto al grupo E.Spergularia (Figura 27B).

Los niveles de TGR plasmáticos fueron superiores en el grupo del **E. Granada** respecto al grupo control. El grupo control desarrolló un aumento progresivo y lineal de dichos niveles y el grupo E. Granada presentó una mayor concentración plasmática en el 5^o mes y después redujo sus niveles un 15%, presentando mayores niveles de TGR al final del experimento, pero sin significación estadística (Figura 27C).

Los niveles de triglicéridos no se vieron significativamente reducidos con el tratamiento **Citrolive** en las dos diferentes vías de administración. A lo largo del tiempo, se vio un aumento superior en la concentración de triglicéridos del grupo control respecto al grupo PO-Citrolive y SC-Citrolive, siendo de un 30%, 12% y un 13% superior respectivamente desde la primera determinación a la última ($p < 0,05$) (Figura 27D).

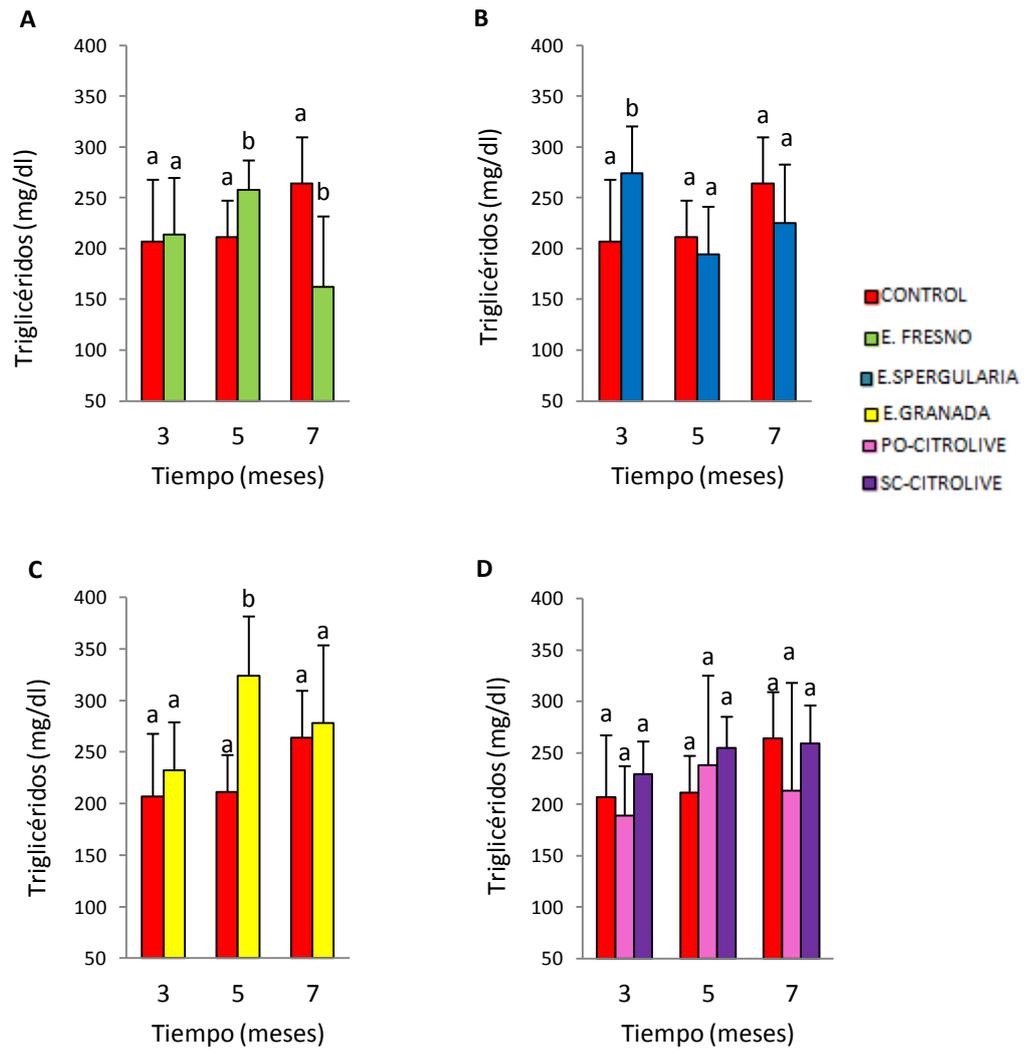


Figura 27. Niveles plasmáticos de triglicéridos a diferentes tiempos, en grupo E. Fresno (A), E. Spergularia (B), E. Granada (C), PO- Citrolive y SC-Citrolive (D). Los valores están expresados como media \pm DE (n = 7-10). Entre los valores que presentan letras distintas, existe diferencia significativa ($p < 0,05$), los valores ab no presentan diferencia significativa ni con a ni con b.

Resultados

➤ ÁCIDOS GRASOS LIBRES (AGL) PLASMATICOS

Los niveles plasmáticos de AGL no se vieron reducidos con ninguno de los tratamientos a estudio (Figura 28).

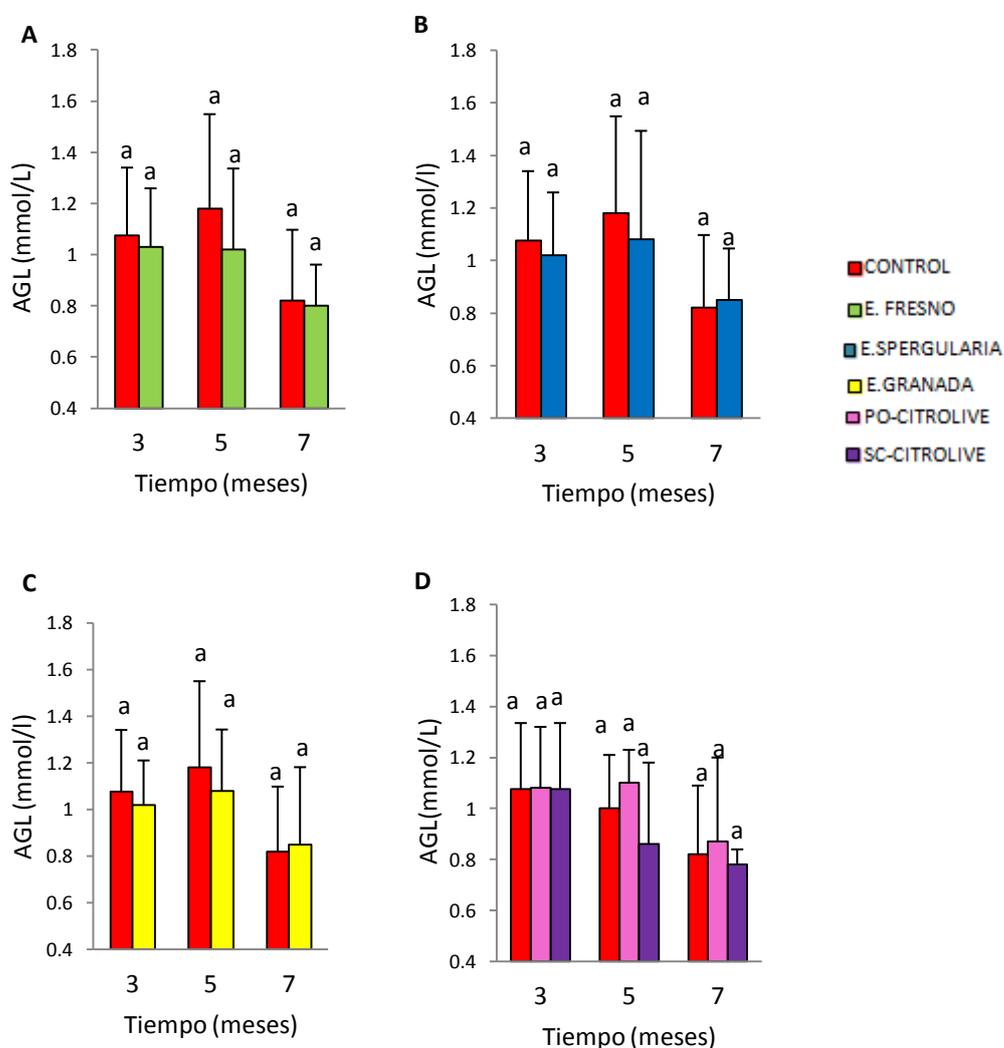


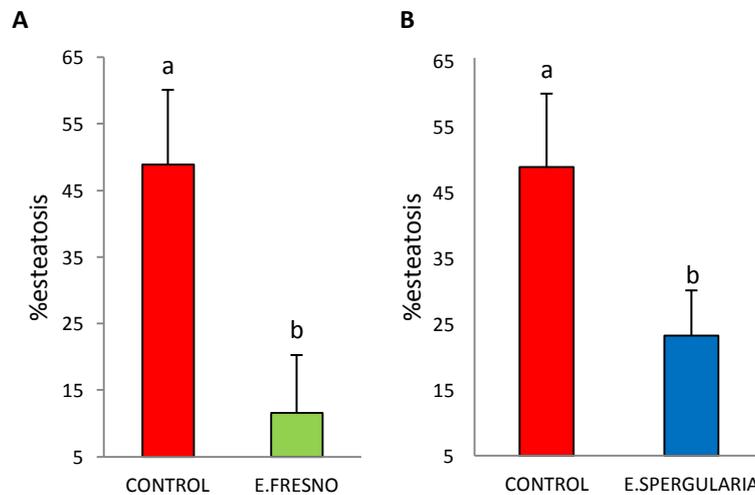
Figura 28. Niveles plasmáticos de ácidos Grasos Libres (AGL) a diferentes tiempos, en grupo E. Fresno (A), E.Spergularia (B), E. Granada (C), PO- Citrolive y SC-Citrolive (D). Los valores están expresados como media \pm DE (n = 7-10). Entre los valores que presentan letras distintas, existe diferencia significativa ($p < 0,05$), los valores ab no presentan diferencia significativa ni con a ni con b.

▪ ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO DEL HÍGADO

➤ DETERMINACIÓN DEL GRADO DE ESTEATOSIS

El tratamiento con E. Fresno, E.Spergularia y E. Granada logró disminuir significativamente el porcentaje de esteatosis un 77%, un 52% y un 65% respectivamente, siendo en todos ellos de grado I, respecto al grupo control, que fue grado II, ($p < 0,05$).

El porcentaje de esteatosis en el grupo de tratamiento con SC-Citrolive fue significativamente menor, siendo de grado I, respecto al grupo control y grupo PO-Citrolive que fueron grado II, ($p < 0,05$). El grupo control y grupo PO-Citrolive presentaron esteatosis grado II, pero el porcentaje de esteatosis en el grupo PO-Citrolive fue significativamente menor.



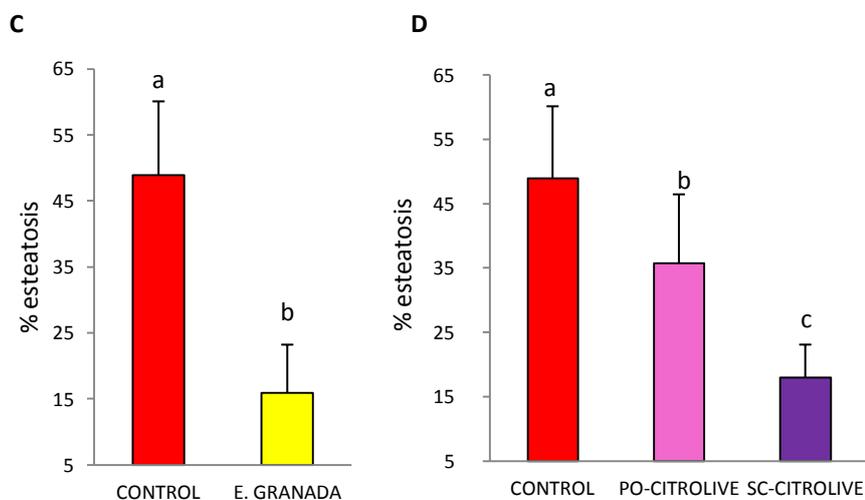


Figura 29. Porcentaje de esteatosis hepática en los grupos E. Fresno (A), E.Spergularia (B), E. Granada (C), PO- Citrolive y SC-Citrolive (D). Los valores están expresados como media \pm DE (n = 7-10). Los valores con distinta letra, presentan diferencia significativa ($p < 0,05$).

➤ DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE GOTAS DE GRASAS

El número de gotas grasas en los grupos de **E. Fresno**, **E.Spergularia** y **E. Granada** fue un 69%, 78% y un 37% inferior respectivamente respecto al grupo control, pero no se apreciaron diferencias significativas entre los 4 grupos.

El número de gotas grasas en el grupo **PO-Citrolive** fue 2,3 y 4 veces significativamente superior respecto al grupo Control y SC-Citrolive respectivamente.

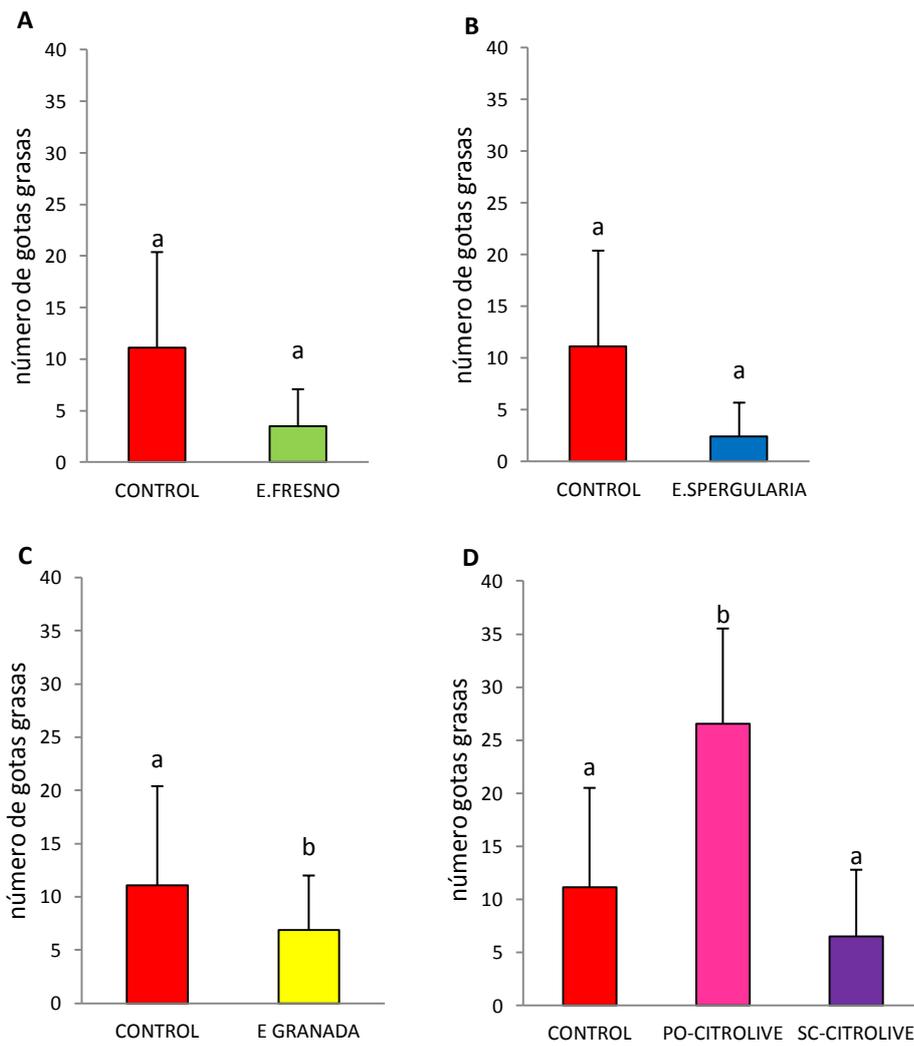


Figura 30. Número de gotas grasas en los grupos del E. Fresno (A), E.Spergularia (B), E. Granada (C), PO- Citrolive y SC-Citrolive (D). Los valores están expresados como media \pm DE (n = 7-10). Los valores con distinta letra, presentan diferencia significativa ($p < 0,05$).

Resultados

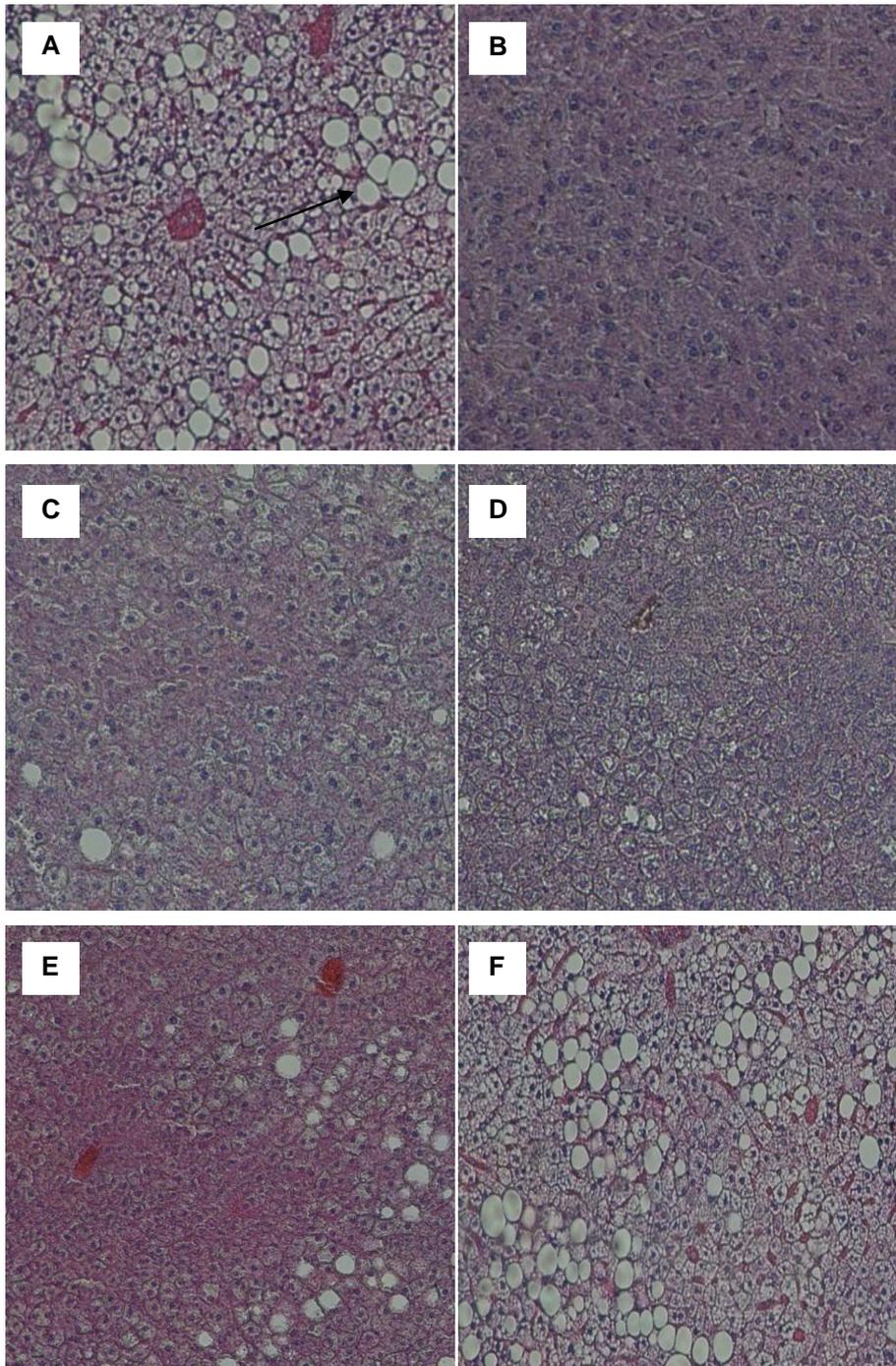


Imagen 4. Sección histológica del hígado y hepatocitos con infiltración de grasa en el parénquima hepático, corte de hígado de grupo control (A), corte de hígado del E. Fresno (B), corte del hígado del E. Spergularia (C), corte del hígado del E. Granada (D), corte del hígado del SC-Citrolive (E) y corte del hígado del PO-Citrolive (F) H.E 10x.

3. DETERMINACIÓN DE MARCADORES RELACIONADOS CON LA OBESIDAD

▪ DETERMINACIÓN DE ADIPONECTINA PLASMÁTICA

El tratamiento con **E. Fresno** aumentó 1,2 veces los niveles de adiponectina al final del experimento, sin embargo no se apreciaron diferencias significativas entre ambos grupos (Figura 31A).

El tratamiento con **E.Spergularia** y **E. Granada** mostró una diferencia significativa superior del 38% y del 23% respecto al grupo control al final del experimento ($p < 0,05$), (Figura 31B y 31C).

El tratamiento con SC-**Citrolive** mostró una superior diferencia significativa del 31% respecto al grupo PO-Citrolive al final del experimento ($p < 0,05$), sin embargo no se encontraron diferencias de ambos grupos de tratamiento de Citrolive y el grupo control (Figura 31D).

Resultados

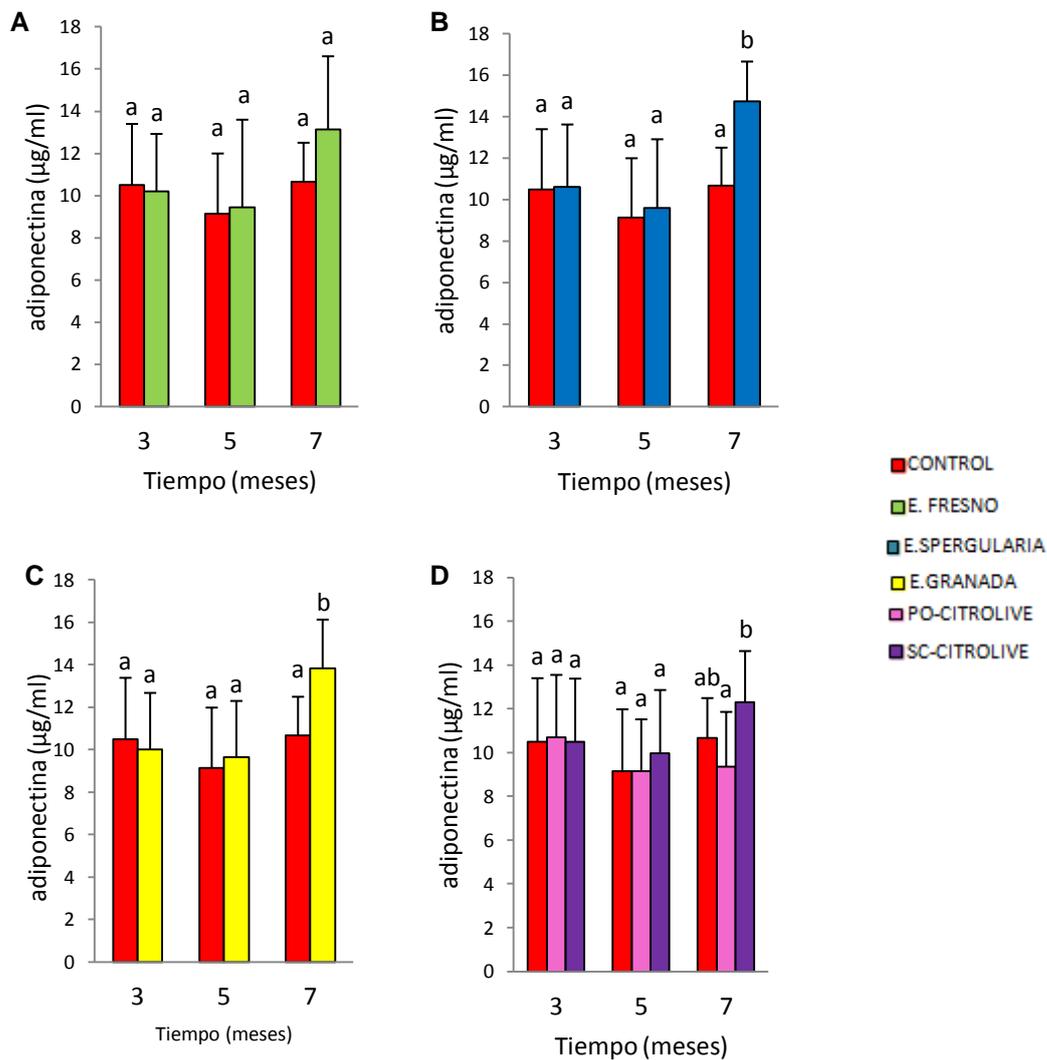


Figura 31. Niveles plasmáticos de adiponectina en grupos experimentales que recibieron tratamiento con E. Fresno (A), E. Spargularia (B), E. Granada (C) y PO-Citrolive o SC-Citrolive (D). Los valores están expresados como media aritmética ($n = 7-10$) \pm DE. Los valores para un mismo tiempo con distinta letra, presentan diferencia significativa ($p < 0,05$), los valores ab no presentan diferencia significativa ni con a ni con b.

▪ DETERMINACIÓN DEL TNF- α PLASMÁTICO

No se apreció una disminución significativa del TNF- α plasmático a lo largo del experimento en ningún grupo (Figura 32). Sin embargo al final del experimento todos los grupos tratados, excepto el grupo PO-Citrolive mostraron menores niveles respecto al grupo control.

Los niveles de TNF- α en el grupo control respecto al grupo del **E. Fresno**, fue de 1,25 veces superior al final del experimento.

El tratamiento con **E.Spergularia** mostró unos niveles un 17% inferior respecto al grupo control.

El tratamiento con **E. Granada** disminuyó un 26% del 5^o mes al 7^o mes los niveles de TNF- α , mostrando niveles superiores en el grupo control respecto al grupo E. Granada de un 40% al final del experimento (p= 0,06).

Los niveles de TNF- α plasmáticos aumentaron linealmente en el grupo control y en el grupo PO-**Citrolive**, mientras que el grupo SC-Citrolive a partir del 5^o mes disminuyeron un 15%. Al final del experimento los mayores niveles de TNF- α los presentaba el grupo PO-Citrolive, seguido del grupo control y por último SC-Citrolive, coincidiendo proporcionalmente con el mayor peso corporal de PO-Citrolive, seguido del grupo control y menor peso del grupo SC-Citrolive, e inversamente proporcional a los niveles de adiponectina (Figura 31).

Resultados

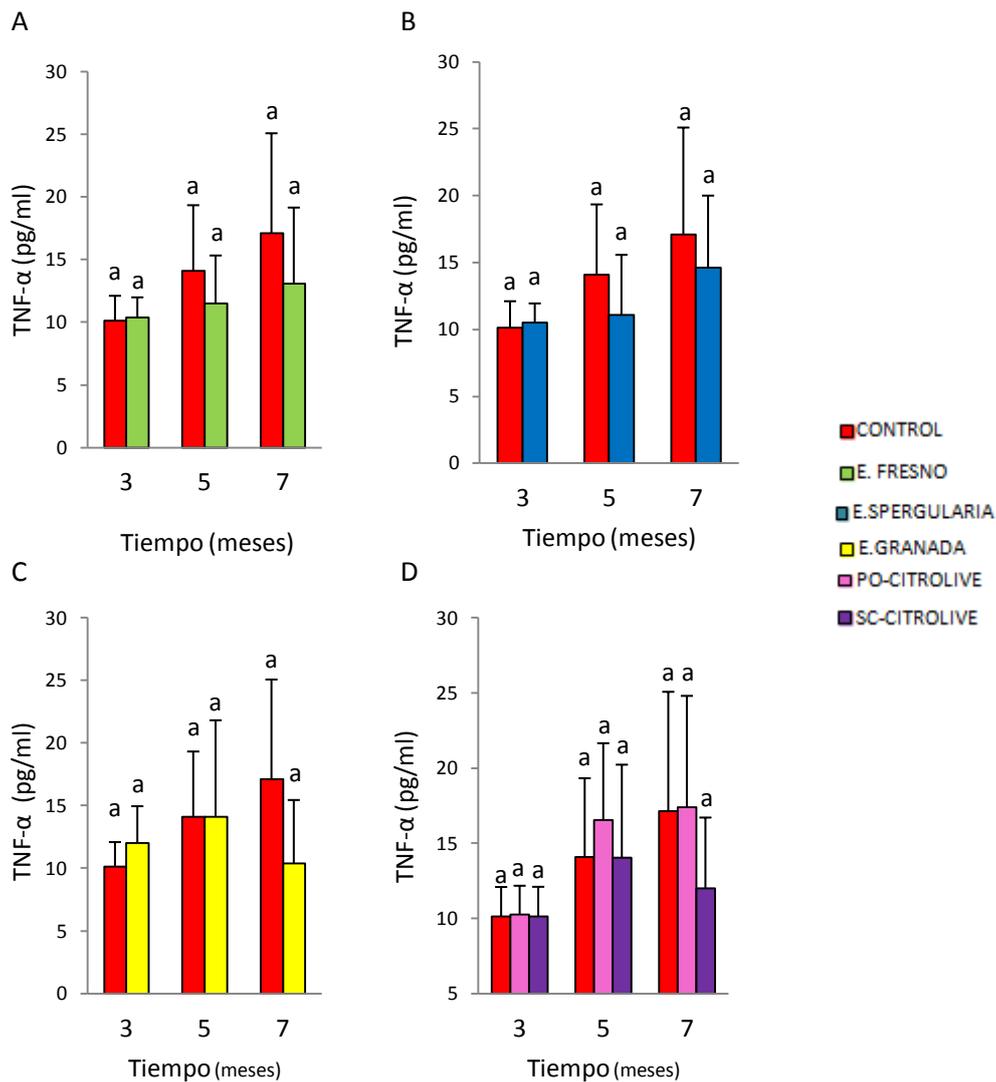


Figura 32. Niveles plasmáticos de TNF- α en grupos experimentales que recibieron E. Fresno (A), E. Spergularia (B), E. Granada (C) y PO-Citrolive o SC-Citrolive (D). Los valores están expresados como media aritmética (n = 7-10). Los valores para un mismo tiempo con distinta letra, presentan diferencia significativa ($p < 0,05$), los valores ab no presentan diferencia significativa ni con a ni con b.

4. PARAMETROS CARDIOVASCULARES

▪ DETERMINACIÓN DE PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA (PAS)

Realizamos una medida basal de la PAS a mitad del experimento que oscilaba entre 163 ± 3 mmHg para el grupo control y 160 ± 2 para el grupo del **E.Fresno**, sin existir diferencias significativas entre ambos grupos ($p=0,081$). Estos valores fueron disminuyendo lentamente en ambos grupos, encontrándose diferencias significativas a partir de la semana 20 (Figura 33A). Al final del experimento, los valores de presión sistólica para el grupo control y para el grupo del E.Fresno fueron de 8 y 25 mmHg menos respectivamente ($p<0,05$), esto supuso una reducción de un 15% de las PAS en el grupo del E.Fresno respecto un 5% en el grupo control ($p< 0,05$).

En la primera determinación no se apreciaron diferencias significativas entre el grupo del **E.Spergularia** y grupo control ($p=0,506$). Estos valores fueron disminuyendo significativamente en el grupo de tratamiento con E.Spergularia a lo largo del experimento, mientras que en el grupo control hizo un ligero descenso en la semana 18 pero posteriormente se mantuvo constante (Figura 33B). Al final del experimento, los valores de presión sistólica para el grupo control y para el grupo del E.Spergularia fueron de 8 y 28 mmHg menos respectivamente ($p<0,05$), esto supuso una reducción de un 17% de las PAS en el grupo del E.Spergularia respecto un 5% en el grupo control ($p< 0,05$).

Resultados

Los valores de PAS fueron disminuyendo significativamente en el grupo de tratamiento con **E. Granada** a lo largo del experimento. Este descenso de PAS fue significativo ($p < 0,05$) a partir de la semana 20 (Figura 33C). Al final del experimento, los valores de presión sistólica para el grupo control y para el grupo E.Granada fueron de 8 y 19 mmHg menos respectivamente ($p < 0,05$), esto supuso una reducción de un 12% de las PAS en el grupo E.Granada respecto un 5% en el grupo control ($p < 0,05$).

Los valores de PAS en ambos grupos de tratamiento con **Citrolive** fueron disminuyendo a lo largo del experimento. Se apreciaron diferencias significativas entre ambos grupos de tratamiento y entre el grupo control y grupo SC-Citrolive, siendo significativamente menor para el grupo SC-Citrolive a partir de la semana 22 (Figura 33D). Al final del experimento, los valores de presión sistólica para el grupo control y para el grupo SC-Citrolive fueron de 8 y 16 mmHg menos respectivamente ($p < 0,05$), esto supuso una reducción de un 11% de las PAS en el grupo SC-Citrolive y una diferencia significativa respecto al grupo control de un 8% ($p < 0,05$). También se apreciarón diferencias significativamente superiores del grupo PO-Citrolive respecto al grupo SC- Citrolive.

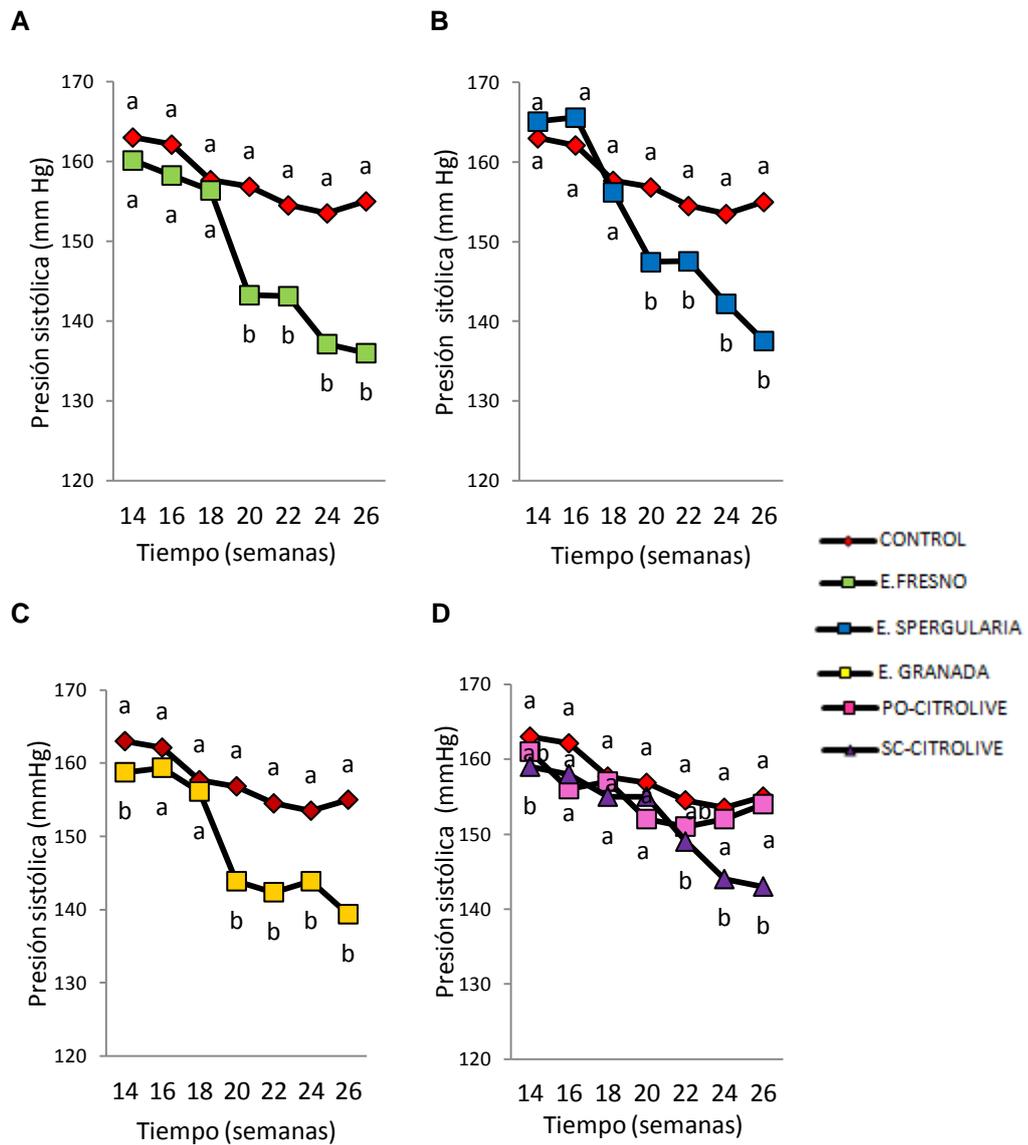


Figura 33. Evolución de la presión arterial sistólica (PAS) medida por pletismografía en la cola de los ratones durante 14 semanas. En grupos experimentales que recibieron tratamiento con E. Fresno (A), E.Spergularia (B), E. Granada (C) y PO-Citrolive o SC-Citrolive (D). Los valores están expresados como media aritmética (n = 7-10). Los valores para un mismo tiempo con distinta letra, presentan diferencia significativa ($p < 0,05$), los valores ab no presentan diferencia significativa ni con a ni con b.

Resultados

- PRESIÓN ARTERIAL DIASTÓLICA (PAD)

El tratamiento con **E.Fresno** provocó una disminución de la PAD, encontrándose diferencias significativas en la semana 22 y en la última semana (Figura 34A). Al final del experimento, los valores de presión diastólica para el grupo control y para el grupo E.Fresno fueron de 14 y 17 mmHg menos respectivamente ($p < 0,05$), esto supuso una reducción de un 14% de las PAD en el grupo E.Fresno respecto un 11% en el grupo control ($p < 0,05$).

Los valores de PAD fueron disminuyendo progresivamente a lo largo del experimento en el grupo del **E.Spergularia**, mostrando una diferencia significativa al final del experimento ($p < 0,05$), mientras que el grupo control tras descender en la semana 16, después se mantuvo relativamente constante a lo largo del estudio (Figura 34B). Al final del experimento, los valores de presión diastólica para el grupo control y para el grupo E.Spergularia fueron de 14 y 16 mmHg menos respectivamente ($p < 0,05$), esto supuso una reducción de un 13% de la PAD en el grupo E.Spergularia.

El tratamiento con **E. Granada** supuso una reducción al final del experimento de un 12% de las PAD, con una diferencia de 10 mmHg respecto al grupo control ($p < 0,05$) (Figura 34C).

Los valores de PAD fueron disminuyendo en los dos grupos de **Citrolive**, siendo este descenso significativamente superior en el PO-Citrolive en la semana 22 ($p < 0,05$), (Figura 34D). Al final del experimento no se apreciaron diferencias significativas entre los dos grupos de tratamiento con Citrolive y el grupo control.

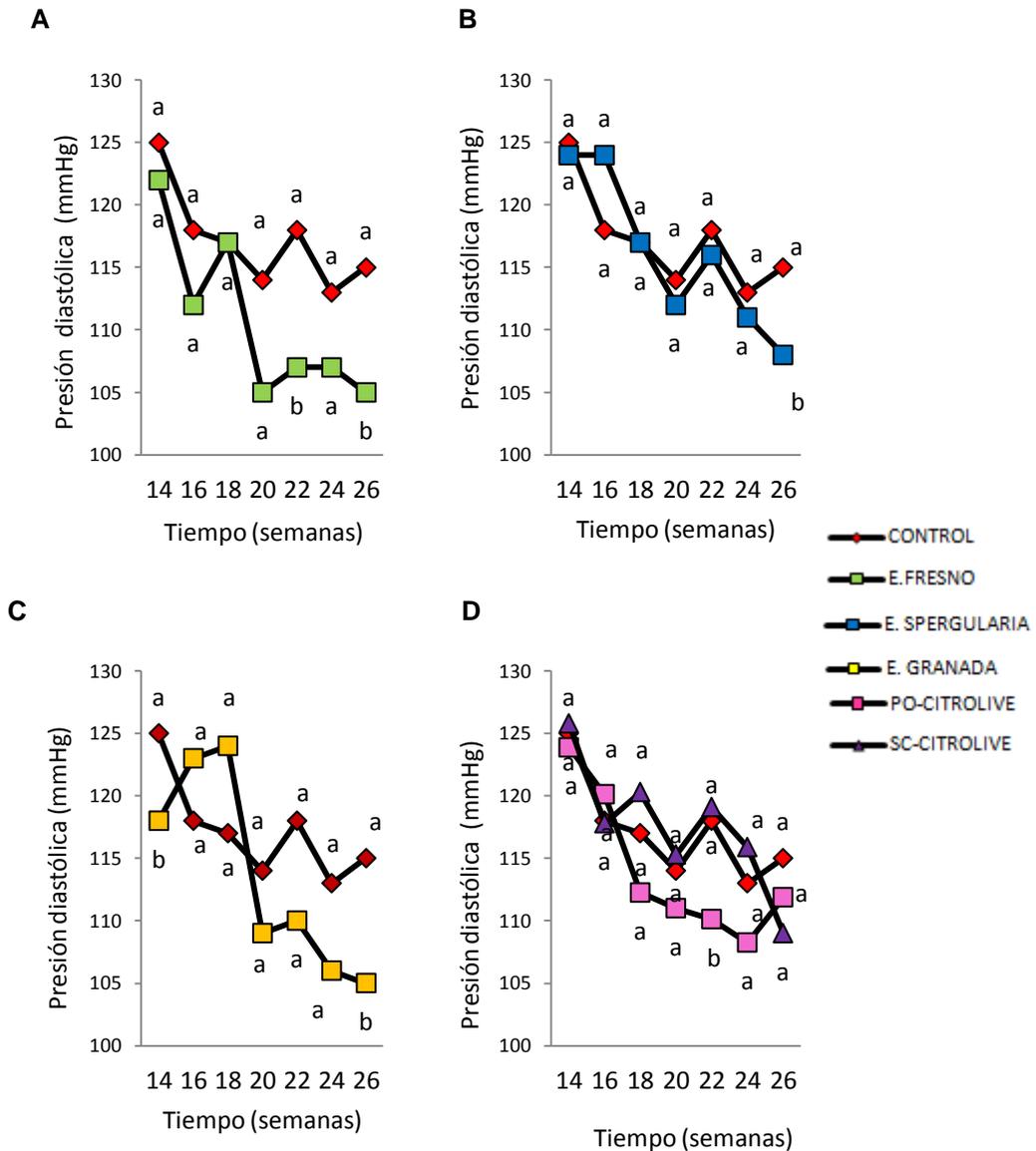


Figura 34. Evolución de la presión arterial diastólica (PAD) medida por pletismografía en la cola de los ratones durante 14 semanas. En grupos experimentales que recibieron tratamiento con E. Fresno (A), E. Spargularia (B), E. Granada (C) y PO-Citrolive o SC-Citrolive (D). Los valores están expresados como media aritmética (n = 7-10). Los valores para un mismo tiempo con distinta letra, presentan diferencia significativa ($p < 0,05$), los valores ab no presentan diferencia significativa ni con a ni con b.

Resultados

- PRESIÓN ARTERIAL MEDIA (PAM)

Los valores de PAM fueron disminuyendo lentamente en el grupo de **E.Fresno**, encontrándose diferencias significativas en la semana 20 y 22 y en la última semana (Figura 35A). Al final del experimento, los valores de presión media para el grupo control y para el grupo E.Fresno fueron de 16 y 21 mmHg menos respectivamente ($p < 0,05$), esto supuso una reducción de un 15% de las PAM en el grupo E.Fresno respecto un 11% en el grupo control ($p < 0,05$).

Los valores de PAM fueron disminuyendo progresivamente en el grupo de **E.Spergularia**, mientras que en el grupo control a partir de la semana 20 se mantuvo constante, encontrándose diferencias significativas entre ambos grupos en el último mes del experimento (Figura 35B). El tratamiento con E.Spergularia supuso una reducción de 21 mmHg al final del tratamiento ($p < 0,05$), esto supuso una reducción de un 15% de las PAM en el grupo de E.Spergularia.

El tratamiento con **E.Granada** supuso una reducción significativa de un 12% de las PAM al final del tratamiento (Figura 35C).

Los valores de PAM fueron disminuyendo progresivamente en los dos grupos de tratamiento con **Citrolive**, y se apreció una significativa diferencia entre el grupo control y el grupo SC-Citrolive en la semana 16 a favor del grupo de tratamiento, sin embargo a pesar que este descenso fue más marcado en el grupo PO-Citrolive respecto los otros dos grupos no aparecieron diferencias significativas (Figura 35D).

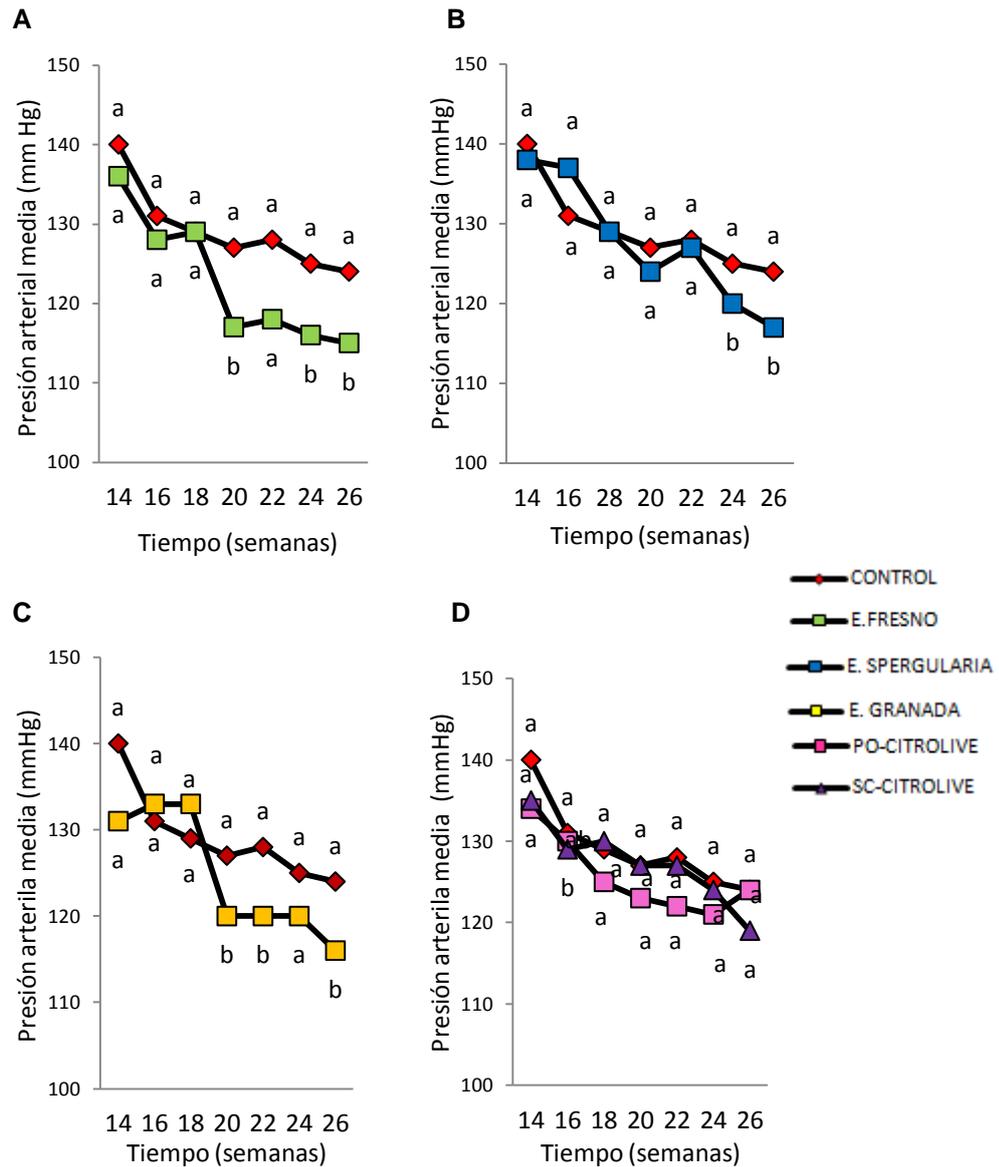


Figura 35. Evolución de la presión arterial media (PAM) medida por pletismografía en la cola de los ratones durante 14 semanas. En grupos experimentales que recibieron tratamiento con E. Fresno (A), E. Spargularia (B), E. Granada (C) y PO- Citrolive o SC- Citrolive (D). Los valores están expresados como media aritmética (n = 7-10). Los valores para un mismo tiempo con distinta letra, presentan diferencia significativa (p< 0,05), los valores ab no presentan diferencia significativa ni con a ni con b.

Resultados

▪ DETERMINACIÓN DE HOMOCISTEÍNA

Los niveles de homocisteína fueron un 44% superiores en el grupo control respecto al grupo experimental con **E. Fresno**, observándose diferencias significativas en la concentración de homocisteína entre ambos grupos ($p < 0,05$) (Figura 36A).

El tratamiento con **E.Spergularia** y **E. Granada** supuso una disminución no significativa del 3% y del 9% respectivamente (Figura 36B y 36C).

En los grupos **PO-Citrolive** y **SC-Citrolive** se redujo un 20% y un 12% los niveles de homocisteína respectivamente, apreciándose diferencias significativamente inferior sólo en el grupo **PO-Citrolive** ($p < 0,05$) y sin diferencia entre ambos grupos de tratamiento (Figura 36D).

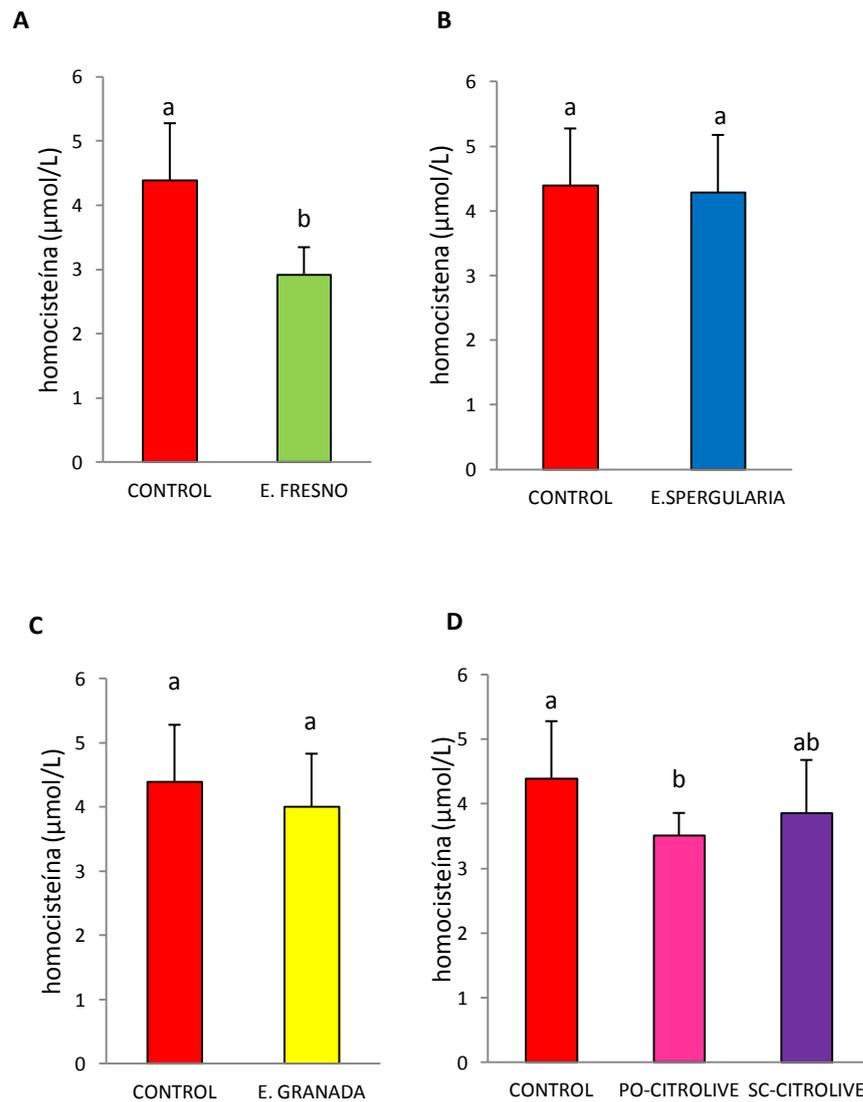


Figura 36. Niveles plasmáticos de homocisteína en el 7º mes en grupos experimentales que recibieron tratamiento con E. Fresno (A), E.Spergularia (B), E. Granada (C) y PO- Citrolive o SC-Citrolive (D). Los valores están expresados como media aritmética ($n = 7-10$) \pm DE. Los valores para un mismo tiempo con distinta letra, presentan diferencia significativa ($p < 0,05$), los valores ab no presentan diferencia significativa ni con a ni con b.

5. PARÁMETROS RELACIONADOS CON LA RESISTENCIA A LA INSULINA

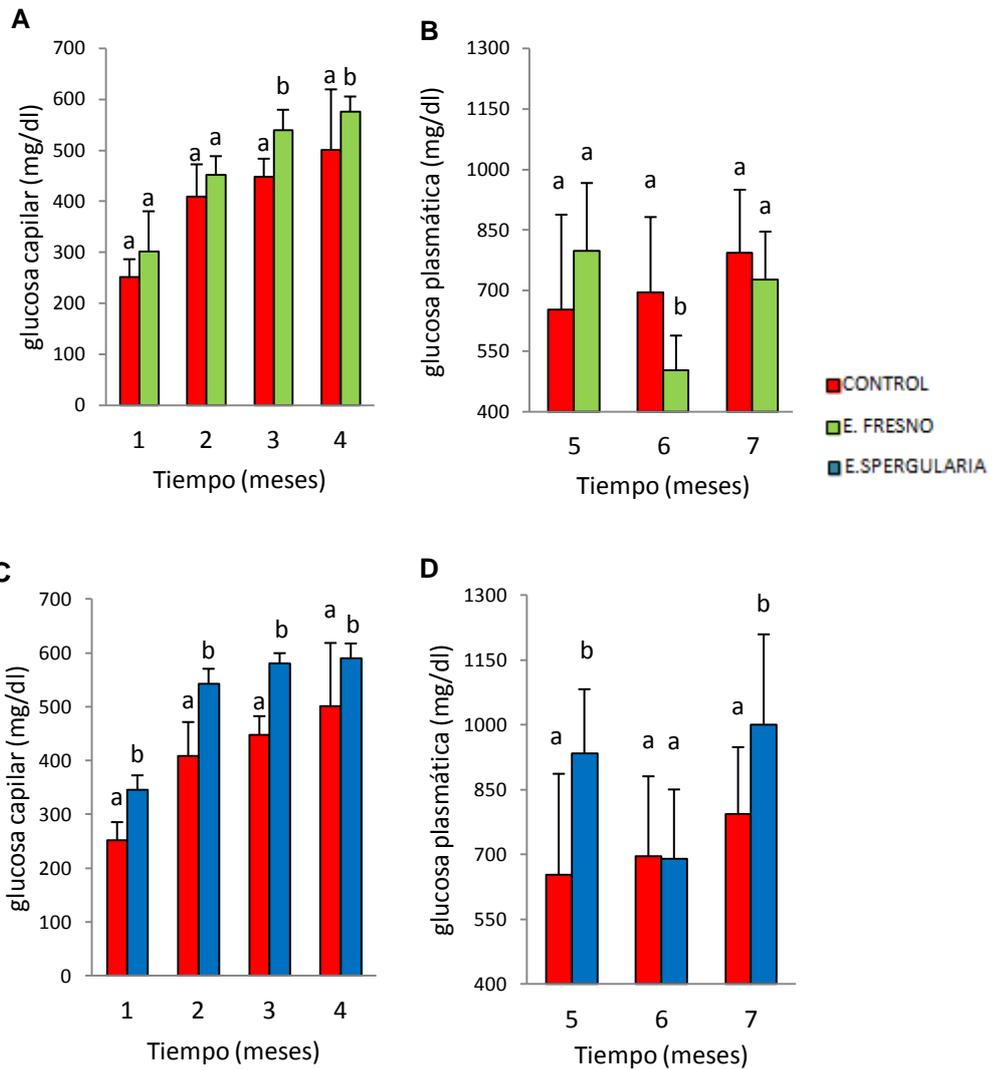
- DETERMINACIÓN DE GLUCOSA

Los niveles de glucosa aumentaron linealmente en el grupo tratado con **E. Fresno** en los 4 primeros meses, sin mostrar consecuencias clínicas. En los 2 últimos meses se apreció una mayor concentración plasmática de glucosa en el grupo control respecto al grupo de E. Fresno, con diferencia estadísticamente significativa en el 6º mes, siendo 1,5 veces superior en el grupo control respecto al grupo E. Fresno ($p < 0,05$) (Figura 37A y B).

El tratamiento con **E.Spergularia** mostró unos valores de glucosa superiores significativamente favorables para el grupo control a lo largo del experimento (Figura 37C y D).

A lo largo del experimento el grupo del **E. Granada** mostró un aumento progresivo y lineal de los niveles de glucosa, excepto en el 6º mes donde se vio una disminución significativa del 12% respecto al grupo control ($p < 0,05$) (Figura 37E y F).

Los dos grupos de tratamiento con **Citrolive** presentaron un aumento progresivo de los niveles de glucosa, siendo superior este aumento en el grupo SC-Citrolive y encontrando una diferencia significativa superior de éste respecto al grupo PO-Citrolive en el 5º y 7º mes ($p < 0,05$), sin apreciar diferencias respecto al grupo control (Figura 37G y H).



Resultados

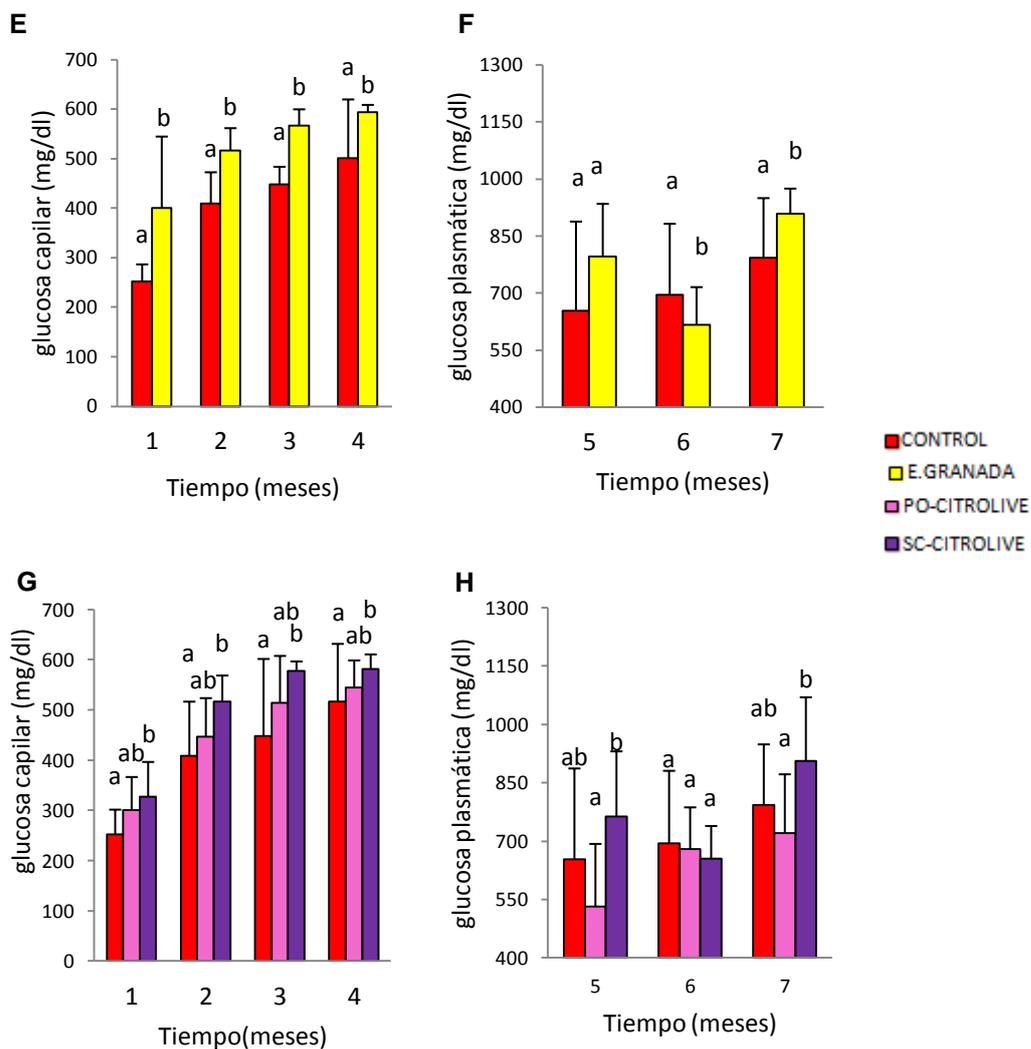


Figura 37. Concentración de glucosa capilar los 4 primeros meses de tratamiento con E. Fresno (A), E.Spergularia (C), E. Granada (E) y PO-Citrolive o SC-Citrolive (G) y de glucosa plasmática los últimos 3 meses en tratamiento con E. Fresno (B), E.Spergularia (D), E. Granada (F) y PO- Citrolive o SC- Citrolive (H). Los valores están expresados como media aritmética ($n = 7-10$) \pm DE. Los valores para un mismo tiempo con distinta letra, presentan diferencia significativa ($p < 0,05$), los valores ab no presentan diferencia significativa ni con a ni con b.

- HEMOGLOBINA GLICOSILADA (HbA1C)

Para monitorizar el control de la glucosa en los últimos meses se determinó el nivel de HbA1c plasmática al final del experimento, y se pudo ver como el tratamiento con **E. Fresno** redujo un 12% los niveles plasmáticos respecto al grupo control, sin embargo no presentó diferencias significativas entre ambos grupos (Figura 38A).

Los niveles plasmáticos de HbA1C fueron un 20% significativamente superior en el grupo de **E.Spergularia** respecto al grupo control a final del experimento (Figura 38B).

Se apreció un 10% mayor los niveles plasmáticos de HbA1C en el grupo **E. Granada** respecto al grupo control, pero sin diferencia significativa entre ambos grupos (Figura 38C).

Los niveles plasmáticos de HbA1C en los dos grupos de tratamiento con Citrolive también fueron superiores al final del experimento, pero sin diferencia significativa entre los tres grupos (Figura 38D).

Resultados

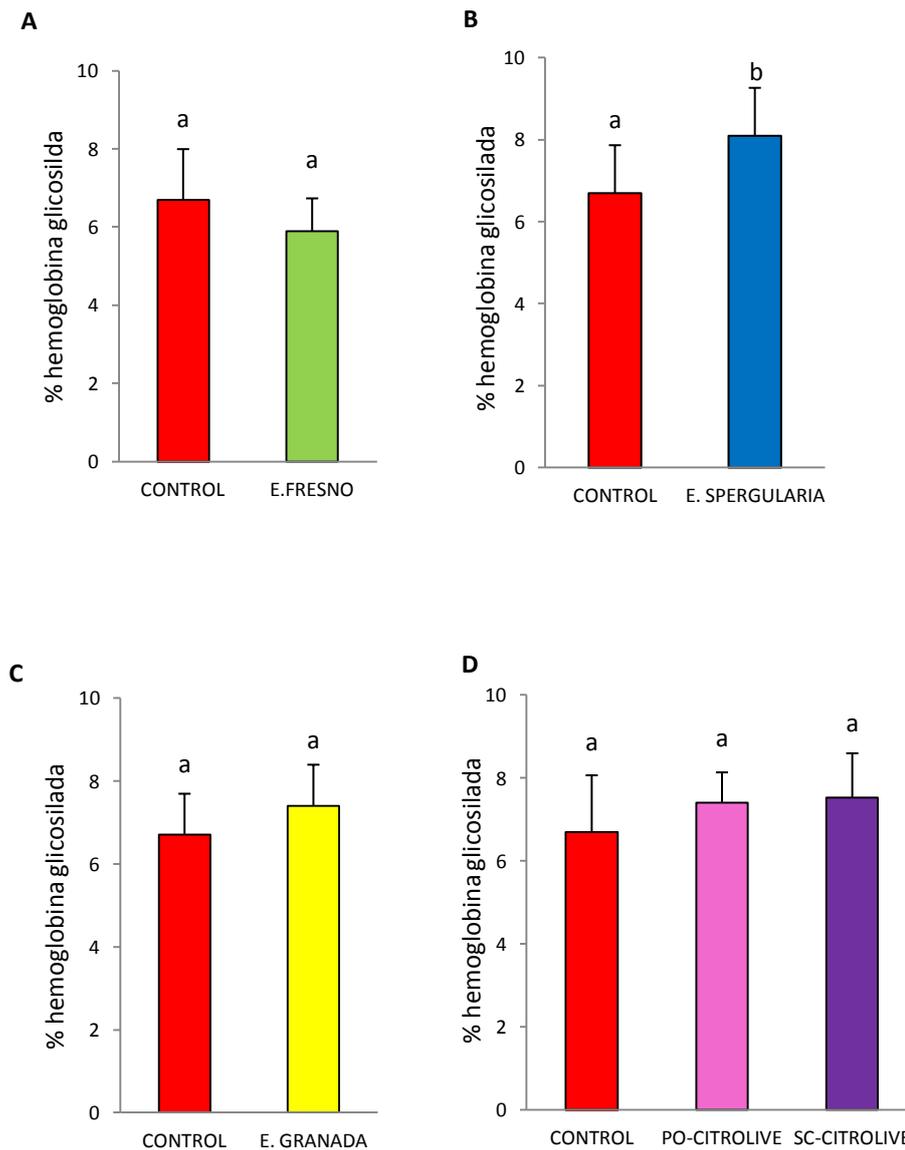


Figura 38. Niveles plasmáticos de hemoglobina glicosilada en el 7^o mes en grupos experimentales que recibieron tratamiento con E. Fresno (A), E.Spergularia (B), E. Granada (C) y PO- Citrolive o SC-Citrolive (D). Los valores están expresados como media aritmética (n = 7-10) ± DE. Los valores con distinta letra, presentan diferencia estadísticamente significativa (p< 0,05).

- DETERMINACIÓN DE INSULINA PLASMÁTICA

La administración de **E. Fresno** logró reducir un 22% los niveles de insulina respecto al grupo control en el 7º mes ($p < 0,05$) (Figura 39A).

El tratamiento con **E.Spergularia** disminuyó un 17% los niveles de insulina respecto al grupo control al final del experimento ($p < 0,05$) (Figura 39B).

Los niveles de insulina en el grupo de **E. Granada** fueron un 9% menor respecto al grupo control sin diferencias significativas entre ambos grupos (Figura 39C).

Los grupos PO-**Citrolive** y SC-**Citrolive** mostraron unos niveles de insulina un 17% y un 20% menor respecto al grupo control sin diferencias significativas entre los tres grupos (Figura 39D).

Resultados

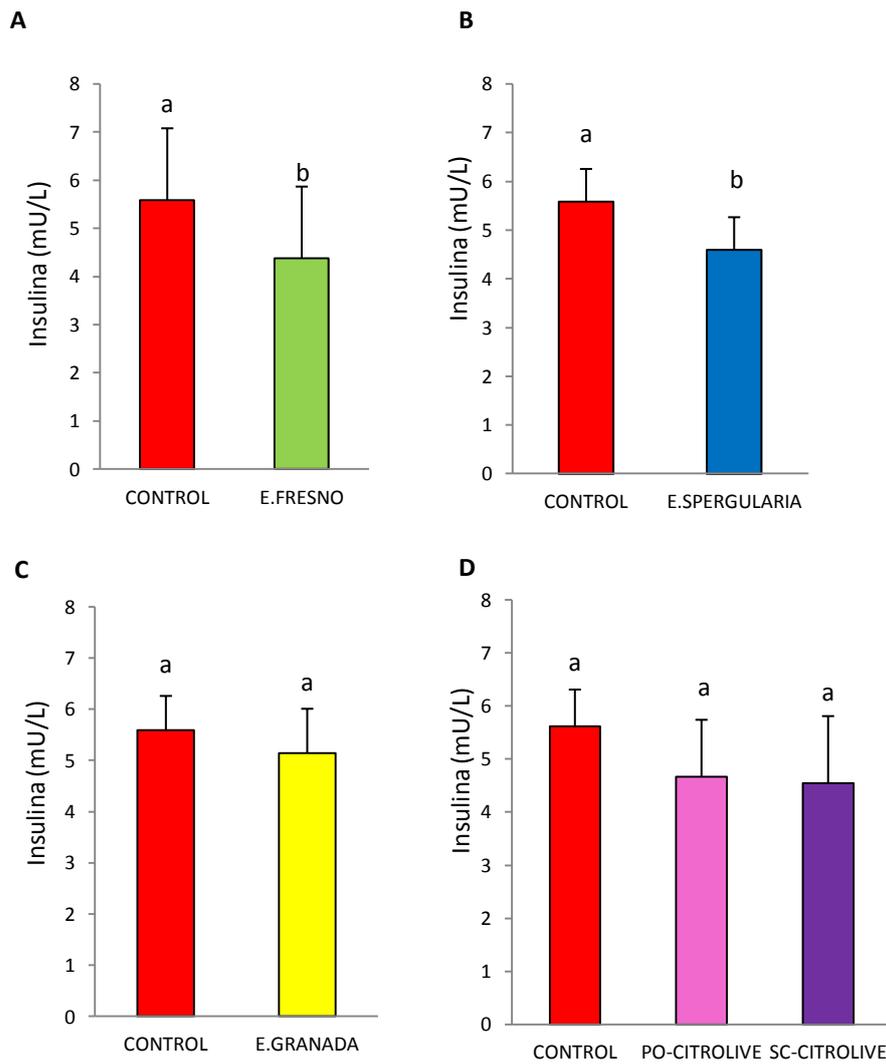


Figura 39. Niveles plasmáticos de insulina en el 7^o mes en grupos experimentales que recibieron tratamiento con E. Fresno (A), E.Spergularia (B), E. Granada (C) y PO-Citrolive o SC-Citrolive (D). Los valores están expresados como media aritmética ($n = 7-10$) \pm DE. Los valores con distinta letra, presentan diferencia significativa ($p < 0,05$).

- HOMA-IR

Este parámetro nos muestra la resistencia a la insulina, el grupo tratado con **E. Fresno** presentó un 46% menos de este valor que el grupo control ($p < 0,05$) (Figura 40A).

El grupo tratado con **E.Spergularia** presentó valores 1,3 inferiores respecto al grupo control, sin diferencias significativas (Figura 40B).

El grupo control presentó mayor resistencia a la insulina, con un parámetro HOMA-IR un 22% superior respecto al grupo de **E. Granada** al final del experimento, sin diferencias clínicamente significativas entre ambos grupos (Figura 40C).

El grupo PO-**Citrolive** y SC-Citrolive presentó un parámetro HOMA-IR un 12% y un 11% menos respecto al grupo control, sin diferencias significativas (Figura 40D).

Resultados

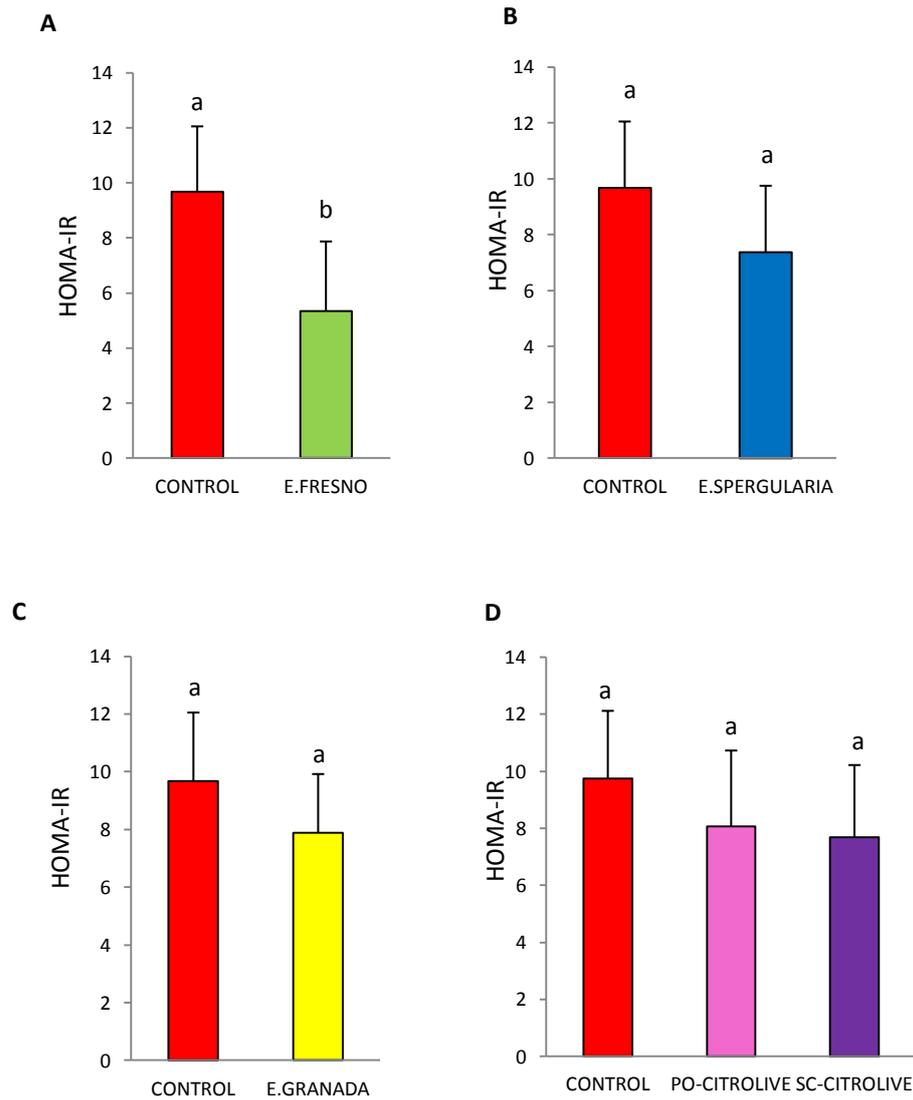


Figura 40. Parámetro HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment) en el 7^o mes en grupos experimentales que recibieron tratamiento con E. Fresno (A), E. Spargularia (B), E. Granada (C) y PO-Citrolive o SC-Citrolive (D). Los valores están expresados como media aritmética ($n = 7-10$) \pm DE. Los valores con distinta letra, presentan diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

VI.DISCUSIÓN

La prevalencia de la obesidad a nivel mundial ha crecido exponencialmente en las últimas décadas tanto en adultos, como en niños, como demuestran recientes estudios que estiman un aumento medio del índice de masa corporal (IMC) de $0,4\text{Kg/m}^2$ por década desde 1980 (Finucane, 2011). Son bien conocidas las consecuencias del exceso de peso sobre el sistema cardiovascular, respiratorio, digestivo, osteoarticular, reproductor y endocrino-metabólico, así como la relación entre obesidad y algunos tipo de cáncer.

Después de la inestimable pérdida que para el tratamiento de la obesidad supuso la retirada del mercado farmacéutico español (Agencia Española del Medicamento, 2008) e internacional de la molécula rimonabant (Acomplia®), volvemos a estar, por lo que respecta a número y diversidad de fármacos antiobesidad, en una situación realmente precaria. Hoy por hoy volvemos a tener sólo dos fármacos autorizados internacionalmente para el tratamiento de la obesidad: la sibutramina (Reductil®) y el orlistat (Xenical®). Sin embargo la Agencia Europea del Medicamento recomendó en enero del 2010 la “suspensión cautelar” de sibutramina, ya que el tratamiento presentaba más riesgos que beneficio, por lo que sólo se encuentra comercializado el orlistat.

Sin duda, el mejor tratamiento de la obesidad consistiría en la modificación de los hábitos de vida, combinando el ejercicio físico con una alimentación adecuada. Una posible contribución a dicha alimentación puede basarse en la inclusión de alimentos funcionales que contengan moléculas que, sin afectar al apetito, contribuyan a mejorar las alteraciones funcionales y metabólicas características de este síndrome. Este podría ser el caso de distintos polifenoles de la dieta, que han manifestado numerosas acciones beneficiosas para la salud, entre las que se encuentran efectos metabólicos.

Discusión

Todo ello hace de la obesidad un importante problema de salud a nivel mundial que demanda una urgente intervención terapéutica.

El objetivo de nuestro estudio fue analizar el efecto de cuatro clases de compuestos fenólicos: E. Fresno, E. Spergularia, E. Granada y Citrolive en un modelo experimental de ratón obeso y diabético.

Para ello, hemos utilizado como modelo experimental de obesidad el ratón hembra $LepR^{db/db}$ de 5 semanas de edad. En este periodo ya manifestaban la mayor parte de las alteraciones funcionales características de esta patología con respecto a los ratones normales de la misma edad: obesidad, hiperfagia, hiperglucemia, hiperlipemia, resistencia a la insulina e hipertensión moderada (Arion, 2010). Todas estas alteraciones se vieron incrementadas al transcurrir 10-12 semanas del periodo de experimentación.

La obesidad característica de este modelo animal, se debe a la resistencia a la leptina por parte de los receptores. Como consecuencia, se produce un excesivo almacenamiento de energía en forma de grasa. La leptina es una hormona producida por el tejido adiposo en proporción directa a la cantidad del mismo, de manera que un individuo obeso originará elevados niveles de leptina (Frühbeck, 2006). En situación de abundancia energética, la leptina, a través de sus receptores centrales y periféricos, envía mensajes para reducir la ingesta de alimento y aumentar el gasto energético mediante la activación de la AMPK (Protein kinasa activada por 5'-adenosin monofosfato), rutas de termogénesis y disipación de energía. En el marco de unos receptores afuncionales, como es el caso de los roedores $LepR^{db/db}$, estas señales no llegan a su destino y no se ponen en marcha tales mecanismos. El organismo interpreta una situación de déficit energético y dirige sus esfuerzos a la captación y acumulación de energía en forma de tejido adiposo.

La elección de este modelo espontáneo con una alteración genética, garantizó unas condiciones homogéneas en todos los grupos experimentales, como podemos apreciar en los resultados mostrados, a diferencia de lo que podría ocurrir con otros modelos inducidos, por ejemplo, con dieta rica en lípidos (Burcelin, 2002), lo que facilitó la planificación y desarrollo del estudio.

Aunque existían otros modelos murinos ideales para estudiar la obesidad (Arion, 2010), elegimos este modelo animal porque nos permitía también estudiar la diabetes secundaria que desarrollan los animales, ya que este trabajo forma parte de un proyecto que pretende estudiar el efecto de diversos polifenoles sobre distintas patologías. Por ejemplo el modelo ob/ob posee características similares al elegido por nosotros ($LepR^{db/db}$), sin embargo no presenta una hiperglucemia tan acusada.

Al inicio de nuestro experimento, todos los animales del estudio, con 5-6 semanas de edad, presentaban un peso corporal homogéneo de 28 ± 3 g. Al finalizar el estudio, con 28 semanas (7 meses) los animales controles presentaron un peso corporal de 45 ± 6 g. Estos datos se correspondían con la curva de crecimiento estándar de este modelo animal (Barouch, 2003) en el que la obesidad está descrita ya desde edades muy tempranas y completamente instaurada hacia el 4^o-5^o mes, aumentando a lo largo de la vida del animal hasta los 5-6 meses que comienza a descender, pudiendo llegar a alcanzar en su pico máximo los 60 g.

La obesidad presente en este modelo animal, se debe a la mutación que afecta al receptor para la leptina. Como consecuencia de esta mutación se produce una disfunción del receptor para la leptina, que se traduce tanto en una disminución en el número de receptores

Discusión

expresados en la superficie celular como en la alteración en la cascada de señalización intracelular mediada a través de dicho receptor, lo que conduce en última instancia a una marcada resistencia a la acción de la leptina.

Esta mutación no implica una ausencia total del efecto de la leptina (Crouse, 1998; Da Silva, 1998). Los animales homocigotos para el alelo *db* (*db/db*) son manifiestamente obesos a las 5 semanas de vida; a las 14 semanas, su composición corporal contiene más de un 40% de lípidos. Como consecuencia de procesos de hipertrofia e hiperplasia, el crecimiento del tejido adiposo en el ratón *db/db* es anormal desde las primeras semanas de vida, fenómeno indicativo de la alteración de mecanismos relacionados con el mantenimiento de la homeostasis energética desde el nacimiento y que posteriormente se ven agravados por el comportamiento hiperfágico (Arion, 2010).

Todos los animales de todos los grupos en estudio, salvo los del grupo PO-Citrolive, mostraron menor peso al final del estudio que el grupo Control, siendo significativa dicha diferencia solamente para el grupo del E. *Spergularia*.

El uso de estos polifenoles, sobre todo el E. Fresno, ya ha sido descrito en patologías como la obesidad (Ibarra, 2011), por su acción en la inhibición de la diferenciación de los adipocitos y por la inhibición del metabolismo de los lípidos a través del aumento de la modulación de la vía de señalización del PPAR- α (Peroxisome proliferator-activated receptor alpha), la cual está involucrada en la homeostasis energética (Bai, 2010).

Efectos similares sobre la disminución del peso corporal se han descrito en estudios realizados con E. *Spergularia* (Jouad, 2000; Jouad 2003). Este efecto reductor de peso corporal, se ha relacionado, en

parte, con la capacidad de *E. Spergularia* para secretar GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) (Jouad, 2000). El GLP-1 es una hormona gastrointestinal, secretada principalmente después de las comidas, lo que estimula la utilización de glucosa por aumento de sensibilidad a la insulina e inhibe la liberación de glucagón, inhibiendo con ello la vía de glucogénesis (Holst, 2008).

Los resultados obtenidos con *E. Granada* revelaron también un efecto reductor en el peso corporal de los animales de ese grupo, así como un menor índice de conversión alimenticio, coincidiendo estos resultados con diversos estudios que han mostrado una disminución de la obesidad relacionada con la inflamación (Hontecillas, 2009) y una reducción en la ganancia de peso en ratones tratados con *E. Granada* (Vroegrijk, 2011).

La diferencia observada respecto al peso corporal entre las dos vías de administración del Citrolive (oral e inyectado), puede relacionarse con la farmacocinética que sufre el producto una vez administrado, que va a depender de la biodisponibilidad de cada uno. Aparentemente, los animales que ingirieron PO-Citrolive engordaron más y los del grupo SC-Citrolive menos. Sin embargo, cuando se evaluó el índice de conversión alimenticio los datos fueron significativamente favorables para ambos grupos de Citrolive, es decir que aunque comieron más, “engordaron” proporcionalmente menos ($p < 0,05$).

Diversos polifenoles han demostrado su efecto biológico sobre la obesidad mediante la modulación de la absorción de glucosa en el tejido adiposo y en el músculo esquelético, al suprimir la expresión de factores de transcripción relacionados con la adipogénesis (Ashida, 2004). Otros estudios se centran en la modulación de la actividad de la lipasa pancreática (LP) (De la Garza, 2011). Este enzima posee una

Discusión

acción clave en la digestión de los triglicéridos (Lowe, 2002) y se ha utilizado para evaluar el potencial de eficiencia de productos naturales como agentes antiobesidad (Sugiyama, 2007).

Partiendo de los datos obtenidos de la ingesta de alimento, se calculó el índice de conversión alimenticio a partir de valores globales por grupo. Para realizar una determinación exacta del índice de conversión hubiera sido necesario llevar a cabo un estudio en jaulas metabólicas, realizando previamente un análisis de palatabilidad de los productos del estudio que se deseaban administrar con el alimento, para descartar cualquier efecto que se pudiera atribuir a estos efectos.

Por lo tanto, una limitación del estudio, correspondió a la monitorización de la ingesta individual durante todo el experimento. A pesar de ello, este índice mostró ser inferior en todos los grupos tratados con respecto al control, lo que indicaría un balance energético negativo, ya que para incrementar 1 gramo de peso , los animales tratados deben ingerir un mayor volumen de alimento que los animales controles. Podría ser que ese índice negativo se relacione con un mayor gasto energético por parte de los animales tratados, congruente con la mayor actividad que éstos podrían presentar, o bien porque desperdiciaran más alimento y ello hubiera hecho elevar el promedio de ingesta mensual de los animales, por lo que esta última opción se asociaría con un mejor estado, por una mayor actividad física.

Consideramos que este hecho pone de manifiesto la hiperfagia característica de los animales de este modelo, que es más notoria en las primeras semanas de vida, estabilizándose hacia la semana 10. En ese momento cobran mayor importancia otros mecanismos en el desarrollo de la obesidad (Vasselli, 1985). Este aumento de la ingesta tiene su origen en el deterioro de la acción de la leptina y, por lo tanto,

uno de sus principales efectos, el control de la ingesta, se encuentra comprometido (Niswender, 2001).

Generalmente, la obesidad “exige” un mayor esfuerzo cardiaco, y como consecuencia, un cierto grado de hipertrofia cardiaca, que puede causar cardiomegalia. El consumo de los polifenoles pareció reducir este efecto, siendo el tamaño de los corazones mayor en el grupo control que en los grupos tratados con polifenoles, apreciándose una diferencia significativamente menor en el grupo SC-Citrolive, lo que podría justificarse con el menor peso de este grupo de tratamiento vs grupo PO-Citrolive y grupo control y la importancia de la diferente biodisponibilidad de las dos vías de administración de Citrolive. Existen estudios que demuestran que el consumo de flavonoides disminuye el riesgo de mortalidad y morbilidad por enfermedades cardiovasculares (Grassi, 2009).

Este efecto ha sido comprobado sobre todo en los polifenoles presentes en el vino y las verduras debido a su protección antioxidante. Tal vez el compuesto más estudiado en este contexto sea el resveratrol. Se ha demostrado que el resveratrol ejerce efectos protectores en el modelo de ratones deficientes en la apolipoproteína E (Do, 2008), actuando sobre la concentración sanguínea de lípidos y sobre el desarrollo de la placa aterosclerótica. Esta molécula también reduce la infiltración celular, la fibrosis y la expresión de citoquinas inflamatorias en un modelo de miocarditis autoinmune (Yoshida, 2007). El mecanismo parece ser, al menos en parte, antiinflamatorio, ya que disminuye la expresión de ICAM-1 (intercelular adhesion molecule 1) y VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) en los vasos sanguíneos disminuyendo la adhesión celular y el proceso inflamatorio.

Discusión

La adiponectina es una adipocitocina, que a diferencia de otras, ve reducida su expresión en tejido adiposo y su concentración plasmática tanto en individuos con sobrepeso y obesos (Beltowski, 2003; Ouchi, 2003), como en modelos de obesidad animal, como por ejemplo en ratones deficientes en leptina (ob/ob), ratones resistentes a la leptina (db/db) y ratones alimentados con dietas ricas en grasas (Scherer, 1995; Beltowski, 2003;).

Los resultados obtenidos en nuestro estudio, muestran cómo el aporte de polifenoles en la dieta en ratones obesos resistentes a la leptina (db/db), provocó un aumento del nivel de adiponectina en suero tras 7 meses de tratamiento, al igual que otros estudios realizados con flavonoides en modelos de ratones (Shabrova, 2011).

De todos los tratamientos, la mayor diferencia significativa se observó con el grupo del E. Spergularia, coincidiendo con el grupo que presentó la mayor diferencia en cuanto a la reducción de peso corporal. Estos datos son concordantes con otros estudios, donde se ha visto la relación inversa que existe entre el porcentaje de grasa corporal y los niveles plasmáticos de adiponectina (Ouchi, 2003; Tesauro, 2012; McCourt, 2013). La pérdida de peso corporal en ratones obesos también supone un incremento de la expresión de adiponectina (Ouchi, 2003).

Entre los grupos tratados con SC-Citrolive, a pesar de ser mayores los niveles de adiponectina respecto al control, no se hallaron diferencias significativas, comportamiento similar al observado con el peso, pero sí manifestaron diferencias entre las dos vías de administración, dando mejores resultados la administración parenteral que la oral, al igual que ocurrió con el peso.

El mecanismo por el que la secreción de adiponectina está reducida en los individuos obesos es desconocido. Dado que la adiponectina se estimula por la insulina y se inhibe por el TNF- α , la resistencia a la insulina y el incremento en la expresión de TNF- α podrían contribuir a este efecto. Por el contrario, la reducción del peso corporal mediante dietas hipocalóricas o el tratamiento quirúrgico de la obesidad provocan una elevación de la adiponectina en el plasma (Beltowski, 2003; Ouchi, 2003). Dicha relación coincide con los resultados obtenidos, donde existe una relación directa entre el peso corporal y la concentración plasmática de TNF- α , e inversamente proporcional a la concentración plasmática de adiponectina.

En los últimos años se ha puesto de manifiesto que la obesidad se asocia a un proceso inflamatorio crónico, ya que existe un aumento de los niveles circulantes de citoquinas proinflamatorias como la interleuquina 6 (IL6) y TNF α , y una concentración plasmática menor de adiponectina (con efectos protectores antiinflamatorios). Las propiedades de los flavonoides como antiinflamatorios ha sido demostrada en numerosos estudios previos (Benavente-García, 2008, Dassprakash, 2012). Así, una reducción de la concentración de TNF- α se traduciría en una menor inflamación y un menor peso corporal (Kern, 1995a; Kern, 2001; Hontecillas, 2009). El consumo de polifenoles ha mostrado en estudios previos, la reducción de los niveles de TNF- α (Shanmugam, 2008).

Dada la importante contribución del desequilibrio que existe en el tejido adiposo de los ratones LepR^{db/db}, analizamos los efectos de la administración crónica de los diferentes polifenoles sobre la secreción de las citoquinas TNF- α (inflamatoria) y adiponectina (antiinflamatoria) en plasma. A los 7 meses de tratamiento, la concentración de TNF- α fue superior en el grupo control respecto a los grupos tratados, a excepción del grupo PO-Citrolive que fue ligeramente superior.

Discusión

Simultáneamente se produjo un aumento en la concentración de adiponectina, lo que demuestra que se redujo el estado inflamatorio general de los animales tratados, con la consiguiente reducción de peso.

La evolución de la concentración plasmática de TNF- α a lo largo del estudio mostró un aumento progresivo tanto en el grupo control, como en los grupos tratados, excepto para el grupo de tratamiento con E. Granada, que fue el único que consiguió reducir los niveles de TNF- α desde el principio del estudio hasta el final, encontrando una concentración un 40% menor a los 7 meses respecto al grupo control.

La actividad antiinflamatoria in vitro de E. Granada ha sido previamente demostrada en diversos estudios (Dassprakash, 2012; Karasu, 2012). Los resultados obtenidos por nosotros coinciden con trabajos consultados sobre el efecto de E. Granada, donde se ha observado una supresión de la obesidad, relacionada con la inflamación (Hontecillas, 2009; Bekir, 2013). Hontecillas et al (2009), demostraron que algunos de los efectos beneficiosos del E. Granada están mediados por la activación de PPAR- γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma).

Otros estudios han encontrado que el E. Granada inhibe el TNF- α inducido por hiperactivación de neutrófilos y protege de la inflamación colónica experimental en ratas y humanos (Boussetta, 2009; Hollebeeck, 2012). Los ácidos grasos conjugados, tales como el ácido linoleico y ácido linolénico han atraído recientemente importante atención debido a sus beneficios para la salud en una variedad de modelos de enfermedades inflamatorias y metabólicas crónicas. El ácido linoleico ejerce sus acciones sensibilizantes a la insulina y anti-inflamatorias a través un mecanismo dependiente de la activación de la

proliferación de PPAR γ (Moya-Camarena, 1999; Bassaganya-Riera, 2004). El ácido linoleico está presente en E. Granada (Sassano, 2009).

Analizando los resultados obtenidos, podemos proponer como mecanismo implicado en el estado inflamatorio, un aumento de la expresión de iNOS (Óxido nítrico sintasa inducible) en detrimento de la isoforma constitutiva endotelial (eNOS), dañando la producción de NO (óxido nítrico) vasodilatador a nivel endotelial y favoreciendo el estado inflamatorio sistémico y las alteraciones metabólicas y vasculares (Kapur, 2000). En este sentido, la actividad antiinflamatoria que se manifiesta en el tejido adiposo con el aumento de la secreción de adiponectina en detrimento de la de TNF- α conllevaría el restablecimiento del equilibrio eNOS/iNOS. El efecto antioxidante que presentan los polifenoles y la mejora de la respuesta a la insulina que producen, también podrían contribuir al efecto antiinflamatorio y por consiguiente, a la mayor pérdida de peso.

El efecto beneficioso de los flavonoides en los niveles de colesterol ha sido ensayado previamente (Aviram, 2008; Benavente-García, 2008). En conejos alimentados con una dieta rica en colesterol, un polifenol como la quercetina, redujo la hiperlipidemia y el estado oxidativo de los vasos sanguíneos (Kamada, 2005).

En nuestro trabajo los niveles de colesterol fueron en general superiores en el grupo control respecto a los grupos tratados, apreciándose una mayor diferencia a mitad del experimento, siendo un 18% ($p < 0,05$), 16%, 13%, 3% y un 13% ($p < 0,05$) menor en el grupo del E. Fresno, E. Spergularia, E. Granada, PO-Citrolive y SC-Citrolive respectivamente. Estos resultados coinciden con estudios previos, donde el E. Spergularia ya mostró una reducción de colesterol en ratas normales y en ratas con diabetes reciente (Jouad, 2003). El zumo del E. Granada disminuyó el nivel de colesterol sérico y la peroxidación

Discusión

lipídica en ratones. La captación de LDL se redujo en 27% en los macrófagos peritoneales de ratones en comparación con ratones tratados con placebo (Aviram, 2008); datos similares fueron reportados en estudios con ácido elágico, presente en el E. Granada (Yoshimura, 2013).

Las principales moléculas presentes en Citrolive son hidroxitirosol y oleuropeína. Numerosos estudios realizados tanto en animales como en voluntarios humanos, han demostrado la capacidad de Citrolive para reducir los niveles plasmáticos de triglicéridos y LDL-Colesterol oxidado, mejorando el perfil lipídico y disminuyendo el índice aterogénico (Bok, 1999; Benavente- García, 2008). Un estudio de administración de polifenoles en hamsters hipercolesterolémicos dio resultados similares (Auger, 2005). Al igual que la mayoría de los efectos beneficiosos de los polifenoles, los efectos hipolipemiantes se han atribuido a su actividad antioxidante, puesto que inhiben la oxidación de las LDL (lipoproteínas de baja densidad). Pese a ello, se plantea también la implicación de otros mecanismos, como pueden ser modificaciones en la absorción hepática de colesterol, cambios en el ensamblaje y la secreción de triglicéridos o mediante efectos antiinflamatorios (Zern, 2005).

Nuestros resultados apuntan a que el descenso en los niveles de lípidos en plasma es secundario al efecto antiinflamatorio y a la mejora en la resistencia a la insulina.

Por otra parte, no se descarta que la reducción de la hiperlipidemia pueda estar además, reforzada por el efecto antioxidante directo de los polifenoles sobre la oxidación de LDL (Frankel, 1993) u otros mecanismos. En este sentido, los flavonoides también han sido descritos como moduladores de la homeostasis lipídica en tejido

adiposo e hígado mediante la inhibición de fosfodiesterasas (Peluso, 2006).

El estudio de Zang et al (2006) atribuye el efecto hipolipemiante a la activación de la AMPK que pueden producir los polifenoles. La activación de la AMPK favorece la oxidación de los lípidos en la mitocondria y reduce su síntesis. Además, la AMPK dificulta la excesiva movilización de ácidos grasos desde el tejido adiposo (Daval, 2005). Por otro lado, el efecto antiinflamatorio de los polifenoles también contribuye al efecto hipolipemiante, ya que una reducción de la concentración de TNF- α reduce el estado inflamatorio del tejido adiposo y con ello la lipólisis y liberación de AGL al torrente circulatorio (Cawthorn, 2008).

En cuanto a los otros parámetros lipídicos, al inicio del experimento todos los grupos mostraron hipertrigliceridemia (>200mg/dl), elevados niveles de AGL (> 1mmol/L) y unos niveles de HDL-C de 73 ± 9 , característico de este modelo animal (Arion, 2010). Los altos niveles de AGL no mostraron cambios a lo largo del experimento en ningún grupo, mientras que los niveles de HDL-C solo mostraron un aumento significativo de un 28% en el grupo SC-Citrolive frente al grupo control.

El tratamiento con E. Fresno logró reducir un 25% los niveles de triglicéridos respecto al grupo control al final del estudio, sin embargo, al contrario de otros estudios (Auger, 2005), el tratamiento con extractos polifenólicos en el resto de tratamientos no mostró una mejoría en dicho niveles.

El hígado es uno de los principales órganos responsables en el control del metabolismo glucídico y lipídico. Este modelo animal, debido a la resistencia a la leptina, manifiesta un acúmulo de grasa en tejidos

Discusión

no adiposos, como es el caso del hígado, por lo que es de esperar encontrar hepatomegalia y esteatosis hepática. El hígado es un órgano con gran implicación en las manifestaciones de la obesidad, lo que motivó al estudio anatomopatológico de dicho órgano.

La obesidad está asociada con esteatosis, una acumulación patológica de lípidos dentro de los hepatocitos (Kleiner, 2012). Este modelo animal manifiesta un acúmulo de grasa en tejidos no adiposos, como es el caso del hígado, por lo que es de esperar encontrar hepatomegalia y esteatosis hepática no alcohólica.

Así, el peso del hígado de los grupos tratados con E. Fresno, E. Spergularia y E. Granada fue un 18%, 21% y 17% menor respectivamente frente al grupo control, siendo significativamente inferior solo en el grupo del E. Spergularia. En los grupos tratados con PO-Citrolive se apreció un incremento significativo de un 13% del peso hepático respecto al grupo control, y de un 32% respecto del grupo SC-Citrolive, lo que estaría justificado por el mayor peso corporal del grupo PO-Citrolive y la menor concentración de adiponectina en este grupo.

En el estudio anatomopatológico, los hígados de los animales alimentados con polifenoles presentaron un porcentaje de grasa un 77%, un 52%, un 65%, un 27% y un 64% menor para el grupo del E. Fresno, E. Spergularia, E. Granada, PO-Citrolive y SC-Citrolive respectivamente respecto al grupo control. El grado de esteatosis observado fue de grado 1, según la clasificación de la AASLD (American Association for the Study of liver Disease (Neuschawander, 2003) para todos ellos, excepto para el grupo Control y el grupo PO-Citrolive que fue grado 2, coincidiendo con el mayor peso corporal de estos grupos.

La esteatosis hepática está relacionada en este modelo con la resistencia a la leptina. De hecho, en modelos experimentales de obesidad inducida por una dieta rica en grasa en roedores sanos, el aumento del tejido adiposo que se produce, conduce a un aumento en la producción de leptina (Zhang, 2002) y de su concentración en plasma. La leptina ejerce su efecto protector y el depósito extra-adiposo de lípidos es mínimo. Por el contrario, en animales resistentes a la leptina, como es nuestro caso, este depósito de lípidos es mucho mayor incluso cuando se les alimenta con una dieta baja en grasa (Lee, 2001). Se indica así que la leptina determina el destino del exceso de grasa aportado por la dieta.

Por otra parte, se ha propuesto que diferentes polifenoles presentan una acción activadora de AMPK (Zang, 2006). La AMPK está presente en la mayoría de los órganos incluyendo el hígado, músculo esquelético, corazón, hipotálamo e incluso en las células adiposas. La AMPK participa en la regulación de la glucólisis, en la entrada de glucosa, en la oxidación de lípidos, en la síntesis de ácidos grasos, en la síntesis de colesterol y en la gluconeogénesis, por lo que ha sido considerada como una enzima diana en el posible tratamiento de algunas enfermedades como lo son la obesidad, la diabetes mellitus tipo 2 y la esteatosis hepática. Así, la reducción plasmática de la producción de TNF- α y el aumento de la secreción de adiponectina, originada por el tratamiento con polifenoles, puede ser responsable de la activación de la AMPK en el hígado (Yamauchi, 2002) y su consecuente reducción de esteatosis frente al grupo control.

En este modelo animal, entre los 3 ó 4 meses de edad, puede aparecer una hipertensión moderada, basada en una disfunción endotelial producida por varios posibles factores. Los factores que pueden influir en su aparición son:

Discusión

- Desaparición del efecto vasodilatador que ejerce la leptina al unirse a sus receptores endoteliales (Winters, 2000).
- Efecto negativo del exceso de insulina en plasma sobre la vasodilatación por aumento de los receptores para la endotelina-1 (Wu, 2000).
- Aumento de la expresión de la isoforma inducible de la NOS (iNOS) en detrimento de la isoforma constitutiva endotelial (eNOS), dañando la producción de NO (óxido nítrico) vasodilatador a nivel endotelial y favoreciendo el estado inflamatorio sistémico y las alteraciones metabólicas y vasculares (Kapur, 2000).
- Hipertrofia ventricular izquierda presente en este modelo animal, debido a la resistencia de la leptina, ya que tiene efectos antihipertróficos en el corazón, ya sea directamente o través de una vía neurohumoral regulado por la leptina. La interrupción de la señalización de la leptina puede representar un nuevo mecanismo en los trastornos cardiovasculares relacionados con la hipertrofia ventricular izquierda debido al aumento de la carga hemodinámica (Barouch, 2003).

Los ratones tratados con E. Fresno, E. Spergularia y E. Granada, revelaron valores de presión sistólica menores, con una diferencia de aproximadamente 17 ± 3 mmHg respecto al grupo control al final del experimento. El tratamiento con Citrolive en diferentes vías, mostró un efecto beneficioso a favor de SC-Citrolive de 12mmHg respecto al grupo control, sin encontrar diferencias respecto al grupo PO-Citrolive, marcando de nuevo la importancia que juega la biodisponibilidad del producto.

Estos datos coinciden con otros estudios realizados con E. Granada en ratas Wistar diabéticas, donde una administración crónica del E. Granada (100 mg/kg y 300 mg/kg; durante 4 semanas) redujo la presión sanguínea arterial media y revirtió los cambios bioquímicos

inducidos por la diabetes y angiotensina II, probablemente por la inhibición de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) (Mohan, 2010).

En ratas Zucker obesas, el tratamiento con E. Granada disminuyó significativamente la expresión de marcadores de inflamación vascular, trombospondina ($p < 0,05$) y aumentó la expresión de la óxido nítrico sintasa endotelial. El nitrato del plasma y los niveles de nitrito se incrementaron de manera significativa por los E. Granada ($p < 0,05$). Este estudio concluyó que los E. Granada pueden ejercer efectos beneficiosos sobre la función arterial en ratas Zucker obesas (de Nigris, 2007).

Asimismo, otros flavonoides han demostrado sus propiedades antihipertensivas en distintos modelos experimentales de hipertensión arterial (Duarte, 2002; Galisteo, 2004; Sánchez, 2006). Dicho efecto ha sido relacionado con los beneficios que ejercen los flavonoides sobre el endotelio vascular, que se atribuyen, entre otros mecanismos, a su actividad antioxidante (Duarte, 2002).

Los niveles elevados de homocisteína se han relacionado con mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares y enfermedades neurodegenerativas (Sánchez, 2009). El valor plasmático de homocisteína en todos los grupos de tratamiento fue menor respecto a los animales del grupo control, apreciándose una mayor diferencia significativa en el grupo del E. Fresno. La homocisteína se encuentra implicada en el desarrollo de la arterosclerosis, parece ser que este aminoácido afecta a la sangre, de forma que las plaquetas se vuelven más adhesivas y, por lo tanto, favorecen la formación de coágulos. Éstos pueden llegar a obstruir completamente las arterias o las venas impidiendo la circulación de la sangre, lo que da lugar a las trombosis y otros accidentes vasculares. Dicha disminución corrobora los efectos

Discusión

beneficiosos de los polifenoles a nivel cardiovascular (Grassi, 2009).

Con objeto de analizar los efectos potenciales de los productos ensayados sobre los parámetros relacionados con la resistencia a la insulina, se realizaron las siguientes determinaciones: niveles de glucosa, Insulina plasmática, hemoglobina glicosilada, y el parámetro HOMA-IR.

Varios estudios *in vitro* en células cultivadas han demostrado que los polifenoles pueden aumentar la captación de glucosa por los tejidos periféricos. El ácido cafeico aumenta la captación de glucosa por los adipocitos y mioblastos de rata o ratón (Cheng, 2000; Hsu, 2000). Extractos de té negro y verde también aumentaron la captación de glucosa por los adipocitos de rata, tanto en la presencia o ausencia de insulina (Anderson, 2002). Sin embargo, resultados opuestos informaron también que la quercetina y la genisteína, inhiben tanto la captación de glucosa inducida por la insulina en adipocitos de rata como de hidrógeno peróxido en líneas de células leucémicas (Shisheva, 1992; Fiorentini, 2001).

Los polifenoles pueden ejercer acciones diferentes en tejidos periféricos que puedan disminuir la glucemia. Estos incluyen la inhibición de la gluconeogénesis (Arion, 1997; Liu, 2000), estimulación adrenérgica de la captación de glucosa (Cheng, 2000) o la estimulación de la liberación de insulina pancreática por las células β (Ohno, 1993). La implicación de estos mecanismos es todavía hipotética. El ácido p-hidroxibenzoico, que muestra los efectos hipoglucemiantes en ratas diabéticas cuando se someten a una prueba de tolerancia a la glucosa, no tuvo efecto sobre la insulinemia y el glucógeno hepático (Peungvicha, 1998). Por el contrario, algunos polifenoles podrían tener efectos opuestos y provocar la disminución de la captación de glucosa en los tejidos

periféricos mediante la inhibición del transportador de glucosa GLUT1, (Shisheva, 1992; Vera, 1996).

A pesar de que muchos flavonoides han demostrado ampliamente sus efectos beneficiosos en la prevención de la diabetes, en parte gracias a sus metabolitos fenólicos secundarios (Crozier, 2009), nuestros resultados no mostraron diferencias significativas en cuanto a la glucemia determinada mensualmente, salvo para el grupo del E. Fresno, que presentó una mejoría significativa en el 6º mes de tratamiento respecto al grupo control. Estos resultados coinciden con otros estudios realizados previamente con este producto (Ibarra, 2011), donde se obtuvieron reducciones de los niveles de glucosa de un 76, 52%.

Sin embargo, los resultados obtenidos respecto a la glucosa para el resto de grupos tratados resultan contradictorios respecto a otros estudios publicados (Hamden 2009; Jemai, 2009; Fuhrman, 2010), donde se pone de manifiesto los efectos beneficiosos de estos extractos frente a la diabetes.

La escasa respuesta obtenida a nivel de la glucemia de nuestros polifenoles, podría estar determinada por la elección del modelo. Debemos considerar que se trata de un modelo espontáneo diabético que presenta hiperglucemia desde la quinta semana de vida y teniendo en cuenta que estamos valorando extractos naturales, a pesar de haber mostrado beneficios en otros modelos experimentales (Hamden 2009; Jemai, 2009; Ibarra, 2011; Vinholes, 2011), es posible que no sean capaces, por sí solos, de contrarrestar los altos niveles plasmáticos de glucosa presentes en este modelo animal.

Por ello sería recomendable plantear el estudio en otro modelo, o asociar la administración concomitante de fármacos antidiabéticos

Discusión

junto con este tipo de extractos, para valorar su efecto sobre la glucemia.

También habría que considerar que la glucemia se puede ver alterada ante situaciones de estrés, hecho que puede producirse durante las manipulaciones de los animales para las extracciones o determinaciones de la glucemia, por ello se llevó a cabo la determinación de la hemoglobina glicosilada, cuyas determinaciones confirmaron que los altos niveles de glucosa se correspondían a elevados valores de hemoglobina glicosilada, siendo estos niveles incluso superiores para los grupos tratados que para los controles, excepto para el grupo del E. Fresno, donde fue un 12% menor respecto al grupo control.

Uno de los efectos más importantes para valorar el efecto de la resistencia a la insulina, fue el descenso de la concentración plasmática de insulina y del parámetro HOMA-IR en los grupos tratados comparados con el grupo control, sugiriendo una mejora de la respuesta a la insulina. Otros antioxidantes han sido estudiados ampliamente y existen trabajos que demuestran la capacidad de estos flavonoides para mejorar la sensibilidad a la insulina y el metabolismo glucídico (Kato, 2008).

Los mecanismos propuestos para estas acciones son fundamentalmente su actividad antioxidante, al igual que ocurre con otros compuestos similares como el epigalo-catecol-galato del té verde o el γ -tocoferol (Venables, 2008; Singh 2008), y el efecto antiinflamatorio, demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* en diferentes modelos experimentales de enfermedades inflamatorias (Hollebeeck 2012; Karasu 2012).

En nuestro trabajo, estos dos parámetros mostraron diferencias significativas en los resultados obtenidos para el grupo del E. Fresno, donde se apreció una disminución del 46 % en los niveles del HOMA-IR frente al grupo control, que se correspondió con un descenso del 22% en los niveles de insulina, lo que pone de manifiesto una menor resistencia a la insulina en los animales que tomaron E. Fresno frente al grupo control. Estos resultados se corresponden con menores niveles de glucosa y de hemoglobina glicosilada, a pesar de no presentar diferencias significativas con los controles.

En general, todos los grupos tratados con polifenoles presentaron menores niveles de insulina y de HOMA-IR que los animales del grupo control. Esto indica que, a pesar de que los niveles de glucosa y de hemoglobina glicosilada no presentaron diferencias significativas entre tratados y controles, excepto para el grupo del E. Fresno, no obstante si observamos diferencias que revelan que los animales tratados presentan menores niveles de insulina que los controles, presentando por ello menor resistencia a la insulina.

El origen de la resistencia a la insulina se podría atribuir a un componente inflamatorio, que se correlaciona con el aumento de la secreción de TNF- α y la disminución de la adiponectina, perdiéndose gran parte del efecto sensibilizador a la insulina de esta última adipocitoquina. En nuestro estudio, al final del experimento, los grupos tratados (excepto el grupo PO-Citrolive) presentaron un mayor nivel de adiponectina y un menor nivel de TNF- α respecto al grupo control. Dicha relación se tradujo en una menor resistencia a la insulina presente en los grupos tratados.

Discusión

Del análisis de los resultados obtenidos podemos proponer dos posibles mecanismos implicados en las propiedades de los polifenoles:

- La actividad antioxidante que presentan los flavonoides (Benavente- García, 2008) puede ser responsable directa de la mejora en la respuesta a la insulina, la reducción de la hiperlipidemia en alguno de los tratamientos y disminución de la tensión arterial.
- La actividad antiinflamatoria que se manifiesta con el aumento de la secreción de adiponectina en detrimento de la de TNF- α podría conllevar el restablecimiento del equilibrio eNOS/iNOS. El aumento de la secreción de adiponectina podría justificar la reducción de la esteatosis hepática a través de la activación de la vía de la AMPK en el hígado. Este mecanismo refuerza los efectos mediados por la actividad antioxidante.

En resumen, la obesidad es una enfermedad que ha ido aumentando su prevalencia en las últimas décadas. Son bien conocidas las consecuencias del exceso de peso sobre el sistema cardiovascular, digestivo, osteoarticular, endocrino-metabólico y algunos tipos de cáncer.

Los flavonoides han demostrado en diversos estudios, propiedades beneficiosas para la salud que incluyen, entre otros, efectos antiinflamatorios, antidiabéticos, antihipertensivos, cardioprotectores y antiobesidad.

Realizamos el estudio experimental con 60 ratones $LepR^{db/db}$ hembras (n=10) para conocer el efecto de 4 tipos de flavonoides: E. Fresno, E. Spergularia, E. Granada y Citrolive (por vía oral: PO-Citrolive y subcutáneo: SC-Citrolive) durante 7 meses.

En todos los grupos de tratamiento se observó una disminución del peso de los animales respecto a los del grupo control, excepto para el grupo PO-Citrolive. Dicha disminución se corroboró con un aumento mayor de adiponectina en los grupos tratados y menor TNF- α a nivel plasmático. El colesterol total plasmático fue menor en todos los grupos de tratamiento. La concentración de triglicéridos plasmáticos resultó menor a los 7 meses de tratamiento en los grupos del E. Fresno, E. Spergularia y PO-Citrolive. Asimismo existió un descenso mayor de la tensión arterial sistólica y diastólica en los grupos de tratamiento. La esteatosis hepática fue significativamente menor en todos los grupos de tratamiento (grado I en todos ellos, excepto en el grupo PO-Citrolive, que, como para el grupo control fue grado II).

Dichos datos demuestran el efecto beneficioso de la pérdida de peso traducido en una menor hipertensión arterial, un mejor perfil lipídico y una menor esteatosis de los grupos tratados con flavonoides.

Discusión

En general, los resultados de nuestro estudio corroboran los efectos beneficiosos de los polifenoles sobre las alteraciones metabólicas, convirtiéndolos en una herramienta potencial como constituyentes fundamentales en la preparación de alimentos funcionales orientados al tratamiento de patologías relacionadas con la obesidad. Sin embargo serían necesarios más trabajos que nos permitan ahondar en los diferentes mecanismos de acción de estas moléculas.

VII. CONCLUSIONES

1. La administración de los 4 agentes de polifenoles: E. Fresno, E. Spergularia, E. Granada y SC-Citrolive provocó la disminución del peso corporal de los animales desde los primeros meses de tratamiento, así como de los órganos estudiados (hígado y corazón) excepto para el grupo PO-Citrolive. El índice de conversión alimenticio fue menor en todos los grupos de tratamiento.
2. El perfil lipídico de los animales tratados mejoró respecto a los controles, siendo las concentraciones plasmáticas de colesterol total menores en todos los grupos de tratamiento, aumentando el HDL-C plasmático en los grupos del E. Fresno, E. Granada y SC-Citrolive y disminuyendo la concentración de triglicéridos plasmáticos en los grupos del E. Fresno, Spergularia y PO-Citrolive. La esteatosis hepática fue significativamente menor en todos los grupos de tratamiento (grado I en todos ellos, excepto en el grupo PO-Citrolive, que, como para el grupo control fue grado II).
3. Los niveles plasmáticos de adiponectina aumentaron y los de TNF- α disminuyeron en todos los grupos tratados (excepto para el grupo PO-Citrolive) respecto al grupo control.
4. La tensión arterial disminuyó a partir de las 18-20 semanas en todos los grupos de tratamiento excepto para el grupo PO-Citrolive. Los niveles plasmáticos de homocisteína también se vieron reducidos en todos los grupos de tratamiento.
5. La concentración de glucosa no mostró mejoría con ningún tratamiento, excepto para el grupo del E. Fresno en el sexto mes, siendo este grupo el único que mostró una menor concentración de hemoglobina glicosilada. Los niveles de insulina plasmática y el parámetro HOMA-IR fueron menor en todos los grupos, lo que refleja la menor resistencia a la insulina en los grupos tratados con polifenoles.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Abbasi F, Chu JW, Lamendola C, McLaughlin T, Hayden J, Reaven GM et al. Discrimination between obesity and insulin resistance in the relationship with adiponectin. *Diabetes* 2004; 53: 585-590.

Aderka D, Engelmann H, Maor Y, Brakebusch C, Wallach D. Stabilization of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptors. *J Exp Med.* 1992; 175:323-9.

Alcaraz Acevedo C, Castillo J, Benavente-Garcia O, Armero D, Vicente V, et al. Liposoluble antioxidants provide an effective radioprotective barrier. *Br J Radiol.* 2009; 82(979):605-9.

Alfalah H, Philippe B, Ghazal F, Jany T, Arnalsteen L, Romon M, et al. Intra-gastric balloon for preoperative weight reduction in candidates for laparoscopic gastric bypass with massive obesity. *Obes Surg.* 2006; 16: 147-50.

Amin D, Gustafson SK, Weinacht JM, Cornell SA, Neuenschwander K, Scotese AC, et al. RG 12561 (Dalvastatin): A novel synthetic inhibitor of HMG-CoA reductase and cholesterol-lowering agent. *Pharmacology.* 1993; 46:13-22.

Anderson RA, Polansky MM. Tea enhances insulin activity. *J Agric Food Chem.* 2002; 50:7182–7186.

Antic V, Dulloo A, Montani JP. Multiple mechanisms evolved in obesity-induced hypertension. *Heart Lung Circ.* 2003; 12: 84-93.

Arai Y, Watanabe S, Kimira M, Shimoi K, Mochizuki R, Kinae N. Dietary intakes of flavonols, flavones and isoflavones by Japanese women and the inverse correlation between quercetin intake and plasma LDL cholesterol concentration. *J Nutr.* 2000;130 (9):2243-50.

Bibliografía

Aranceta J, Pérez Rodrigo C, Serra Majem L, Vioque J, Tur Marí JA, Mataix Verdú J, et al. Estudio DORICA: dislipemia, obesidad y riesgo cardiovascular. En: Aranceta J, Foz M, Gil B, Jover E, Mantilla T, Millán J, et al, editores. Obesidad y riesgo cardiovascular. Estudio DORICA. Madrid: Panamericana. 2004:125-56.

Aranceta-Bartrina J, Serra-Majem LI, Foz-Sala M, Moreno-Esteban B Y Grupo Colaborativo SEEDO. Prevalencia de Obesidad en España. Med Clin (Barc). 2005; 125 (12):460-6.

Arion J. Kennedy, Kate L. J. Ellacott, Victoria L. King, Alyssa H. Hasty. Mouse models of the metabolic syndrome. Disease Models & Mechanisms 2010; 3: 156-166.

Arion WJ, Canfield WK, Ramos FC, Schindler PW, Burer HJ, Hemmerle H, et al. Chlorogenic acid and hydroxynitrobenzaldehyde: new inhibitors of hepatic glucose 6-phosphatase. Arch. Biochem. Biophys. 1997; 339:315–322.

Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. Biochem Biophys Res Commun 1999; 257:79-83.

Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li ZW, Long JM, et al. Ikk-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. Nat Med. 2005; 11:91- 198.

Arner P. The adipocyte in insulin resistance: key molecules and the impact of the thiazolidinediones. Trends Endocrinol Metab. 2003; 14:137-45.

Artola Menéndez S, Duelo Marcos M, Escribano Ceruelo E. Síndrome metabólico. Rev Pediatr Aten Primaria. 2009;11 (16):s259-s277.

Ashida, H, Furuyashiki T, Nagayasu H, Bessho H, Sakakibara H, Hashimoto T, et al. Anti-obesity actions of green tea: possible involvements in modulation of the glucose uptake system and suppression of the adipogenesis-related transcription factors. *Biofactors*. 2004; 22:135-40.

Auger C, Teissedre PL, Gérain P, Lequeux N, Bornet A, Serisier S, et al. Dietary wine phenolics catechin, quercetin, and resveratrol efficiently protect hypercholesterolemic hamsters against aortic fatty streak accumulation. *J Agric Food Chem*. 2005; 53:2015-2021.

Avenell A, Brown TJ, McGee MA, Campbell MK, Grant AM, Broom J, et al. What are the long-term benefits of weight reducing diets in adults? A systematic review of randomized controlled trials. *J Hum Nutr Diet*. 2004; 17: 317-35.

Aviram M, Dornfeld L. Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure. *Atherosclerosis*. 2001; 158(1):195-8.

Aviram M, Rosenblat M, Gaitini D, Nitecki S, Hoffman A, Dornfeld L, et al. Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation. *Clin Nutr*. 2004; 23(3):423-33.

Aviram M, Volkova N, Coleman R, Dreher M, Reddy MK, Ferreira D, et al. Pomegranate phenolics from the peels, arils, and flowers are antiatherogenic: studies in vivo in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient (E 0) mice and in vitro in cultured macrophages and lipoproteins. *J. Agric. Food Chem*. 2008; 56:1148-1157.

Bai N, He K, Ibarra A, Bily A, Roller M, Chen X, Rühl R.. Iridoids from *Fraxinus excelsior* with adipocyte differentiation-inhibitory and PPAR- α activation activity. *J. Nat. Prod*. 2010 ; 73:2-6.

Bibliografía

Ballesta, M, Carral F, Oliveira G, Girón JA, Aguilar M. Economic cost associated with type II diabetes in Spanish patients. *Eur J Health Econ.* 2006; 7:270-5.

Barouch LA, Berkowitz DE, Harrison RW, O'Donnell CP, Hare JM. Disruption of leptin signaling contributes to cardiac hypertrophy independently of body weight in mice. *Circulation* 2003; 108 (6) 754-9.

Bassaganya-Riera J, Bassaganya-Riera J, Reynolds K, Martino-Catt S, Cui Y, Hennighausen L, Gonzalez F, et al. Activation of PPAR gamma and delta by conjugated linoleic acid mediates protection from experimental inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2004; 127: 777–791.

Batsis JA, Romero-Corral A, Collazo-Clavell ML, Sarr MG, Somers VK, López-Jiménez F. Effect of bariatric surgery on the metabolic syndrome: a population-based, long-term controlled study. *Mayo Clin Proc.* 2008a;83:897–907.

Batsis JA, Sarr MG, Collazo-Clavell ML, Thomas RJ, Romero-Corral A, Somers VK, et al. Cardiovascular risk after bariatric surgery for obesity. *Am J Cardiol.* 2008b;102:930–7.

Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 2006; 444:337-42.

Beecher GR. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *J Nutr.* 2003; 133 (10):3248S-3254S.

Bekir J, Mars M, Souchard JP, Bouajila J. Assessment of antioxidant, anti-inflammatory, anti-cholinesterase and cytotoxic activities of pomegranate (*Punica granatum*) leaves. *Food Chem Toxicol.* 2013; 55:470-5.

Beltowski J. Adiponectin and resistin – new hormones of white adipose tissue. *Med Sci Monit.* 2003; 9:55RA-61.

Benavente-García O, Castillo J, Lorente J, Ortuño A, Del Rubio JA. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europea* L. leaves. *Food Chemistry* 2000 (68); 457-462.

Benavente-García O, Castillo J. Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular and antiinflammatory activity. *J. Agric Food Chem.* 2008; 56 (15):6185-205.

Berghöfer A, Pischon, Reinhold T, Apovian CM, Sharma AM, Willich SN. Obesity prevalence from a European perspective: a systematic review. *BMC Publ Health.* 2008; 8: 200-10.

Bergquist SA, Gertsson UE, Knuthsen P, Olsson ME. Flavonoids in baby spinach (*Spinacia oleracea* L.): changes during plant growth and storage. *J Agric Food Chem.* 2005; 53 (24):9459-64.

Berkow SE, Barnard ND, Saxe GA, Ankerberg-Nobis T. Diet and survival after prostate cancer diagnosis. *Nutr Rev.* 2007; (9):391-403.

Birari RB, Bhutani KK. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. *Drug Discov Today.* 2007; 12:879-89.

Bloomberg RD, Fleishman A, Nalle JE, Herron DM, Kini S. Nutritional deficiencies following bariatric surgery: what have we learned? *Obes Surg.* 2005; 15: 145-54.

Bok SH, Lee SH, Park YB, Bae KH, Son KH, Jeong TS, et al. Plasma and Hepatic Cholesterol and Hepatic Activities of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Reductase and Acyl CoA: Cholesterol Transferase Are Lower in Rats Fed Citrus Peel Extract or a Mixture of Citrus Bioflavonoids. *J Nutrition.* 1999; 129: 1182-1185.

Bibliografía

Bors W, Heller W, Michael C, Saran M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical scavenging efficiencies. *Methods Enzymol* 1990; 186, 343-55.

Boussetta T, Raad H, Lettéron P, Gougerot-Pocidaló MA, Marie JC, Driss F, et al. Punicic acid a conjugated linolenic acid inhibits TNF α induced neutrophil hyperactivation and protects from experimental colon inflammation in rats. *PLoS One*. 2009; 31(7):4.

Brasier AR, Li J, Wimbish KA. Tumor necrosis factor activates angiotensinogen gene expression by the Rel A transactivator. *Hypertension* 1996; 27: 1009-17.

Bray GA, York DA. Genetically transmitted obesity in rodents. *Physiol Rev*. 1971; 51: 598-646.

Bray GA. Obesity: Historical development of scientific and cultural ideas. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1990; 14:909-926.

Brown PJ, Konner M. An anthropological perspective on obesity. En: Wurtman RJ, Wurtman IJ (ed). *Human obesity*. Annals of the New York Academy of Sciences. Nueva York, 1987 (499); 29-46.

Bruning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, et al. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* 2000; 289: 2122-2125.

Bruning JC, Michael MD, Winnay JN, Hayashi T, Horsch D, Accili D et al. A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol Cell* 1998; 2: 559-569.

Bruning JC, Winnay J, Bonner-Weir S, Taylor SI, Accili D, Kahn CR. Development of a novel polygenic model of NIDDM in mice heterozygous for IR and IRS-1 null alleles. *Cell*. 1997; 88: 561-572.

Bruno Gómez, J. La flor del Páramo V, Catálogo Ilustrado. León: Instituto Leonés de Cultura. Año de edición 2002. ISBN 84-95702-18-5.

Bruun JM, Lihn AS, Verdich C, Pedersen SB, Toubro S, Astrup A, Richelsen B Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003; 285: E527-E533.

Burcelin R, Crivelli V, Dacosta A, Roy-Tirelli A, Thorens B. Heterogeneous metabolic adaptation of C57BL/6J mice to high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002; 282: E834-E842.

Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, Shoelson SE. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of ikk-beta and NF-kappa-B. *Nat Med* 2005; 11:183- 190.

Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. Recombinant mouse ob protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science.* 1995; 269: 546- 549.

Carson JL, Ruddy ME, Duff AE, Holmes NJ, Cody RP, Brolin RE. The effect of gastric bypass surgery on hypertension in morbidly obese patients. *Arch Intern Med.* 1994;154:193–200.

Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Ramírez B, Rotellar F, Pastor C, Silva C, et al. Proinflammatory cytokines in obesity: impact of type 2 diabetes mellitus and gastric bypass. *Obes Surg.* 2007; 17: 1464-74.

Cawthorn WP, Sethi JK. TNF- α and adipocyte biology. *FEBS Letters* 2008; 582:117-131.

Ceddia RB. Direct metabolic regulation in skeletal muscle and fat tissue by leptin: implication for glucose and fatty acid homeostasis. *Int J Obes (Lond)* 2005; 29(10):1175-1183.

Bibliografía

Cerdá B, Cerón JJ, Tomás-Barberán FA, Espín JC. Repeated oral administration of high doses of the pomegranate ellagitannin punicalagin to rats for 37 days is not toxic. *J Agric Food Chem.* 2003a; 21;51 (11):3493-501.

Cerdá B, Llorach R, Cerón JJ, Espín JC, Tomás-Barberán FA. Evaluation of the bioavailability and metabolism in the rat of punicalagin, an antioxidant polyphenol from pomegranate juice. *Eur J Nutr.* 2003b; 42(1):18-28.

Chandran M, Phillips SA, Ciaraldi T, Henry RR. Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diabetes Care.* 2003;26: 2442-50.

Chaowalit N, López-Jiménez F. Epicardial adipose tissue: friendly companion or hazardous neighbour for adjacent coronary arteries? *Eur Heart J.* 2008; 29:695–7.

Charriere G, Cousin B, Arnaud E, Andre E, Bacou F, Penicaud L, et al. Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity. *J Biol Chem.* 2003;278: 9850-5.

Cheng JT, Liu IM. Stimulatory effect of caffeic acid on alpha1A-adrenoceptors to increase glucose uptake into cultured C2C12 cells. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 2000; 362:122–127.

Chin-Lin Hsu, Gow-Chin Yen. Phenolic compounds: Evidence for inhibitory effects against obesity and their underlying molecular signaling mechanisms. *Molecular Nutrition & Food Research* 2008;52 (1): 53–61.

Chua Jr SC, Chung WK, Wu- Peng XS, Zhang Y, Liu S-M, Tartaglia L, Leibel RL. Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor. *Science* 1996; 271:994-996.

Chua S, Leibel R. Obesity genes: molecular and metabolic mechanisms. *Diabetes Reviews* 1997;5 (1): 2-7.

Chun OK, Chung SJ, Song WO Estimated dietary flavonoid intake and major food sources of U.S adults. *J Nutr.* 2007;137 (5):1244-52.

Chun OK., Dae-Ok K, Smith N, Schroeder D, Jae Taek H, Chang Yong L. Daily consumption of phenolics and total antioxidant capacity from fruit and vegetables in the American diet. *J Sci Food Agric.* 2005; 85(10):1715–1724.

Chung, KT, Wong TY, Wei CI, Huang YW, Lin Y. Tannins and human health: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*1998; 38: 421-64.

Combs TP, Berg AH, Obici S, Scherer PE, Rossetti L. Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *J Clin Invest* 2001; 108(12):1875-1881.

Combs TP, Berg AH, Rajala MW, Klebanov S, Iyengar P, Jimenez-Chillaron JC, et al. Sexual differentiation, pregnancy, calorie restriction, and aging affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin. *Diabetes* 2003; 52: 268-276.

Combs TP, Wagner JA, Berger J, Doebber T, Wang WJ, Zhang BB et al. Induction of adipocyte complement-related protein of 30 kilodaltons by PPARgamma agonists: a potential mechanism of insulin sensitization. *Endocrinology* 2002; 143: 998-1007.

Comuzzie AG, Funahashi T, Sonnenberg G, Martin LJ, Jacob HJ, Black AE, et al. The genetic basis of plasma variation in adiponectin, a global endophenotype for obesity and the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:4321-5.

Crouse JA, Elliott GE, Burgess TL, Chiu L, Bennett L, Moore J, et al. Altered Cell Surface Expression and Signaling of Leptin Receptors Containing the fatty Mutation. *J Biol Chem* 1998; 273(29):18365-18373.

Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. Dietary **phenolics**: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat Prod Rep.* 2009 ; 26 (8):1001-43.

Bibliografía

Csiszar A, Labinskyy N, Pinto JT, Ballabh P, Zhang H, Losonczy G, et al. Resveratrol induces mitochondrial biogenesis in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009; 297:H13-20.

Cumin F, Baum HP, Levens N. Leptin is cleared from the circulation primarily by the kidney. *Int J Obes*. 1996; 20:1120-1126.

Da Silva BA, Bjorbæk C, Shigeo U, Flier JS. Functional properties of leptin receptor isoforms containing the Gln3Pro extracellular domain mutation of the fatty rat. *Endocrinology* 1998; 139(9):3681-3690.

Dassprakash MV, Arun R, Abraham SK, Premkumar K. In vitro and in vivo evaluation of antioxidant and antigenotoxic potential of *Punica granatum* leaf extract. *Pharm Biol*. 2012;12:1523-30

Daval M, Diot-Dupuy F, Bazin R, Hainault I, Viollet B, Vaulont S, et al. Anti-lipolytic action of AMP-activated protein kinase in rodent adipocytes. *J Biol Chem* 2005; 280:25250-25207.

De Fronzo RA, Ferrannini E. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 1991; 14:173-194.

De la Garza AL, Milagro F I, Boque N, Campión J, Martínez J A. Natural inhibitors of pancreatic lipase as new players in obesity treatment. *Planta Med*. 2011; 77:773-85.

de Nigris F, Balestrieri ML, Williams-Ignarro S, D'Armiento FP, Fiorito C, Ignarro LJ, et al. The influence of pomegranate fruit extract in comparison to regular pomegranate juice and seed oil on nitric oxide and arterial function in obese Zucker rats. *Nitric. Oxide*. 2007;17:50-54.

Do GM, Kwon EY, Kim HJ, Jeon SM, Ha TY, Park T, Choi MS. Long-term effects of resveratrol supplementation on suppression of atherogenic lesion formation and cholesterol synthesis in apo E-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; 374:55-9.

Duarte J, Jiménez R, O'Valle F, Galisteo M, Pérez-Palencia R, Vargas F, et al. Protective effects of the flavonoid quercetin in chronic nitric oxide deficient rats. *J Hypertens* 2002; 20(9):1843- 1854.

Eddouks M, Maghrani M, Lemhadri A, Ouahidi ML, Jouad H. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes mellitus, hypertension and cardiac diseases in the south-east region of Morocco (Tafilalet). *J. Ethnopharmacol.*2002; 82:97-103.

Eddouks M, Maghrani M, Zeggwagh NA, Haloui M, Michel JB. *Fraxinus excelsior* L. evokes a hypotensive action in normal and spontaneously hypertensive rats. *J. Ethnopharmacol.*2005; 99:49-54.

Eddouks M, Maghrani M. Phlorizin-like effect of *Fraxinus excelsior* in normal and diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.*2004; 94:149-154.

Eddouks. L'utilisation des plantes médicinales dans le traitement du diabète au Maroc. *Phytothérapie* 2007; 5:194-203.

Enriquez L, García G, Matas P. Prevalence of pharmacological iatrogenic factors in obese patients sent to a nutrition unit. *Int. J. Obesity.* 1996; 20 (4): 69.

Esmailzadeh A, Tahbaz F, Gaieni I, Alavi-Majd H, Azadbakht L. Concentrated pomegranate juice improves lipid profiles in diabetic patients with hyperlipidemia. *J. Med. Food.* 2004; 7:305-308.

Espin JC, Garcia-Conesa MT, Tomas-Barberan FA. Nutraceuticals: Facts and fiction. *Phytochemistry* 2007;68:2986-3008.

Esposito K, Pontillo A, Di Palo C, Giugliano G, Masella M, Marfella R, Giugliano D. Effect of weight loss and lifestyle changes on vascular inflammatory markers in obese women. A randomized trial. *JAMA* 2003;289: 1799-804.

Bibliografía

Faraj M, Havel PJ, Phelis S, Blank D, Sniderman AD, Cianflone K. Plasma acylation-stimulating protein, adiponectin, leptin, and ghrelin before and after weight loss induced by gastric bypass surgery in morbidly obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88: 1594-1602.

Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, Paschke R. Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 290: 1084-1089.

Feillet-Coudray C, Sutra T, Fouret G, Ramos J, Wrutniak-Cabello C, Cabello G, et al. Oxidative stress in rats fed a high-fat high-sucrose diet and preventive effect of polyphenols: Involvement of mitochondrial and NAD(P)H oxidase systems. *Free Radic Biol Med.* 2009; 46:624-32.

Fernández- Real JM, Gutiérrez C, Ricart W, Castiñeira MJ, Vendrell J, Richart C. Plasma levels of soluble fraction of tumor necrosis factor- α receptors 1 and 2 are independent determinants of total and LDL-cholesterol concentrations in healthy subjects. *Atherosclerosis* 1999;146:321-7.

Ferrante Jr AW. Obesity-induced inflammation: a metabolic dialogue in the language of inflammation. *J Intern Med.* 2007; 262:408-414.

Festa A, D'Agostino RJ, Howard G, Mykkänen L, Russell PT, Haffner SM. Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Circulation* 2000; 102:42-7.

Finucane MM, Stevens GA, Cowan MJ, Danaei G, Lin JK, Paciorek CJ, et al. National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: Systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. *Lancet.* 2011; 377: 557-67.

Fiorentini D, Hakim G, Bonsi L, Bagnara GP, Maraldi T, Landi L. Acute regulation of glucose transport in a human megakaryocytic cell line: difference between growth factors and H₂O₂ Free Radic. Biol. Med. 2001; 31:923–931.

Forga L, Petrina E, Barberia JJ. Complicaciones de la diabetes. An Sist Sanit Navar. 2002; 25: 117-26.

Formica RV, Regelson W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. Food Chem Toxicol. 1995; 33 (12):1061-1080.

Foz M. «La Declaración de Milán». Med Clin (Barc) 1999; 113:494-495.

Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin 6: depot difference and regulation by glucocorticoid. J Clin Endocrinol Metab 1998; 83: 1313-6

Friedman JM, Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Lori L. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature 1994; 372: 425-431.

Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, et al. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. Proc Natl Acad Sci U S A 2001; 98(4):2005-2010.

Frühbeck G. Intracellular signalling pathways activated by leptin. Biochem J 2006; 393:7-20.

Frühbeck G. The adipose tissue as a source of vasoactive factors. Curr Med Chem - Cardiovasc Hematol Agents 2004; 2: 197-208.

Bibliografía

Fruehwald-Schultes B, Oltmanns KM, Kern W, Born J, Fehm HL, Peters A. The effect of experimentally induced insulin resistance on the leptin response to hyperinsulinaemia. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002; 26:510-516.

Fuhrman B, Volkova N, Aviram M. Pomegranate juice polyphenols increase recombinant paraoxonase-1 binding to high-density lipoprotein: studies in vitro and in diabetic patients. *Nutrition*. 2010; 26:359-366.

Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, Segawa K, Tanaka M, Kishimoto K, et al. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science* 2005; 307: 426-430.

Galisteo M, García-Saura MF, Jiménez R, Villar IC, Zarzuelo A, Vargas F, et al. Effects of chronic quercetin treatment on antioxidant defence system and oxidative status of deoxycorticosterone acetate-salt-hypertensive rats. *Mol Cell Biochem* 2004; 259:91-99.

Garcia-Closas R, Gonzalez CA, Agudo A, Riboli E. Intake of specific carotenoids and flavonoids and the risk of gastric cancer in Spain. *Cancer Causes Control*. 1999; 10(1):71-5.

Gates MA, Vitonis AF, Tworoger SS, Rosner B, Titus-Ernstoff L, Hankinson SE, et al. Flavonoid intake and ovarian cancer risk in a population-based case-control study. *Int J Cancer*. 2009;124 (8):1918-25.

Gee JM, DuPont MS, Day AJ, Plumb GW, Williamson G, Johnson IT. Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway. *J. Nutr*. 2000; 130:2765–2771.

Ghanim H, Aljada A, Hofmeyer D, Syed T, Mohanty P, Dandona P. Circulating mononuclear cells in the obese are in a proinflammatory state. *Circulation* 2004;110:1567-1571.

Gil MI, Tomás-Barberán FA, Hess-Pierce B, Holcroft DM, Kader AA. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J Agric Food Chem.* 2000, 48(10):4581-9.

Girousse A, Tavernier G, Valle C, Moro C, Mejhert N, Dinel AL, et al. Partial inhibition of adipose tissue lipolysis improves glucose metabolism and insulin sensitivity without alteration of fat mass. *PLoS Biol.* 2013;11(2).

Grassi D, Desideri G, Croce G, Tiberti S, Aggio A, Ferri C. Flavonoids, vascular function and cardiovascular protection. *Curr Pharm Des.* 2009; 15:1072-84.

Griffen SC, Wang J, German MS. A genetic defect in beta-cell gene expression segregates independently from the fa locus in the ZDF rat. *Diabetes* 2001; 50 (1): 63-8.

Grunfeld C, Feingold KR. Role of cytokines in inducing hyperlipidemia. *Diabetes* 1992; 41:97-101.

Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9: 367-77.

Guo C, Wei J, Yang J, Xu J, Pang W, Jiang Y. Pomegranate juice is potentially better than apple juice in improving antioxidant function in elderly subjects. *Nutr. Res.* 2008; 28:72-77.

Gutiérrez-Fisac JL, López E, Banegas JR, Graciani A, Rodríguez-Artalejo F. Prevalence of overweight and obesity in elderly people in Spain. *Obes Res.* 2004; 12: 710-5.

Bibliografía

Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, et al. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*. 1995; 269: 543-547.

Halleux CM, Takahashi M, Delporte ML, Detry R, Funahashi T, Matsuzawa Y, et al. Secretion of adiponectin and regulation of apM1 gene expression in human visceral adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 288: 1102-1107.

Hamden K, Allouche N, Damak M, Elfeki A. Hypoglycemic and antioxidant effects of phenolics extracts and purified hydroxytyrosol from olive mill waste in vitro and in rats. *Elsevier* 2009; 23: 421-432.

Hanley AJG, Connelly PW, Harris SB, Zinman B. Adiponectin in a native Canadian population experiencing rapid epidemiological transition. *Diabetes Care* 2003; 26:3219-25.

Hardie DG, Scott JW, Pan DA, Hudson ER. Management of cellular energy by the AMPactivated protein kinase system. *FEBS Lett* 2003; 546:113-120.

Harrison Larry Jameson J. *Endocrinología. Derivado de Harrison. Principios de la Medicina Interna, 16ª Edición.* Ed. Mc Graw-Hill Interamericana. 2006 (capítulo 16) *Obesidad*: 269.

Havel PJ. Control of energy homeostasis and insulin action by adipocyte hormones: leptin, acylation stimulating protein, and adiponectin. *Curr Opin Lipidol*. 2002; 13:51-59.

He J, Ogden LG, Bazzano LA, Vupputuri S, Loria C, Whelton PK. et al. Risk factors for congestive heart failure in US men and women: NHANES I epidemiologic follow-up study. *Arc Inter Med* 2001; 161: 996-1002.

Helgerud P, Saarem K, Norum KR. Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase in human small intestine: its activity and some properties of the enzyme reaction. *J. Lipid Res.* 1981; 22:271-277.

Hillman GG, Forman JD, Kucuk O, Yudelev M, Maughan RL, Rubio J, et al. Genistein potentiates the radiation effect on prostate carcinoma cells. *Clin Cancer Res.* 2001; 7 (2):382-90.

Hirvonen T, Virtamo J, Korhonen P, Albanes D, Pietinen P. Intake of flavonoids, carotenoids, vitamins C and E, and risk of stroke in male smokers. *Stroke* 2000; 31(10):2301-6.

Hollebeeck S, Winand J, Hérent MF, During A, Leclercq J, Larondelle Y, Schneider YJ. Anti-inflammatory effects of pomegranate (*Punica granatum* L.) husk ellagitannins in Caco-2 cells, an in vitro model of human intestine. *Food Funct.* 2012;3 (8):875-85.

Holst L, Nordeng H, Haavik S Use of herbal drugs during early pregnancy in relation to maternal characteristics and pregnancy outcome. *Pharmacoepidemiol. Drug Saf.* 2008; 17:151-159.

Hontecillas R, Diguardo M, Duran E, Orpi M, Bassaganya-Riera J. Catalpic acid decreases abdominal fat deposition, improves glucose homeostasis and upregulates PPAR alpha expression in adipose tissue. *Clin. Nutr.* 2008; 27: 764–772.

Hontecillas R, O'Shea M, Einerhand A, Diguardo M, Bassaganya-Riera J. Activation of PPAR gamma and alpha by Punicic acid ameliorates glucose tolerance and suppresses obesity-related inflammation. *J. Am. Coll. Nutr.* 2009; 28: 184–195.

Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest.* 1995; 95:2409- 2415.

Bibliografia

Hotamisligil GS, Budavari A, Murray D, Spiegelman BM. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor- α . *J Clin Invest.* 1994a; 94(4):1543-1549.

Hotamisligil GS, Murray DL, Choy LN, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor α inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1994b; 91:4854-4858.

Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993; 259:87-91.

Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α . *Science* 1993; 259:87- 91.

Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 2006; 444: 860-7.

Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, et al. Plasma concentration of a novel adipose specific protein adiponectin in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 1595-9.

Hotta K, Funahashi T, Bodkin NL, Ortmeyer HK, Arita Y, Hansen BC, et al. Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. *Diabetes* 2001;50(5):1126-33.

Hotta K, Gustafson TA, Yoshioka S, Ortmeyer HK, Bodkin NL, Hansen BC Relationships of PPAR γ and PPAR γ 2 mRNA levels to obesity, diabetes and hyperinsulinaemia in rhesus monkeys. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1998; 22: 1000-1010.

Hou X, Xu S, Maitland-Toolan KA, Sato K, Jiang B, Ido Y, et al. SIRT1 regulates hepatocyte lipid metabolism through activating AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 2008; 283:20015-26.

Houseknecht KL, Mantzoros CS, Kuliawat R, Hadro E, Flier JS, Kahn BB. Evidence for leptin binding proteins in serum of rodents and humans: modulation with obesity. *Diabetes*. 1996; 45:1638-1643.

Hsu FL, Chen YC, Cheng JT. Caffeic acid as active principle from the fruit of *Xanthium strumarium* to lower plasma glucose in diabetic rats. *Planta. Med.* 2000; 66:228–230.

Hu E, Liang P, Spiegelman BM. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* 1996; 271:10697-703.

Hug C, Lodish HF. Medicine. Visfatin: a new adipokine. *Science* 2005; 307: 366-367.

Ibarra A, Bai N, He K, Bily A, Cases J, Roller M, Sang S. Fraxinus excelsior seed extract FraxiPure™ limits weight gains and hyperglycemia in high-fat diet-induced obese mice. *Phytomedicine*. 2011 Apr 15;18 (6):479-85.

Ignarro LJ, Byrns RE, Sumi D, de Nigris F, Napoli C. Pomegranate juice protects nitric oxide against oxidative destruction and enhances the biological actions of nitric oxide. *Nitric Oxide*. 2006; 15(2):93-102.

Imagawa A, Funahashi T, Nakamura T, Moriwaki M, Tanaka S, Nishizawa H, et al. Elevated serum concentration of adipose-derived factor, adiponectin, in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2002; 25: 1665-1666.

Ingalls AM, Dickie MM, Snell GD. Obese, a new mutation in the house mouse. *J Hered*. 1950;12:317-8.

Bibliografía

Isganaitis E, Lustig RH. Fast food, central nervous system insulin resistance and obesity. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol* 2005; 25:2451-2462.

Iwaki M, Matsuda M, Maeda N, Funahashi T, Matsuzawa Y, Makishima M, et al. Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors. *Diabetes* 2003 (52): 1655-1663.

Jara Albarrán A. Endocrinología. Ed. Médica panamericana, 2001; Capítulo 98 Obesidad 775-792

Jeffcoale W. Obesity is a disease: food for thought. *Lancet* 1998;351: 903-904.

Jemai H, El Feki A, Sayadi S. Antidiabetic and antioxidante effects of hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves in alloxan-diabetic rats. *Journal of Agricultural and food chemistry* 2009; 57, 8798-8804.

Jéquier E, Tappy L. Regulation of Body Weight in Humans. *Physiol Rev.* 1999; 79:451-480.

Jin YR, Im JH, Park ES, Cho MR, Han XH, Lee JJ, et al. Antiplatelet activity of epigallocatechin gallate is mediated by the inhibition of PLCgamma2 phosphorylation, elevation of PGD2 production, and maintaining calcium-ATPase activity. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2008; 51:45-54.

Joh Y-G, Kim S-J, Christie WW. The structure of the triacylglycerols, containing punicic acid, in the seed oil of *Trichosanthes kirilowii*. *JAOCS* 1995; 72: 1037–1042.

Johannot L, Somerset SM. Age-related variations in flavonoid intake and sources in the Australian population. *Public Health Nutr.* 2006; 9 (8):1045-54.

Jouad H, Eddouks M, Lacaille-Dubois MA, Lyoussi B. Hypoglycaemic effect of *Spergularia purpurea* in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol.* 2000; 71(1-2):169-77.

Jouad H, Haloui M, Rhiouani H, El Hilaly J, Eddouks M.. Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes, cardiac and renal diseases in the North centre region of Morocco (Fez-Boulemane). *J Ethnopharmacol.* 2001a ;77(2-3):175-82.

Jouad H, Lacaille-Dubois MA, Eddouks M. Chronic diuretic effect of the water extract of *Spergularia purpurea* in normal rats. *J Ethnopharmacol.* 2001b; 75(2-3):219-23.

Jouad H, Lacaille-Dubois MA, Lyoussi B, Eddouks M. Effects of the flavonoids extracted from *Spergularia purpurea* Pers. on arterial blood pressure and renal function in normal and hypertensive rats. *J Ethnopharmacol.* 2001c;76 (2):159-63.

Jouad H, Lemhadri A, Maghrani M, Zeggwagh NA, Eddouks M. Cholesterol-lowering activity of the aqueous extract of *Spergularia purpurea* in normal and recent-onset diabetic rats. *J Ethnopharmacol.* 2003; 87(1):43-9.

Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev* 2005; 26 (3):439- 451.

Kahaleh MB, Fan PS. Effect of cytokines on the production of endothelin by endothelial cells. *Clin Exp Rheumatol* 1997;15:163-7.

Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 2000; 106:473-481.

Kamada C, da Silva EL, Ohnishi-Kameyama M, Moon JH, Terao J. Attenuation of lipid peroxidation and hyperlipidemia by quercetin glucoside in the aorta of high cholesterol-fed rabbit. *Free Radic Res* 2005; 39(2):185-194.

Bibliografia

Kao, Y.H, Hiipakka R.A, Liao S. Modulation of endocrine systems and food intake by green tea epigallocatechin gallate. *Endocrinology*. 2000; 141:980-7.

Kappes A, Loffler G. Influences of ionomycin, dibutyryl-cycloAMP and tumour necrosis factor alpha on intracellular amount and secretion of apM1 in differentiating primary human preadipocytes. *Hormone Metab Res* 2000; 32:548-54.

Kaplan NM. The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. *Arch Intern Med* 1989; 149:1514-1520.

Kapur S, Picard F, Perreault M, Deshaies Y, Marette A. Nitric oxide: a new player in the modulation of energy metabolism. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; 24:S36-S40.

Karasu C, Cumaoglu A, Gürpınar AR, Kartal M, Kovacicova L, Milackova I et al. Aldose reductase inhibitory activity and antioxidant capacity of pomegranate extracts. *Interdiscip Toxicol*. 2012;5 (1):15-20.

Kasimsetty SG, Bialonska D, Reddy MK, Ma G, Khan SI, Ferreira D. Colon cancer chemopreventive activities of pomegranate ellagitannins and urolithins. *J. Agric. Food Chem*. 2010; 58:2180-2187.

Kasimsetty SG, Bialonska D, Reddy MK, Thornton C, Willett KL, Ferreira D. Effects of pomegranate chemical constituents/intestinal microbial metabolites on CYP1B1 in 22Rv1 prostate cancer cells. *J. Agric. Food Chem*. 2009; 57:10636-10644.

Kato A, Minoshima Y, Yamamoto J, Adachi I, Watson AA, Nash RJ. Protective Effects of Dietary Chamomile Tea on Diabetic Complications. *J Agric Food Chem* 2008; 56:8206-8211.

Kaufman M, Wiesman Z. Pomegranate oil analysis with emphasis on MALDI-TOF/MS triacylglycerol fingerprinting. *J. Agric. Food Chem*. 2007; 55: 10405– 10413.

Kaur G, Rao LV, Agrawal A, Pendurthi UR. Effect of wine phenolics on cytokine-induced Creactive protein expression. *J Thromb Haemost* 2007; 5:1309-17.

Kawaguchi K, Mizuno T, Aida K, Uchino K. Hesperidin as an inhibitor of lipases from porcine pancreas and *Pseudomonas*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1997; 61:102-4.

Kawai Y, Nishikawa T, Shiba Y, Saito S, Murota K, Shibata N, et al. Macrophage as a target of quercetin glucuronides in human atherosclerotic arteries: implication in the antiatherosclerotic mechanism of dietary flavonoids. *J Biol Chem*. 2008a; 283: 9424-34.

Kawai Y, Tanaka H, Murota K, Naito M, Terao J. (-)-Epicatechin gallate accumulates in foamy macrophages in human atherosclerotic aorta: implication in the anti-atherosclerotic actions of tea catechins. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008b; 374:527-32.

Kazumi T, Kawaguchi A, Sakai K, Hirano T, Yoshino G . Young men with highnormal blood pressure have lower serum adiponectin, smaller LDL size, and higher elevated heart rate than those with optimal blood pressure. *Diabetes Care* 2002 (25): 971-976.

Kern PA, Di Gregorio GB, Lu T, Rassouli N, Ranganathan G. Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor-alpha expression. *Diabetes* 2003; 52: 1779-1785.

Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin-resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;280:E745-E751.

Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, Bosch RJ, Deem R, Simsolo RB. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue.

Bibliografia

Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest* 1995a;95:2111-9.

Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, Bosch RJ, Deem R, Simsolo RB. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest* 1995b; 95:2111-9.

Khan GN, Gorin MA, Rosenthal D, Pan Q, Bao LW, Wu ZF, et al. Pomegranate fruit extract impairs invasion and motility in human breast cancer. *Integr. Cancer Ther.* 2009; 8:242-253.

Khaw KT, Bingham S, Welch A, Luben R, Wareham N, Oakes S, Day NK.T, et al. Relation between plasma ascorbic acid and mortality in men and women in EPIC-Norfolk prospective study: a prospective population study. *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. Lancet*, 2001. 357:657-63.

Kim HP, Son KH, Chang HW, Kang SS. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *J Pharmacol Sci.* 2004; 96(3):229-45.

Kim JK, Michael MD, Previs SF, Peroni OD, Mauvais-Jarvis F, Neschen S, et al. Redistribution of substrates to adipose tissue promotes obesity in mice with selective insulin resistance in muscle. *J Clin Invest* 2000; 105: 1791-1797.

Klaus S, Pultz S, Thone-Reinekeand C, Wolfram S. Epigallocatechin gallate attenuates diet-induced obesity in mice by decreasing energy absorption and increasing fat oxidation. *Int J Obes (Lond).* 2005; 29:615-23.

Kleiner D, Brunt E. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathologic Patterns and Biopsy Evaluation in Clinical Research. *Semin Liver Dis.* 2012; 32: 3-13.

Knekt P, Kumpulainen J, Järvinen R, Rissanen H, Heliövaara M, Reunanen A, et al. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr.* 2002;76(3):560-8

Kohno H, Suzuki R, Yasui Y, Hosokawa M, Miyashita K, Tanaka T. Pomegranate seed oil rich in conjugated linolenic acid suppresses chemically induced colon carcinogenesis in rats. *Cancer Sci.* 2004a; 95: 481–486.

Kohno H, Yasui Y, Suzuki R, Hosokawa M, Miyashita K, Tanaka T. Dietary seed oil rich in conjugated linolenic acid from bitter melon inhibits azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis through elevation of colonic PPARgamma expression and alteration of lipid composition. *Int. J. Cancer* 2004b; 110: 896–901

Kosmiski L, Kuritzkes D, Lichtenstein K, Eckel R. Adipocyte-derived hormone levels in HIV lipodystrophy. *Antivir Ther* 2003; 8: 9-15.

Krum H, Abraham WT. Heart failure. *Lancet.* 2009;373:941–55.

Larrosa M, García-Conesa MT, Espín JC, Tomás-Barberán FA. Ellagitannins, ellagic acid and vascular health. *Mol. Aspects Med.*2010; 31:513-539.

Lash JM, Sherman WM, Hamlin RL. Capillary basement membrane thickness and capillary density in sedentary and trained obese Zucker rats. *Diabetes* 1989; 38 (7): 854-60.

Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI, et al. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature.* 1996; 379: 632-635.

Lee Y, Wang MY, Kakuma T, Wang ZW, Babcock E, McCorkle K, et al. Liporegulation in diet-induced obesity. The antisteatotic role of hyperleptinemia. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 5629-5635.

Bibliografia

Letenneur L, Proust-Lima C, Le Gouge A, Dartigues JF, Barberger-Gateau P. Flavonoid intake and cognitive decline over a 10-year period. *Am J Epidemiol.* 2007; 165(12):1364-71.

Li,Y., C.Guo, J.Yang, J.Wei, J.Xu, S.Cheng. Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chemistry* 2006; 96:254-260.

Lian TW, Wang L, Lo YH, Huang IJ, Wu MJ. Fisetin, morin and myricetin attenuate CD36 expression and oxLDL uptake in U937-derived macrophages. *Biochim Biophys Acta.* 2008; 1781:601-9.

Lihn AS, Bruun JM, He G, Pedersen SB, Jensen PF, Richelsen B. Lower expression of adiponectin mRNA in visceral adipose tissue in lean and obese subjects. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 219: 9-15.

Like AA, Lavine RL, Poffenbarger PL, Chick WL. Studies in the diabetic mutant mouse. VI. Evolution of glomerular lesions and associated proteinuria. *Am J Pathol* 1972; 66 (2): 193-224.

Lin, J.K. and S.Y. Lin-Shiau, Mechanisms of hypolipidemic and anti-obesity effects of tea and tea polyphenols. *Mol Nutr Food Res.* 2006; 50:211-7.

Lin, Y.L, Chyi BY, Wu LY, Hwang LS, Ho LT. Hypolipidemic effect of Green Tea Leaves through Induction of Antioxidant and Phase II Enzymes Including Superoxide Dismutase, Catalase, and Glutathione S-Transferase in Rats. *J Agric Food Chem.* 1998; 46:1893-1899.

Lindsay RS, Funahashi T, Hanson RL, Matsuzawa Y, Tanaka S, Tataranni PA, et al. Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population. *Lancet.* 2002; 360: 57-58.

Liu IM, Hsu FL, Chen CF, Cheng JT. Antihyperglycemic action of isoferulic acid in streptozotocin-induced diabetic rats. *Br. J. Pharmacol.* 2000; 129:631–636.

Loke WM, Proudfoot JM, McKinley AJ, Needs PW, Kroon PA, Hodgson JM, et al. Quercetin and its in vivo metabolites inhibit neutrophil-mediated low-density lipoprotein oxidation. *J Agric Food Chem.* 2008a; 56:3609-15.

Loke WM, Proudfoot JM, Stewart S, McKinley AJ, Needs PW, Kroon PA, et al. Metabolic transformation has a profound effect on anti-inflammatory activity of flavonoids such as quercetin: lack of association between antioxidant and lipoxygenase inhibitory activity. *Biochem Pharmacol.* 2008b; 75:1045- 53.

López-Jiménez F, Bhatia S, Collazo-Clavell ML, Sarr MG, Somers VK. Safety and efficacy of bariatric surgery in patients with coronary artery disease. *Mayo Clin Proc.* 2005;80:1157–62.

Lowe, M.E. The triglyceride lipases of the pancreas. *J Lipid Res.* 2002; 43:2007-16.

Madej T, Bogussi MS, Bryant SH. Threading analysis suggest that the obese gene product may be a helical cytokine. *FEBS Lett.* 1995;373:13-18.

Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun.* 1996; 221: 286-289.

Malik A, Afaq F, Sarfaraz S, Adhami VM, Syed DN, Mukhtar H. Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 2005; 102:14813-14818.

Malik A, Mukhtar H. Prostate cancer prevention through pomegranate fruit. *Cell Cycle* 2006; 5:371-373.

Manach C, Scalber At, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004;79 (5): 727–47.

Bibliografía

Marañón G. Gordos y flacos. 3ª ed. Madrid: Espasa Calpe, 1.A, 1936.

Masaki T, Chiba S, Yasuda T, Tsubone T, Kakuma T, Shimomura I, et al. Peripheral, but not central, administration of adiponectin reduces visceral adiposity and upregulates the expression of uncoupling protein in Agouti yellow (Ay/a) obese mice. *Diabetes* 2003 (52):2266-73.

Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, et al. Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med.* 1997; 3:1029-1033.

Mathus-Vliegen EM, Tytgat GN. Intra-gastric balloon for treatment-resistant obesity: safety, tolerance, and efficacy of 1-year balloon treatment followed by a 1-year balloon-free follow-up. *Gastrointest Endosc* 2005; 61: 19-27.

Matsui T, Ebuchi S, Kobayashi M, Fukui K, Sugita, K, Terahara N, et al. Anti-hyperglycemic effect of diacylated anthocyanin derived from Ipomoea batatas cultivar Ayamurasaki can be achieved through the alpha-glucosidase inhibitory action. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50:7244–7248.

Matsushita K, Ishikawa T, Sumita S, Kobayashi T, Ogawa H, Inoue N, et al. Comparison of circulating adiponectin and proinflammatory markers regarding their association with metabolic syndrome in Japanese men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26:871-876.

McCourt HJ, Hunter SJ, Cardwell CR, Young IS, Murray LJ, Boreham CA et al. Adiponectin multimers, body weight and markers of cardiovascular risk in adolescence: Northern Ireland Young Hearts Project. *Int J Obes (Lond).* 2013 Jan 15. doi: 10.1038/ijo.2012.214.

Meigs JB, Wilson PW, Nathan DM, D'Agostino RB, Williams K, Haffner SM. Prevalence and characteristics of the metabolic syndrome in the San Antonio Heart and Framingham Offspring Studies. *Diabetes* 2003; 52: 2160-167.

Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Müller C, Carling D, Kahn BB. Leptin stimulates fattyacid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* 2002; 17;415 (6869):339-43.

Mohan M, Waghulde H, Kasture S. Effect of Pomegranate Juice on Angiotensin II-Induced Hypertension in Diabetic Wistar Rats. *Phytotherapy Research* 2010; 24:S196-S203.

Moller DE. New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Nature* 2001; 414:821-7.

Morrison CD. Leptin resistance and the response to positive energy balance. *Physiology and behaviour* 2008; 94:660-663.

Moya-Camarena, S.Y., Van den Heuvel, J.P., Belury, M.A. Conjugated linoleic acid activates peroxisome proliferator-activated receptor alpha and beta subtypes but does not induce hepatic peroxisome proliferation in Sprague–Dawley rats. *Biochim. Biophys.* 1999; 1436: 331–342.

Mulvihill EE, Allister EM, Sutherland BG, Telford DE, Sawyez CG, Edwards JY, et al. Naringenin prevents dyslipidemia, apolipoprotein B overproduction, and hyperinsulinemia in LDL receptor-null mice with diet-induced insulin resistance. *Diabetes* 2009; 58:2198-210.

Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura NH, Mazda T, Tomita T. Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J Biochem.* 1996; 20:803-12.

Narkiewicz K, Wolf J, López-Jiménez F, Somers VK. Obstructive sleep apnea and hypertension. *Curr Cardiol Rep.* 2005,7:435–40.

Neuschwander Brent A-Tetri and Stephen H. Caldwell. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD single topic conference. *Hepatology* 2003; 37 (5); 1203-19.

Niki E. a-Tocopherol. En: *Handbook of antioxidants.* (L. Packer and E. Cadenas, eds). Marcel Dekker, New York: 1996; 3-25.

Bibliografía

Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Seo K, Yamashita H, Hosoya Y, et al. In vivo imaging in mice reveals local cell dynamics and inflammation in obese adipose tissue. *J Clin Invest.* 2008; 118: 710-21.

Niswender KD, Baskin DG, Schwartz MW. Insulin and its evolving partnership with leptin in the hypothalamic control of energy homeostasis. *Trends Endocrinol Metab* 2004; 15(8):362-369.

Niswender KD, Morton GJ, Stearns WH, Rhodes CJ, Myers MG, Schwartz MW. Intracellular signaling: Key enzyme in leptin-induced anorexia. *Nature* 2001; 413:794-795.

Nophar Y, Kemper O, Brakebusch C, Engelmann H, Zwang R, Adreka D, et al. Soluble forms of tumor necrosis factors (TNFRs). The cDNA for the type 1 TNF-R, cloned using amino acid sequence data of its soluble form, encodes both the cell surface and a soluble form of the receptor. *EMBO J.* 1990 (10):3269-78.

Nyui N, Tamura K, Yamaguchi S, Nakamaru M, Ishigami T, Yabana M, et al. Tissue angiotensinogen gene expresión induced by lipopolysaccharide in hypertensive rats. *Hypertension* 1997; 30:859-67.

Odgen CL, Carroll MD, Curtin LR, et al. Prevalence of overweigh and obesity in the United States, 1999-2004. *JAMA* 2006; 295:1549-1555.

Ofei F, Hurel S, Newkirk J, Sopwith M, Taylor R Effects of engineered anti-TNF- α antibody(cdp571) on insulin sensivity and glycemc control in patients with niddm. *Diabetes* 1996; 45:881-885.

OhnoT, Kato N, Ishii C, Shimizu M, Ito Y, Tomono S, et al Genistein augments cyclic adenosine 3' 5' monophosphate(cAMP) accumulation and insulin release in MIN6 cells. *Endocr. Res.* 1993; 19:273–285.

Okamoto Y, Kihara S, Ouchi N, Nishida M, Arita Y, Kumada M, Ohashi K, Sakai N, Shimomura I, Kobayashi H, Terasaka N, Inaba T, Funahashi T, Matsuzawa Y. Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2002; 26; 106(22):2767-2770.

Omar SH. Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Scientia Pharmaceutica; Sci Pharm.* 2010; 78(2):133-54.

OMS Organización Mundial de la Salud. Obesity and overweight. Disponible: <http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/facts/obesity/en> 2012.

Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y, Walsh K. Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease. *Curr Opin Lipidol* 2003; 14: 561-6.

Paganga G, Al-Hashim H, Khodr H, Scott BC, Auroma OI, Hider RC, et al. Mechanisms of the antioxidant activities of quercetin and catechins. *Redox Report.* 1996; 2: 359-64.

Pagano C, Soardo G, Esposito W, Fallo F, Basan L, Donnini D, et al. Plasma adiponectin is decreased in nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Endocrinol.* 2005; 152: 113-8.

Pantuck AJ, Leppert JT, Zomorodian N, Aronson W, Hong J, Barnard RJ, et al. Phase II study of pomegranate juice for men with rising prostate-specific antigen following surgery or radiation for prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* 2006; 12:4018-4026.

Patel D, Shukla S, Gupta S. Apigenin and cancer chemoprevention: progress, potential and promise (review). *Int J Oncol.* 2007; 30 (1):233-45.

Paur I, Austenaa LM, Blomhoff R. Extracts of dietary plants are efficient modulators of nuclear factor kappa B. *Food Chem Toxicol* 2008; 46:1288-97.

Bibliografía

Pender C, Goldfine ID, Tanner CJ, Pories WJ, MacDonald KG, Havel PJ, Houmard JA, Youngren JF. Muscle insulin receptor concentrations in obese patients post bariatric surgery: relationship to hyperinsulinemia. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2004; 28: 363- 369.

Pérusse L, Tremblay A, Leblanc C. Familial resemblance in energy intake: contribution of genetic and environmental factors. *Am J Clin Nutr* 1988; 47: 629-35.

Peungvicha P, Thirawarapan SS, Watanabe H. Possible mechanism of hypoglycemic effect of 4-hydroxybenzoic acid, a constituent of *Pandanus odoratus* root. *Jpn. J. Pharmacol.* 1998; 78:395–398.

Phillips SA, Ciaraldi TP, Kong APS, Bandukwala R, Aroda V, Carter L, et al. Modulation of circulating and adipose tissue adiponectin levels by antidiabetic therapy. *Diabetes* 2003; 52:667-74.

Pisabarro R, Irruzábal E, Reculde A, Barrios E, Arocenu A, Aguirre B, et al. Leptina: una hormona secretada por el tejido adiposo. Primer estudio en muestra poblacional uruguaya *Rev Med Uruguay*. 1999; 15: 43-48.

Plomgaard P, Bouzakri K, Krogh-Madsen R, Mittendorfer B, Zicrath JR, Pedersen BK. Tumor necrosis factor- α induces skeletal muscle insulin resistance in healthy human subjects via inhibition of akt substrate 160 phosphorylation. *Diabetes* 2005; 54:2939-2945.

Poirier P, Giles TD, Bray GA, Hong Y, Stern JS, Pi-Sunyer FX, et al. Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: an update of the 1997 American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease from the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. *Circulation*. 2006; 113:898–918.

Polagruto JA, Schramm DD, Wang-Polagruto JF, Lee L, Keen CL. Effects of flavonoid-rich beverages on prostacyclin synthesis in humans and human aortic endothelial cells: association with ex vivo platelet function. *J. Med. Food* 2003; 6:301-308.

Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 2001; 286: 327-34.

Prentice AM, Black AE, Murgatriyd PR y cols: Metabolism of appetite: question of energy balance with particular reference to obesity. *J Hum Nutr Diet* 1989; 2: 95-104.

Qi Y, Takahashi N, Hileman SM, Patel HR, Berg AH, Pajvani UB, et al. Adiponectin acts in the brain to decrease body weight. *Nat Med* 2004; 10: 524-529.

Quesada, H, del Bas JM, Pajuero D, Díaz S, Fernandez-Larrea J, Pinent M et al. Grape seed proanthocyanidins correct dyslipidemia associated with a highfat diet in rats and repress genes controlling lipogenesis and VLDL assembling in liver. *Int J Obes (Lond)*. 2009; 33:1007-12.

Rahman I, Biswas SK, Kirkham PA. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochem Pharmacol*. 2006; 72(11):1439-52.

Ranheim T, Haugen F, Staff AC, Braekke K, Harsem NK, Drevon CA. Adiponectin is reduced in gestational diabetes mellitus in normal weight women. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2004; 83: 341-347.

Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988; 37:1595-607.

Bibliografía

Rice-Evans C, Miller NJ, Bolwell PG, Bramley PM, Pridham JB. The relative antioxidant properties of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Rad Res* 1995; 87: 35-40.

Rice-Evans CA. Screening of phenolics and flavonoids for antioxidant activity. En: *Antioxidant food supplements in human health*. (Packer L, Hiramatsu M, Yoshikawa T, eds). New York: Academic Press, 1999. p. 239.

Rivera L, Morón R, Zarzuelo A, Galisteo M. Long-term resveratrol administration reduces metabolic disturbances and lowers blood pressure in obese Zucker rats. *Biochem Pharmacol*. 2009; 77:1053-63.

Rocchini AP. Childhood obesity and diabetes epidemic. *N eng. J Med* 2002; 346:854-855

Rock W, Rosenblat M, Miller-Lotan R, Levy AP, Elias M, Aviram M. Consumption of wonderful variety pomegranate juice and extract by diabetic patients increases paraoxonase 1 association with high-density lipoprotein and stimulates its catalytic activities. *J. Agric. Food Chem.*2008; 56:8704-8713.

Romero M, Jiménez R, Sánchez M, López-Sepúlveda R, Zarzuelo MJ, O'Valle F, et al. Quercetin inhibits vascular superoxide production induced by endothelin-1: Role of NADPH oxidase, uncoupled eNOS and PKC. *Atherosclerosis*. 2009; 202:58-67.

Romero-Corral A, Montori VM, Somers VK, Korinek J, Thomas RJ, Allison TG, et al. Association of bodyweight with total mortality and with cardiovascular events in coronary artery disease: a systematic review of cohort studies. *Lancet*. 2006;368:666–78.

Rosebaum M, Leibel R, Hirsch J. Obesity. *N Eng J Med*. 1997; 337: 396-407.

Rotella C.M , Pala L , Mannucci E. Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) and metabolic diseases. *J Endocrinol. Invest.* 2005; 28:746-758.

Rozenberg O, Howell A, Aviram M. Pomegranate juice sugar fraction reduces macrophage oxidative state, whereas white grape juice sugar fraction increases it. *Atherosclerosis* 2006, 188:68-76.

Rubio MA, Gómez de la Cámara A, Del Campo J, Jurado C, García JD, Gómez-Gerique JA, et al. Prevalencia de obesidad en España tras 14 años de seguimiento de la cohorte DRECE. *Endocr Nutr.* 2006; 53 (1): 86.

Salas-Salvadó J, Rubio MA, Barbany M, Moreno B; Grupo Colaborativo de la SEEDO. Consenso SEEDO 2007 para la evaluación del sobrepeso y la obesidad y el establecimiento de criterios de intervención terapéutica. *Med Clin (Barc).* 2007; 128:184-96.

Sánchez Cuevas M, Patricio Jiménez S, Morgado Vázquez R y JS. La homocisteína: un aminoácido neurotóxico. *REB* 2009;28 (1): 3-8.

Sánchez M, Galisteo M, Vera R et al. Quercetin downregulates NADPH oxidase, increases eNOS activity and prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2006; 24:75–84.

Sánchez-Campillo M, Gabaldon JA, Castillo J, Benavente-García O, Del Baño MJ, Alcaraz M, et al. Rosmarinic acid, a photo-protective agent against UV and other ionizing radiations. *Food Chem Toxicol.* 2009;47(2):386-92.

Sánchez-Recalde Á, Kaski JC. Diabetes mellitus, inflamación y aterosclerosis coronaria: perspectiva actual y futura. *Rev Esp Cardiol* 2001; 54: 751-63.

Sassano G, Sanderson P, Franx J, Groot P, Van Straalen J, Bassaganya-Riera J. Analysis of pomegranate seed oil for the presence of jacaric acid. *J. Sci. Food Agric.* 2009; 89 (6): 1046–1052.

Bibliografía

Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2005; 45(4):287-306.

Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem*. 1995; 270:26746-9.

SEEDO: Sociedad Española para el estudio de la Obesidad. Consenso SEEDO'2000 para la evaluación del sobrepeso y la obesidad y el establecimiento de criterios de intervención terapéutica. *Med Clin (Barc)*. 2000; 115: 587-597.

Shabrova EV, Tarnopolsky O, Singh AP, Plutzky J, Vorsa N, et al. Insights into the Molecular Mechanisms of the Anti-Atherogenic Actions of Flavonoids in Normal and Obese Mice. *PLoS One*. 2011;6 (10):e24634.

Shanmugam K, Holmquist L, Steele M, Stuchbury G, Berbaum K, Schulz O, et al. Plant-derived polyphenols attenuate lipopolysaccharide-induced nitric oxide and tumour necrosis factor production in murine microglia and macrophages. *Mol. Nutr. Food Res*. 2008 (52), 000 – 000

Sharma K, McCue P, Dunn SR. Diabetic kidney disease in the db/db mouse. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 284 (6): 1138-44.

Shimada K, Miyazaki T, Daida H. Adiponectin and atherosclerotic disease. *Clin Chim Acta* 2004; 344:1-12.

Shisheva A, Shechter Y. Quercetin selectively inhibits insulin receptor function in vitro and the bioresponses of insulin and insulinomimetic agents in rat adipocytes. *Biochemistry* 1992; 31:8059–8063.

Shoelson SE, Herrero L, Naaz A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology* 2007; 132: 2169-80.

Sierra-Johnson J, Romero-Corral A, López-Jiménez F. Utility of different lipid measures to predict coronary heart disease. *JAMA*. 2008; 299:235.

Simonen RL, Pérusse L, Rankinen T, Rice T, Rao DE, Bouchard C. Familial aggregation of physical activity levels in the Familial Quebec Study. *Med Sci Sports Exerc* 2002; 34: 1137-62.

Singh I, Carey AL, Watson N, Febbraio MA, Hawly JA. Oxidative stress-induced insulin resistance in skeletal muscle cells is ameliorated by gamma-tocopherol treatment. *Eur J Nutr* 2008; 47:387-392.

Slanc P, Doljak B, Kreft S, Lunder M, Janes D, Strukelj B. Screening of selected food and medicinal plant extracts for pancreatic lipase inhibition. *Phytother Res*. 2009; 23:874-7.

Smith CA, Farrah T, Goodwin RG. The TNF- α superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation and death. *Cell* 1994; 76:959-62.

Snehalatha C, Mukesh B, Simon M, Viswanathan V, Haffner SM, Ramachandran A. Plasma adiponectin is an independent predictor of type 2 diabetes in Asian Indians. *Diabetes Care* 2003; 26:3226-9.

Snyder EE, Walts B, Pérusse L, Chagnon YC, Weignagel SJ, Rankinen T, Bouchard C. The human obesity gene map: the 2003 update. *Obes Res* 2004; 12: 369-439.

Somerset SM, Johannot L. Dietary flavonoid sources in Australian adults. *Nutr Cancer*. 2008; 60(4):442-9

Spranger J, Kroke A, Mohlig M, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H, et al. Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *Lancet*. 2003; 361: 226-228.

Bibliografia

Stefan N, Stumvoll M, Vozarova B, Weyer C, Funahashi T, Matsuzawa Y, Bogardus C, Tataranni PA. Plasma adiponectin and endogenous glucose production in humans. *Diabetes Care* 2003;26: 3315-3319.

Steinberg GR. Inflammation in obesity is the common link between defects in fatty acid metabolism and insulin resistance. *Cell Cycle* 2007; 6 (8):888-894.

Storlien LH, James DE, Burleigh KM, Chisholm DJ, Kraegen EW. Fat feeding causes widespread in vivo insulin resistance, decreased energy expenditure, and obesity in rats. *Am J Physiol* 1986; 251: E576-E583.

Stunkard AJ, LaFleur WR, Wadden TA. Stigmatization of obesity in medieval times: Asia and Europe. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1998; 22: 1141-1144.

Suckling KE, Stange EF. Role of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase in cellular cholesterol metabolism. *J. Lipid Res.*1985; 26 :647-671.

Sugiyama H, Akazome Y, Shoji T, Yamaguchi A, Yasue M, Kanda T, Ohtake Y. Oligomeric procyanidins in apple polyphenol are main active components for inhibition of pancreatic lipase and triglyceride absorption. *J Agric Food Chem.* 2007; 55: 4604-9.

Sumner MD, Elliott-Eller M, Weidner G, Daubenmier JJ, Chew MH, Marlin R, et al. Effects of pomegranate juice consumption on myocardial perfusion in patients with coronary heart disease. *Am. J. Cardiol.* 2005; 96:810-814.

Surmi BK, Hasty AH. Macrophage infiltration into adipose tissue: initiation, propagation and remodeling. *Future Lipidol* 2008; 3: 545-56.

Tartaglia LA, Goeddel DV. Two TNF receptors. *Immunol Today* 1992;13:151-3.

Terao J, Murota K, Kawai Y. Vegetable flavonoids and cardiovascular disease. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2008; 1:291-3.

Tesauro M, Mascali A, Franzese O, Cipriani S, Cardillo C, Di Daniele N. Chronic kidney disease, obesity, and hypertension: the role of leptin and adiponectin. *Int J Hypertens*. 2012; 2012: 943605.

Tirosh A, Shai I, Afek A, Dubnov-Raz G, Ayalon N, Gordon B, et al. Adolescent BMI trajectory and risk of diabetes versus coronary disease. *N Engl J Med*. 2011; 364: 1315-25.

Toplak H, Hamann A, Moore R, Masson E, Gorska M, Vercruyse F, et al. Efficacy and safety of topiramate in combination with metformin in the treatment of obese subjects with type 2 diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Int J Obes (Lond)*. 2007; 31: 138-46.

Trombold JR, Barnes JN, Critchley L, Coyle EF. Ellagitannin consumption improves strength recovery 2-3 d after eccentric exercise. *Med. Sci. Sports Exerc*. 2010; 42:493-498.

Tu YC, Lian TW, Yen JH, Chen ZT, Wu MJ. Antiatherogenic effects of kaempferol and rhamnocitrin. *J Agric Food Chem*. 2007; 55: 9969-76.

Turrens J.F, Lariccia J, Nair M.G. Resveratrol has no effect on lipoprotein profile and does not prevent peroxidation of serum lipids in normal rats. *Free Radic Res*. 1997; 27:557-62.

Unger RH. Lipid overload and overflow: metabolic trauma and the metabolic syndrome. *Trends in Endocrinology Metabolism*. 2003; 14(9):398-403.

Vague J. La différenciation sexuelle, facteur déterminant des formes de l'obésité. *Press Méd*. 1947; 55:339-340.

Varo JJ, Martínez-González MA, Martínez JA. Prevalencia de obesidad en Europa. *An Sist Sanit Navar*. 2002; 25: 103-08.

Vasselli JR. Patterns of hyperphagia in the Zucker obese rat: a role for fat cell size and number? *Brain Res Bull* 1985; 14:633-641.

Bibliografía

Vasseur F, Lepretre F, Lacquemant C, Froguel P. The genetics of adiponectin. *Curr Diab Rep* 2003; 3: 151-158.

Venables MC, Hulston CJ, Cox HR, Jeukendrup AE. Green tea extract ingestion, fat oxidation, and glucose tolerance in healthy humans. *Am J Clin Nutr* 2008; 87(3):778-84.

Vinaixa M, Rodríguez MA, Rull A, Beltrán R, Bladé C, Brezmes J, et al. Metabolomic assessment of the effect of dietary cholesterol in the progressive development of fatty liver disease. *J Proteome Res* 2010; 9: 2527-38.

Vinholes J, Grosso C, Andrade P B, Gil-Izquierdo A, Valentao P , de Pinho PG, et al.. In vitro studies to assess the antidiabetic, anti-cholinesterase and antioxidant potential of *Spergularia rubra*. *Food Chemistry* 2011;129:454-462.

Vroegrijk IO, van Diepen JA, van den Berg S, Westbroek I, Keizer H, Gambelli L, et al. Pomegranate seed oil, a rich source of punicic acid, prevents diet-induced obesity and insulin resistance in mice. *Food Chem Toxicol.* 2011;49(6):1426-30.

Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocrine Reviews* 2000; 21:697-738.

Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest.* 2003; 112: 1796-808.

Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, et al. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86: 1930-1935.

Wilding J, Van Gaal L, Rissanen A, Vercruysse F, Fitchet M; OBES-002 Study Group. A randomized, double-blind placebo-controlled study of the long-term efficacy and safety of topiramate in the treatment of obese subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2004; 28: 1399-1410.

Wilson PW, D'Agostino RB, Sullivan L, Parise H, Kannel WB. Overweight and obesity as determinants of cardiovascular risk: the Framingham experience. *Arch Intern Med*. 2002; 162: 1867-872.

Wilson T, Knight TJ, Beitz DC, Lewis DS, Engen RL. Resveratrol promotes atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Life Sci*. 1996; 59:PL15-21.

Winters B, Mo Z, Brooks-Asplund E, Kim S, Shoukas A, Li D, et al. Reduction of obesity, as induced by leptin, reverses endothelial dysfunction in obese (Lepob) mice. *J Appl Physiol* 2000; 89:2382-2390.

Wong CY, O'Moore-Sullivan T, Leano R, Byrne N, Beller E, Marwick TH. Alterations of left ventricular myocardial characteristics associated with obesity. *Circulation*. 2004;110:3081–7.

Wright CI, Van-Buren L, Kroner CI, Koning MM. Herbal medicines as diuretics: A review of the scientific evidence. *J. Ethnopharmacol*. 2007; 114:1-31.

Wu SQ, Hopfner RL, McNeill JR, Wilson TW, Gopalakrishnan V. Altered paracrine effect of endothelin in blood vessels of the hyperinsulinemic, insulin resistant obese Zucker rat. *Cardiovascular Res* 2000; 45:994-1000.

Xu KZ, Zhu C, Kim MS, Yamahara J, Li Y. Pomegranate flower ameliorates fatty liver in an animal model of type 2 diabetes and obesity. *Journal of Ethnopharmacology* 2009; 123: 280–287

Bibliografia

Yamamoto Y, Oue E. Antihypertensive effect of quercetin in rats fed with a high-fat high-sucrose diet. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2006; 70: 933-939.

Yamauchi T, Hara K, Kubota N, Terauchi Y, Tobe K, Froguel P, et al. Dual roles of adiponectin/Acrp30 in vivo as an anti-diabetic and anti-atherogenic adipokine. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*. 2003b 3(4):243-254.

Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 2003a; 423:762-9.

Yamauchi T, Kamon J, Kaki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, et al. The fat-derived hormone Adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med* 2001;7: 941-6.

Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 2002; 8(11):1288-95.

Yang WS, Lee WJ, Funahashi T, Tanaka S, Matsuzawa Y, Chao CL, Chen CL, Tai TY, Chuang LM. Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; (86): 3815-3819.

Yoshida Y, Shioi T, Izumi T. Resveratrol ameliorates experimental autoimmune myocarditis. *Circ J*. 2007; 71:397-404.

Yoshimura Y, Nishii S, Zaima N, Moriyama T, Kawamura Y. Ellagic acid improves hepatic steatosis and serum lipid composition through reduction of serum resistin levels and transcriptional activation of hepatic ppara in obese, diabetic KK-Ay mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 pii: S0006-291X(13)00579-2.

Yu JG, Javorschi S, Hevener AL, Kruszynska YT, Norman RA, Sinha M, et al. The effect of thiazolidinediones on plasma adiponectin levels in normal, obese, and type 2 diabetic subjects. *Diabetes* 2002; 51: 2968-2974.

Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, Coppack SW. C-Reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19:972-8.

Zang M, Xu S, Maitland-Toolan KA, Zuccollo A, Hou X, Jiang B et al. Polyphenols stimulate AMP-activated protein kinase, lower lipids, and inhibit accelerated atherosclerosis in diabetic LDL receptor-deficient mice. *Diabetes.* 2006; 55:2180-91.

Zern TL, Fernandez ML. Cardioprotective effects of dietary polyphenols. *J Nutr* 2005;135:229- 2294.

Zhang HH, Halbleib M, Ahmad F, Manganiello VC, Greenberg AS. Tumor necrosis factor-alpha stimulates lipolysis in differentiated human adipocytes through activation of extracellular signalrelated kinase and elevation of intracellular cAMP. *Diabetes* 2002; 51: 2929-2935.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372: 425-432.

Zhang Y, Wang D, Lee RP, Henning SM, Heber D. Absence of pomegranate ellagitannins in the majority of commercial Pomegranate extracts: implications for standardization and quality control. *J Agric Food Chem.* 2009; 57(16):7395-400.

Ziccardi P, Nappo F, Giugliano G, Esposito K, Marfella R, Cioffi M, et al. Reduction of inflammatory cytokine concentrations and improvement of endothelial functions in obese women after weight loss over one year. *Circulation* 2002;105: 804-9.

Bibliografía

Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 2001; 414:782-787.

Zinman B, Hanley AJG, Harris SB, Kwan J, Fantus IG. Circulating tumor necrosis factor- α concentrations in a native Canadian population with high rates of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:272-8.

Zucker LM, Zucker TF. Fatty, a new mutation in the rat. *J. Hered.* 1961; 52: 275-278.