

TESIS DOCTORAL
Belén San Román Arenas

Búsqueda de **extractos naturales** para el tratamiento de la **obesidad**



Universidad de Granada



TESIS DOCTORAL

Búsqueda de Extractos Naturales para el Tratamiento de la Obesidad

Memoria presentada por

Belén San Román Arenas

Para optar al grado de

Doctor por la Universidad de Granada

Granada, 2011



ugr

Universidad
de Granada



Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Belén San Román Arenas
D.L.: GR 1409-2012
ISBN: 978-84-695-1164-0

Búsqueda de Extractos Naturales para el Tratamiento de la Obesidad

Memoria que presenta la bióloga Belén San Román Arenas para aspirar al grado de doctor por la Universidad de Granada.

Firmado: Belén San Román Arenas

Los directores de esta Tesis Doctoral, **Dr. Óscar Bañuelos Hortigüela** y **Dra. Mónica Olivares Martín**, pertenecientes al departamento de Biomedicina de Biosearch Life S.A.,

CERTIFICAN:

Que la memoria titulada "**Búsqueda de Extractos Naturales para el Tratamiento de la Obesidad**", ha sido realizada por **D^a. Belén San Román Arenas** bajo nuestra dirección en el departamento de Biomedicina de Biosearch Life S.A y en colaboración con la **Dra. Olga Martínez Augustín** del departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Granada para optar al grado de Doctor por la Universidad de Granada.

Granada, a 11 de noviembre de 2011

Dr. Óscar Bañuelos Hortigüela
Director de la Tesis

Dra. Mónica Olivares Martín
Directora de la Tesis

Índice

Abreviaturas, siglas y acrónimos	v
Capítulo 1. Introducción	1
1.1. La obesidad: un problema de salud pública	3
1.1.1. Definición, epidemiología y repercusiones sobre la economía	3
1.1.2. Etiología	9
1.1.3. Clasificación de la obesidad y métodos de diagnóstico	12
1.1.4. Medida de los grados de obesidad	14
1.1.5. Trastornos asociados a la obesidad	16
1.1.6. Tratamiento de la obesidad	25
1.2. El tejido adiposo	29
1.2.1. Tejido adiposo blanco	31
1.2.2. El tejido adiposo blanco como órgano endocrino	32
1.2.3. Tejido adiposo marrón	35
1.3. El adipocito	35
1.3.1. Diferenciación de los adipocitos	36
1.3.2. Modelo de estudio <i>in vitro</i> : línea celular 3T3-L1	42
1.4. Lipólisis	45
1.4.1. Principales enzimas implicadas en la hidrólisis de triglicéridos y su función	45
1.4.2. Regulación de la lipólisis	48
1.4.3. Lipólisis y obesidad	51
1.5. Lipogénesis	52
1.5.1. Principales enzimas implicadas en la lipogénesis y su función	52
1.5.2. Regulación de la lipogénesis	53
1.5.3. Lipogénesis y obesidad	54
1.6. Digestión y absorción de las grasas	54
1.6.1. Enzimas involucradas en la absorción de la grasa: la lipasa pancreática	55
1.7. Digestión y absorción de hidratos de carbono: digestión del almidón	56

1.7.1. Enzimas involucradas en la absorción del almidón: la α -amilasa pancreática.....	58
1.8. Modelos animales para el estudio de obesidad	58
1.9. Las plantas como fuente de compuestos anti-obesidad.....	64
Capítulo 2. Objetivos	67
Capítulo 3. Materiales y Métodos	71
3.1. Proceso de obtención/elaboración de los extractos	73
3.2. Búsqueda de compuestos con potencial actividad sobre la obesidad.....	76
3.2.1. Ensayos enzimáticos	76
3.2.2. Ensayos celulares.....	80
3.2.3. Medida de la citotoxicidad de los extractos.....	89
3.2.4. Ensayos para cuantificar la expresión génica.....	90
3.3. Modelos de experimentación <i>in vivo</i>	105
3.3.1. Animales y condiciones de mantenimiento de los mismos.....	105
3.3.2. Composición de las dietas empleadas.....	107
3.3.3. Sacrificio de los animales y recogida de muestras.....	108
3.3.4. Parámetros analizados.....	109
3.4. Análisis estadístico.....	115
Capítulo 4. Resultados.....	117
4.1. Creación de la librería de extractos.....	119
4.2. Búsqueda de compuestos con potencial actividad sobre la obesidad.....	121
4.2.1. Búsqueda de inhibidores de lipasa pancreática.....	122
4.2.2. Búsqueda de inhibidores de α -amilasa	127
4.2.3. Búsqueda de extractos inhibidores de la adipogénesis.....	134
4.2.4. Búsqueda de extractos inductores de lipólisis.....	145
4.3. Selección de extractos para experimentación animal	151
4.4. Efectos del tratamiento con extractos vegetales en modelos de experimentación animal	152
4.4.1. Efecto del consumo de extractos sobre la absorción de grasa en ratas Wistar alimentadas con dieta de cafetería	152
4.4.2. Evaluación del efecto de tres extractos inductores de la lipólisis en el modelo de obesidad genética de ratas Zucker	155

4.4.3. Evaluación del efecto del extracto EB1223 sobre la obesidad en ratas Zucker	167
4.5. Ensayos a nivel molecular para analizar el efecto de los extractos utilizados en experimentación animal con ratas Zucker	177
4.5.1. Efecto de la adición de extractos sobre la concentración de AMPc.....	177
4.5.2. Efecto del tratamiento con el extracto EB1223 sobre la expresión de genes implicados en lipólisis	178
4.5.3. Conclusiones de los ensayos a nivel molecular sobre el mecanismo de acción de los extractos utilizados en experimentación animal con ratas Zucker	183
Capítulo 5. Discusión	185
5.1. Búsqueda de inhibidores de la absorción de grasa	188
5.2. Búsqueda de inhibidores de la absorción de hidratos de carbono	192
5.3. Búsqueda de inhibidores de la adipogénesis	196
5.4. Búsqueda de inductores de lipólisis	200
Capítulo 6. Conclusiones.....	211
Anexo I: Listado de muestras vegetales.....	215
Bibliografía	225

Abreviaturas, siglas y acrónimos

ABHD5	Proteína 5 con dominio α/β hidrolasa, también denominada <i>Comparative Gene Identification-58</i> (CGI-58)
AC	Adenilato ciclasa
ACC	Acetil-CoA carboxilasa
ACS	Acil-CoA sintetasa
ADD-1/SREBP-1	Factor de diferenciación y determinación de los adipocitos/proteína de unión a elementos de respuesta regulados por esteroides (<i>Adipocyte-Differentiation and Determination factor 1/Sterol Response Element Binding Protein 1</i>)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGL	Ácidos grasos libres
AMP	Adenosín monofosfato
AMPK	Quinasa estimulada por el adenosín monofosfato (AMP)
aP2	Proteína de unión a ácidos grasos en el adipocito (<i>Adipocyte fatty acid binding protein</i>)
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	Asociación Americana de Cultivos Tipo (<i>American Type Culture Collection</i>)
ATGL	Adiposa triglicérido lipasa
C/EBP	Proteínas de unión a intensificadores CCAAT (<i>CCAAT/enhancer binding protein</i>)
CGI-58	Identificación comparativa del gen 58 (<i>Comparative Gene Identification-58</i>)
Ct	Ciclo umbral (<i>Cycle threshold</i>)
DEPC	Dietilpirocarbonato
DHBS	Sulfato 2-hidroxi-3,5-diclorobenceno sódico
DM2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
DMSO	Dimetil sulfóxido

ECV	Enfermedad cardiovascular
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (<i>European Food Safety Authority</i>)
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
FABP-4	Proteína fijadora de ácidos grasos (<i>Fatty Acid-Binding Protein</i>)
FAS	Sintasa de ácidos grasos (<i>Fatty Acid Synthase</i>)
FBS	Suero bovino fetal (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
FCS	Suero de ternera fetal (<i>Fetal Calf Serum</i>)
FAF	Factor adiposo inducido por el ayuno (<i>Fasting-Induced Adipose Factor</i>)
GLUT4	Transportador de glucosa tipo 4 (<i>Glucose Transporter type 4</i>)
GPAT	Glicerol-fosfato aciltransferasa
HDL	Lipoproteína de alta densidad (<i>High-Density Lipoprotein</i>)
HOMA	Evaluación del modelo homeostático (<i>Homeostatic Model Assessment</i>)
HSL	Lipasa sensible a hormonas (<i>Hormone Sensitive Lipase</i>)
HTA	Hipertensión arterial
IBMX	Isobutilmetilxantina
IEFS	Instituto Europeo de Estudios Alimentarios (<i>Institute of European Food Studies</i>)
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico tipo 1 (<i>Insulin-like Growth Factor</i>)
IL-6	Interleucina-6
IMC	Índice de masa corporal
INE	Instituto Nacional de Estadística
LDL	Lipoproteína de baja densidad (<i>Low-Density Lipoprotein</i>)
LPL	Lipoproteína lipasa
MGL	Enzima monoacilglicerol lipasa
MTT	Bromuro azul de tetrazolio de Thiazolyl

NAOS	Nutrición, Actividad Física y Prevención de la Obesidad
NO	Óxido nítrico
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAI-1	Activador inhibidor del plasminógeno-1
PBS	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PCR	Proteína C reactiva
PDE 3	Fosfodiesterasa 3
PEPCK	Fosfoenol piruvato carboxiquinasa
PIK-3	Fosfatidilinositol quinasa 3
PKA	Proteína quinasa A
PKB	Proteína quinasa B
PPAR	Receptores activados por proliferadores de los peroxisomas (<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor</i>)
RSE	Error estándar relativo
SEEDO	Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad
SEM	Error estándar de la media
SM	Síndrome metabólico
SOP	Síndrome de ovario poliquístico
TG	Triglicéridos
TNF-α	Factor de necrosis tumoral (TNF) alpha
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad (<i>Very-Low-Density Lipoprotein</i>)
WHO MONICA	<i>World Health Organization Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease</i>

Capítulo 1. Introducción

En este capítulo se realiza un análisis de la prevalencia de la obesidad, su definición, causas y efectos sobre la salud, de donde deriva la importancia de reducir su incidencia. Se describe el tejido adiposo y sus células, los adipocitos, en los cuales se acumula el exceso de grasa característico en la obesidad, el proceso de diferenciación y algunos de los genes implicados en los procesos de lipogénesis o lipólisis involucrados en la síntesis e hidrólisis respectivamente de la grasa acumulada en su interior.

1.1. La obesidad: un problema de salud pública

1.1.1. Definición, epidemiología y repercusiones sobre la economía

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la obesidad se define como una acumulación anormal o excesiva de grasa, en el tejido adiposo blanco y en forma de triglicéridos, que puede ser perjudicial para la salud. La acumulación de grasa resulta favorecida cuando tiene lugar una canalización preferente de los nutrientes hacia el tejido adiposo, en detrimento del músculo y otros tejidos, en los que el destino más inmediato es la oxidación (Kopelman 2000; Palou y col. 2004).

En la actualidad los dos problemas nutricionales más frecuentes con los que se enfrenta el mundo son la desnutrición y la obesidad. La creciente prevalencia de la obesidad, sobre todo en los últimos 30 años, ha llevado a la OMS a considerarla como una epidemia global que se ha convertido en el mayor problema de salud pública en numerosas partes del mundo. Hace un tiempo el sobrepeso y la obesidad se consideraban un problema exclusivo de los países ricos, sin embargo, en los últimos años, su incidencia está aumentando de una forma espectacular en los países pobres o en vías de desarrollo, sobre todo en el medio urbano.

Los últimos cálculos de la OMS indican que en el año 2005 había en todo el mundo aproximadamente 1600 millones de adultos con sobrepeso y unos 400 millones de obesos, y si no se llevan a cabo acciones para resolver este problema, se estima que en 2015 el número de adultos en el mundo con sobrepeso alcanzará los 2300 millones y más de 700 millones serán obesos (Organización Mundial de la Salud 2000).

En Europa, la prevalencia de la obesidad en la población general se ha triplicado en las dos últimas décadas, y los datos ofrecidos por la OMS estimaban que en el año 2010 aproximadamente un 20% de la población europea adulta y

un 10% de la población infantil presentaría problemas de obesidad (Oliva y col. 2008).

Se han llevado a cabo estudios que analizan la prevalencia de la obesidad de forma general. Uno de los primeros en los que se analizó de forma global la prevalencia de la obesidad en Europa fue el proyecto WHO MONICA (*Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease*), diseñado para evaluar los cambios temporales entre los factores de riesgo de enfermedad cardiovascular entre la población de 35 a 64 años de edad. El estudio se llevó a cabo en 21 países desde comienzos de los años 80 hasta la mitad de los años 90. En 1989 se publicaron los primeros resultados de este proyecto en el que se observó que la prevalencia de obesidad era mayor entre los varones que entre las mujeres, y su incidencia era mayor en los países de la región del Mediterráneo y del este de Europa, que en los de Europa central y norte. Los resultados finales mostraron que la prevalencia de esta enfermedad tiene una gran variabilidad entre países, alcanzando el 30% en la zona de la antigua Yugoslavia y llegando sólo a un 5% de la población en Suiza (Varo y col. 2002; Silventoinen y col. 2004).

Una década después, el *Institute of European Food Studies* (IEFS) promovió otro estudio, realizado en 1997, que tenía como objetivo determinar la proporción y características sociodemográficas de la población obesa. En este estudio participaron los 15 estados miembros de la Unión Europea, con aproximadamente 1000 representantes de cada país. Este estudio reveló que la mayor prevalencia de obesidad se presentaba en el Reino Unido, donde alcanzaba el 12% de la población, seguido de España, con un 11%, mientras que los porcentajes más bajos se daban en Suecia e Italia, ambas con un 7% de la población obesa (Figura 1.1). Si se tenían en cuenta y de forma conjunta la obesidad y el sobrepeso, la mayor prevalencia se observaba en España, Alemania y Grecia (Varo y col. 2002).

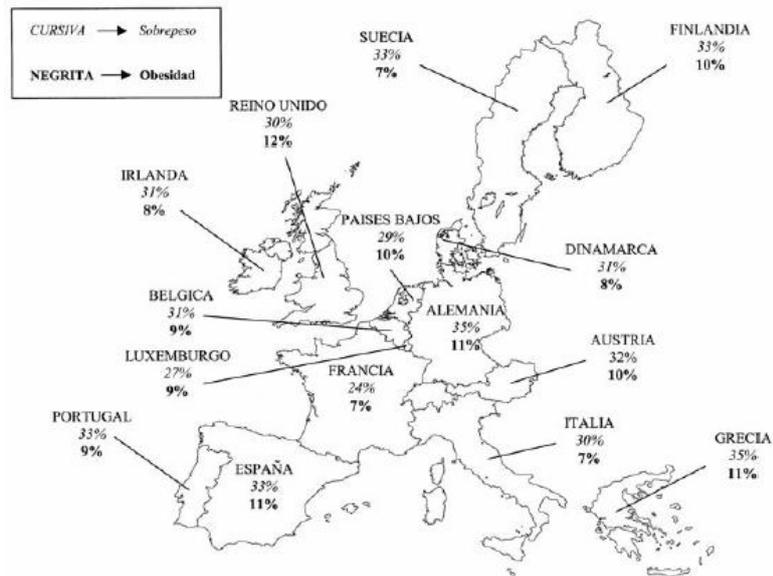


Figura 1.1. Distribución geográfica de la prevalencia de sobrepeso y obesidad en la Unión Europea (Varo y col. 2002).

En nuestro país, los últimos datos publicados por el Instituto Nacional de Estadística (INE), el 21 diciembre 2009, sobre la Encuesta Europea de Salud en España revelan un aumento en la tasa de obesidad, con seis millones de personas adultas obesas (Tabla 1-1).

Tabla 1-1. Porcentaje de población adulta con obesidad o sobrepeso en España.

Año	% obesos	% sobrepeso
2006	15,6	37,8
2009	17,1	36,7

Esta situación aumenta con la edad en ambos sexos, siendo más frecuente en el caso de los hombres, entre los que un 18,6% presenta obesidad y un 44,2% sobrepeso, que en las mujeres, entre las cuales un 15,6% presentan obesidad y un 29,2% sobrepeso (Instituto Nacional de Estadística 2009).

La obesidad infantil

Más allá de solucionarse el problema de la obesidad al trasladarlo al ámbito infantil, éste se agudiza apareciendo en la población a edades cada vez más tempranas. Ya en 2005 había en todo mundo al menos 20 millones de menores de cinco años con sobrepeso. En Europa, la prevalencia del sobrepeso en niños y adolescentes ronda el 20% y un tercio de ellos se consideran obesos. Evaluando los datos sobre obesidad infantil de los 27 países pertenecientes a la Unión Europea y considerando que nueve de dichos países no poseen datos representativos a nivel nacional, se determina que los países de la región del Mediterráneo y de las islas Británicas presentan los niveles más altos de sobrepeso y obesidad, mientras que los países del centro, este y norte de Europa presentan niveles más bajos (Cattaneo y col. 2010).

Según la SEEDO (Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad), en los últimos años la obesidad en bebés ha crecido un 60%, debido especialmente a los malos hábitos alimentarios de la mujer durante la gestación. La OMS calculó que en el año 2010 habría 42 millones de niños con sobrepeso en todo el mundo, de los que cerca de 35 millones vivirían en países en vías de desarrollo (Organización Mundial de la Salud 2011).

Entre los años 1998 y 2000 se llevó a cabo en España el estudio enKid (Serra Majem y col. 2003), diseñado para evaluar los hábitos alimentarios y el estado nutricional de la población infantil y juvenil española (entre 2 y 24 años). Los resultados del estudio revelaron unos valores de Índice de Masa Corporal (IMC) similares en ambos sexos hasta la edad de ocho años, a partir de la cual se observaba un aumento progresivo con la edad del IMC en varones, mientras que en las mujeres el IMC se estabilizaba a partir de los 16 años (Figura 1.2).

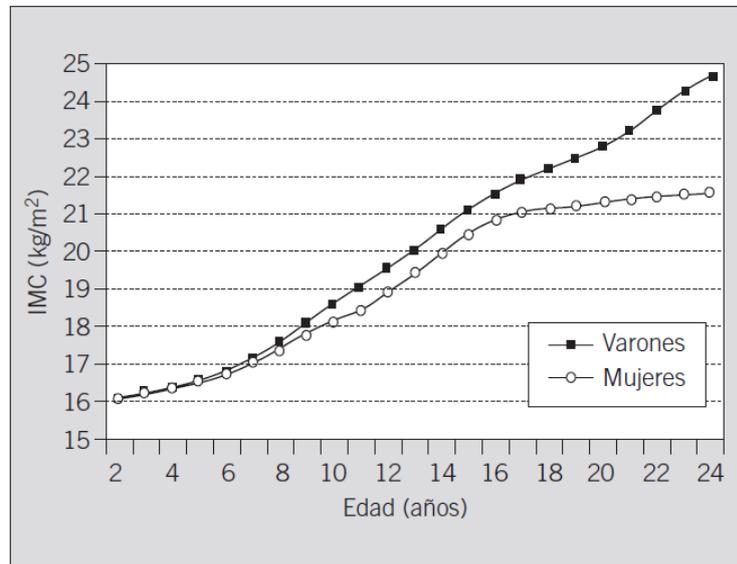


Figura 1.2. Percentil 50 del índice de masa corporal en la población española de 2 a 24 años de edad (Serra Majem y col. 2003).

En el año 2011 se han publicado los resultados obtenidos del estudio conocido como ALADINO (ALimentación, Actividad física, Desarrollo INFantil y Obesidad) realizado por la Agencia de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) (Ministerio de Sanidad Política Social e Igualdad 2011). El impacto de los resultados de este estudio ha traspasado el ámbito científico y figuró entre las principales noticias de los medios de comunicación nacionales de ámbito general. Este estudio se llevó a cabo entre octubre de 2010 y mayo de 2011 en 7923 niños y niñas de entre seis y nueve años. Los resultados reflejan que el 45,2% de los niños españoles de seis a nueve años tiene exceso de peso. De ellos, el 26,1% sufre sobrepeso y el 19,1%, obesidad (Figura 1.3). El estudio manifiesta diferencias significativas en la prevalencia de la obesidad dependiendo del género (mayor prevalencia entre varones), nivel educativo de los progenitores, nivel de ingresos (mayor prevalencia entre las clases más desfavorecidas) y hábitos de los niños durante el tiempo de ocio en el hogar.

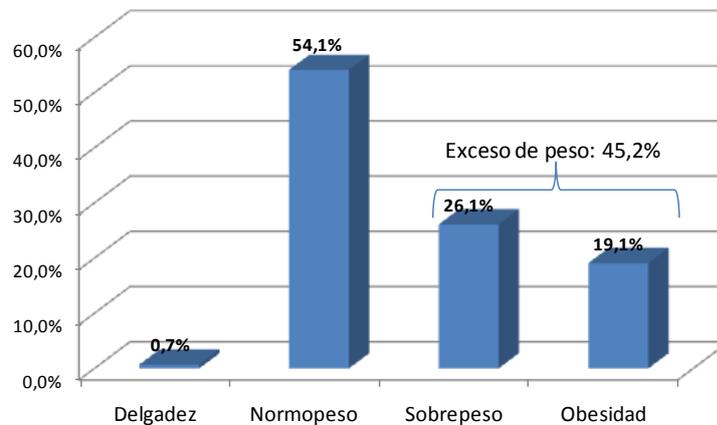


Figura 1.3. Estudio de prevalencia de la obesidad en niños entre 6 y 9 años (Estudio ALADINO).

Repercusiones de la obesidad sobre la salud

La obesidad tiene un importante impacto sobre la salud de las personas que la padecen que no sólo consiste en una peor calidad de vida durante los años vividos, sino que además reduce su esperanza de vida y provoca que requieran la utilización de recursos sanitarios con mayor frecuencia y de forma más intensa que las personas no obesas. Las complicaciones de la obesidad la han convertido en la segunda causa de mortalidad prematura y evitable después del tabaco. Se estima que una de cada trece muertes anuales producidas en la Unión Europea está probablemente relacionada con el exceso de peso. Al menos 279000 de las muertes anuales ocurridas durante la década de los años 90 en la Unión Europea se podían atribuir al exceso de peso y la obesidad. Esto representa un 7,7% de todas las muertes registradas entre personas adultas mayores de 25 años (Banegas y col. 2003). Concretamente, en España, cada año se pueden atribuir al exceso de peso unas 28000 muertes de personas adultas, lo que se traduce en un 8,5% de todas las muertes ocurridas.

La obesidad infantil se asocia a una mayor probabilidad de muerte prematura y discapacidad en la edad adulta, siendo un potente predictor de la obesidad en el adulto (Cattaneo y col. 2010).

Además de los problemas de salud, la obesidad tiene una fuerte repercusión sobre la economía. En el mundo occidental, el gasto sanitario derivado de la obesidad oscila entre el 2-8% del presupuesto sanitario total (Banegas y col. 2003; Pereira y García Luna 2005; Young y col. 2007; Oliva y col. 2008).

1.1.2. Etiología

Las causas principales de la epidemia de la obesidad en las últimas décadas hay que buscarlas en cambios en las conductas de la población ocasionados por razones sociales. Entre los factores que más contribuyen al desarrollo de la obesidad se encuentran aquellos debidos al entorno, estos son la alimentación y la falta de actividad física, lo que ocasiona un desequilibrio entre la ingesta de alimentos y el gasto energético.

La industria alimentaria ofrece cada vez más productos que facilitan la vida del consumidor, pero que en muchos casos van acompañados de un exceso de colesterol, grasas saturadas, grasas trans, azúcares simples y aditivos, que consumidos en exceso conducen a un aumento de peso. Además al exceso de consumo de grasas y colesterol hay que añadirle el aumento del sedentarismo debido al uso de medios de transporte motorizados y la falta de ejercicio físico (Oliva y col. 2008).

Además de la alimentación y la falta de actividad física, existen otros factores que pueden contribuir en el desarrollo de la obesidad, como factores genéticos, fisiológicos, psicológicos y, en un menor número de casos, factores endocrinos (Figura 1.4).



Figura 1.4. Principales factores que contribuyen al desarrollo de la obesidad.

- **Factores genéticos:** la obesidad no presenta un patrón hereditario claro, sino que es consecuencia de la interacción entre unos rasgos genotípicos y factores externos como la dieta y el estilo de vida. No obstante, una persona que tenga una historia familiar con antecedentes en obesidad puede estar genéticamente predispuesta a ganar peso con mayor facilidad. Se asume que la contribución genética para el desarrollo de la obesidad constituye el 50% de los factores desencadenantes, habiéndose observado que la probabilidad de que una persona cuyos padres son obesos llegue también a serlo en la edad adulta es de un 50%, mientras que la de una persona cuyos padres son delgados es de un 20%.

Se han asociado más de 600 genes con la regulación del metabolismo y el mantenimiento del peso corporal. Entre estos genes nos encontramos con genes implicados en la termogénesis, lipólisis, adipogénesis y con la ingesta. Durante un tiempo las investigaciones genéticas se han centrado en determinados genes candidatos que codifican proteínas con una función metabólica conocida. Gracias a las nuevas técnicas de análisis genético basadas en microarrays se pueden llevar a cabo estudios de genotipado a gran escala donde se pueden analizar cientos de variantes genéticas de forma simultánea e identificar factores genéticos para los que previamente no se

conocía su implicación en la etiología de la obesidad (Vaquero y col. 2008; González Caballero 2009).

- **Factores fisiológicos:** existen varios factores fisiológicos involucrados en el desarrollo de obesidad. Estos factores incluyen una alteración del metabolismo del tejido adiposo y cambios en las zonas del cerebro que controlan los niveles de saciedad de la persona.

Los casos en los que la obesidad se debe a un trastorno metabólico son pocos. Entre estos casos se encuentra el Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP), en el que entre el 30% y el 60% de las mujeres que lo padecen son obesas.

- **Factores psicológicos:** hay situaciones en las que las personas tienen tendencia a la sobrealimentación en respuesta a estados de ánimo, como la depresión, la ansiedad, el estrés o el aburrimiento.

Además, aunque no puede considerarse un factor desencadenante, las personas obesas pueden tener una concepción de sí mismas, que les haga perder la fuerza de voluntad para hacer dieta y ejercicio. En el caso de niños y adolescentes el problema se agrava en la escuela, donde los niños obesos son objeto de burla y discriminación, lo que puede generar cambios de ánimo que influyan en los hábitos alimentarios.

- **Factores endocrinos:** los casos de obesidad cuyo origen es un desequilibrio hormonal, como puede darse en pacientes con hipotiroidismo, suponen un 5% del total. Los casos de hipotiroidismo ocurren cuando existe un fallo en la glándula tiroidea y la producción de hormonas es baja. Esta glándula es la responsable de controlar el crecimiento, el metabolismo y la utilización de la energía. Las personas que sufren deficiencias en esta glándula suele presentar un crecimiento anormal o sobrepeso.
- **Actividad física y alimentación:** la actividad física se considera fundamental para conseguir aumentar por parte del organismo el consumo de calorías ingeridas con la dieta, calorías que de no ser utilizadas se acumularían en

forma de tejido adiposo. Por este motivo la falta de práctica de ejercicio físico es un factor que se relaciona con el desarrollo de la obesidad.

La suma de todos estos factores hace que se pueda definir la obesidad como una enfermedad crónica, compleja, multifactorial, caracterizada por el aumento del tejido adiposo, influida por factores metabólicos, fisiológicos, genéticos, celulares, moleculares, culturales y sociales, que se desarrolla por una interacción entre los genes y el ambiente (Albright y Stern 1998; Kopelman 2000; Comuzzie y col. 2001; Barbany y Foz 2002; Martí y col. 2004; Vaquero y col. 2008; González Caballero 2009).

1.1.3. Clasificación de la obesidad y métodos de diagnóstico

La obesidad se puede clasificar atendiendo a distintos parámetros. En la Tabla 1-2 se muestran las distintas clasificaciones que se pueden hacer de la obesidad.

Tabla 1-2. Formas de clasificación de la obesidad.

Parámetros de clasificación	Tipos de obesidad
Etiología	Primaria Secundaria
Origen	Endógena Exógena
Distribución de la grasa corporal	Androide o central Ginoide o periférica
Número y tamaño de adipocitos	Hiperplásica Hipertrófica

Según su etiología, la obesidad se clasifica en obesidad primaria o secundaria.

- *Obesidad primaria.* Es la obesidad producida por el desequilibrio entre la energía procedente de la alimentación y el gasto energético.

- *Obesidad secundaria.* Es la obesidad producida como consecuencia de determinadas enfermedades que provocan un aumento de la grasa corporal. Por ejemplo, ocurre en el caso de la hiperinsulinemia que se puede producir en la diabetes tipo 2, donde el exceso de insulina favorece la síntesis de grasa y su acumulación en el tejido adiposo.

Si la clasificación se basa en su origen, la obesidad puede ser endógena o exógena.

- *Obesidad endógena.* Es la producida por factores fisiológicos como cambios hormonales o alteraciones metabólicas.
- *Obesidad exógena.* Es la producida por factores dietéticos, una ingesta excesiva de grasa a través de la dieta, acompañado de la falta de ejercicio.

De todas las clasificaciones posibles, la más aceptada en la comunidad científica es la que se hace según la distribución de la grasa corporal. Según esta distribución la obesidad se clasifica en obesidad *androide* y obesidad *ginoide*, aunque existen casos en los que la distribución de la grasa es homogénea. La diferencia entre estos dos tipos de acumulación de tejido adiposo tiene gran importancia desde el punto de vista clínico para poder valorar el grado de riesgo metabólico y cardiovascular.

- *Obesidad androide o central.* También conocida por su distribución en forma de manzana. Es más frecuente en hombres que en mujeres. Se caracteriza porque la acumulación de grasa está localizada en la parte superior del cuerpo (cintura). Suele aparecer cuando se come en exceso (hiperfagia) y se asocia a complicaciones de tipo metabólico como la diabetes y la hipertensión arterial y, por tanto, con un aumento del riesgo coronario.
- *Obesidad ginoide o periférica.* También conocida por su distribución en forma de pera. Es más frecuente en mujeres que en hombres. Se caracteriza porque la acumulación de grasa se encuentra en la parte inferior del cuerpo (caderas y piernas). Suele aparecer por acción de estrógenos y se asocia a complicaciones de tipo mecánico como la artrosis

de la columna y rodillas, además de problemas de circulación como las varices.

Este tipo de clasificación no se puede tener en cuenta en el caso de la obesidad infantil, debido a que los niños todavía están en la etapa de crecimiento y sus cuerpos no se encuentran completamente desarrollados.

Otra forma de clasificar la obesidad, si bien no se utiliza en clínica, se establece según el número y tamaño de los adipocitos. Según este criterio la obesidad se puede clasificar en hiperplásica (tamaño de adipocitos normal pero en elevado número), hipertrófica (número normal de adipocitos pero con una gran cantidad de grasa en su interior) y mixta. Esta clasificación se realiza mediante el análisis de muestras de tejido adiposo obtenidas por medio de una punción biopsica. La obesidad hipertrófica se relaciona con la obesidad androide y, por lo tanto, con complicaciones metabólicas (Barbany y Foz 2002; González Caballero 2009).

1.1.4. Medida de los grados de obesidad

Existen diferentes métodos para medir el grado de obesidad. Principalmente se utilizan métodos basados en medidas antropométricas, como el peso y la talla, el índice de masa corporal, la medida de los pliegues cutáneos, o la medida de las circunferencias corporales como el perímetro de la cintura y el índice cintura-cadera. En clínica los métodos más utilizados son el índice de masa corporal (IMC) y la medida de los pliegues cutáneos, aunque ambos métodos tienen sus limitaciones.

La fórmula más utilizada en estudios epidemiológicos como método de referencia para el diagnóstico de la obesidad es el índice de masa corporal, también conocido como Índice Quetelet o en inglés *Body Mass Index* (BMI), que relaciona el peso con la altura ($IMC = \text{kg}/\text{m}^2$). Según este índice, la OMS propuso en 1998 una clasificación para el sobrepeso y la obesidad que se aplica a individuos adultos de ambos sexos (Tabla 1-3).

Tabla 1-3. Clasificación del sobrepeso y obesidad según los criterios de la OMS en función del Índice de Masa Corporal (IMC).

IMC (kg/m²)	Clasificación OMS	Descripción de la población
<18,5	Bajopeso	Delgado
18,5-24,9	Normopeso	Saludable, "normal"
25,0-29,9	Sobrepeso (obesidad grado I)	Sobrepeso
30,0-34,9	Obesidad grado II	Obeso
35-39,9	Obesidad grado III	Obeso mórbido
≥40,0	Obesidad grado IV	Obeso mórbido

En el año 2007 la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO) publicó un documento consenso en el que realiza una nueva clasificación que subdividió la gama de sobrepeso en dos categorías e introdujo un grado adicional de obesidad para aquellos pacientes con IMC \geq a 50 kg/m² que son sujetos de indicaciones especiales en la elección del procedimiento de cirugía bariátrica (Rubio 2007).

El otro método más utilizado para el diagnóstico de la obesidad es el que utiliza los pliegues cutáneos. Estos pliegues se pueden medir en varias partes del cuerpo: en el ángulo inferior de la escápula (pliegue subescapular), en el abdomen (pliegue supraíliaco), en la cara anterior del brazo sobre el bíceps (pliegue bicipital) y el de la zona tricípital, que representa una medida de la grasa subcutánea (debajo de la piel). Sin embargo, este método de medida presenta varios inconvenientes que hacen que sea menos utilizado en clínica que el IMC.

Además de los mencionados, existen otros métodos antropométricos que permiten valorar el riesgo para la salud, para un paciente obeso, que representan su exceso de grasa y la distribución de la misma. Es el caso del método que utiliza el valor del perímetro de la cintura (relacionado con el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares (Tabla 1-4)) y el método que utiliza el índice cintura-cadera, que permite distinguir entre obesidad androide o ginoide (Zayas-Torriente y col. 2002; Gibney y col. 2006).

Tabla 1-4. Valores de riesgo cardiovascular a partir del perímetro de la cintura según la SEEDO (Aranceta y col. 2003).

	Riesgo	Riesgo elevado
Hombres	> 95 cm	> 102 cm
Mujeres	> 82 cm	> 90 cm

Finalmente, en clínica, para un diagnóstico completo de la obesidad es preciso llevar a cabo un historial completo de la persona obesa, en el que además de los datos antropométricos (talla, peso, IMC) se deben tener en cuenta sus hábitos alimenticios, la actividad física que realiza y los antecedentes familiares de obesidad para establecer una posible predisposición genética (Barbany y Foz 2002).

1.1.5. Trastornos asociados a la obesidad

El aumento de la masa corporal va acompañado de grandes cambios fisiológicos. De forma generalizada la obesidad provoca un aumento del volumen total de sangre y la función cardíaca. Otras alteraciones parecen estar relacionadas con la distribución anatómica de la grasa. Específicamente, la grasa que se localiza en el abdomen y cavidad torácica, que caracteriza la obesidad androide, altera la función respiratoria y es la mayor contribuyente al desarrollo de hipertensión, concentraciones de insulina elevadas en plasma y resistencia a la insulina, diabetes e hiperlipidemia (Kopelman 2000).

La obesidad causa numerosos problemas de salud de forma independiente y en asociación con otras enfermedades. Está directamente relacionada con el síndrome metabólico, la enfermedad cardiovascular, la diabetes tipo 2, la hipertensión, las complicaciones respiratorias y la osteoartritis, además de

aumentar la incidencia de ciertos tipos de cáncer, como el de endometrio, mama y colon.

Síndrome metabólico

El síndrome metabólico (SM) es un grupo de alteraciones metabólicas y vasculares, entre las que destacan la obesidad visceral, la hipertensión arterial (HTA), las alteraciones del metabolismo glucídico como resistencia a la insulina y anomalías lipoproteicas. Esta suma de alteraciones está asociada a un mayor riesgo de padecer enfermedad cardiovascular y diabetes.

La obesidad, como enfermedad relacionada con el SM, es protagonista del desarrollo de la resistencia a la insulina e hiperinsulinemia, existiendo también una relación estrecha entre los niveles de ácidos grasos en circulación y el desarrollo del síndrome metabólico. Estas patologías pueden aparecer simultáneamente o de forma progresiva, contribuyendo a acelerar el desarrollo de la enfermedad cardiovascular. Se considera que una persona sufre SM si presenta intolerancia a la glucosa, diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) o resistencia a la insulina, además de dos o más de las alteraciones señaladas en la Tabla 1-5.

La obesidad afecta tanto al desarrollo del síndrome metabólico como a la aparición de la resistencia a la insulina, que a su vez está estrechamente ligada al síndrome metabólico. Además, la obesidad, sobre todo la de tipo abdominal, está relacionada por sí misma, con un mayor riesgo de padecer todas las alteraciones implicadas en el SM. La relación entre obesidad y síndrome metabólico queda patente en el hecho de que la mayoría de los pacientes con síndrome metabólico tienen algún grado de obesidad, aunque el sobrepeso u obesidad no implica en todos los casos el desarrollo del síndrome metabólico (Becerra 2005; Griera 2005; Corbatón Anchuelo y Serrano Ríos 2006).

Tabla 1-5. Alteraciones asociadas al síndrome metabólico (Becerra 2005).

Alteraciones	
Antropométricas	Obesidad central (visceral)*
Metabolismo de la glucosa	Glucemia basal alterada Intolerancia a los hidratos de carbono Diabete <i>mellitus</i>
Metabolismo del ácido úrico	Hiperuricemia y gota* ↓ Aclaración renal*
Metabolismo lipídico	↑ Triglicéridos y LDL* ↓ HDL* Hiperlipemia posprandial
Hemodinámicas	↑ Presión arterial* ↑ Retención renal de sodio ↑ Actividad simpática
Coagulación/Fibrinólisis	↑ PAI-1 y fibrinógeno
Disfunción endotelial	↑ Adhesión de células mononucleares ↑ Moléculas de adhesión celular ↓ Vasodilatación dependiente del endotelio
Inflamatorias	↑ Proteína C reactiva ↑ IL-6 y TNF α
Reproductivas	Síndrome del ovario poliquístico

* alteraciones secundarias empleadas para el diagnóstico de SM

Diabetes *mellitus* tipo 2 y resistencia a la insulina

La diabetes *mellitus* tipo 2 es una compleja enfermedad metabólica caracterizada por una hiperglucemia resultante de una inadecuada actividad de la insulina, ocasionada por un déficit en la producción de esta hormona o por un proceso de resistencia a la misma en los tejidos periféricos.

La insulina es una hormona metabólica responsable de la regulación de los nutrientes energéticos (proteínas, grasas e hidratos de carbono). El principal estímulo para la secreción de la insulina es el aumento de la glucosa sanguínea que se produce unos minutos después de ingerir una comida que contenga carbohidratos. La insulina tiene una gran variedad de acciones sobre el metabolismo celular de la glucosa, pero sus principales efectos van dirigidos a la incorporación de la glucosa en los diferentes tejidos y su posterior utilización y, por tanto, a la disminución de la glucemia después de una comida hasta valores normales (4-10 mmol/L) (Figura 1.5).

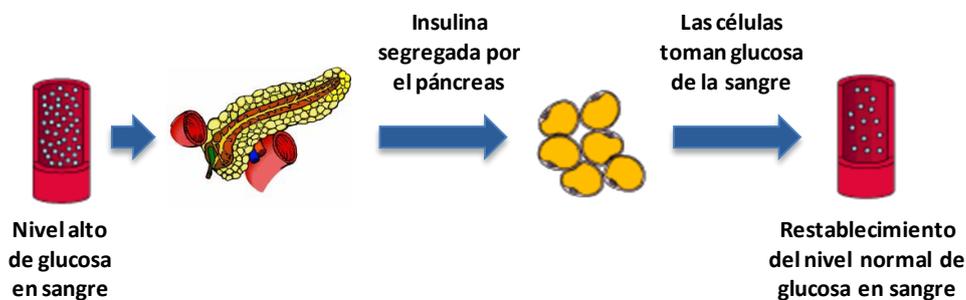


Figura 1.5. Respuesta metabólica a una concentración elevada de glucosa en sangre.

De la misma forma, la insulina tiene un papel importante en el metabolismo lipídico, manteniendo las concentraciones plasmáticas de triglicéridos (TG) dentro de los límites normales (0,5-4 mmol/L) tanto en periodos post-prandiales como de ayuno, a través de la estimulación de la hidrólisis de TG circulantes, por medio de la activación de la enzima encargada de dicha hidrólisis, la lipoproteína lipasa (LPL), y posterior captación de los ácidos grasos libres (AGL) por el tejido adiposo, actuando además como inhibidora de la lipólisis (hidrólisis de los TG almacenados) a través de la inhibición de la lipasa sensible a hormonas (HSL) en los adipocitos.

El concepto de resistencia a la insulina se basa en la disminución de la acción biológica de la hormona, especialmente sobre el músculo esquelético, hígado y tejido adiposo, que ocasiona que estos tejidos no sean capaces de captar glucosa y como consecuencia, los niveles de glucemia después de las comidas sean

elevados. Para compensar esta situación las células β del páncreas incrementan la secreción de insulina, con la consiguiente hiperinsulinemia. Cuando esta situación se prolonga en el tiempo, el páncreas no puede producir insulina suficiente apareciendo por tanto la hiperglucemia.

Por otro lado, en estados de resistencia a la insulina, no sólo se presenta hiperglucemia, sino también hiperlipemia atribuida al incremento de ácidos grasos libres en plasma secretados por el tejido adiposo (desregulación de LPL y HSL), los cuales llegan al hígado, donde son empaquetados e incorporados a la circulación sanguínea como lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (Figura 1.6). Además los ácidos grasos libres contribuyen a la activación de vías inflamatorias que pueden entorpecer la señalización insulínica en el músculo esquelético.

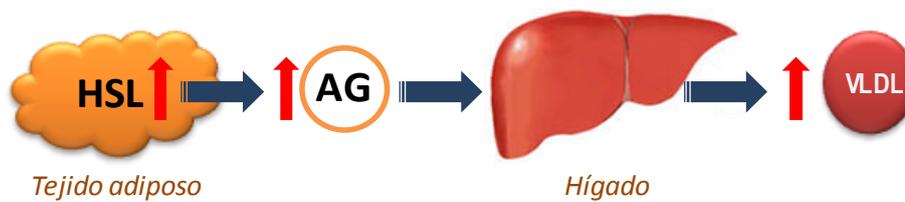


Figura 1.6. Alteración en el metabolismo de lípidos en diabetes tipo 2.

La obesidad es considerada como el factor de riesgo fundamental para el desarrollo del trastorno del metabolismo glucídico y la diabetes tipo 2 (más del 80% de los obesos son insulino-resistentes), siendo la prevalencia de diabetes en adultos con obesidad tres veces superior que en adultos con peso normal. Esto se debe a que en el estado de obesidad, el tejido adiposo aumenta la secreción de algunas adipoquinas como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), la interleucina 6 (IL-6) y la resistina, las cuales hacen que el tejido adiposo se vuelva resistente a la acción de la insulina. La aparición de la resistencia a la insulina en el tejido adiposo estimula a la HSL favoreciendo la lipólisis de los triglicéridos almacenados en dicho tejido, lo que aumenta la liberación de ácidos grasos libres, los cuales ejercen un efecto lipotóxico sobre las células β del páncreas provocando la muerte de las mismas por apoptosis.

De esta forma, en aquellos pacientes en los que la obesidad interviene en el desarrollo de patologías del metabolismo glucídico, aparece primero la resistencia a la acción de la insulina en el tejido adiposo y luego en el resto de tejidos diana. Cuando esta situación se prolonga en el tiempo, debido a una disfunción de las células β del páncreas provocada por su hiperactividad para mantener los niveles de glucosa normales o por efecto lipotóxico de los ácidos grasos libres, la resistencia a la insulina puede derivar en DM2. De esta forma, los ácidos grasos libres están relacionados como causa y efecto con la resistencia a la insulina y la diabetes *mellitus* tipo 2.

Estudios epidemiológicos confirman que la obesidad y la DM2 están íntimamente ligadas y varios estudios han llevado a considerar la obesidad como un estado prediabético. Si no se toman medidas frente al desarrollo de la diabetes, la OMS calcula que las muertes por diabetes aumentarán en todo el mundo en más de un 50% en los próximos 10 años y la gran mayoría desarrollará DM2 en relación con la obesidad. Por esta razón, la obesidad y la DM2 son en la actualidad y lo seguirán siendo en el futuro, un importante reto para los sistemas de salud pública (Figura 1.7) (Bastarrachea-Sosa y col. 2002a; Hernández y col. 2005; Langin y col. 2005; Jocken y col. 2007; Karnieli y Armoni 2008; González Caballero 2009).

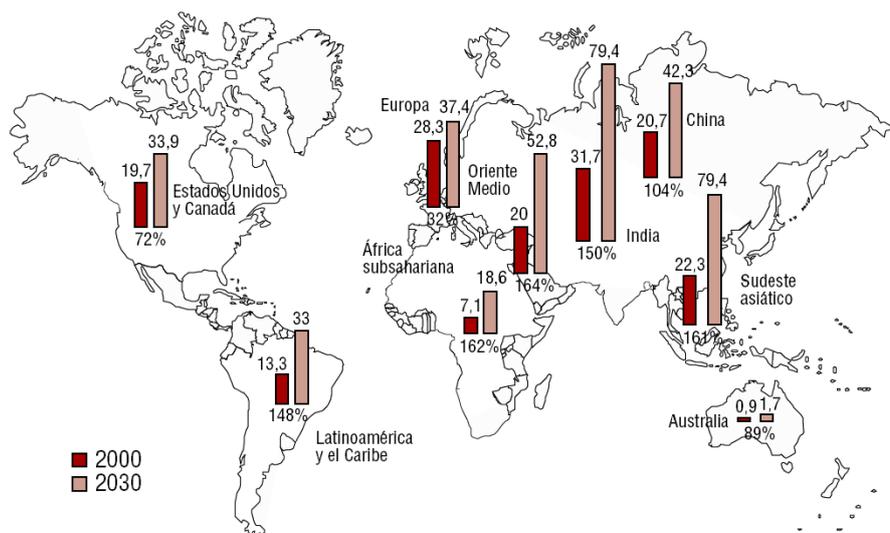


Figura 1.7. Casos de diabetes (en millones de personas) en el año 2000 y predicciones para el año 2030 (Alegría y col, 2008).

Enfermedad cardiovascular

La enfermedad cardiovascular (ECV) se refiere al grupo de enfermedades que afectan al corazón y a los vasos sanguíneos, como la cardiopatía coronaria, la arteriopatía periférica, las enfermedades cerebrovasculares y las trombosis venosas.

La aterosclerosis es un proceso multifactorial relacionado directamente con el desarrollo de accidentes cardiovasculares. La aterosclerosis se produce por la formación de acumulaciones fibroadiposas conocidas como ateromas en las paredes de las arterias, lo que provoca el estrechamiento de los vasos sanguíneos que suministran sangre y oxígeno al corazón. A medida que se estrechan las arterias, se reduce el flujo de sangre que llega al corazón lo que causa dolor en el pecho, dificultad respiratoria y, en los casos en los que se produce un coágulo, provoca un infarto.

Los factores de riesgo de padecer ECV se presentan en la Tabla 1-6.

Tabla 1-6. Factores de riesgo cardiovascular.

Factores de riesgo de ECV	
No modificables	Modificables
Historial familiar	Actividad física
Edad	Sobrepeso u obesidad
Sexo	Tensión arterial
	Consumo de tabaco

La obesidad aumenta el volumen de sangre total y la sobrecarga cardíaca, tendiendo a elevar la presión arterial y los niveles de colesterol total, el colesterol-LDL (lipoproteína de baja densidad) y disminuir el colesterol HDL (lipoproteína de alta densidad). La elevación del colesterol plasmático en forma de LDL y la reducción de las HDL, junto con la elevación de los TG y de la presión arterial, son factores de riesgo independientes bien establecidos para la

enfermedad cardiovascular. Además existen numerosos estudios que asocian el IMC con el riesgo de padecer un accidente cerebrovascular, estableciendo que por cada unidad de aumento del IMC, se incrementa un 5% el riesgo de accidente cerebrovascular.

En los últimos años han empezado a surgir nuevos factores de riesgo que pueden permitir mejorar la estimación del riesgo cardiovascular y al mismo tiempo ofrecer nuevas dianas terapéuticas. Entre estos nuevos factores destacan las elevaciones plasmáticas de Proteína C Reactiva (PCR), proteína que se considera como el mejor marcador de inflamación conocido actualmente. Existe una relación entre los procesos inflamatorios y el progreso de la aterosclerosis y de la enfermedad cardiovascular. El proceso inflamatorio participa en alguno de los estadios del desarrollo de la placa de ateroma provocando la alteración del endotelio y promoviendo la expresión de moléculas de adhesión que a su vez participan en el reclutamiento de leucocitos. Los propios mediadores de la inflamación incrementan la captación de lipoproteínas modificadas por macrófagos y su evolución a células espumosas (acumuladoras de grasa). Por otro lado, los linfocitos T segregan citoquinas con la consiguiente amplificación del proceso inflamatorio. Cuando el proceso se encuentra en fases avanzadas los mediadores inflamatorios pueden participar en el debilitamiento de la capa fibrosa y facilitar su ruptura, desencadenando los accidentes coronarios agudos. Además, la PCR interviene en el desarrollo de resistencia a la leptina, trastorno asociado a la obesidad y que puede estar implicado en el agravamiento de dicha enfermedad y, por tanto, también de la ECV (Kopelman 2000; Vaquero y col. 2008; Lavie y col. 2009; Pérez Gallardo 2010).

Hipertensión

La hipertensión arterial es una enfermedad que se produce cuando aumenta la presión arterial de forma crónica lo que puede desencadenar en infarto de miocardio o trombosis cerebral si no se controla de forma adecuada. Cuando las arterias sufren una presión arterial alta de forma continua, se vuelven más gruesas dificultando el paso de la sangre a través de ellas. Este hecho se conoce como arterosclerosis.

La hipertensión arterial se relaciona con factores ambientales y sociales, así como con mecanismos endocrinos, genéticos y metabólicos. De manera general, se considera que la presión arterial se ve influida por el peso de una persona, a medida que el peso aumenta, también lo hace su presión arterial, por lo que las personas con sobrepeso u obesidad tienen más probabilidades de padecer hipertensión, aumentando la probabilidad si tienen localizada la grasa en la mitad superior del cuerpo. Sustentando la relación entre obesidad e hipertensión, se ha observado que una reducción del peso corporal tiene efectos beneficiosos sobre los valores de presión arterial. Una pérdida ponderal tanto en personas normotensas como hipertensas se asocia con una bajada de presión arterial. En el caso de personas obesas, la presión arterial empieza a descender antes de alcanzar su peso ideal. La frecuencia de hipertensión entre adultos jóvenes obesos de entre 20 y 45 años es seis veces mayor que en individuos de la misma edad con peso normal.

La hipertensión arterial inducida por la obesidad se asocia a otras fisiopatologías como la resistencia a la insulina, la hiperinsulinemia y la retención de sodio y agua. Además presenta una mayor predisposición al fallo cardíaco y puede provocar también fallo renal.

La disfunción endotelial también se relaciona con la obesidad e hipertensión. El óxido nítrico (NO) es el vasodilatador endógeno más potente que interviene en la regulación del tono muscular e inhibición de la agregación plaquetaria y la proliferación de células musculares. Estudios realizados con pacientes hipertensos han mostrado que éstos presentan una alteración de la respuesta vasodilatadora a los estimuladores del NO promoviendo la agregación plaquetaria a través de una menor disponibilidad de NO y favoreciendo la trombosis (Iribarra y col. 2000; Hernán 2002; López de Fez y col. 2004).

Otros trastornos asociados a la obesidad

Entre los trastornos que se asocian a la obesidad también se encuentran algunos tipos de cáncer. Entre los hombres con sobrepeso existe una tasa de mortalidad significativamente más alta por cáncer de colon, recto y próstata; mientras que las

mujeres menopáusicas con obesidad, cuya grasa se localiza en la región abdominal, tienen mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama, siendo mayor la tasa de mortalidad por cáncer de ovario y útero entre las mujeres obesas que entre mujeres de la misma edad no obesas (Hernán 2002). En el año 2001 Bergström y col. publicaron un estudio en el que estimaban que alrededor de 70000 casos de cáncer en la Unión Europea podían atribuirse a un exceso de peso y obesidad, lo que correspondería con un 5% del total de casos de cáncer estudiados (Bergstrom y col. 2001).

Otros trastornos asociados a la obesidad están relacionados con la función respiratoria. Esto se debe a que a medida que la persona se va volviendo más obesa, el trabajo muscular requerido para la ventilación pulmonar se eleva y los músculos respiratorios pueden funcionar incorrectamente.

La relación entre obesidad y artritis no está muy definida, pero sí se considera que el aumento de peso añade una carga traumática a las articulaciones que soportan el peso del cuerpo y, en mujeres de mediana edad, este sobrepeso es un serio predictor de osteoartritis en la rodilla.

Por otro lado, las mujeres obesas, especialmente aquellas en las que el exceso de grasa se localiza en la zona abdominal, sufren más irregularidades y trastornos del ciclo menstrual, en comparación con aquellas que presentan un peso normal, además de presentar mayores problemas durante el embarazo (Hernán 2002).

1.1.6. Tratamiento de la obesidad

Desde principios del siglo XX, se han producido numerosos avances en el tratamiento de la obesidad, basados en la dieta, el ejercicio y las conductas, complementados además con el desarrollo de nuevos medicamentos que permiten obtener mejores resultados.

Hábitos alimentarios y actividad física

Desde la consideración por parte de la OMS de la obesidad como la Epidemia del siglo XXI, se han propuesto estrategias internacionales para frenar su avance. En

España, siguiendo las directrices de la OMS, desde el Ministerio de Sanidad se puso en marcha en 2005 la conocida como estrategia para la Nutrición, Actividad Física y Prevención de la Obesidad (eNAOS), que centra sus esfuerzos en la promoción de unos hábitos alimentarios saludables y en un aumento de la actividad física. La representación gráfica de este mensaje es la “pirámide NAOS” que asocia recomendaciones alimentarias y de actividad física (Figura 1.8).



Figura 1.8. Pirámide NAOS

Para conseguir un equilibrio entre el consumo de energía y la utilización de ésta, se aconseja practicar actividad física de forma habitual y adaptada a las posibilidades de cada persona. Se considera que una media de treinta minutos de ejercicio realizado de forma sistemática, al menos tres veces por semana, permite disfrutar de los beneficios que produce sobre la salud. Entre los beneficios que aporta la práctica de ejercicio destacan el aumento de la resistencia del corazón y

la prevención de la aparición de enfermedades cardiovasculares, además de reducir la cantidad de tejido graso y aumentar el tejido muscular, previniendo la aparición de sobrepeso (Bastos y col. 2005; Ballesteros Arribas y col. 2007).

En el futuro, las dietas serán diseñadas de forma individualizada atendiendo a la carga genética de cada individuo, la cual determinará su mayor o menor predisposición a desarrollar obesidad. El estudio de la influencia de los nutrientes en los procesos metabólicos y en la expresión de genes (nutrigenómica) en combinación con la influencia de las variaciones genéticas de cada individuo sobre la respuesta metabólica a los nutrientes de la dieta (nutrigenética) permitirá un tratamiento más personalizado y cada dieta, dependiendo de sus nutrientes, se adecuará específicamente a cada individuo (Palou y col. 2004; Goyenechea y col. 2010).

Tratamiento farmacológico

El tratamiento con fármacos puede iniciarse en el caso de individuos con sobrepeso (IMC 27-29.9) en los que el tratamiento mediante la modificación de la dieta y el ejercicio físico no han dado resultado. En la actualidad y bajo el criterio de las agencias europea y americana reguladoras de los medicamentos, para el tratamiento de la obesidad solo está autorizado un medicamento: el orlistat.

El Orlistat es un inhibidor de la lipasa pancreática que disminuye la absorción de la grasa alimentaria aproximadamente un 30%. Como consecuencia hay un aumento en el número de deposiciones, deposiciones grasas (oleosas) y disminución en la absorción de las vitaminas liposolubles. Para evitar los efectos secundarios durante el tratamiento hay que seguir una dieta baja en grasa. El medicamento se presenta en cápsulas de 120 mg y debe ingerirse una cápsula con cada una de las principales comidas (desayuno, almuerzo y cena). El principio activo fue originariamente aislado de *Streptomyces toxytricini* aunque posteriormente se obtuvo una molécula de síntesis con mayor estabilidad.

Hasta el año 2010 también estaba autorizado el tratamiento con sibutramina, una betafeniletilamina cuya acción es la de inhibir la recaptación de la serotonina, noradrenalina y dopamina, provocando una disminución del apetito y como

consecuencia, una disminución de la ingesta de alimentos, además de producir un aumento de la termogénesis. Existen varios estudios de larga duración (6-24 meses) que avalaban sus resultados respecto a la pérdida de peso, pero analizando otros parámetros, observaron que su consumo incrementaba el pulso cardíaco y se relacionaba con problemas cardiovasculares graves lo que condujo a la suspensión de su comercialización en España, al igual que se había hecho en otros países europeos y Estados Unidos.

Se han evaluado otros medicamentos para el tratamiento de la obesidad, como la lorcaserin, involucrada en la reducción del apetito, o el rimonabant. Sin embargo, sus efectos secundarios provocaron su retirada del mercado (Bello y Liang 2011; Glandt y Raz 2011; Ioannides-Demos y col. 2011; Pan y col. 2011).

Tratamiento quirúrgico

Los procedimientos quirúrgicos usados para el tratamiento de la obesidad se engloban en el término cirugía bariátrica. El uso de esta cirugía es muy reciente y sólo se plantea cuando han fracasado otros tipos de tratamientos, siendo el tratamiento que mejores resultados proporciona a largo plazo aplicado a individuos con obesidad mórbida. La cirugía bariátrica sólo se practica en personas que presentan una obesidad con un IMC superior o igual a 40 asociado a complicaciones graves como la diabetes *mellitus* tipo 2, o un IMC superior o igual a 50, en cuyo caso se consideran ya superobesos. Este tipo de cirugía presenta algunas complicaciones como consecuencia de la inadaptación de algunas personas a las nuevas pautas alimentarias. Algunas de estas complicaciones son estreñimiento, náuseas y vómitos, dolor abdominal y deshidratación.

Otra técnica no quirúrgica que se practica en los últimos años es la colocación del denominado “balón gástrico”. Esta técnica consiste en la colocación de una banda gástrica por vía laparoscópica y la colocación endoscópica de un balón relleno de suero salino en la cavidad gástrica durante periodos de tiempo variables dependiendo del paciente (Vaquero y col. 2008; González Caballero 2009).

Diseño de nuevas estrategias frente a la obesidad

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), como organismo de referencia para la evaluación de riesgos alimentarios, proporciona una base científica para poder definir la funcionalidad de los alimentos, complementos alimenticios y productos dietéticos, para proporcionar una correcta protección de los consumidores a través del suministro de alimentos que sean seguros y saludables. Esta protección del consumidor debe estar basada en el conocimiento científico y en la evaluación de los riesgos.

En el año 2011 la EFSA publicó una guía orientativa (European Food Safety Authority 2011) sobre los requisitos científicos que se requieren para la obtención de una concesión en la utilización de un producto con fines nutricionales en el tratamiento de la obesidad.

En los últimos años y dado el creciente interés en la reducción de la incidencia de la obesidad, han sido presentados a la EFSA para su evaluación más de ciento veinte productos provenientes de plantas como posibles candidatos para el tratamiento de la obesidad. Sin embargo, ninguno de ellos ha sido aprobado para su comercialización. Entre las objeciones que pueden plantearse sobre estas propuestas se encuentran la escasez de estudios en humanos que demuestren las propiedades que se les atribuyen a cada uno de los productos y la falta de publicaciones con estudios *in vitro* y en animales que apoyen la propuesta. De esta forma, se pone de manifiesto la dificultad que presenta encontrar un producto que pueda ser utilizado a la hora de tratar una enfermedad tan compleja como la obesidad y la necesidad de seguir investigando en ello.

1.2. El tejido adiposo

El tejido adiposo es un órgano formado por tejido conectivo que consiste principalmente en adipocitos (células capaces de almacenar grasa en forma de triglicéridos) asociados de forma libre dentro de una matriz de fibras de colágeno. El resto del tejido está compuesto por células sanguíneas, células endoteliales,

leucocitos, macrófagos y preadipocitos (adipocitos no diferenciados). Está especializado en la síntesis y almacenamiento de triglicéridos (lipogénesis) y en la liberación de ácidos grasos hasta la circulación sistémica (lipolisis).

El principal sustrato que utiliza el tejido adiposo para la síntesis de ácidos grasos (lipogénesis) y del glicerol de los glicéridos (glicerogénesis) es la glucosa. Las formas activas de los ácidos grasos y del glicerol, los acil-CoA y el glicerol 3-fosfato, se esterifican para la síntesis de los triglicéridos (Figura 1.9). Los triglicéridos constituyen más del 90% de los lípidos acumulados en el tejido adiposo. Ambos procesos, la lipogénesis y la glicerogénesis a partir de glucosa en tejido adiposo, son activados por insulina.

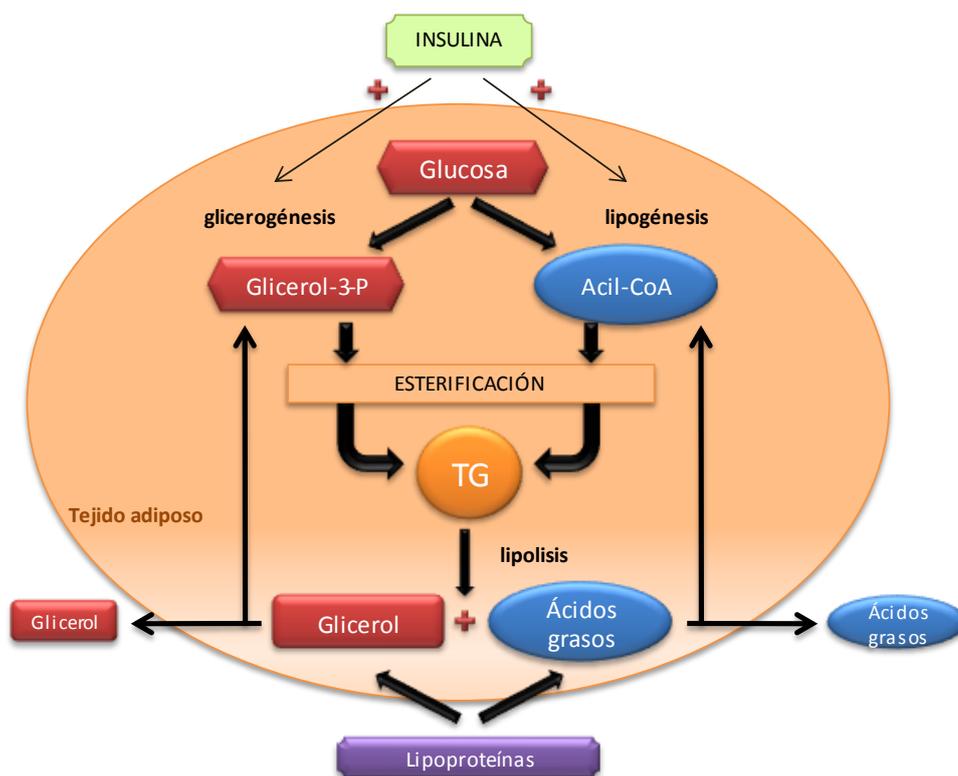


Figura 1.9. Principales vías metabólicas del tejido adiposo.

No todos los lípidos almacenados en los adipocitos son sintetizados de *novo*. Los TG plasmáticos asociados a lipoproteínas (quilomicrones y VLDL principalmente) son hidrolizados a AGL y glicerol por medio de la actividad LPL,

pudiendo ser captados por los tejidos para su posterior conversión en sus formas activas y subsecuente re-esterificación en la síntesis de TG.

En mamíferos, el tejido adiposo puede diferenciarse morfológica y funcionalmente en tejido adiposo blanco y tejido adiposo marrón. Ambos tienen la capacidad de metabolizar y almacenar lípidos, pero presentan diferencias en cuanto a su metabolismo, morfología, distribución, tipo de genes expresados y función fisiológica (Moreno y Martínez 2002; Ailhaud y Hauner 2004).

1.2.1. Tejido adiposo blanco

El tejido adiposo blanco es la mayor reserva de energía en humanos y su principal función es el almacenamiento de los lípidos en forma de triglicéridos (lipogénesis) en periodos de exceso de energía y su movilización y liberación de la energía almacenada, en forma de ácidos grasos libres (no esterificados) y glicerol, en periodos de escasez (lipolisis).

Aproximadamente del 60 al 85% del peso total del tejido adiposo lo conforman los lípidos, de los cuales el 90% son triglicéridos. También se encuentran pequeñas cantidades de ácidos grasos libres, diglicéridos, colesterol, fosfolípidos y monoglicéridos. El peso restante del tejido se compone de agua (del 5 al 30%) y de proteínas (del 2 al 3%).

El tejido adiposo blanco está formado por adipocitos uniloculares. No tiene mucha vascularización, pero cada adipocito está en contacto con al menos un capilar que le proporciona el soporte necesario para su actividad metabólica. El flujo sanguíneo que llega al tejido adiposo depende del peso del individuo y del estado nutricional, aumentando el flujo durante los periodos de ayuno.

El tejido adiposo blanco es el único órgano que libera a la circulación ácidos grasos no esterificados y controla el flujo de los mismos en cada momento. Por otro lado, también es responsable de una gran proporción del consumo de ácidos grasos procedentes de la dieta y de la síntesis de triglicéridos a partir de dichos

ácidos grasos (Figura 1.10) (Albright y Stern 1998; Gregoire y col. 1998; Gil 2002; Moreno y Martínez 2002; Palomer y col. 2005; Gibney y col. 2006).

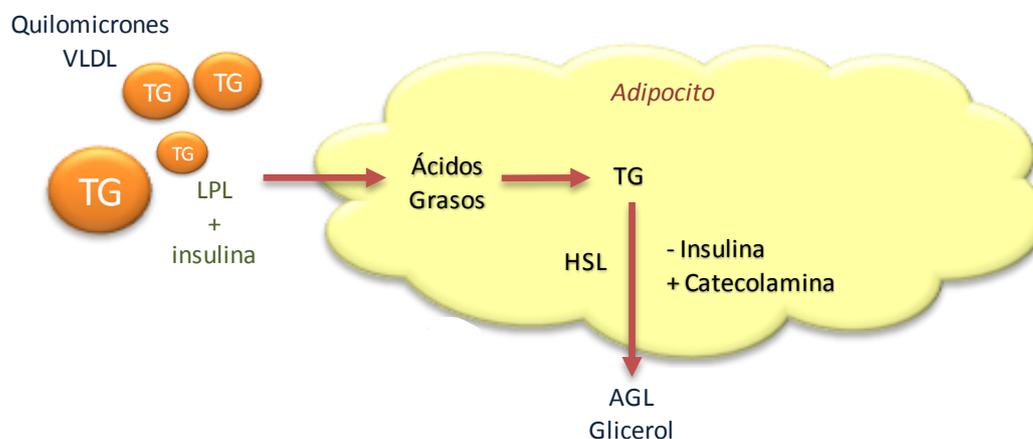


Figura 1.10. Regulación de las principales vías de movilización y almacenamiento de grasas en el tejido adiposo blanco. HSL: lipasa sensible a hormonas; LPL: lipoproteína lipasa; AGL: ácidos grasos libres; TG: triglicéridos; VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad. La insulina promueve la hidrólisis de los TG de las lipoproteínas por la LPL y reduce la hidrólisis de los TG intracelulares por la HSL. Este último proceso es activado por catecolaminas (Gibney y col. 2006).

1.2.2. El tejido adiposo blanco como órgano endocrino

Tradicionalmente, se ha considerado al tejido adiposo blanco como un reservorio pasivo de energía, con una función secundaria de relleno y de protección de los órganos y estructuras del cuerpo frente a golpes. Sin embargo, actualmente está establecido que juega un papel mucho más activo en la regulación del metabolismo mediante la secreción de factores endocrinos y paracrinos. En la siguiente tabla se muestran algunos de los compuestos bioactivos que puede expresar el tejido adiposo (Tabla 1-7).

Entre las principales adipoquinas que secreta el tejido adiposo blanco, destacan la leptina, la adiponectina y el TNF- α .

Tabla 1-7. Principales moléculas sintetizadas por el tejido adiposo.

Molécula	Función y/o implicaciones en obesidad
Leptina	Disminuye la ingesta y regula el balance energético
Adiponectina	Hormona con efectos antidiabéticos, antiinflamatorios y antiaterogénicos
TNF- α	Incrementa la lipólisis y activa la LPL
IL-6	Posible regulador del balance energético, contribuye a la resistencia a la insulina
Adipsina	Probablemente actúa a nivel del adipocito regulando el metabolismo lipídico
Activador inhibidor del plasminógeno-1 (PAI-1)	Contribuye al desarrollo de la obesidad y la resistencia a la insulina
Resistina	Disminuye sus niveles con la diferenciación y mejora la resistencia a la insulina
Ácidos grasos	Reguladores de la expresión génica de genes relacionados con el metabolismo y transporte de los ácidos grasos
Factor adiposo inducido por el ayuno (FIAF, <i>Fasting-induced adipose factor</i>)	Implicado en la regulación del metabolismo en situaciones de ayuno

- La **leptina** es una hormona que informa al cerebro del estado nutricional del individuo para regular la ingesta y el gasto energético. La leptina es secretada casi exclusivamente por los adipocitos en el tejido adiposo blanco y sus niveles de secreción están relacionados con el grado de reserva de grasa presente en el adipocito (cuanto más grasa acumulan los adipocitos más leptina secretan).

La leptina actúa a través de receptores que están presentes en varios tejidos, aunque probablemente los más importantes están en el cerebro, particularmente en el hipotálamo. En el cerebro actúa de factor saciante estimulando la disminución del apetito y constituyendo así un sistema importante de regulación de las reservas de energía. Si las reservas de energía (en forma de grasa en el tejido adiposo) son bajas, la concentración de leptina es baja y las señales en el hipotálamo dan como resultado el aumento del apetito.

Se han descrito algunas mutaciones en el gen de la leptina o en el gen del receptor de la leptina, descubiertas en individuos con obesidad mórbida, asociadas a un impulso intenso de comer. Sin embargo, las personas obesas portan generalmente el gen de la leptina sin mutaciones y presentan niveles de leptina elevados en sangre, hecho fisiológicamente normal debido a la acumulación de grasa en el organismo. Sin embargo, estos niveles elevados de leptina no son suficientes para regular el peso corporal a través de la supresión del apetito, por lo que en individuos obesos con elevados niveles de leptina se asume que existe un proceso de resistencia a la leptina que evita que esta adipocina realice correctamente su función. Se han sugerido varias causas para el desarrollo de resistencia a la leptina, como una inhibición de la habilidad de la leptina para suprimir la señalización vía AMPK en el hipotálamo, o la existencia de alguna barrera que impida su acceso al cerebro. Sin embargo, no existe un mecanismo claro que explique el fenómeno de resistencia a la leptina (Gibney y col. 2006).

- La **adiponectina** es una hormona cuya expresión en el tejido adiposo y su concentración plasmática se ven reducidas en personas con sobrepeso y obesidad, aunque el mecanismo por el cual se ven reducidas no se conoce. La adiponectina estimula la oxidación de los ácidos grasos, reduce los triglicéridos plasmáticos y mejora el metabolismo de la glucosa aumentando la sensibilidad a la insulina. Además presenta propiedades antiinflamatorias y antiaterogénicas suprimiendo la secreción y señalización de TNF- α en cultivos celulares de macrófagos y células endoteliales, e inhibiendo el proceso de adhesión celular. También suprime la proliferación y la migración de células musculares lisas a la pared arterial, así como la proliferación y la capacidad fagocítica de los monocitos, células clave en la progresión y la formación de la lesión vascular.

- Otras **citoquinas** secretadas por el tejido adiposo, pero no en exclusiva, son:

El **TNF- α** , factor regulador clave en el metabolismo de los adipocitos, el cual disminuye la lipogénesis y, en alta concentración, se relaciona con un aumento de la lipólisis. Además, reduce la expresión de LPL, regula la formación de

leptina y es un factor clave en el desarrollo de la resistencia a la insulina en el tejido adiposo, pues interfiere en la señalización del receptor de insulina.

La **IL-6**, que es un regulador de la producción hepática de la proteína C reactiva. La PCR se considera un factor de riesgo independiente para las enfermedades cardiovasculares. La IL-6, al igual que TNF- α , también presenta una correlación negativa con la adiponectina y, como hemos visto anteriormente, parece estar implicada en el desarrollo de la resistencia a la insulina (Hauner 2005; Palomer y col. 2005).

1.2.3. Tejido adiposo marrón

El tejido adiposo marrón posee adipocitos multiloculares, esto es, con numerosas gotas de grasa de diferente tamaño y con abundantes mitocondrias. Le debe su color a la concentración de estas mitocondrias y a su gran vascularización. Según la especie y/o edad del animal, se localiza en distintos puntos del cuerpo.

Tiene una función fisiológicamente opuesta al tejido adiposo blanco. En lugar de servir como sustrato, la grasa acumulada en el tejido adiposo marrón se emplea para liberar energía directamente en forma de calor en vez de almacenarla, por lo que su principal función es la termogénesis. De esta forma, su función metabólica es la de generar calor a través de la oxidación de ácidos grasos. Esta función es importante en animales pequeños, especialmente en recién nacidos y en animales que hibernan, pero en seres humanos adultos no presenta una función destacable (Albright y Stern 1998; Moreno y Martínez 2002; Gibney y col. 2006).

1.3. El adipocito

Como se ha mencionado previamente, los adipocitos, principales células del tejido adiposo blanco, son las células especializadas en el almacenamiento de energía en forma de grasa. Durante periodos de exceso nutricional en el organismo, los adipocitos almacenan lípidos y azúcares en forma de triglicéridos (lipogénesis) y

durante estados de necesidad energética liberan las reservas en forma de ácidos grasos libres y glicerol (lipólisis).

La cantidad de triglicéridos almacenada dentro de un adipocito es grande en comparación con el recambio diario, por lo cual la vida media para el recambio de las reservas de triglicéridos en un adipocito es de alrededor de un año. Un incremento en el número de adipocitos (hiperplasia) o en su tamaño (hipertrofia) es lo que ocasiona un notable aumento del tejido adiposo en los individuos obesos (Hutley y col. 2004; Palomer y col. 2005; Clavijo y col. 2007).

El incremento en el número de células grasas parece ser un proceso irreversible. Es muy importante, por tanto, conocer cuáles son los factores que regulan la formación de nuevas células grasas a partir de sus células precursoras existentes en el tejido adiposo, es decir, conocer cómo se produce y regula la adipogénesis. El conocimiento de la biología del adipocito es crucial para la comprensión de las bases moleculares para el desarrollo de la obesidad y las patologías asociadas (Moreno y Martínez 2002).

1.3.1. Diferenciación de los adipocitos

Aunque el origen embrionario de las células grasas no es del todo conocido, varios estudios han sugerido que las células adiposas derivan de un precursor embrionario multipotente con la capacidad para diferenciarse en células unipotentes y comprometidas hacia el desarrollo de líneas celulares mesodérmicas como los adipocitos, mioblastos, condroblastos y osteoblastos (Figura 1.11).

En concreto, la adipogénesis es el proceso de diferenciación celular en el que las células precursoras dan lugar a adipocitos maduros. Este proceso implica dos eventos fundamentales: la proliferación de los preadipocitos y la diferenciación a adipocitos. De esta forma, la adipogénesis comienza con la formación de adipoblastos. El compromiso de estos adipoblastos genera preadipocitos, células en las que se expresan ya marcadores moleculares tempranos de la adipogénesis.

En la última etapa de la diferenciación ocurren cambios morfológicos, así como la síntesis y acumulación de grasa (Figura 1.11).

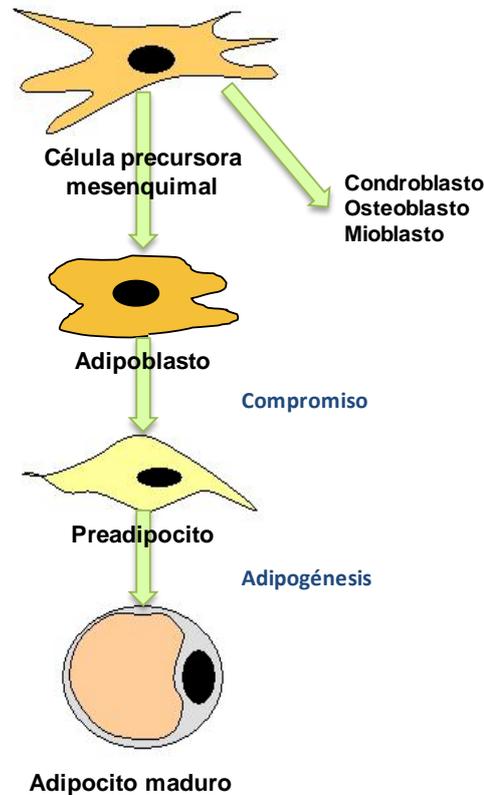


Figura 1.11. Desarrollo de los estados celulares desde una célula precursora hasta su conversión en un adipocito maduro.

Durante su diferenciación, los adipocitos sufren varios procesos moleculares, se activan vías de activación de traducción de señales y el perfil de expresión génica se modifica. Algunos ejemplos de estos hechos se analizarán en profundidad a continuación en el caso concreto de la línea celular de adipocitos 3T3-L1.

La diferenciación de los adipocitos es un proceso complejo, del cual no se conocen completamente todos los fenómenos moleculares implicados, en el que los preadipocitos deben interrumpir su crecimiento y salir del ciclo celular previamente a su conversión terminal en adipocitos. Este proceso de diferenciación puede ser explicado por un modelo de diferenciación dividido en etapas y que incluye cambios cronológicos en la expresión de numerosos genes

(Palomer y col. 2005). Estas etapas, tomando como ejemplo la diferenciación de la línea celular 3T3-L1 son:

- 1) *Inhibición del crecimiento.* Los adipocitos proliferan hasta sufrir una inhibición por contacto y cesa su crecimiento, comenzando a exhibir alguno de los marcadores tempranos de la diferenciación.
- 2) *Expansión clonal.* Se producen varias rondas de replicación de ADN y duplicación celular. La insulina así como niveles elevados de AMP cíclico (AMPC), sustancias mitogénicas, inducen esta fase. En concreto, la insulina activa el receptor IGF-1 (factor de crecimiento insulínico tipo 1) que es uno de los más potentes inductores de la expansión clonal. Esta expansión mitótica clonal de células comprometidas es esencial para completar la diferenciación terminal en adipocitos maduros.
- 3) *Cambios tempranos en la expresión de genes.* Según cesa la expansión clonal, se inicia la transcripción coordinada de genes específicos del adipocito, como las familias de factores de transcripción PPAR γ (receptores activados por proliferadores de los peroxisomas γ) y C/EBPs (proteínas de unión a intensificadores CCAAT). La expresión de estos genes se acompaña de cambios bioquímicos y morfológicos que conducen a la adquisición del fenotipo del adipocito.
- 4) *Diferenciación terminal.* En la fase final de la diferenciación, los adipocitos incrementan la lipogénesis *de novo* y se produce un incremento en la expresión y actividad de enzimas implicados en esta ruta como la sintasa de ácidos grasos y la glicerol fosfato deshidrogenasa. Durante esta etapa aumenta considerablemente la sensibilidad a la insulina, debido al aumento en el número de receptores de insulina y transportadores de glucosa dependientes de insulina (GLUT4). También se sintetizan proteínas específicas como la aP2, proteína de unión a ácidos grasos en adipocitos, y la perilipina, proteína asociada a las gotas intracelulares de lípidos (Moreno y Martínez 2002).

Factores de transcripción implicados en la diferenciación: C/EBP α y PPAR γ

Para que el proceso de diferenciación se produzca es necesario la acción secuenciada y coordinada de factores de transcripción que incluyen la familia de las proteínas C/EBP, los PPAR y el factor de diferenciación y determinación de los adipocitos/proteína de unión a elementos de respuesta regulados por esteroides (ADD-1/SREBP-1) (Figura 1.12) (Gil Hernández 2010). El aumento de la expresión de ADD-1/SREBP-1 conduce a la producción de otros ligandos de PPAR γ requeridos para la actividad transcripcional de este factor (Ntambi y Young-Cheul 2000).

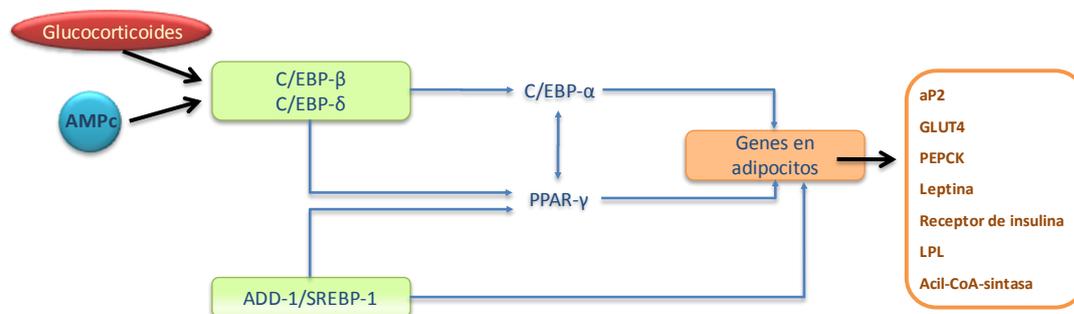


Figura 1.12. Factores de transcripción involucrados en la diferenciación. Figura modificada de (Gil Hernández 2010).

Las familias de factores de transcripción PPARs y C/EBPs se han descrito como las reguladoras de la transcripción de genes adipogénicos. Dentro de estas familias, PPAR γ y C/EBP α son críticos para la adipogénesis (Moreno y Martínez 2002).

Existen 3 isoformas de la familia de los C/EBPs que participan en la diferenciación celular: C/EBP α , C/EBP β y C/EBP δ . En el control de la expresión de genes en adipocitos participan homo- y heterodimerizaciones de estas isoformas.

Cada isoforma se expresa en un tiempo distinto de la diferenciación. Varios estudios en líneas celulares de adipocitos han demostrado que las isoformas

C/EBP β y C/EBP δ están presentes en preadipocitos y su nivel aumenta nada más iniciarse la diferenciación, aunque se desconoce si la inducción de C/EBP β y C/EBP δ es una causa de la entrada de la célula a un ciclo celular o es una consecuencia de la misma. Los responsables directos de su inducción transcripcional son el AMPc para C/EBP β y los glucocorticoides para C/EBP δ . No se conoce la función precisa de C/EBP β y C/EBP δ , sin embargo, parece que la actividad primaria de estas proteínas es la de inducir a C/EBP α y a PPAR γ en las células adiposas. En las primeras etapas de la diferenciación los niveles de expresión de estos genes están en su máximo nivel y, según avanza ésta, la expresión de C/EBP β desciende un 50% y la de C/EBP δ es prácticamente indetectable.

El descenso en la expresión de C/EBP β y C/EBP δ coincide con el aumento de PPAR γ y C/EBP α . Estos dos últimos factores de transcripción inducen cambios en la expresión de determinados genes característicos de los adipocitos maduros y su concentración se mantendrá elevada durante la vida de la célula. Estos dos factores son fundamentales, habiéndose observado que la adición de PPAR γ y C/EBP α a líneas celulares de fibroblastos, por sí sola, puede promover la diferenciación de estas células a adipocitos.

En varios estudios realizados principalmente en células 3T3-L1 se destaca la función de C/EBP α , el cual juega un papel central en el control de la homeostasis energética. C/EBP α se manifiesta durante la fase terminal de diferenciación, inmediatamente antes de la expresión de los otros genes adiposo-específicos; muchos de éstos presentan sitios de unión para C/EBP en sus promotores proximales y son transactivados por la isoforma C/EBP α . Entre estos genes se incluyen el gen aP2, GLUT4 (principal transportador de glucosa hacia el interior celular que responde a insulina), PEPCCK (fosfoenol piruvato carboxiquinasa, enzima que cataliza una reacción en la gluconeogénesis), leptina y el receptor de la insulina. El papel clave en la adipogénesis de C/EBP α queda reflejado en algunos estudios con células 3T3-L1, en las que se ha visto que una expresión constitutiva de C/EBP α es suficiente para inducir la diferenciación en ausencia de

agentes hormonales y una expresión de un ARNm sin sentido de C/EBP α previene la diferenciación.

Los PPARs pertenecen a una familia de receptores de hormonas nucleares que han sido identificados en base a su activación por sustancias que inducen proliferación de peroxisomas en las células. La expresión de PPAR γ antecede la inducción de C/EBP α en la cascada de eventos que conducen a la diferenciación de los adipocitos.

Existen 3 miembros de receptores nucleares de hormonas de la subfamilia de los PPAR que son: α , γ y δ .

El procesamiento alternativo del ARN mensajero del gen PPAR γ durante la transcripción da origen a dos isoformas de la proteína; los transcritos PPAR γ 1 y PPAR γ 3 dan lugar a la proteína PPAR γ 1, mientras que el PPAR γ 2 codifica una proteína que contiene entre 28 y 30 aminoácidos adicionales en su extremo N-terminal. Las dos isoformas de la proteína se expresan abundantemente en el tejido adiposo y, en condiciones fisiológicas, PPAR γ 2 se produce casi exclusivamente en él (Christodoulides y Vidal-Puig 2010). No se han encontrado diferencias funcionales entre ambas, siendo inducidas anticipadamente en el programa de diferenciación del adipocito, coincidiendo o precediendo a la inducción de C/EBP α .

PPAR γ sufre varias modificaciones post-transcripcionales que modulan su actividad y su habilidad para inducir la adipogénesis. En un gran número de genes adipogénicos existen promotores o potenciadores que presentan sitios de unión para PPAR γ . La activación de PPAR γ en los adipocitos conduce a la regulación de los genes implicados en la liberación de los ácidos grasos de las lipoproteínas (LPL), en su transporte (FABP-4, proteína fijadora de ácidos grasos), su activación (acyl-CoA sintasa) y su esterificación (PEPCK).

Desde su descubrimiento en la década de los 90, PPAR γ ha sido considerado como el principal regulador de la diferenciación del adipocito. Se ha verificado que la expresión de PPAR γ es suficiente para provocar una parada del crecimiento e iniciar la adipogénesis en líneas celulares de fibroblastos que están

creciendo exponencialmente, lo que demuestra el importante papel que desarrolla en la diferenciación de los adipocitos. Además, PPAR γ es el PPAR más específico del tejido adiposo y juega un papel importante en el metabolismo de lípidos y glucosa, estando implicado en los desórdenes metabólicos relacionados con la obesidad como la hiperlipidemia, la resistencia a la insulina y la enfermedad arterial coronaria (Lin y Lane 1992; Lin y Lane 1994; Gregoire y col. 1998; Wu y col. 1999; Moreno y Martínez 2002; Rosen y col. 2002; Viveros y col. 2004; Christodoulides y Vidal-Puig 2010).

Finalmente, en algunos estudios se ha llegado a la conclusión de que la deficiencia en PPAR γ con expresión de C/EBP α no es suficiente para una correcta acumulación de lípidos, sin embargo, si hay deficiencia en C/EBP α y no en PPAR γ se da una correcta acumulación de lípidos y se adquieren las características morfológicas de adipocito, pero estas células no transportan glucosa en respuesta a un estímulo de insulina. Así, C/EBP α se requiere para adquirir la sensibilidad a la insulina y PPAR γ para acumular lípidos y, los dos juntos, son los grandes reguladores de la adipogénesis a través de la regulación de la expresión de los genes característicos para la adquisición del fenotipo de adipocito (Cho y col. 2008).

1.3.2. Modelo de estudio *in vitro*: línea celular 3T3-L1

El conocimiento sobre los procesos de diferenciación de los adipocitos deriva inicialmente de estudios con cultivos celulares, con líneas establecidas o con preadipocitos primarios aislados del tejido adiposo (Viveros y col. 2004).

Las líneas celulares utilizadas para el estudio del metabolismo en adipocitos se pueden dividir en 3 categorías:

- 1) Células embrionarias totipotentes capaces de generar todas las líneas celulares
- 2) Células multipotentes que pueden dar lugar a miocitos, adipocitos y condrocitos

- 3) Células ya comprometidas hacia la línea adiposa, que son las denominadas líneas celulares de preadipocitos (Tabla 1-8)

Tabla 1-8. Líneas celulares y cultivos primarios utilizados para el estudio de los adipocitos (Moreno y Martínez 2002).

Líneas celulares	Origen/Especie	Categoría
ES	Blastocitos/Embrión ratón	Totipotente
TA1	Fibroblastos 10 T1/2 tratados con 5-azacitidina/Embrión ratón	Multipotente
3T3-L1	Fibroblastos/Embrión ratón	Unipotente
3T3-F442A	Fibroblastos/Embrión ratón	Unipotente
Ob17	Grasa epididimal/ratón ob/ob adulto	Unipotente
Cultivos primarios	Origen	Categoría
Rata	Células estroma vasculares de grasa subcutánea, epididimal, retroperitoneal	Unipotente
Ratón	Células estroma vasculares de grasa subcutánea	Unipotente
Cerdo	Células estroma vasculares de grasa subcutánea y perirrenal	Unipotente
Humano	Células estroma vasculares de grasa subcutánea y omental	Unipotente

Durante la fase de crecimiento, tanto las líneas celulares de preadipocitos como los preadipocitos primarios, son morfológicamente similares a los fibroblastos. Una vez que las células han alcanzado la confluencia en cultivos *in vitro*, el tratamiento con los inductores adecuados de la diferenciación conduce a un cambio drástico en la forma de las células. Los preadipocitos se convierten en células de forma esférica que empiezan a acumular lípidos y que van adquiriendo progresivamente las características morfológicas y bioquímicas propias de los adipocitos maduros (Moreno y Martínez 2002).

Las líneas celulares de preadipocitos más utilizadas en estudios *in vitro* de la diferenciación de adipocitos son las líneas celulares murinas 3T3-L1 y la 3T3-F442A, las cuales fueron aisladas por clonación partiendo de células Swiss 3T3 derivadas de embriones de ratón de 17-19 días. El desarrollo de estas líneas

celulares establecidas de preadipocitos ha facilitado el conocimiento a nivel molecular de la diferenciación de los adipocitos (Smas y Sul 1995; Gregoire y col. 1998). El empleo de estas células en lugar de emplear adipocitos humanos se debe a que, al contrario que las células 3T3-L1, los adipocitos humanos crecen de forma muy lenta y su diferenciación *in vitro* es insuficiente. Además, los requerimientos y necesidades del cultivo de adipocitos humanos son mayores y más definidos (Hutley y col. 2004).

Los inductores más eficaces para la diferenciación, en varios modelos de cultivo además de en la línea celular 3T3-L1, incluyen la insulina, el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), glucocorticoides (dexametasona), triiodotironina (T3) y AMP cíclico (AMPC). Estos mediadores son más activos cuando se combinan (Viveros y col. 2004).

La línea inmortalizada de ratón 3T3-L1 es una línea celular de preadipocitos que mantiene su capacidad de división, pero cuyas células están comprometidas hacia la línea adiposa (unipotente) (Musri y col. 2007). Aunque la conversión a adipocito puede ocurrir de forma espontánea dos o cuatro semanas después de haber alcanzado la confluencia (Rubin y col. 1978), la diferenciación se ve acelerada tras el tratamiento durante 48 horas con dexametasona (corticoide); isobutilmetilxantina (IBMX), que estimula la concentración de AMPC intracelular actuando sobre la adenilciclase) y altas concentraciones de insulina, en presencia de suero bovino fetal (Moreno y Martínez 2002). Cuando estas células son tratadas con estos inductores de diferenciación, se observan de dos a tres ciclos de división celular (expansión clonal) antes de detener su crecimiento y expresar coordinadamente los genes tardíos del adipocito, momento en el que pierden su morfología típica de fibroblasto, redondeándose y acumulando triglicéridos (lipogénesis), lo que conduce a la formación de adipocitos maduros.

La adquisición de este fenotipo va precedida de la activación de una cascada de factores de transcripción de un grupo determinado de genes específicos de adipocitos (Lin y Lane 1992). Esta cascada comienza con la expresión de los genes C/EBP β y δ , cuyos productos proteicos inducen la expresión de C/EBP α y de los PPAR γ (Tabla 1-9). Estos factores de transcripción coordinan la expresión de los

genes involucrados en la creación y mantenimiento del fenotipo de los adipocitos, incluyendo los genes de la proteína aP2, el GLUT4, la LPL y la leptina (Cho y col. 2008).

Tabla 1-9. Factores de transcripción que participan en la diferenciación de células con potencial adipogénico.

Familia	Isoforma	Tipo de actividad
C/EBP (proteínas nucleares de unión)	α	Control homeostasis energética
	β	Regulador temprano adipogénesis
	δ	Inductor de la isoforma C/EBP α y PPAR γ Inductor de la isoforma C/EBP α y PPAR γ
PPAR (receptores nucleares)	γ	Promotores de la diferenciación de preadipocitos a adipocitos

1.4. Lipolisis

La lipolisis es el proceso por el cual los triglicéridos almacenados en el tejido adiposo son hidrolizados hasta ácidos grasos y glicerol.

1.4.1. Principales enzimas implicadas en la hidrólisis de triglicéridos y su función

Las principales enzimas que participan en la completa hidrólisis de los triglicéridos son la Atgl (adiposa triglicérido lipasa), la HSL, la perilipina A y la monoglicérido lipasa (MGL) (Figura 1.13). Además hay que tener en cuenta la participación de la proteína 5 con dominio α/β hidrolasa (Abhd5), sin la cual, la Atgl no podría llevar a cabo su función.

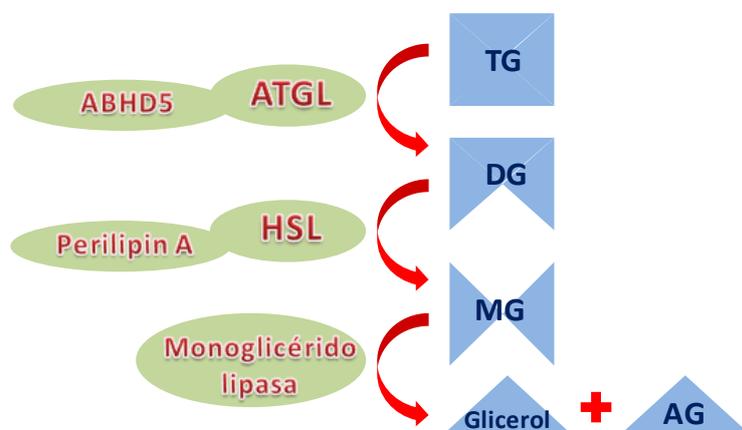


Figura 1.13. Esquema de la hidrólisis de triglicéridos en el adipocito.

La **Atgl**, desnutrina, o fosfolipasa A2 ζ (PLA2 ζ) fue identificada en 2004. Se expresa en la mayoría de los tejidos, aunque la máxima expresión se da en el tejido adiposo y la mínima en el hígado. Presenta una gran especificidad por los TG, mediando la hidrólisis de los mismos durante la lipólisis basal, poca actividad frente a los diglicéridos y ninguna actividad frente a los ésteres de colesterol. Esta enzima no es fosforilada por la proteína quinasa A (PKA) y, por tanto, su activación no depende de la vía del AMPc, sino que ve incrementada su actividad cuando se asocia con la proteína Abhd5, también denominada CGI-58.

La proteína **Abhd5** se encuentra mayoritariamente en la superficie de las gotas de grasa en los adipocitos y su expresión aumenta durante la diferenciación de los mismos. La función de la Abhd5 es aumentar la lipólisis a nivel celular actuando como cofactor de la Atgl, pero por sí sola no tiene actividad lipasa ni esterasa. Una vez iniciada la lipólisis y, habiendo sido liberada de las gotas de grasa, Abhd5 se mantiene en el citosol de la célula sin ser degradada (Yamaguchi y col. 2007).

La **HSL** es una enzima que se expresa en tejido adiposo y, en menor cantidad, en otros tejidos como en músculo esquelético, páncreas y macrófagos. A diferencia del resto de las lipasas, presenta casi la misma actividad catalítica frente a triglicéridos que a ésteres de colesterol de cadena larga, mientras que la

mayoría de las lipasas apenas presentan actividad colesterol esterasa (Londos 2004).

Las perilipinas son una familia de fosfoproteínas localizadas principalmente en la superficie de las membranas de las gotas de grasa de los adipocitos, aunque también se detectan en otras células como los macrófagos y las células del músculo liso. En el adipocito se expresan las isoformas A y B, aunque la más abundante en la superficie de las gotas de grasa es la **perilipina A**.

En condiciones basales, la perilipina A actúa como barrera cubriendo la superficie de las gotas de grasa y protegiendo a los triglicéridos almacenados de la hidrólisis impidiendo el acceso a las lipasas (Figura 1.14). Cuando la PKA (proteína quinasa A) fosforila a la perilipina A, ésta deja de actuar como barrera en los adipocitos, lo que permite la traslocación de la HSL desde el citosol a la gota de grasa, donde cataliza la hidrólisis de los tri-, di- y monoglicéridos, ésteres de colesterol y otros sustratos (Souza y col. 2002; Arvidsson y col. 2004).

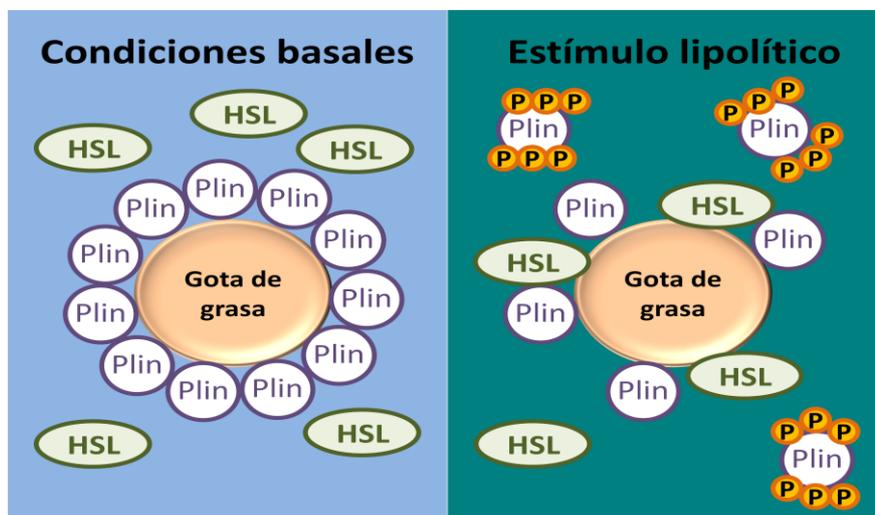


Figura 1.14. Representación de la localización y funcionalidad de la perilipina (plin) en la gota de grasa. En condiciones basales, la perilipina se encuentra situada recubriendo la membrana de la gota de grasa, mientras que la lipasa sensible a hormonas (HSL), se encuentra en el citosol. En condiciones de estímulo lipolítico, tiene lugar la fosforilación de la perilipina en seis serinas y de la HSL, así como la traslocación de la HSL a la membrana de la gota lipídica, con el consiguiente desplazamiento de la perilipina y la hidrólisis de los triglicéridos, liberándose los ácidos grasos. Figura modificada de (Vaquero y col. 2008).

El paso final en la hidrólisis de los triglicéridos es la hidrólisis del 2-monoglicérido, la cual es llevada a cabo por la **MGL**. Los monoglicéridos no se acumulan en los adipocitos, ni siquiera en los periodos de máxima actividad lipolítica, por lo que la MGL no se considera limitante para la lipólisis.

La movilización de los depósitos de grasa del tejido adiposo está mediada por la Atgl y la HSL. Durante la diferenciación de los adipocitos aumentan los ARN mensajeros de ambas lipasas. La Atgl inicia la lipólisis retirando el primer ácido graso del TG para producir un diglicérido, el cual es hidrolizado por la HSL para generar un nuevo ácido graso y un monoglicérido (Granneman y col. 2007; Watt y Spriet 2010). Tanto la HSL como la Atgl presentan la capacidad de hidrolizar triglicéridos *in vitro*, pero sólo la HSL muestra la capacidad de actuar como diglicérido lipasa. La hidrólisis de los triglicéridos es más lenta que la de los diglicéridos, por lo que la hidrólisis de TG se considera el paso limitante en los adipocitos.

Aunque en ensayos *in vitro* la HSL presenta también la capacidad de hidrolizar monoglicéridos, la MGL, que no está regulada por hormonas, es imprescindible para completar la hidrólisis de los monoglicéridos *in vivo* (Watt y Spriet 2010).

1.4.2. Regulación de la lipólisis

En el estado basal, la Atgl se encuentra en el citoplasma y en las gotas de grasa de los adipocitos. Aunque no es fosforilada por la PKA, sí hay indicios de que sea fosforilada por otras quinasas. Sí está claro que para una activación completa, necesita interaccionar con Abhd5, lo que implica también en su activación a la perilipina A. En condiciones basales, Abhd5 se encuentra en la superficie de las gotas de grasa interaccionando con la perilipina A. Cuando se produce una activación de la PKA (por estimulación del receptor β -adrenérgico), la perilipina A se fosforila, disociándose de la Abhd5, lo que permite la interacción de esta última con la Atgl.

La activación de la HSL está controlada por la vía del AMPc, por lo que la lipólisis se verá estimulada por todas aquellas hormonas que al unirse a su

receptor provoquen la formación de AMPc y se verá inhibida por aquellas hormonas cuyo receptor provoquen una menor producción de AMPc. La HSL presenta una propiedad que la diferencia del resto de las lipasas, siendo la única lipasa cuya actividad está totalmente regulada por una fosforilación reversible.

De esta forma, el proceso de lipólisis está regulado por una serie de hormonas, como las catecolaminas producidas por la glándula suprarrenal, norepinefrina y epinefrina (también conocida como adrenalina) y el glucagón, secretado por el páncreas y que colabora en el control de los niveles de glucosa (Nishino y col. 2007). Además, parece que existe un ritmo basal de lipólisis que es independiente de hormonas (Moreno y Martínez 2002).

La lipólisis inducida por catecolaminas (Figura 1.15) se inicia por una estimulación de los receptores β adrenérgicos, los cuales están acoplados a la activación de la adenilato ciclasa a través de una proteína G estimuladora, la cual transforma el ATP en AMPc. Este AMPc activa a la proteína quinasa A (PKA) dependiente de AMPc que fosforila a la HSL y a la perilipina A. La fosforilación de la perilipina A provoca un cambio conformacional en ella que es esencial para la traslocación de la HSL desde el citosol hasta la superficie de la gota de grasa donde cataliza la hidrólisis de los triglicéridos (Moreno y Martínez 2002; Garcia y col. 2004; Zimmermann y col. 2004; Kershaw y col. 2006; Nishino y col. 2007; Ducharme y Bickel 2008).

Por otro lado, cuando las catecolaminas se unen a receptores que se encuentran asociados a la adenilato ciclasa (AC) a través de proteínas G inhibitorias se produce una inhibición de la lipólisis al producirse menos AMPc y una menor activación de la PKA y, por tanto, de la HSL y la perilipina A. Este es el caso de la activación por catecolaminas de receptores α_2 -adrenérgicos y receptores de adenosina.

En consecuencia, en el caso de las catecolaminas, éstas tienen un efecto dual sobre la regulación de la lipólisis y el efecto lipolítico neto dependerá del balance entre receptores α y β adrenérgicos (Moreno y Martínez 2002).

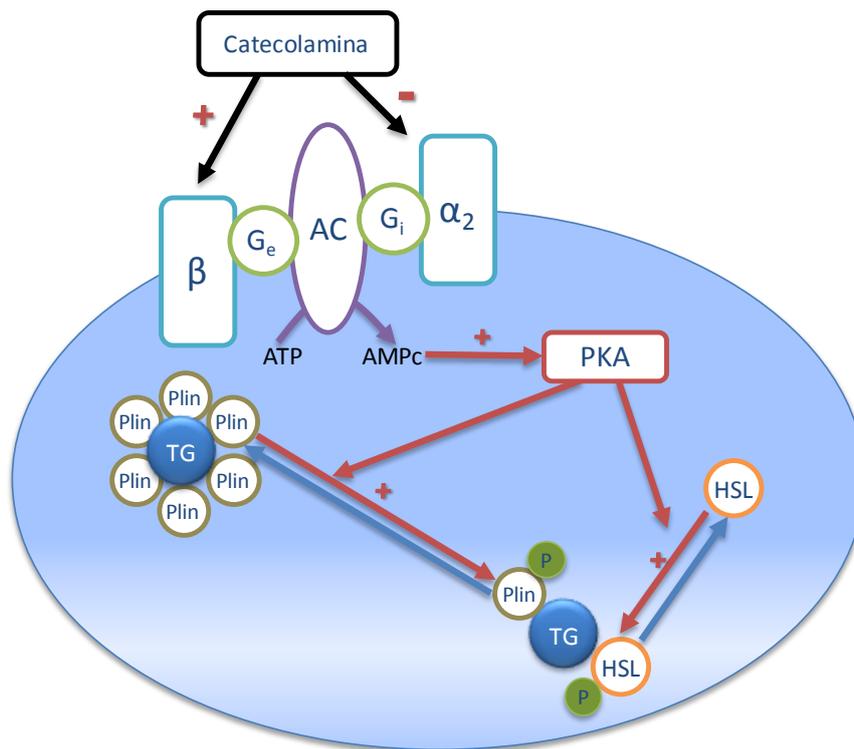


Figura 1.15. Representación gráfica de la lipólisis inducida o inhibida por catecolaminas. Cuando la catecolamina se une al receptor β adrenérgico (β) se activa la adenilato ciclasa (AC) a través de la proteína G estimuladora (G_e). La adenilato ciclasa transforma el ATP en AMPc que activa a la proteína quinasa A (PKA). La PKA fosforila a la perilipina A (plin) que se encontraba unida a los triglicéridos (TG) y a la lipasa sensible a hormonas (HSL). La fosforilación de la perilipina permite la traslocación de la HSL hasta la superficie de la gota lipídica donde ejercerá su función hidrolizando los TG. Por otro lado, si la catecolamina se une al receptor α_2 , se inhibe la adenilato ciclasa a través de la proteína G inhibitoria (G_i), disminuyendo la concentración de AMPc. P: grupo fosfato.

Otra vía que favorece la inactivación del AMPc a 5'AMP se da a través de los receptores asociados a la fosfatidilinositol quinasa 3 (PIK-3), cuya acción provoca la activación de la fosfodiesterasa 3 (PDE 3) que provoca la inactivación del AMPc (Moreno y Martínez 2002). Este es el caso de la insulina, la cual inhibe la lipólisis, al menos en parte, inhibiendo la vía dependiente de AMPc a través de la fosforilación de la PKB (proteína quinasa B o Akt) (Figura 1.16) y la activación de la PDE 3, las cuales bajan los niveles de AMPc. Además de esta vía, la insulina tiene otros efectos en la lipólisis que aún no están muy caracterizados (Kershaw y col. 2006). En líneas generales, una concentración elevada de insulina es inversamente proporcional al flujo de ácidos grasos desde el tejido adiposo. Además, la insulina regula la expresión del ARNm de la HSL y la Atgl en adipocitos

3T3-L1 y la expresión del ARNm se ve aumentada en los adipocitos de animales con deficiencia insulínica (Jocken y col. 2007).

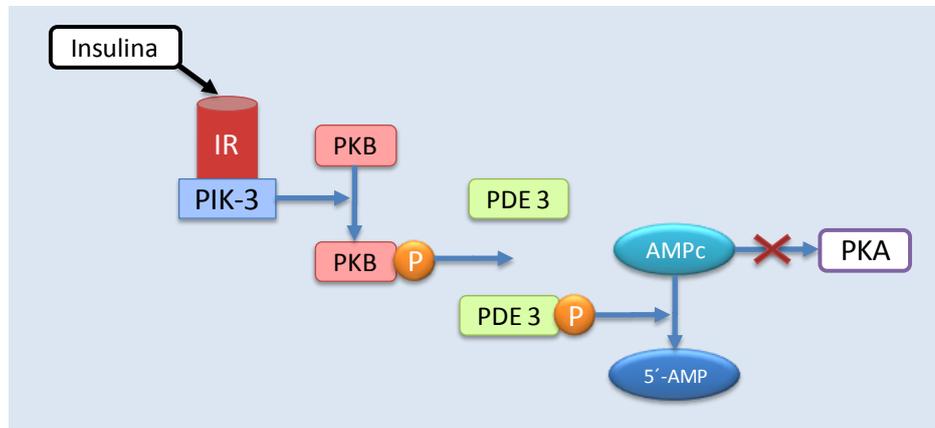


Figura 1.16. Inhibición de la lipólisis por activación de la fosfodiesterasa 3 (PDE 3).

1.4.3. Lipólisis y obesidad

Un descenso en la lipólisis inducida por catecolaminas y una baja expresión de HSL constituyen uno de los primeros defectos encontrados en obesidad (Langin y col. 2005). Además se considera que una supresión de la expresión de *Atgl* induce obesidad, mientras que una sobre expresión confiere un fenotipo delgado.

Por otro lado, la falta de regulación en la liberación de ácidos grasos desde los adipocitos que se produce en estados de obesidad es una de las complicaciones características de algunas enfermedades como la diabetes tipo 2, incrementándose los niveles de AGL circulantes, debido en parte al aumento de tejido adiposo. Estos AGL, además de actuar como sustrato energético, son liberados a la circulación a través de la cual, unidos a albúminas, llegan hasta otros órganos, como el hígado y el músculo esquelético, dañando el metabolismo de la glucosa modulando la acción de la insulina, pudiendo producir DM2 y resistencia a la misma (Miyoshi y col. 2006).

Se ha demostrado que cuando se tratan adipocitos de ratón con $\text{TNF}\alpha$ se produce una reducción de la expresión de perilipina A lo que produce un

aumento de la lipólisis, mientras que una sobre expresión de perilipina A bloquearía la acción lipolítica del TNF α . En el caso de humanos, se ha descubierto que existe un descenso en los niveles de expresión de perilipina en individuos obesos, lo que se plantea como un posible mecanismo para explicar los altos niveles de ácidos grasos en plasma que se observan en dichos individuos. Además, los niveles de ARN mensajero no se corresponden siempre con la cantidad de proteína, lo que hace pensar en la existencia de un mecanismo de regulación post-transcripcional que controla los niveles de proteína y, por tanto, de actividad lipolítica en el adipocito (Kovsan y col. 2007).

1.5. Lipogénesis

La lipogénesis es la formación de triglicéridos dentro del adipocito a partir de glicerol y ácidos grasos. La principal fuente de sustratos para la síntesis de triglicéridos en los adipocitos procede de los quilomicrones y las VLDL circulantes. Los triglicéridos de estas lipoproteínas son hidrolizados hasta monoglicerol y ácidos grasos libres, los cuales son captados por los adipocitos a través de procesos de transporte activo mediado por proteínas transportadoras específicas de ácidos grasos. En humanos, el proceso de hidrólisis depende prácticamente de la acción de la LPL. Una vez en el interior de la célula, los ácidos grasos son reesterificados para formar triglicéridos.

La lipogénesis *de novo* designa específicamente la formación de ácidos grasos a partir de un precursor derivado del adipocito, como la glucosa.

1.5.1. Principales enzimas implicadas en la lipogénesis y su función

La lipogénesis puede ser inducida a través de la activación de varios enzimas, como la LPL y la proteína aP2.

La **LPL** es una enzima presente en el músculo y en la pared de los capilares del tejido adiposo. A través de la acción de la LPL se van retirando progresivamente los triglicéridos de lipoproteínas, como las VLDL, hidrolizándolos hasta ácidos

grasos libres y glicerol. Los ácidos grasos que se liberan por acción de la lipasa son captados y empleados como sustrato de energía por los tejidos (especialmente del músculo cardíaco y del esquelético), o son almacenados dentro del tejido adiposo. La retirada progresiva de TG de las VLDL conduce a la formación de partículas más pequeñas y con mayor contenido en colesterol, las LDL.

La proteína **aP2** pertenece a la familia de proteínas transportadoras de ácidos grasos intracelulares (FABPs), cuya función es unirse de modo reversible a ácidos grasos y transportar una sola molécula de ácido graso saturado o insaturado. Esta proteína se encuentra en altos niveles en los adipocitos y se encarga de transportar los ácidos grasos a través del citosol en dichas células.

Otras enzimas implicados en la lipogénesis son aquellos que participan en la activación y biosíntesis de los ácidos grasos, como la acil-CoA sintetasa (ACS), que participa en la activación, además de la sintasa de ácidos grasos (FAS), la acetil-CoA carboxilasa (ACC) y la glicerol-fosfato aciltransferasa (GPAT), implicadas en la biosíntesis (Kong y col. 2009).

1.5.2. Regulación de la lipogénesis

La expresión de las enzimas implicadas en lipogénesis está regulada por los factores de transcripción PPAR γ y C/EBP α (Kong y col. 2009). Además, existe otra vía reguladora dependiente de AMP y mediada por la quinasa AMPK (quinasa activada por AMP). Esta enzima, a través de procesos de fosforilación, regula varias etapas de la lipogénesis bloqueando las vías metabólicas que consumen ATP (lipogénesis o gluconeogénesis) y activando aquellas vías generadoras de ATP (β -oxidación y captación de glucosa y glucolisis) (Gao y col. 2008; Zhou y col. 2009).

1.5.3. Lipogénesis y obesidad

La diferenciación del adipocito y la cantidad de grasa que se acumule en él está íntimamente relacionados con el desarrollo de la obesidad. Existen estudios que relacionan bajos niveles de activación de la AMPK con el desarrollo de obesidad y diabetes (Gao y col. 2008; Zhou y col. 2009).

Estudios realizados en roedores obesos indican que la deficiencia de aP2 incrementa la sensibilidad a la insulina, disminuyendo la resistencia periférica a la insulina y manteniendo aparentemente la función de las células del páncreas, teniendo efectos beneficiosos en el metabolismo de lípidos (Bastarrachea-Sosa y col. 2002b).

1.6. Digestión y absorción de las grasas

El aparato digestivo tiene como función el procesamiento de los alimentos ingeridos para permitir la absorción de los nutrientes que contienen dichos alimentos. Los procesos de digestión dependen de la naturaleza del alimento.

Cuando se ingiere un alimento que contiene grasas tienen lugar dos procesos fisiológicos, la digestión y la absorción, hasta llegar a la formación de los quilomicrones, ricos en triglicéridos, que podrán ser asimilados por las células del organismo. La digestión comienza en la boca, donde junto a la saliva, se segrega la lipasa lingual, como respuesta a la masticación y a estímulos nerviosos. Esta enzima, junto con la lipasa gástrica, hidroliza los enlaces ésteres de triglicéridos formados por ácidos grasos de cadena corta y media. La emulsión que se forma en el estómago pasa posteriormente al intestino delgado donde, en el duodeno y yeyuno proximal, tiene lugar la mayor parte de la absorción de las grasas. En este tramo del intestino delgado el hígado libera las sales biliares, procedentes de la conjugación de los ácidos biliares, sintetizados por el hígado a partir del colesterol, con los aminoácidos glicina o taurina. Las sales biliares son fundamentales para dividir las grandes gotas de grasa en gotas de menor tamaño emulsionando los lípidos para formar micelas, aumentando la superficie expuesta

a las enzimas lipolíticas. Para que los lípidos sean absorbidos es necesaria la formación de estas micelas mixtas que contienen lecitina, sales biliares y los productos de la digestión de la grasa. Las micelas permiten el contacto de los productos procedentes de la digestión de los lípidos con el borde del enterocito, contribuyendo a la absorción de los lípidos. En este punto, el páncreas vierte su jugo, conteniendo la lipasa pancreática (principal enzima que cataliza la hidrólisis de triglicéridos en ácidos grasos libres y 2-monoglicéridos), colipasa (cofactor de la lipasa pancreática), colesterol esterasa y fosfolipasa A2, que hidrolizan otros lípidos de la dieta para que sean absorbidos.

La absorción de ácidos grasos, una vez producida la hidrólisis de TG y otros lípidos, se realiza por difusión simple y una vez en el interior de la célula intestinal se incorporan de nuevo como triglicéridos que, junto con otros lípidos resintetizados, se combinan con proteínas apolipoproteína B-48 para formar los quilomicrones, los cuales alcanzan el torrente sanguíneo a nivel de la vena cava, a través de los vasos linfáticos que drenan el intestino. Por otro lado, las sales biliares se quedan en la luz intestinal, siendo una parte de ellas absorbida en el íleon y otra eliminada en las heces.

A partir de este momento, los quilomicrones conducen la grasa hasta el hígado, el cual lo utiliza según las necesidades del momento (producción de energía mediante la oxidación de ácidos grasos, síntesis de sales biliares, hormonas, o para formar nuevas lipoproteínas VLDL)(Jones y Papamandjaris 2001; Gibney y col. 2006).

1.6.1. Enzimas involucradas en la absorción de la grasa: la lipasa pancreática

El páncreas tiene la capacidad de modificar la cantidad y composición de su secreción exocrina en función de los niveles de sustratos nutricionales presentes en la dieta. De esta forma, la síntesis de lipasa pancreática se incrementa en respuesta a la ingesta de dietas ricas en grasa. Aunque los niveles de lipasa pancreática se adaptan a la presencia o no de grasa en la dieta, se piensa que existe un nivel umbral por debajo del cual la adaptación es muy baja. El cofactor

de la lipasa, la colipasa, también parece adaptarse al contenido de grasa de la dieta, aunque con una respuesta más débil.

La lipasa pancreática o triacilglicerol acil hidrolasa es la principal enzima sintetizada y secretada por el páncreas, que juega un papel importante en la digestión de los triglicéridos, siendo responsable de la hidrólisis de entre un 50 – 70% de la grasa total que se ingiere en la dieta. Esta enzima retira los ácidos grasos de las posiciones α y α' de los triglicéridos de la dieta (Figura 1.17), liberando como productos de la lipólisis β -monoglicéridos y ácidos grasos de cadena larga y poliinsaturados (Martins y col. 2010). La actividad catalítica de la lipasa aumenta en presencia de la colipasa, pero también depende de la presencia de ácidos biliares u otras moléculas capaces de emulsionar los lípidos (Brownlee y col. 2010), debido a que la naturaleza y estructura de la superficie de la gota de grasa pueden modular la actividad de esta enzima (Tsujita y col. 2006).

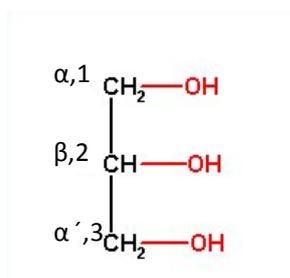


Figura 1.17. Molécula de glicerol.

1.7. Digestión y absorción de hidratos de carbono: digestión del almidón

La mayoría de la energía que utiliza el organismo proviene del consumo de hidratos de carbono. La clasificación de los hidratos de carbono se muestra en la Tabla 1-10.

El almidón es un hidrato de carbono de origen vegetal que contiene dos polisacáridos, la amilosa (cadenas lineales de glucosa unidas por enlaces $\alpha(1-4)$) y la amilopectina (cadena ramificada formada por glucosas unidas por enlaces $\alpha(1-6)$).

Tabla 1-10. Clasificación de los hidratos de carbono.

	Tipo	Ejemplos
Simples	Monosacáridos	Glucosa Fructosa Galactosa
	Disacáridos	Maltosa Sacarosa Lactosa
	Oligosacáridos	Maltotriosa Rafinosa
Polisacáridos	Homopolisacáridos	Almidón Glucógeno Celulosa
	Heteropolisacáridos	Hemicelulosa Pectinas

La digestión del almidón comienza en la boca, donde actúa la amilasa salivar (ptialina). La actuación de esta enzima permanece hasta la llegada del alimento al estómago, donde se inactiva por el pH ácido.

En el intestino delgado actúa la amilasa pancreática. Tanto la amilasa salivar como la pancreática rompen sólo los enlaces α -1,4 y los subproductos que se forman tras la acción de la amilasa pancreática son atacados por otras enzimas intestinales, dando como productos finales monosacáridos (glucosa) que atraviesan la membrana celular intestinal y pasan a la sangre. La parte del almidón que no es digerido en el tracto gastrointestinal llega al colon, donde puede ser utilizado por la flora microbiana residente.

La absorción de la glucosa por los enterocitos del epitelio intestinal se realiza por un transporte activo secundario al Na⁺, utilizando una proteína transportadora dependiente de este catión, la SGLUT-1, mientras que el mecanismo de salida del enterocito es por difusión facilitada mediante el transportador GLUT-2. Una vez en el torrente sanguíneo y, por mediación de la insulina, la glucosa es transportada al hígado y músculo, donde se almacenará en forma de glucógeno y al tejido adiposo, donde se almacenará en forma de triglicéridos (Gil Hernández 2010).

1.7.1. Enzimas involucradas en la absorción del almidón: la α -amilasa pancreática

La α -amilasa (α -1,4-glucan-4-glucanohidrolasa) es una enzima perteneciente a la familia de las glicosil hidrolasas. En humanos existen 2 isoformas de α -amilasa, una sintetizada por las glándulas salivares y otra por el páncreas. Las dos enzimas participan en la digestión del almidón. En primer lugar, la amilasa de las glándulas salivares hidroliza el 5% de los polímeros de almidón en cadenas más cortas. Esta enzima continúa con los alimentos hasta el estómago, donde es inactivada debido a la acidez, pero antes de que esto ocurra, entre un 30-40% del almidón ya ha sido hidrolizado. Más adelante, la α -amilasa pancreática secretada al estómago completa la digestión, siendo responsable de la mayor parte de la hidrólisis del almidón.

La α -amilasa pancreática cataliza la hidrólisis del almidón produciendo oligosacáridos de menor tamaño como la maltosa, isomaltosa, maltotriosa y otros α (1-6) y α (1-4) oligosacáridos, que serán degradados a glucosa por otras α -glucosidasas.

La actividad de la amilasa pancreática humana se relaciona con el aumento de los niveles de glucosa después de comer. Cuando la actividad de esta enzima se ve reducida, se reduce a su vez la cantidad de glucosa que se absorbe, disminuyendo los niveles de glucosa en sangre (Qin y col. 2010; Sudha y col. 2011). Por este motivo, existen fármacos que utilizan inhibidores de la amilasa, como la acarbosa (conocido como Glucobay y Precose), un producto natural de *Actinoplanes utahensis* que se utiliza para controlar los niveles de glucosa en sangre en enfermos de diabetes tipo 2 (Grussu y col. 2011).

1.8. Modelos animales para el estudio de obesidad

La obesidad se ha convertido en el mayor problema de salud pública en el mundo. Por esta razón, existe una necesidad urgente de identificación de nuevos métodos terapéuticos que promuevan una reducción de peso. Sin embargo, antes de poder

ensayar nuevas terapias en humanos, la acción y los posibles efectos secundarios del método en cuestión deben ser comprobados en modelos de estudio en animales.

Una de las dificultades a la hora de trabajar con modelos animales es encontrar un modelo que sea capaz de reflejar de la mejor forma posible los aspectos fisiológicos de la obesidad y como un nuevo tratamiento terapéutico podría modificar estos factores.

Debido a que el desarrollo de la obesidad no se debe a un sólo factor, sino a la interacción de varios factores, no existe un único modelo de obesidad válido para su estudio. Desde el punto de vista etiológico los modelos experimentales animales de obesidad se pueden clasificar como se muestra en la Tabla 1-11.

Modelos de experimentación animal con obesidad inducida genéticamente

Tal y como ha quedado reflejado en la Tabla 1-11 existen varios modelos animales de obesidad inducidos por mutaciones genéticas. Estos modelos han sido y son, empleados para estudiar las mutaciones inductoras de obesidad mediante genética clásica estudiando caracteres hereditarios y mediante generación de animales transgénicos en *loci* candidatos a estar implicados en la incidencia de la obesidad. Sin embargo, estos modelos animales se utilizan principalmente como modelos de obesidad estandarizados en los que estudiar principalmente aspectos de esta enfermedad. (Li y col. 2002).

Podemos distinguir dos tipos de modelos genéticos: poligénicos y monogénicos. Los modelos de obesidad con base poligénica son útiles a la hora de estudiar la implicación de varios factores en el desarrollo de la obesidad, debido a que parecen tener una mayor similitud y paralelismo con la obesidad humana. Sin embargo, su base poligénica hace muy difícil identificar la causa primaria de la obesidad, por lo que se suelen emplear modelos animales de estudio en los que el defecto reside en un único gen, ya sea transmitible con carácter dominante o recesivo.

*Tabla 1-11. Clasificación etiológica de los modelos de experimentación animal
(Mallo Ferrer y col. 1994).*

Clasificación etiológica de los modelos de experimentación animal		
Sistema nervioso central	Hipotálamo	- Lesiones de hipotálamo ventromedial, núcleo paraventricular, ablación hipotálamo medial - Inyecciones de tioglucosa de oro, glutamato monosódico, mostaza de bipiperidina, 5-7 dihidroxitriptamina - Estimulación crónica del hipotálamo lateral
	Tronco encefálico	- Inyección de 6-hidroxi dopamina, lesiones electrolíticas
	Sección del bulbo olfatorio	
	Lesiones del lóbulo temporal y amígdala	
	Simpatectomía abdominal unilateral	
Genética	Gen único dominante	- Ratón amarillo agouti (A y/ a) - Ratón adiposo (Ad)
	Gen único recesivo	- Ratón obeso (ob) - Ratón diabético (db) - Ratón fat (fat) - Ratón PAS - Ratón Tubby (tu) - Rata Zucker (fa, fa) - Rata corpulenta (SHR/N-cp)
	Poligénica espontánea	- Ratón New Zeland (NZO) - Ratón japonés (KK) - Ratón negro Paul Bailey (PBB/Ld) - Ratón NH - Ratón Weilesley (C3HF1)
	Poligénica ambiental	- Ratón A/St - Ratón C3H - Rata BHE - Ratón Spiny - Rata Osborne/Mendel - Rata Sand
Nutricional	Alimentación forzada	
	Dependientes de la dieta	- Dieta rica en grasa (HFC) - Dieta rica en hidratos de carbono - Dieta de cafetería o supermercado
	Hipernutrición postnatal	
	Hiponutrición prenatal	
	Hiperfagia prandial	
Endocrina		- Gonadectomía - Hiper cortisolismo - Hiperinsulinismo
Farmacológica		- Ciproheptadina - Clonidina - Clordicepoxido
Ambiental		- Restricción de actividad física - Estrés por estímulo doloroso
Estacional		- Prehibernación - Premigración
Otros		- Viral - Idiopática

Entre los modelos de obesidad de etiología poligénica se encuentran los ratones obesos *New Zealand*, el ratón BSB, la rata *Osborne-Mendel* y la rata del desierto, que tiene como característica particular la presencia del gen *Beacon*, también relacionado con la obesidad a través de modificaciones en el apetito.

Gracias a la descripción de animales fenotípicamente obesos con mutaciones monogénicas como la rata Zucker (*fa/fa*), el ratón diabético (*db/db*), el ratón obeso (*ob/ob*) y el ratón graso (*fat*), se han podido localizar algunos genes y caracterizar su participación en la obesidad y las consecuencias de su ausencia o alteración.

Dentro de los modelos de obesidad monogénica destaca, por ser el más utilizado en estudios de obesidad, la rata Zucker, que comparte varias características de la enfermedad en el ser humano. La rata Zucker puede ser heterocigota (*Fa/fa*), en cuyo caso es una rata delgada, o ser homocigota (*fa/fa*), en cuyo caso es obesa. La rata homocigota para el alelo *fa* (fenotipo resistente a leptina por mutación puntual en el gen del receptor de la leptina) (Fu y col. 2005) fue descrita por primera vez en 1961 por Zucker y Zucker (Zucker y Zucker 1961) y presenta una mutación en el gen *fa* que le hace exhibir una obesidad masiva, caracterizada por una acumulación de excesivas cantidades de grasa en el tejido graso subcutáneo e intraperitoneal.

En roedores, esta mutación conlleva variaciones en el desarrollo del tejido adiposo desde los dos primeros días de vida, cuando aumenta el contenido de triglicéridos en plasma provenientes de la leche materna. La primera expresión fenotípica de la mutación se hace manifiesta en dicho tejido a la semana de vida, aumentando la cantidad de enzimas con actividad relacionada con la acumulación de lípidos, provocando una hipertrofia de las células. Estas diferencias se detectan sin que se aprecie ninguna diferencia en la cantidad de dieta consumida ni en los niveles de insulina entre las ratas homocigotas y las delgadas heterocigotas. La expresión del fenotipo obeso llega a desarrollarse completamente cuando las ratas abandonan la alimentación materna y se asocia con el desarrollo de enfermedades secundarias como la resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, hiperlipogénesis en el hígado, e hiperfagia, la cual deja de presentar a las 12

semanas al aparecer hipertensión. (Laurent-Winter y col. 1992). A las 5 semanas de edad del animal la obesidad es completamente visible y, a las 14 semanas, la composición de su cuerpo presenta un 40% de lípidos (Giridharan 1998).

Otros modelos animales que pueden utilizarse para el estudio de la obesidad son los modelos con ratones, pero estos tienen el inconveniente de que todos ellos difieren de la enfermedad en humanos en varios aspectos. La mayoría de los modelos de ratón utilizados en obesidad derivan de mutaciones espontáneas, como el modelo de ratón obeso deficiente en leptina ($Lep^{ob/ob}$), que acaba padeciendo una obesidad grave con resistencia a la insulina e hiperfagia, incrementando la acumulación de grasa incluso recibiendo una dieta normocalórica (Kennedy y col. 2010).

Además de los dos modelos animales portadores de mutaciones espontáneas, la creación de animales transgénicos ha permitido validar la función de algunos genes relacionados con la obesidad, como el de la leptina, AGRPq (relacionado con el apetito) o el GLUT4 (transportador de glucosa), a través de su sobreexpresión, anulación o desregulación (Martí y col. 2004).

Modelos de experimentación animal de obesidad inducida por dieta

Como se ha mencionado anteriormente, además de modelos animales con base genética, existen modelos experimentales en los que la obesidad se trata de generar mediante dietas especiales. En este tipo de modelos hay que tener en cuenta dos factores fundamentales: la composición de la propia dieta y sus características organolépticas de sabor, olor, textura y temperatura que las pueden hacer más deseables con el objeto de inducir hiperfagia.

Las dietas que se utilizan se pueden clasificar en:

- **Dieta de alto contenido graso:** la dieta normal de laboratorio contiene un 10% de aporte calórico en forma de grasa. Si este porcentaje aumenta por encima del 30% los animales aumentan su ingesta calórica favoreciendo la aparición de obesidad. La alimentación de los animales con una dieta rica en grasa consigue reproducir varias alteraciones nutricionales y endocrinas,

como desórdenes en el metabolismo de la insulina y la glucosa, dislipidemia y disfunción cardíaca. Sin embargo, aunque el empleo de estos modelos con dieta hipercalórica está muy extendido, los resultados que se obtienen de ellos presentan mucha variabilidad a nivel nutricional (Oliveira y col. 2010).

Estos modelos, en los que los animales son alimentados con una dieta hipercalórica, suelen basarse en la utilización de la rata Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*) (Campion y Martinez 2004; Pessole y col. 2010) o de la rata albina Sprague-Dawley, desarrollada a partir de la rata Wistar pero a diferencia de ésta es menos activa (Chun, 2010; Frye, 2009; Shin, 2009).

- **Dietas de alto contenido en carbohidratos:** estas dietas, hipercalóricas también, producen un incremento de la ingesta energética de aproximadamente un 15%, con el consiguiente aumento de peso y acumulación de grasa.
- **Dietas combinadas de alto contenido en grasa y carbohidratos (dieta de cafetería):** otra alternativa de dieta utilizada para engordar a los roedores es la conocida como dieta de “cafetería” en la que se prepara una mezcla de alimentos comerciales de consumo humano. Con esta dieta los animales ganan peso más rápidamente y desarrollan antes la obesidad que con las dietas hipercalóricas ricas únicamente en grasa o hidratos de carbono, debido en parte a la hiperfagia que produce esta dieta, que puede conducir a un incremento de la ingesta calórica de hasta el 60% (West y York 1998) y un incremento de peso de entre un 50-200% con respecto a los animales que ingieren dieta estándar. Los estudios que se basan en el modelo de cafetería también suelen emplear la rata Wistar (Chua y col. 1996; White y Martin 1997; Speakman y col. 2008).

1.9. Las plantas como fuente de compuestos anti-obesidad

La idea de utilizar las plantas como fuente de compuestos para el tratamiento de la obesidad y enfermedades relacionadas viene existiendo desde hace siglos y ya, en el siglo XVI, algunas plantas eran utilizadas para el tratamiento de la diabetes (Cao y col. 2007). El potencial que presentan los productos naturales para el tratamiento de la obesidad se considera una gran alternativa para el desarrollo de nuevos fármacos efectivos y saludables, que reduzcan los costes y efectos secundarios de los sintetizados de forma industrial (Yun 2010).

La medicina tradicional ha sido la promotora de la utilización de numerosas plantas como herramienta para el tratamiento de distintas enfermedades, muchas de ellas relacionadas con la reducción del peso y varias plantas utilizadas en medicina tradicional que presentan componentes con capacidad antioxidante han sido consideradas de utilidad frente a la diabetes y a sus complicaciones relacionadas (Dewanjee y col. 2009). Algunos ejemplos de plantas utilizadas en medicina tradicional los encontramos en *“Obesity and medicinal plants”* (Moro y Basile 2000).

Los compuestos naturales que presentan la capacidad de inhibir la obesidad se pueden agrupar en cinco categorías basadas en sus distintos mecanismos de actuación (Tabla 1-12). Jong Won Yun en su revisión *“Possible anti-obesity therapeutics from nature”* presenta una gran variedad de ejemplos de compuestos procedentes de plantas que se incluyen en alguna de estas categorías (Yun 2010).

Tabla 1-12. Mecanismos de actuación de los inhibidores de obesidad.

Actuación de los inhibidores

Disminución de la absorción de lípidos

Disminución de la absorción de energía

Incremento del gasto energético

Disminución de la diferenciación y proliferación de los adipocitos

Disminución de la lipogénesis e incremento de la lipólisis

Existe una gran cantidad de suplementos dietéticos de origen vegetal que se utilizan con frecuencia en todo el mundo, pero la mayoría de ellos carecen de estudios científicos que demuestren su eficacia. Durante las dos últimas décadas se han llevado a cabo numerosos estudios con el fin de acreditar los efectos de determinados compuestos, o de localizar otros nuevos que puedan utilizarse en el tratamiento de la obesidad (Han y col. 2005; Amini y col. 2009; Kim y col. 2009; Zheng y col. 2010).

Parte de los efectos beneficiosos de una dieta rica en frutas y verduras se han asociado a la cantidad de antioxidantes naturales que existen en ellas. Los principales antioxidantes que se encuentran en la fruta son la vitamina C y los polifenoles. Los polifenoles, muy frecuentes en plantas con flores y frutos, o sus metabolitos, incluyen entre sus propiedades biológicas efectos antiinflamatorios, anticancerígenos y antioxidantes, previniendo frente al daño que provocan los radicales libres generados en el tracto gastrointestinal modulando la respuesta inflamatoria y la microbiota. Además se considera que los polifenoles modulan la disponibilidad de los nutrientes a través de la inhibición de enzimas digestivos implicados en la hidrólisis de lípidos y almidones, lo que produciría efectos beneficiosos como la reducción en la ingesta calórica en obesidad y el control de los niveles de glucosa en sangre (Ferrazzano y col. 2011; Grussu y col. 2011).

Los polifenoles presentes en la dieta humana pertenecen al grupo de los flavonoides y pueden ser flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavononas, catequinas, o antocianidinas. Algunos de estos compuestos han demostrado la capacidad de reducir el peso corporal y prevenir la aparición de obesidad provocada por la dieta y varios estudios los han relacionado con una reducción de la mortalidad por enfermedad cardiovascular.

Algunos ejemplos de polifenoles sobre los que se han hecho varios estudios son la genisteína (isoflavona), inhibidora de la adipogénesis y la epigallocatechin gallate (EGCG), la mayor catequina del té verde, que presenta una potente capacidad antioxidante *in vitro*, destacando su potencial como herramienta control frente a la obesidad y diabetes (Harmon y Harp 2001; Furuyashiki y col. 2004; Chun y col. 2010; Tanaka y col. 2010; Zheng y col. 2010; Ferrazzano y col.

2011; Kusano y col. 2011; Naz y col. 2011). Otros efectos fisiológicos que se les atribuyen son modular la agregación plaquetaria y presión sanguínea por medio de la inhibición competitiva de la fosfodiesterasa, lo que aumenta la concentración de AMPc y provoca la activación de la PKA en el tejido adiposo (Peluso 2006).

La búsqueda de compuestos de origen vegetal para el tratamiento de la obesidad y enfermedades relacionadas, continúa siendo una de las estrategias más utilizadas en la actualidad. En un estudio reciente (Akkarachiyasit y col. 2011), se demostró la capacidad inhibitoria de una antocianidina, la Cyanidin-3-rutinoside, frente a la α -amilasa, sugiriéndola como una posible candidata para controlar la hiperglucemia en pacientes con diabetes tipo 2 (Shen y col. 2006; Hsu y Yen 2007; Amini y col. 2009; Smirin y col. 2010; Akkarachiyasit y col. 2011).

.
. **Capítulo 2. Objetivos** .

En este capítulo se describen los objetivos marcados para este trabajo de investigación, analizando la razón por la que se plantean y, de forma simplificada, relatando los métodos de estudio utilizados para conseguir tales objetivos.

El objetivo de este trabajo es la identificación de nuevos compuestos de origen vegetal que puedan ser utilizados para el tratamiento de la obesidad, bien como complementos alimenticios o añadidos a un alimento para mejorar o modificar la acción metabólica de alguno de sus compuestos una vez ingeridos.

Para alcanzar este objetivo, se parte de métodos de búsqueda centrados en cada uno de estos puntos (inhibición de la absorción de grasa, inhibición de la absorción de almidón, inhibición de adipogénesis, e inducción de adipolisis), con los que poder analizar un gran número de extractos para hacer una primera selección de aquellos que resulten más efectivos en cada uno de sus cometidos.

Para la búsqueda de posibles inhibidores de la absorción de grasa y de almidón se utilizaron en los experimentos modelos de estudio basados en ensayos enzimáticos en los que participan las principales enzimas implicadas en dichos procesos, la lipasa pancreática y la α -amilasa, respectivamente.

Como modelo de estudio de la adipogénesis y la adipolisis se utiliza en ambos casos la línea celular de preadipocitos de ratón 3T3-L1, buscando extractos que inhiban su diferenciación (inhibición de la adipogénesis) o extractos que, una vez diferenciados a adipocitos, induzcan la hidrólisis de los triglicéridos acumulados en ellos (inducción de lipolisis).

Una vez seleccionados los posibles extractos inhibidores de la diferenciación de preadipocitos, o los posibles inductores de la hidrólisis de triglicéridos en adipocitos maduros, se trabajará en la evaluación de los mecanismos de acción de los mismos y, una vez seleccionados mediante estudios *in vitro* los extractos que pueden ejercer un efecto positivo en el tratamiento de la obesidad, el siguiente objetivo será la comprobación de dichos efectos en estudios con animales. Para este objetivo se utilizará como modelo de estudio la rata Zucker en los ensayos de inducción de lipolisis y la rata Wistar en los ensayos de inhibición de absorción de grasa procedente de la dieta, induciendo la obesidad mediante el consumo de una dieta de cafetería.

Capítulo 3. Materiales y Métodos

Este capítulo presenta una descripción detallada de los materiales empleados en cada uno de los ensayos llevados a cabo en este trabajo de investigación para buscar compuestos que puedan ser considerados en el tratamiento y/o prevención de la obesidad. Además, se exponen los métodos utilizados y se detallan los procedimientos seguidos en cada una de las búsquedas realizadas.

3.1. Proceso de obtención/elaboración de los extractos

Todos los extractos utilizados en este trabajo se obtuvieron en los laboratorios de Biosearch Life S.A. Los extractos provienen de 340 muestras vegetales obtenidas de los proveedores Amorós Nature, S.L. (Gerona, España), Plantarom S.L. (Lérida, España) y Granadiet S.L. (Granada, España). Por muestras vegetales nos referimos a partes de plantas como raíz, hoja, semilla, flor, o la planta entera que proceden de un total de 299 especies vegetales.

Creación de una librería de extractos

Las plantas contienen principios activos de composición química muy diferente. Por ello, con el fin de extraer la mayor variedad de compuestos de cada planta, se hicieron extracciones en tres solventes de diferente polaridad: agua, metanol y hexano.

Se utilizó un procedimiento de extracción acelerada por solventes (Dionex ASE200, Dionex Corporation, EE.UU.) utilizando unas condiciones estándar de extracción de presión 1500 PSI y una temperatura de 80°C durante 10 minutos.

Para la obtención de cada extracto, se pesaron entre 1-5 g de muestra vegetal molida, se mezclaron con arena de mar lavada (Panreac Química S.A.U., España) y se introdujeron en la celda de extracción, donde se añadieron 30 mL del solvente correspondiente. Tras la extracción, el extracto obtenido fue recogido en tubos falcon de 50 mL y guardados a -20°C hasta su utilización. En el caso de los extractos obtenidos con hexano, antes de ser guardados, fueron evaporados en un concentrador SpeedVac (Thermo Fischer Scientific, EE.UU.) a 80°C y vacío. El residuo seco obtenido fue disuelto en 10 mL de DMSO y almacenado a -20 °C.

Tras el procesamiento de las muestras vegetales se obtuvo finalmente una librería de 987 extractos, de los cuales 338 fueron extractos acuosos, 332 extractos metanólicos y 317 extractos obtenidos con hexano.

Preparación de los extractos para su evaluación en los ensayos con células 3T3-L1

Para la utilización de los extractos en los ensayos llevados a cabo con células 3T3-L1, estos se diluyeron en PBS estéril a una dilución 1/10 en el caso de los extractos acuosos y metanólicos y a una dilución 1/100 en el caso de los hexánicos. Estas diluciones se determinaron según la toxicidad el solvente utilizado. Debido a que la carga microbiológica de los extractos podría interferir con los ensayos celulares al contaminar los cultivos durante la incubación se procedió a la irradiación de éstos con luz UV durante 30 minutos.

Elaboración de extractos a pequeña escala

Cuando algunos de los ensayos realizados requirieron una mayor cantidad de muestra (en torno a 1-2 g) se llevó a cabo un proceso de extracción por infusión, mezclando 10 g de planta triturada con 100 mL de solvente (metanol o agua). La mezcla se dejó a presión atmosférica, agitación y 60°C durante 1 hora, después de la cual se filtró y el filtrado obtenido se evaporó en un horno de secado bajo vacío (Binder GmbH, Alemania) a 80°C. El producto obtenido se molió y se almacenó a temperatura ambiente.

Elaboración de extractos a escala de planta piloto

Los ensayos en animales de experimentación presentados en esta memoria y los realizados por centros de investigación participantes en el proyecto PRONAOS, necesitaron cantidades de muestra superiores a los 10 g (100-200 g en muchos de los casos). Obtener estas cantidades de extracto en el laboratorio es difícil y muy laborioso. Por este motivo y para disponer de extractos estandarizados, decidimos emplear productos comerciales fabricados con las mismas especies vegetales de las que obtuvimos los extractos que conforman nuestra colección de muestras. Los extractos comerciales utilizados se recogen en la Tabla 3-1.

En los casos en los que no encontramos productos comerciales equivalentes a aquellos extractos positivos en nuestros programas de búsqueda de actividades biológicas, realizamos procesos de fabricación a escala de planta piloto. Recurrimos a este tipo de fabricación, también, cuando los productos comerciales no exhibieron

la actividad biológica detectada en nuestros ensayos. Para ello, incubamos entre 1 y 2 kg de materia vegetal en 10 L de solvente (agua:metanol, 1:1) durante 4-5 h a 60 °C en un rotavapor Büchi R-220 (Büchi. Labortechnik AG, Suiza). El producto obtenido fue filtrado a través de un tatis con 200 µm de poro y el extracto resultante se secó en un equipo Spray Dryer B-290 (Büchi. Labortechnik AG, Suiza). El producto en polvo obtenido se mezcló con un 1-2 % (p/p) de sílica pirogénica (Aerosil™ 200, Evonik Industries AG, Alemania) para evitar su rehidratación y apelmazamiento y se almacenó a temperatura ambiente.

Tabla 3-1. Extractos comerciales utilizados en esta tesis doctoral.

Código¹	Extracto²	Proveedor³
EB2167	PB Abedul	Biosearch S.A.
EB2197	Abedul	Planta piloto
EB2187	EN Ciprés	Biosearch S.A.
EB2172	EN Hamamelis	Biosearch S.A.
EB2174	EN Ratania	Biosearch S.A.
EB2177	EN Tila	Biosearch S.A.
EB2171	PB Vid	Biosearch S.A.
EB2179	EN Pomelo	Biosearch S.A.
EB2175	EN Sol de Oro	Biosearch S.A.
EB2178	PB Sol de Oro	Biosearch S.A.
EB2180	EN Sol de Oro	Biosearch S.A.
EB2176	EN Rhodiola	Biosearch S.A.
EB2164	Amapola	Planta piloto
EB2199	PB Amapola	Biosearch S.A.
EB2200	PB Amapola	Biosearch S.A.
EB2169	PB Tila	Biosearch S.A.
EB2163	Macis	Planta piloto
EB2165	Azahar	Planta piloto
EB2166	PB Azahar	Biosearch S.A.
EB2202	PB Azahar	Biosearch S.A.

¹Las muestras de extractos comerciales se codificaron de igual forma que los extractos obtenidos mediante el equipo ASE200. ²PB: producto en bruto, EN: extracto normalizado en base a los principios activos más habituales requeridos en el extracto en cuestión. ³Productos obtenidos de la división de extractos de Biosearch S.A. (Talayuela, Cáceres, España) o fabricados en los laboratorios en Granada a escala de planta piloto

3.2. Búsqueda de compuestos con potencial actividad sobre la obesidad.

Para cada uno de los mecanismos relacionados con la obesidad que fueron seleccionados como dianas para la búsqueda de compuestos activos se diseñó un ensayo *in vitro* que permitiera el análisis de la potencial actividad de los extractos de nuestra colección de muestras. Dos de los mecanismos (inhibición de la actividad lipasa y de la actividad amilasa) están directamente relacionados con la absorción de lípidos y carbohidratos y se evaluaron a través de ensayos de tipo enzimático. Otros dos mecanismos (lipólisis y adipogénesis) están relacionados con los fenómenos de acumulación de grasa en los adipocitos y se evaluaron a través de ensayos celulares.

Todos los estudios se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos en las cuales se analizaron en cada una de ellas 30 extractos por triplicado. En todas las placas se incluyeron un control negativo y un control positivo ambos por triplicado, excepto en las placas utilizadas para la búsqueda de inhibidores de actividad amilasa en las cuales hubo un control positivo, un control negativo y un control del indicador colorimétrico utilizado todos ellos por duplicado.

El protocolo que se siguió para cada uno de los ensayos se detalla a continuación.

3.2.1. Ensayos enzimáticos

Protocolo para la medida de actividad lipasa pancreática

Para la evaluación de la actividad inhibitoria de lipasa se utilizó el kit de medida de actividad lipasa de Roche Farma, S.A. (Hoffmann-La Roche, Suiza). El método se basa en la hidrólisis de un substrato cromogénico específico para la lipasa, el 1,2-O-dilauril-rac-glicero-3-ácido glutárico-(6-metilresorufina) formándose 1,2-O-dilauril-rac-glicerol y el ácido glutárico-(6-metil-resorufina)-éster, un producto intermedio inestable. En solución alcalina, éste último se descompone espontáneamente en

ácido glutámico y metilresorufina. La intensidad cromática del colorante rojo formado es directamente proporcional a la actividad de la lipasa Figura 3.1.

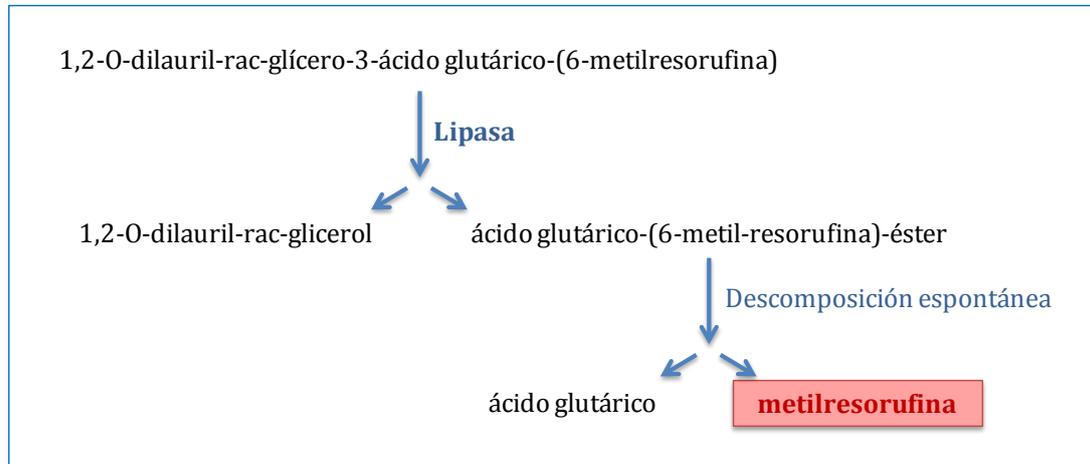


Figura 3.1. Esquema de resumen del método empleado para determinar actividad lipasa y las reacciones químicas y enzimáticas que tienen lugar.

El kit está formado por dos reactivos que contienen tampón BICIN (N,N-bis(2-hidroxietil)-glicina) (R1) y tampón tartrato (R2), cuya composición de cada uno de ellos viene especificada en el kit. Como enzima se utilizó lipasa pancreática porcina (Fluka, SigmaAldrich, EE.UU.) con la cual se preparó una solución madre disolviéndola en tampón Tris-HCl 100 mM a pH 8 NaCl 100 mM, a una concentración de 0,75U/mL. Para calcular la concentración óptima de lipasa pancreática se llevó a cabo un ensayo con concentraciones decrecientes de enzima para determinar aquella concentración a la cual la actividad del enzima era suficientemente alta para poder cuantificar la reducción de dicha actividad en nuestro ensayo.

Los ensayos se llevaron a cabo en placas microtiter de fondo plano (Microtiter, Labortecnic) mezclando 80 μ L del reactivo R1, 50 μ L del reactivo R2, 20 μ L del stock de lipasa y 10 μ L de las muestras a ensayar o de los controles correspondientes. La reacción se incubó a 37 $^{\circ}$ C y agitación durante un máximo de 30 minutos en un lector de placas GENios (Tecan Trading AG, Suiza) leyendo absorbancia a 595 nm cada minuto.

Como controles negativos se emplearon los solventes correspondientes a las muestras ensayadas en cada placa y, como control positivo se utilizó Orlistat

(Hoffmann-La Roche, Suiza) disuelto en DMSO y diluido en agua hasta una concentración de 6,25 µg/mL. Los controles blancos de cada reacción fueron el tiempo 0 de incubación, antes de añadir el enzima.

Protocolo para la medida de la actividad α -amilasa

Los hidratos de carbono complejos ingeridos en la dieta deben ser degradados a moléculas más sencillas para poder ser absorbidos en el tubo digestivo. En la hidrólisis del almidón participan varias enzimas, entre ellas la enzima α -amilasa, la cual en humanos presenta dos isoformas, la amilasa salival y la amilasa pancreática.

La evaluación de la actividad inhibitoria de α -amilasa se llevó a cabo mediante un ensayo basado en el método descrito por Walker y Harmon (Walker y Harmon 1996). Este método utiliza como substrato la amilopectina de patata (Fluka, Sigma-Aldrich Co., EE.UU.), un polisacárido formado por moléculas de glucosa unidas linealmente por enlaces α -1,4 y ramificaciones unidas por enlaces α -1,6. Por acción de la enzima α -amilasa, la amilopectina se hidroliza dando como producto de la hidrólisis una mezcla de dextrinas, con mayor actividad como azúcares reductores que la propia amilopectina. Como indicador colorimétrico se utiliza ferricianuro (de color amarillo) el cual en presencia de azúcares reductores se reduce a ferrocianuro (incoloro). La pérdida de color en el ensayo es directamente proporcional a la actividad de la enzima α -amilasa (Figura 3.2).

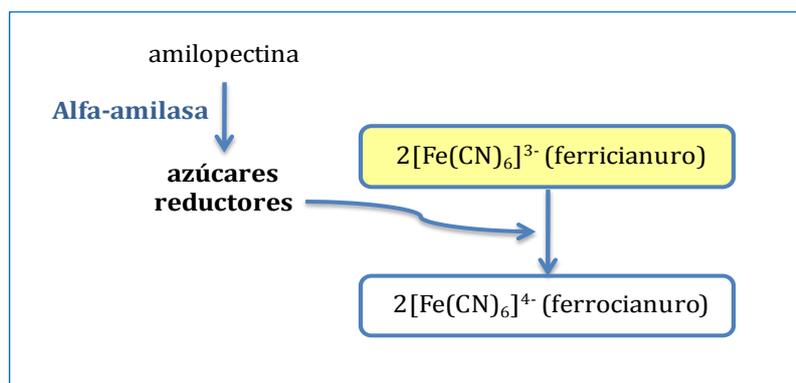


Figura 3.2. Esquema de las reacciones que tienen lugar durante el ensayo de medida de actividad α -amilasa.

Para llevar a cabo el ensayo la amilopectina se preparó a una concentración de 10 mg/mL en tampón Tris-HCl 50mM pH 7. Para su correcta disolución se calentó en un baño de agua a 90°C durante cinco minutos y, una vez disuelto, se atemperó dos minutos a 37°C antes de su utilización. El substrato de amilopectina se preparó el mismo día de su utilización para evitar el fenómeno de retrogradación (insolubilización y precipitación espontánea) entre sus secciones lineales las cuales formarían una organización cristalina rígida que requeriría una alta cantidad de energía para romperse, lo que se reflejaría como una pérdida actividad enzimática en nuestro experimento.

La solución colorante utilizada estaba compuesta por 0,35g de ferrocianuro potásico + 2 g de carbonato de sodio en 100 mL de agua destilada.

Como enzima se utilizó la α -amilasa de saliva humana (Sigma-Aldrich Co., Ref.A1031), de la cual se preparó una solución madre en CaCl₂ 1 mM a una concentración de 32 U/mL, que se conservó congelada a -20°C tras una dilución 1/2 en glicerol.

Los ensayos de medida de actividad α -amilasa se realizaron en placas de 96 pocillos de fondo profundo en forma de U, en los que mezclaron 70 μ L de amilopectina, 15 μ L de muestras o controles y 15 μ L de enzima α -amilasa (8 U/mL). Las reacciones se incubaron a 37 °C durante 15 minutos y transcurrido este tiempo se añadieron 300 μ L de solución colorante. A continuación se incubaron a 90 °C durante 10 min. Para la lectura de absorbancia a 450 nm se trasvasó la mitad del volumen de reacción a placas de 96 pocillos de fondo plano y se empleó un lector de placas GENios (Tecan Trading AG, Suiza).

Como controles negativos se emplearon los solventes presentes en las muestras. Como control positivo se utilizó una solución de acarbosa (Glucobay; Bayer AG, Alemania), una pseudo-tetramaltosa de origen microbiano con capacidad de inhibir la actividad α -amilasa, a una concentración de 37,5 μ g/mL en PBS, por ser una concentración con la cual obteníamos una inhibición de la actividad α -amilasa superior al 80%. Como controles blancos de cada una de las muestras, se emplearon

mezclas de reacción con los extractos y sin presencia de enzima e incubadas en las mismas condiciones.

La medida de la capacidad de inhibir la actividad de la enzima α -amilasa de páncreas porcino, llevaba a cabo con una parte de la colección de muestras, se realizó siguiendo el mismo procedimiento descrito.

3.2.2. Ensayos celulares.

Línea celular 3T3-L1

Para identificar extractos con efectos sobre los mecanismos relacionados con los fenómenos de acumulación de grasa en los adipocitos se utilizó una línea celular de preadipocitos de ratón 3T3-L1 adquirida a la American Type Culture Collection (ATCC) (Harmon y Harp 2001; Park y col. 2011; Pulido y col. 2011).

Reactivos y medios de cultivo

- Reactivos utilizados para el cultivo celular:
 - Medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium* con 4500 mg/L de glucosa, 110 mg/L de piruvato sódico y L-glutamina) de Sigma-Aldrich Co. (EE.UU.).
 - Penicilina/estreptomicina (P/S) de Sigma-Aldrich Co.
 - Suero de ternera inactivado por calor (CS) de PAA Laboratories GmbH (Austria).
 - Suero bovino fetal inactivado por calor (FBS) de PAA Laboratories GmbH.
 - Isobutilmetilxantina (IBMX) de Sigma-Aldrich Co.
 - Dexametasona de Sigma-Aldrich Co.
 - Insulina humana de Sigma-Aldrich Co.
 - Tripsina-EDTA (ácido etilen diamino tetra acético) de Sigma-Aldrich Co.
 - Dimetil sulfóxido (DMSO) de Sigma-Aldrich Co.

- Medios de cultivo:
 - Medio de mantenimiento: DMEM complementado con un 10% (v/v) de CS y un 1% (v/v) de P/S.
 - Medio de iniciación: DMEM complementado con un 10% (v/v) de FCS, un 1% (v/v) de P/S, 0,5 mM de IBMX, 1 μ M de dexametasona y 10 μ g/ml de insulina.
 - Medio de continuación: DMEM complementado con un 10% (v/v) de FCS, un 1% (v/v) de P/S y 10 μ g/ml de insulina.
 - Medio de crecimiento: DMEM complementado con un 10% (v/v) de FBS y un 1% (v/v) de P/S.
 - Medio de congelación: medio de mantenimiento con un 10% (v/v) de DMSO.

- Preparación de la placa de cultivo:
 - Placas de cultivo celular (NUNC) de 96 pocillos.
 - Solución de colágeno: 10 mg de colágeno de cola de rata (Sigma-Aldrich Co., EE.UU.) en 200 mL de PBS estéril con 200 μ L de ácido acético.
 - PBS: 8,2 g de NaCl, 0,27 g de KH₂PO₄, 1,4 g de Na₂HPO₄, 0,15 g de KCl en 1 litro de agua destilada ajustando el pH a 7,4.
 - Solución de tripsina al 0,25% (p/v) en EDTA 10mM preparado en PBS.

Cultivo y subcultivo de adipocitos 3T3-L1

- Cultivo en frasco:

El cultivo de células 3T3-L1 se llevó a cabo en una atmósfera con una humedad del 95%, un 5% de CO₂ y 37°C de temperatura. El cultivo se inició a partir de un vial de células 3T3-L1 procedente de la ATCC el cual se descongeló y se traspasó su contenido a un frasco de cultivo de 25 mc² de Nunc (Thermo Fisher Scientific Inc., EE.UU.) en el que se mantuvieron las células en 7 mL de medio de mantenimiento durante 2 días hasta que alcanzaron aproximadamente un 80% de confluencia. Transcurrido ese tiempo, las células fueron despegadas con tripsina-EDTA y se centrifugaron a 1500 rpm durante cinco minutos para retirar toda la tripsina-EDTA. El *pellet* de células obtenido tras la centrifugación se suspendió en 15 mL de medio

de mantenimiento y se traspasó a un frasco de cultivo de 80 cm² de Nunc en el cual permanecieron las células durante dos días hasta que alcanzaron de nuevo un 80% de confluencia. Transcurrido ese tiempo, se repitió el mismo proceso, empleando 50 mL de medio de mantenimiento y frascos de cultivo de 175 cm² (Nunc). Los siguientes subcultivos se realizaron inoculando los frascos de cultivo con una proporción de células por medio de cultivo de entre 1/50 y 1/100. Una vez que el número de subcultivos (pases) alcanzaron los 10, se iniciaron nuevos subcultivos a partir de viales congelados (-80°C) de células con un número menor de pases.

- Cultivo en placa:

Antes de sembrar las células, la superficie de los pocillos de las placas de cultivo fue tratada con colágeno para ayudar a la adhesión de las células. Para ello, los pocillos de las placas de cultivo se cubrieron con la solución de colágeno para cubrir toda la superficie (aproximadamente 30µL en placas de 96 pocillos y 300µL en placas de 24 pocillos). Se incubaron 30 minutos en estufa a 37°C para permitir la unión del colágeno al fondo de la placa. Posteriormente, se retiró la solución de colágeno y se hizo un lavado con PBS estéril. Las placas de cultivo se dejaron secar en la campana y bajo la luz ultravioleta durante otros 30 minutos tras lo cual estaban lista para su uso.

Las células 3T3-L1 sembradas en las placas procedían de frascos de cultivo de 175 cm². Una vez despegadas las células con tripsina y trascurrida la centrifugación, se llevaba a cabo un conteo de células en una cámara de Neubauer (Brand GMBH + CO KG, Alemania) y se sembraban en las placas de cultivo a una concentración de 8000 células/pocillo en placas de 96 pocillos en el caso de los ensayos de búsqueda de inhibidores de adipogénesis e inductores de lipólisis y de 80000 células/pocillo en placas de 24 pocillos en el caso de los estudios de expresión génica. Una vez sembradas en las placas, se dejaron con medio de mantenimiento hasta que formaron una monocapa confluyente.

Diferenciación de adipocitos 3T3-L1

Una vez formada la monocapa confluyente, los preadipocitos sufren inhibición por contacto y cesan su crecimiento. En este momento se dejan incubando durante 2-3 días en medio de mantenimiento tras los cuales se estimuló su diferenciación cambiando este medio por medio de iniciación, el cual contiene factores que aumentan la concentración intracelular de AMPc (IBMX) y la expresión de factores de transcripción implicados en los mecanismos de diferenciación. Transcurridas 48 horas, se cambió el medio por medio de crecimiento, enriquecido con FBS, en el que las células continúan la acumulación de grasa en su interior (Figura 3.3). Las células se mantuvieron en este medio, renovándolo cada 2-3 días, hasta el día en el que se determinó llevar a cabo cada ensayo. Tanto los ensayos de búsqueda de extractos inhibidores de adipogénesis como de extractos inductores de lipólisis se llevaron a cabo el séptimo día desde el inicio de la diferenciación, momento en el cual las células han completado la misma y las células presentan una gran cantidad de gotas de grasa en su interior.

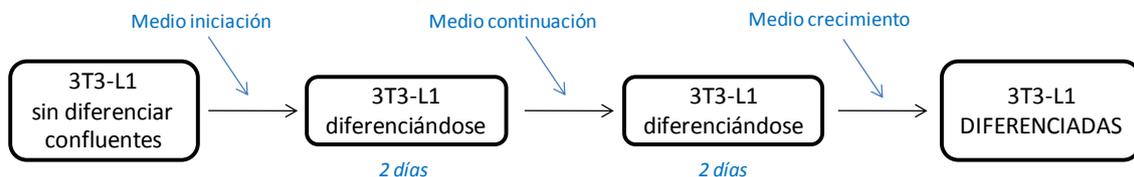


Figura 3.3. Esquema de la diferenciación celular de preadipocitos 3T3-L1 a adipocitos.

Con el fin de comprobar que las células 3T3-L1 se habían diferenciado correctamente a adipocitos acumulando grasa se llevaron a cabo dos tipos de tinciones, una con Rojo Nilo y otra con Oil Red, las cuales en ambos casos tiñen la grasa acumulada en el interior de las células.

- Tinción de la grasa intracelular con Oil Red:

Una vez diferenciadas las células a adipocitos, se retiró el medio de cultivo y se lavaron tres veces con PBS. A continuación se fijaron las células con formaldehído al

3,7% (v/v) durante cinco horas, tras lo cual se retiró el formaldehído lavándose las células con isopropanol al 60% (v/v) (preparado al momento) y dejándolo secar durante 10 minutos. Una vez secas se cubrieron las células con solución de Oil Red O (Sigma-Aldrich Co., EE.UU.), el cual tiñe los lípidos neutros de color rojo, a una concentración de 2 mg/mL en isopropanol. Las células se mantuvieron cubiertas por la solución de Oil Red O durante 30 minutos, tras los cuales se retiró la solución de Oil Red O y se hicieron cuatro lavados con agua destilada. Una vez retirado todo el colorante, se dejaron secar durante 15 minutos. En este momento se observaron al microscopio las gotas de grasa teñidas (Figura 3.4).

La grasa acumulada se puede cuantificar en el espectrofotómetro para lo cual las células se incuban previamente en isopropanol 100% durante 10 minutos tras los cuales se mide la absorbancia de la muestra a 450 nm en el lector de placas (Tecan Group Ltd., Austria).

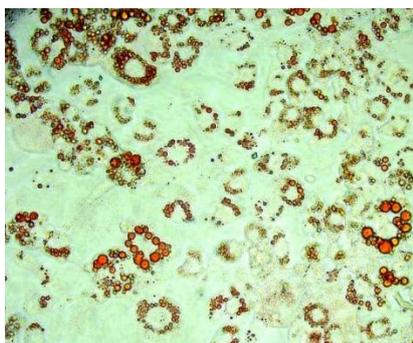


Figura 3.4. Células 3T3-L1 diferenciadas y teñidas con Oil Red.

- Tinción de la grasa intracelular con Rojo Nilo:

Una vez diferenciadas las células a adipocitos, se les retiró el medio de cultivo y cubrió cada pocillo con una solución de Rojo Nilo (Sigma-Aldrich Co., EE.UU.). La solución de Rojo Nilo utilizada se preparó añadiendo a 1 mL de PBS 10 μ L de una solución madre de Rojo Nilo preparada en acetona (1 mg/mL) y conservada en oscuridad. Pasados aproximadamente 10 minutos se podían ver los resultados de la tinción al microscopio de fluorescencia (Axiovert200 de Zeiss a 400 aumentos con el

filtro de fluorescencia 09 a una longitud de onda de excitación de 450-490 nm y de emisión de 515 nm) (Greenspan y col. 1985).

Además de poder ser observada microscópicamente, la grasa intracelular pudo ser cuantificada midiendo fluorescencia (filtro de excitación de 485 nm y filtro de emisión de 535 nm) en un lector de placas (Tecan Group Ltd., Austria).

- Cuantificación de glicerol en el medio extracelular:

La determinación de la concentración de glicerol se realizó mediante un ensayo colorimétrico desarrollado por McGowan (McGowan y col. 1983). Este método enzimático se basa en la fosforilación del glicerol por acción de la enzima glicerol quinasa dando como resultado glicerol-3-fosfato el cual es oxidado por la enzima glicerol 3-P-oxidasa produciendo peróxido de hidrógeno (H₂O₂). El peróxido de hidrógeno junto a la 4-aminoantipirina y el sulfato 2-hidroxi-3,5-diclorobenceno sódico (DHBS) producen un derivado quinonímico coloreado que puede cuantificarse espectrofotométricamente (Figura 3.5).

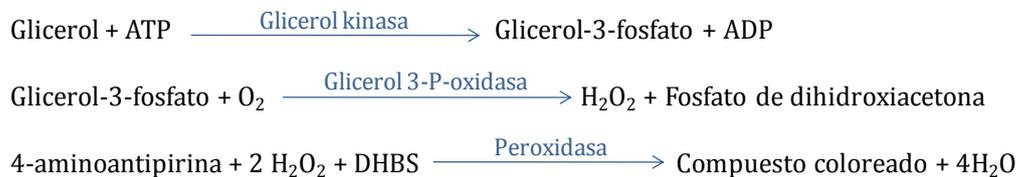


Figura 3.5. Esquema del ensayo de determinación de la concentración de glicerol. ATP: adenosina trifosfato; ADP: adenosina difosfato; DHBS: sulfato 2-hidroxi-3,5-diclorobenceno sódico.

Para cuantificar el glicerol presente en muestras de medio de cultivo, estas se dispensaron en placas de 96 pocillos de fondo plano (25 µL/pocillo). Al mismo tiempo se dispusieron en otros pocillos de la placa 25 µL de una recta patrón de glicerol (Sigma-Aldrich Co., EE.UU.) preparada mediante diluciones seriadas decrecientes en PBS a partir de una solución madre de glicerol (2,5 mM). A continuación, se añadieron 100 µL de mezcla reactiva descrita a continuación a cada una de las muestras dispensadas en la placa de 96 pocillos y se hizo una primera

medida en el espectrofotómetro a 490 nm (tiempo cero). La placa se incubó durante 30 minutos en estufa a 37°C y se midió de nuevo en el espectrofotómetro a 490 nm. Los valores netos de absorbancia (valores a 30 min menos valores a tiempo 0) se emplearon para calcular una recta de calibrado con la muestras patrón de glicerol, e interpolando en esta recta los valores obtenidos en las muestras de medio de cultivo, determinamos la concentración de glicerol en dichas muestras.

Premezcla reactiva:

- 100 mL de Tris-HCl 50 mM pH 7.4.
- 137,87 mg de ATP (Adenosín 5'-trifosfato disódico sal hidratada, Sigma-Aldrich Co., EE.UU.).
- 159 mg de DHBS (Sigma-Aldrich Co.).
- 122 mg de AAP (4-aminoantipirina, Sigma-Aldrich Co.).
- 101,65 mg de MgCl₂ y se dejó a 4°C hasta su utilización.

Mezcla reactiva:

- 100 mL premezcla reactiva.
- 132,1 µL de peroxidasa (150 U/mg) (Sigma-Aldrich Co.).
- 5,4 mg de glicerol 3-P-oxidasa (≥70 U/mg) (GPO, Sigma-Aldrich Co.).
- 208,3 µL de glicerol quinasa (25-75 U/mg) (Gliceroquinasa de *Cellulomonas* sp, Sigma-Aldrich Co.).

Cuantificación de inhibición de adipogénesis

Para la búsqueda de extractos inhibidores de adipogénesis se diseñó un ensayo que evaluaba el efecto de la presencia de los extractos en el medio de cultivo sobre el proceso de diferenciación de las células 3T3-L1. La inhibición en el proceso de adipogénesis provocará una disminución o inhibición en la acumulación de grasa que puede ser cuantificada mediante tinción con Rojo Nilo.

Los resultados presentados en esta memoria se obtuvieron de ensayos realizados según el procedimiento que a continuación se detalla. Los extractos vegetales se añadieron, por triplicado, a cultivos celulares de adipocitos 3T3-L1 en

placas de 96 pocillos y junto al medio de inicio de la diferenciación (200 uL por pocillo). Se añadieron 2 uL de extractos acuosos, 1 uL de extractos metanólicos y 0,2 uL de extractos preparados en hexano y posteriormente disueltos en DMSO. En cada placa de ensayo se utilizaron tres pocillos como controles negativos, conteniendo medio de inicio de la diferenciación (200 uL) y agua, metanol o DMSO (2, 1 o 0,2 uL respectivamente). Como control positivo se utilizó genisteína (Extrasynthese, Francia) a una concentración de 100 μ M y disuelta en DMSO.

Las células se incubaron con los extractos durante 2 días, tras los cuales se cambió el medio por medio de continuación (sin extractos, solventes o genisteína) y se continuó con el proceso de diferenciación hasta completar los siete días desde su inicio (Figura 3.6).

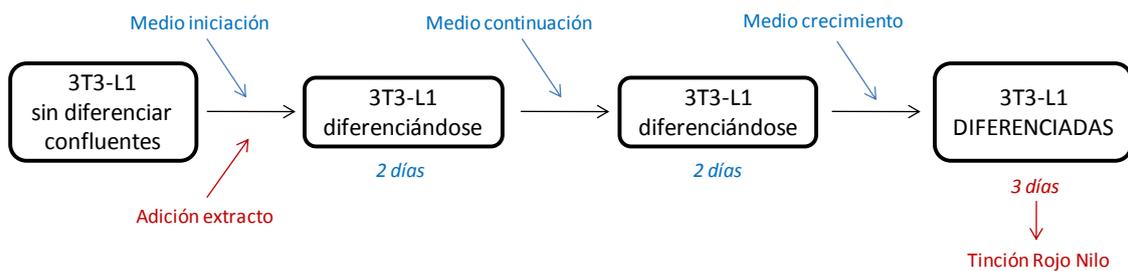


Figura 3.6. Esquema del ensayo de búsqueda de inhibidores de adipogénesis.

El grado de diferenciación que habían alcanzado las células se determinó mediante tinción con Rojo Nilo y cuantificación de la grasa intracelular mediante espectroscopía de fluorescencia (Apartado 3.2.2, Diferenciación de adipocitos 3T3-L1). Los valores de grasa intracelular obtenidos en los cultivos incubados en presencia de extractos vegetales se expresaron como porcentaje relativo a los controles negativos de la placa de ensayo correspondiente (Figura 3.7).

$$\% \text{ Grasa} = \frac{\text{Fluorescencia células con extracto}}{\text{Fluorescencia células control}} \times 100$$

Figura 3.7. Fórmula para el cálculo de grasa en el ensayo de inhibición de adipogénesis.

Cuantificación de inducción de lipólisis

Para la búsqueda de inductores de lipólisis se diseñó un ensayo que evaluaba la capacidad de los extractos para inducir la liberación de glicerol al medio de cultivo por parte de adipocitos 3T3-L1 completamente diferenciados. Este procedimiento se basó en el empleo de cultivos celulares de adipocitos 3T3-L1 diferenciados (más del 80 % de las células con gotas de grasa intracelulares) en placas de 96 pocillos. En cada placa se añadieron, junto al medio de crecimiento, 2,5 uL de extractos acuosos o metanólicos o 0,2 uL de extractos hexánicos disueltos en DMSO. Todas las muestras se ensayaron por triplicado. Como controles negativos se emplearon los solventes agua (2,5 uL), metanol (2,5 uL) o DMSO (0,2 uL). Como control positivo se utilizó el isoproterenol ((-)-Isoproterenol hidrocloreuro, Sigma-Aldrich Co., EE.UU.) a una concentración de 10µM. Las células se incubaron con las muestras y controles durante 24 horas a 37°C y un 5% de CO₂, tras las cuales se recogió una muestra del medio de cultivo (100 µL) y se determinó la concentración de glicerol en él mediante el método colorimétrico descrito previamente (Apartado 3.2.2, Diferenciación de adipocitos 3T3-L1 y Figura 3.8).

Los valores de glicerol liberado al medio de cultivo celular obtenidos en los cultivos incubados en presencia de extractos vegetales se expresaron como porcentaje relativo a los controles negativos de la placa de ensayo correspondiente.

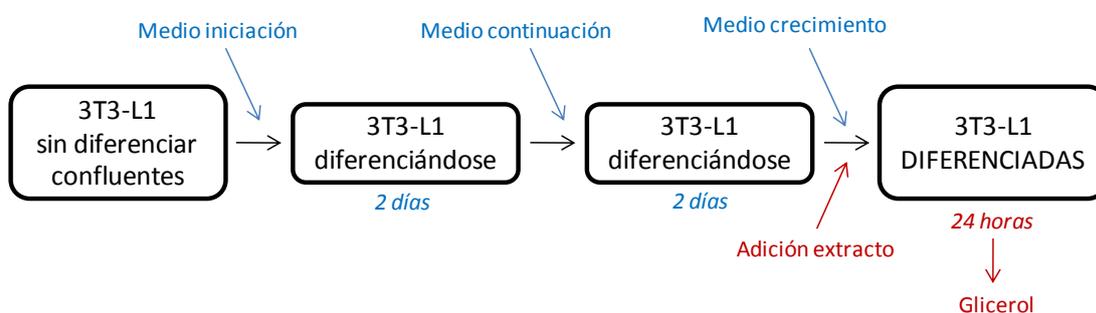


Figura 3.8. Esquema del ensayo de búsqueda de inductores de lipólisis.

3.2.3. Medida de la citotoxicidad de los extractos

La adición de compuestos químicos distintos a los propios de los medios de cultivo, como son los extractos vegetales, puede afectar a la viabilidad de cultivos celulares, reduciendo su tasa de crecimiento o, incluso, ejerciendo un efecto tóxico capaz de matar dichos cultivos. Los tipos de ensayos realizados en la línea celular 3T3-L1 podrían verse afectados por un fenómeno de citotoxicidad, alterando los resultados obtenidos de dichos ensayos. Por ello, se cuantificó la citotoxicidad de los extractos sobre la línea celular de adipocitos, de forma que se pudiera obtener información para adaptar en cierta medida las concentraciones de extractos empleados en los ensayos celulares. Además, el grado de citotoxicidad sobre la línea 3T3-L1 que ejercieron cada uno de los extractos permitió valorar posibles problemas de seguridad a la hora de aplicarlos en humanos.

La citotoxicidad de los extractos se determinó mediante el test mitocondrial del MTT (Bromuro azul de tetrazolio de Thiazolyl, Sigma-Aldrich Co., EE.UU.) basado en el método desarrollado por Denizot y Lang (Denizot y Lang 1986). Este ensayo se basa en la reducción de una sal de tetrazolio (MTT), soluble y de color amarillo, a un formazán insoluble y de color azul. En el interior de la célula, esta reducción la realiza la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa. La cantidad de células viables es proporcional a la cantidad de formazán producido. Los ensayos de citotoxicidad se llevaron a cabo con las células 3T3-L1 en paralelo a los ensayos de funcionalidad biológica (inhibición de adipogénesis e inducción de lipólisis) y determinada por triplicado, seleccionando como control negativo cultivos celulares no incubados con ninguna muestra. La citotoxicidad de cada muestra se expresó como el porcentaje de viabilidad que se obtiene mediante la siguiente fórmula (Figura 3.9):

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{DO células con extracto}}{\text{DO células control}} \times 100$$

Figura 3.9. Fórmula para el cálculo de viabilidad en el ensayo de citotoxicidad.

Para llevar a cabo el ensayo se preparó una solución madre de MTT a una concentración de 5 mg/mL en PBS que se esterilizó utilizando un filtro de 0,2 μm (Minisart, Sartorius) y se conservó a 4°C. Para el ensayo, se diluyó en el medio de cultivo en una proporción de 1 mL de MTT por cada 10 mL de medio y este medio de cultivo se añadió a los cultivos celulares, incubando a continuación a 37°C durante 3-4 h. En el caso de los ensayos de inhibición de adipogénesis, la adición del reactivo MTT se llevó a cabo después de la tinción con Rojo Nilo y la medida de grasa intracelular. En ensayos previos, pudimos comprobar que dicha tinción no afecta a la viabilidad de los cultivos en nuestras condiciones de ensayo. En el caso de los ensayos de inducción de lipólisis, la medida de la viabilidad de los cultivos se realizó inmediatamente después de tomar la muestra de sobrenadante para la cuantificación de glicerol extracelular. Una vez formados los depósitos intracelulares de formazán, se eliminó el medio de cultivo y se lavó 1 vez con PBS. Por último, se disolvieron dichos depósitos y extrajeron del interior de las células añadiendo una solución de desteñido (100 mL de 2-propanol más 45 μL de HCl 36%R y 0,1 mL de Triton X-100 (Sigma-Aldrich Co.)). Tras agitar las placas de ensayo durante 10-15 min a temperatura, la solución de desteñido se trasvasó a placas de ensayo limpias para medir absorbancia a 595 nm (y referencia a 630 nm) en un espectrofotómetro de placas (Microplate Reader 550, Bio-Rad Laboratories Inc., EE.UU.).

3.2.4. Ensayos para cuantificar la expresión génica

Extracción de ARN

Todos los reactivos y materiales utilizados para la extracción y manipulación de ARN fueron adquiridos libres de enzimas nucleasas o fueron tratados para eliminar la presencia de esta actividad. Las soluciones acuosas empleadas se trataron con dietilpircarbonato (DEPC) a una concentración de 0,01 % (v/v) en agitación durante al menos 2-3 h, esterilizando en autoclave posteriormente para degradar el DEPC. El material de plástico y vidrio se trató durante 20 minutos con peróxido de hidrógeno al 3 % (v/v) y posteriormente se enjuagó con agua libre de ARNasas. La

disolución final del ARN y los tratamientos subsiguientes se realizaron con agua libre de ARNasas no tratada con DEPC y adquirida a 5Prime GmbH (Alemania).

- Extracción de ARN a partir de cultivos celulares.

La extracción de ARN total a partir de cultivos celulares se realizó mediante un protocolo basado en la utilización de tiocianato de guanidina, fenol y cloroformo (Chomczynski y Sacchi 2006). Esta extracción se hizo a partir de células 3T3-L1 cultivadas en placas de 24 pocillos (Nunc) incubadas en presencia de las muestras de extractos en las mismas condiciones descritas para los ensayos de inhibición de adipogénesis (Apartado 3.2.2, Cuantificación de inhibición de adipogénesis) e inducción de lipólisis (Apartado 3.2.2, Cuantificación de inducción de lipólisis).

Para recoger las células de las placas de cultivo se retiró el medio de cultivo y se añadieron 200 μ L de una solución de tripsina-EDTA 0,25% (p/v) incubándose durante 5 min a 37°C. Una vez despegadas las células se recogieron en tubos de 1,5 mL (Eppendorf, Alemania), se centrifugaron a 1.500 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante fue descartado. El *pellet* de células formado se suspendió en 1 mL de una solución de tiocianato de guanidina, fenol y cloroformo (TRIzol[®], Invitrogen, EE.UU.) para iniciar el proceso de extracción.

La suspensión de células en TRIzol[®] puede ser o bien congelada a -80°C hasta su procesamiento o utilizada directamente para realizar el protocolo de extracción descrito a continuación:

- Adición de 200 μ L de cloroformo. Agitación vigorosa con vortex y reposo a temperatura ambiente durante dos min. Centrifugación a 12000 g a 4°C durante 15 min.
- Recogida de la fase acuosa en un nuevo tubo de 1,5 mL y adición de 250 μ L de trizol y 50 μ L de cloroformo. Agitación con vortex y reposo a temperatura ambiente durante dos min. Centrifugación de 12000 g a 4°C durante 15 min.
- Repetición del paso anterior, para asegurarse de eliminar completamente la grasa contenida en los adipocitos.

- Precipitación del ARN añadiendo 750 μ L de isopropanol. Incubación durante 10 min a temperatura ambiente. Centrifugación a 12000 g y 4°C durante 10 min.
- Eliminación del sobrenadante y lavado del ARN con 1 mL de etanol al 70% (v/v) en agua-DEPC. Agitación y centrifugación a 7500 g y 4°C durante 5 min.
- Retirada del etanol y repetición del lavado en las mismas condiciones.
- Retirada del etanol y secado del *pellet* a temperatura ambiente.
- Disolución del *pellet* en 30 μ L de agua libre de ARNasas.
Una vez disuelto, el ARN se almacenó a -80°C.

- Extracción de ARN a partir del tejido adiposo de rata.

La extracción de ARN a partir del tejido adiposo de las ratas, el cual se conservó en nitrógeno líquido una vez obtenida la muestra del animal y posteriormente se mantuvo almacenado a -80°C, se hizo utilizando el kit RNeasy Lipid Tissue Mini (QIAGEN, Alemania), incluyendo un tratamiento con DNasa en el proceso de purificación (RNase-free DNase Set de QIAGEN, Alemania).

El protocolo que se siguió fue el recomendado por el fabricante, con una modificación en el método de preparación del tejido. Esta modificación consistió en una homogenización previa de 100 mg de grasa subcutánea en 1 mL de QIAzol Lysis Reagent (QIAGEN, Alemania) con cinco esferas de vidrio en el homogenizador FastPrep-24 (MP Biomedicals LCC, Francia) durante 40 segundos y fuerza seis. Las esferas de vidrio utilizadas fueron previamente lavadas con ácido para eliminar restos de materia orgánica (incubación en HCl 5,8 M durante una hora y lavados extensivos con agua ultra filtrada) y tratadas con DEPC para inactivar las posibles ARNasas presentes. Una vez homogeneizado el tejido, el protocolo de extracción continuó de la siguiente forma:

- Adición de 200 μ L de cloroformo. Agitación vigorosa con vortex y reposo a temperatura ambiente durante dos min. Centrifugación a 12000 g a 4°C durante 15 min.
- Recogida de la fase acuosa en un nuevo tubo de 1,5 mL y adición de 250 μ L de QIAzol Lysis Reagent y 50 μ L de cloroformo. Agitación con vortex y reposo a

- temperatura ambiente durante dos min. Centrifugación de 12000 g a 4°C durante 15 min.
- Repetición del paso anterior con 200 µL de QIAzol Lysis Reagent y 40 µL de cloroformo, para asegurarse de eliminar completamente la grasa contenida en los adipocitos.
 - Adición de 800 µL de etanol al 70% (v/v) y transferencia de la muestra a una columna RNeasy de 2 mL. Centrifugación a 8000 g durante 15 s.
 - Adición de 350 µL de tampón RW1. Centrifugación a 8000 g durante 15 s.
 - Tratamiento con 80 µL de DNasa. Incubación a temperatura ambiente durante 15 min.
 - Adición de 350 µL de tampón RW1. Centrifugación a 8000 g durante 15 s.
 - Adición de 500 µL de tampón RPE. Centrifugación a 8000 g durante 15 s.
 - Adición de 500 µL de tampón RPE. Centrifugación a 8000 g durante dos min.
 - Sobre un nuevo tubo de 1,5 mL, lavado de la columna con 30 µL de agua libre de ARNasas. Centrifugación a 8000 g durante 1 min.

Una vez obtenido, el ARN se almacenó a -80°C.

Análisis cuantitativo y cualitativo del ARN

Un paso crítico para el análisis de expresión génica mediante PCR a tiempo real es la calidad de las muestras de ARN. Durante el proceso de extracción puede purificarse al mismo tiempo ADN genómico, o durante el almacenamiento de las muestras de células o tejido, el ARN puede degradarse haciéndolo inservible para estudios de expresión. Existen varios procedimientos que aportan información sobre la calidad y cantidad del ARN. En nuestros ensayos hemos utilizado tres técnicas: electroforesis en geles de agarosa, electroforesis capilar y espectroscopía UV.

- Electroforesis en geles de agarosa.

Mediante esta técnica comprobamos la presencia de ADN genómico, que se revela como una banda electroforética de peso molecular aparente superior a 25-30 kb, así como la concentración y eventual degradación de la muestra de ARN. Para resolver las muestras de ARN total utilizamos geles de agarosa (Agarose D-1 low

EEO Pronadisa, Laboratorios Conda, España) al 1% en tampón TAE 1X (Eppendorf, Alemania). Como marcador de peso molecular en la electroforesis se utilizó ADN del fago Lambda digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII* (Promega, EE.UU.). La electroforesis se llevó a cabo con 4 uL de muestras, agua-DEPC y tampón de carga (6x Loading Dye Solution, Fermentas GmbH, Alemania) en equipos Mini-SubCell GT (Bio-Rad, EE.UU.) tiñendo posteriormente los ácidos nucleicos con bromuro de etidio (Bio-Rad, EE.UU.). La visualización de las bandas electroforéticas bajo luz UV, así como su cuantificación por densitometría se realizó en un equipo *Gene Genius Gel Imaging System* (Syngene, Reino Unido). El software de este equipo nos permitió realizar un análisis preliminar de la concentración de ARN (integrando la intensidad de las bandas electroforéticas correspondientes a los ARN ribosómicos 18S y 28 S) y de su integridad (comprobando la presencia o ausencia de rastros o *smears* cercanos a las bandas de los ARN ribosómicos).

- Electroforesis capilar.

Esta técnica nos permitió realizar un análisis cuantitativo y cualitativo más preciso que la electroforesis en geles de agarosa y se empleó una vez que confirmamos, mediante esta última técnica, que el proceso de extracción de ARN había tenido éxito. Empleamos el kit RNA 6000 Nano y un equipo Bioanalyzer 2100, ambos fabricados por Agilent Technologies (EE.UU.) para teñir fluorescentemente el ARN, resolverlo electroforéticamente y analizar los resultados, siempre siguiendo las instrucciones del fabricante.

El software de análisis, además de mostrar los resultados de intensidad y migración relativa de cada fragmento de ARN, en forma de gel o de electroferograma, puede calcular la concentración total de ARN de una muestra, integrando cada una de las bandas electroforéticas. Además, puede determinar un índice de integridad del ARN (RIN, *RNA integrity number*) utilizado y aceptado en la comunidad científica para determinar la calidad y utilidad de muestras de ARN para ciertas aplicaciones (Schroeder y col. 2006).

- Espectrofotometría UV.

Esta técnica, basada en la capacidad que muestran los ácidos nucleicos de absorber luz en el rango de longitudes de onda UV, permite hacer una estimación de la concentración de ARN así como determinar la presencia de materia contaminante en una muestra.

El índice de pureza de una preparación de ARN se determina midiendo a unas longitudes de onda de 260 nm y 280 nm, debido a que sus bases nitrogenadas absorben a 260 nm y las proteínas absorben a 280 nm. La relación entre ambas medidas ($A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$) indica el índice de pureza el cual puede alcanzar un valor máximo de 2,0. De esta forma, los valores comprendidos entre 1,8 y 2,0 indican que el ARN analizado se encuentra libre de contaminaciones y los valores por debajo de 1,8 indican contaminaciones del ARN con restos de proteínas o fenol. Por otro lado, la concentración de ARN se determina a partir de la siguiente relación:

$$1 \text{ unidad } A_{260\text{nm}} \text{ de ARN hebra sencilla} = 40 \mu\text{g/mL}$$

En nuestros ensayos, utilizamos alícuotas de 2 uL de ARN para determinar su concentración y presencia de contaminaciones en un equipo NanoVue Plus (GE Healthcare, EE.UU.), empleando los valores de concentración obtenidos mediante esta técnica para diseñar los siguientes experimentos realizados con las muestras de ARN total.

Retrotranscripción

Previamente a la síntesis de ADNc, las muestras de ARN seleccionadas para los procesos de retrotranscripción fueron objeto de un análisis para confirmar la no presencia de ADN genómico. Para ello, realizamos un ensayo de amplificación mediante PCR a tiempo real empleando *primers* específicos para el gen de la β -actina de rata (Tabla 3-4) y una mezcla de reacción que contenía el fluoróforo SYBR® Green (Brilliant SYBR® Green QPCR Master Mix, Agilent Technologies, EE.UU.) o *primers* y sonda TaqMan específicos para el gen de la β -actina de ratón (Tabla 3-2) y el kit de PCR HotMaster Taq Polymerase (5 Prime, GmbH, Alemania). Como molde, se empleó 1 uL de cada una de las muestras de ARN. Una vez realizado el ensayo de

amplificación, en las condiciones especificadas a continuación (Apartado 3.2.4, Análisis cuantitativo y cualitativo del ARN) confirmamos la inexistencia de ADN genómico contaminante en todas las muestras en las que no se produjo amplificación del gen de la β -actina. Todas las muestras superaron este test y fueron aptas por tanto para los ensayos de retrotranscripción.

Para la síntesis de ADN complementario, necesario como molde para los siguientes ensayos de cuantificación mediante PCR, utilizamos entre 0,2 – 0,5 μ g de ARN total y el Kit AffinityScript QPCR ADNc (Agilent Technologies, EE.UU.), siguiendo el procedimiento indicado por el fabricante.

Para cada reacción de transcripción se preparó una mezcla que contenía:

- 10 μ L de master mix (2X).
- 2,55 μ L oligo(dT) *primer* (0,1 μ g/mL).
- 0,45 μ L *random primers* (0,1 μ g/mL).
- 1 μ L *affinityScript RT/RNase block enzyme mixture*.

En la reacción se utilizó una mezcla de oligo (dT) y *random primers* para aumentar el rendimiento de la reacción y tratar de obtener ADNc representativo de todos los transcritos presentes en la muestra de ARN. Los 14 μ L de mezcla se mezclaron con 6 μ L de muestra de ARN cuya concentración se ajustó (0,2 – 0,5 μ g) diluyendo con agua libre de RNAsas no tratada con DEPC. A continuación, se incubó durante 5 minutos a 25°C, 45 minutos a 42°C y finalmente 5 minutos a 95°C, en un termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf, Alemania). Las muestras de ADNc obtenidas se conservaron a -20°C hasta su utilización.

Análisis por PCR cuantitativa

El análisis de la expresión génica llevados a cabo en nuestros ensayos se realizaron partiendo de ADNc sintetizado a partir de ARN total aislado de cultivos celulares de la línea 3T3-L1 y de tejido adiposo graso de rata.

▪ Ensayos de cuantificación de la expresión génica en células 3T3-L1.

Los ensayos realizados con ADNc de la línea celular 3T3-L1 se llevaron a cabo utilizando *primers* y sondas TaqMan (Tabla 3-2) diseñados utilizando el software *Primer Express* (Applied Biosystems, Lifetechnologies Corporation, EE.UU.) y adquiridos a Eurofins MWG Operon (Alemania), para la cuantificación de los transcritos correspondientes a los genes PPAR γ y C/EBP α y del gen control de la β -actina, como parte de los ensayos llevados a cabo en la búsqueda de inhibidores de adipogénesis.

La mezcla de reacción estaba compuesta por:

- 2,5 μ L de tampón 10x con 15 mM MgCl₂ (HotMaster Taq Polymerase kit, 5 Prime, GmbH, Alemania).
- 0,5 μ L de mezcla de dNTPs 10 mM (Biotools B&M Labs S.A., España).
- 0,125 μ L de enzima Taq Polimerasa (5 U/uL, HotMaster Taq Polymerase kit, 5 Prime, GmbH, Alemania).
- 500 nM de cada oligonucleótido o cebador.
- 50 nM o 250 nM de sonda TaqMan (PPAR γ o C/EBP α y β -actina respectivamente).
- 1 μ L de molde de ADNc.

Tabla 3-2. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para el análisis de expresión génica por PCR cuantitativa.

Oligos	Gen	Nº acceso (EMBL Bank)	Tipo	Secuencia (5'-3')	Sitio de unión	Mod 5' ¹	Mod 3' ²
PPAR γ _F			Directo	CCATTCTGGCCACCAAC	109-126		
PPAR γ _R	PPARG (PPARG)	BAF80899	Reverso	AATGCGAGTGGTCTTCCATCA	155-175		
PPAR γ _sonda			Sonda	TCGGAATCAGCTCTGTGGACCTCTCC	128-153	FAM	BHQ1
CEBPa_F			Directo	TCTGCGAGCACGAGACGTC	164-182		
CEBPa_R	CEBPA (C/EBPa)	AAH51102	Reverso	AACTCGTCGTTGAAGGCGG	212-230		
CEBPa_sonda			Sonda	AGACATCAGCGCTACATCGACCCG	186-210	JOE	BHQ1
mACTB_s			Directo	GCTCTGGCTCCTAGACCCAT	955-974		
mACTB_as	ACTB (b-actina)	AAI38612	Reverso	GCCACCGATCCACACAGAGT	1010-1029		
mACTB_TM			Sonda	ATCAAGATCATTGCTCCTCCTGAGCGC	979-1005	ROX	BHQ2

¹ fluoróforo, ² quencher

La mezcla de reacción se completó con agua hasta alcanzar el volumen final de cada reacción que fue de 25 μ L y se incubó en un equipo Mx3005P de Agilent Technologies (EE.UU.) siguiendo el siguiente perfil térmico:

- Un ciclo: dos minutos a 95°C.
- 40 ciclos: 30 segundos a 95°C.
60 segundos a 60°C (leyendo fluorescencia al final del ciclo).

La cuantificación de la expresión génica en células 3T3-L1 de los genes ABHD5, FABP4, PNPLA2, LIPE, LEP, LPL, PLIN1 y de nuevo, el gen control ACTB, como parte de los ensayos llevados a cabo en la búsqueda de inductores de lipólisis, se llevó a cabo mediante un mecanismo de detección no específico utilizando como fluoróforo SYBR® Green I (Brilliant SYBR® Green QPCR Master Mix, Agilent Technologies, EE.UU.). Los oligonucleótidos utilizados como *primers*, adquiridos a Eurofins MWG Operon (Alemania), se recogen en la Tabla 3-3. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Mx3005P (Agilent Technologies, EE.UU.) y la secuencia de amplificación que se empleó fue:

- Un ciclo: 10 minutos a 95°C.
- 40 ciclos: 30 segundos a 95°C.
30 segundos a 55°C.
30 segundos a 72°C (leyendo fluorescencia al final del ciclo).
- Curva de disociación: 60 segundos a 95°C.
30 segundos a 55°C.
30 segundos a 95°C.

Tabla 3-3. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para el análisis de expresión génica por PCR cuantitativa mediante SYBR® Green I en muestras procedentes de células 3T3-L1.

Oligos	Gen	Nº acceso (EMBL Bank)	Tipo	Secuencias	Sitio de unión	Tam. de Amplicón
ACTB_F	B-actina	BC138614	Directo	ACA CCC CAG CCA TGT ACG TA	429-448	251 pb
ACTB_R			Reverso	GTC ACG CAC GAT TTC CCT C	661-679	
ABHD5_F	Abdh5	NM_026179	Directo	TGT GTC CCC TGC ACT TAC AA	138-157	302 pb
ABHD5_R			Reverso	CCA ACC TGA GGG CAC ATC T	421-439	
FABP4_F	aP2	NM_024406	Directo	TCA CCT GGA AGA CAG CTC CT	29-38	182 pb
FABP4_R			Reverso	AAT CCC CAT TTA CGC TGA TG	191-210	
PNPLA2_F	Atgl	NR_028142	Directo	GAG CCC CGG GGT GGA ACA AGA T	1707-1728	230 pb
PNPLA_R			Reverso	AAA AGG TGG TGG GCA GGA GTA AGG	1814-1936	
LIPE_F	Hsl	NM_010719	Directo	ATA GAC CCA GAG TTG CGT GG	778-797	326 pb
LIPE_R			Reverso	TCA GAT TTT GCC AGG CTG TT	1084-1103	
LEP_F	Leptina	NM_008493	Directo	CAC ACG CAG TCG GTA TCC G	139-157	63 pb
LEP_R			Reverso	GTG AAG CCC AGG AAT GAA G	183-201	
LPL_F	LPL	NM_008509	Directo	TCC AAG GAA GCC TTT GAG AA	877-896	188 pb
LPL_R			Reverso	CCA TCC TCA GTC CCA GAA AA	1045-1064	
PLIN1_F	Perilipin A	BC096685	Directo	TCT GTG TGC AAT GCC TAT GAG A	207-228	276 pb
PLIN1_R			Reverso	CCC CAG AAC CTT GTC AGA GG	463-482	

- Ensayos de cuantificación de la expresión génica en tejido adiposo de rata.

En este caso, la amplificación y cuantificación de la expresión génica se llevó a cabo en todos los casos utilizando como fluoróforo SYBR® Green I (Brilliant SYBR® Green QPCR Master Mix, Agilent Technologies, EE.UU.). Los genes estudiados fueron, excepto por genes PPARG y CEBPA, los mismos que los analizados en los estudios realizados con células 3T3-L1 de ratón. Debido a las diferencias en las secuencias nucleotídicas existentes entre ratón y rata, diseñamos y adquirimos (Eurofins MWG Operon, Alemania) nuevos oligonucleótidos para ser empleados como *primers* en nuestros ensayos Tabla 3-4.

Tabla 3-4. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para el análisis de expresión génica por PCR cuantitativa mediante SYBR® Green I en muestras procedentes de tejido adiposo de rata.

<i>Oligos</i>	<i>Gen</i>	<i>Nº acceso (EMBL Bank)</i>	<i>Tipo</i>	<i>Secuencias</i>	<i>Sitio de unión</i>	<i>Tam. de Amplicón</i>
ACTB_F	B-actina	NM_031144	Directo	ACA CCC CAG CCA TGT ACG TA	464-483	251 pb
ACTB_R			Reverso	GTC ACG CAC GAT TTC CCT C	696-714	
ABHD5_F	Abdh5	NM_212524	Directo	TGT GTC CCC TGC ACT TAC AA	179-198	302 pb
ABHD5_R			Reverso	CCA ACC TGA GGG CAC ATC T	461-479	
FABP4_F	aP2	NM_053365	Directo	CCA AGC CCA ACT TGA TCA TCA G	110-131	201 pb
FABP4_R			Reverso	TGG TCG ACT TTC CAT CCC ACT	290-310	
PNPLA2_F	Atgl	NM_001108509	Directo	CAC TTT AGC TCC AAG GAT GA	391-410	380 pb
PNPLA_R			Reverso	TGG TTC AGT AGG CCA TTC CT	751-770	
LIPE_F	Hsl	NM_012859	Directo	ATA GAC CCA GAG TTG CGT GG	1549-1568	326 pb
LIPE_R			Reverso	TCA GAT TTT GCC AGG CTG TT	1855-1874	
LEP_F	Leptina	NM_013076	Directo	CAC ACG CAG TCG GTA TCC G	139-157	63 pb
LEP_R			Reverso	GTG AAG CCC AGG AAT GAA G	183-201	
LPL_F	LPL	NM_012598	Directo	GAA AAT AAT GCC CTG GCT GA	2410-2429	454 pb
LPL_R			Reverso	GAA GGC TCC TCA CTT TGC AC	2844-2863	
PLIN1_F	Perilipin A	NM_013094	Directo	GAG GGG CTG ATC TGG CTT TG	524-543	102 pb
PLIN1_R			Reverso	GCA TCT TTT GCC GTC CTG AA	606-625	

Comprobación de la eficiencia de la amplificación en la PCR

La eficiencia de la amplificación en la qPCR de cada uno de los genes estudiado se comprobó mediante rectas de calibrado a partir de las muestras de ADNc obtenidas. De cada muestra se hicieron cinco diluciones seriadas y cada una de estas cinco diluciones se utilizó como molde en un experimento de amplificación mediante qPCR con cada una de las parejas de oligonucleótidos diseñados para nuestros ensayos de análisis de la expresión génica. El resultado de este ensayo permite establecer una correlación lineal entre el grado de dilución de la muestra (expresado como logaritmo en base 10) y los valores de ciclo umbral (Ct) obtenidos. Mediante este método para determinar la eficiencia de amplificación (existen otros métodos que emplean diferentes datos) dicho parámetro se calcula utilizando la pendiente de la recta obtenida y de la siguiente forma:

$$\text{Eficiencia} = 10^{(-1/\text{Pendiente})}$$

De esta forma, la eficiencia de la amplificación suele arrojar valores entre dos (máxima eficiencia teórica, en la que se dobla el producto de la amplificación en cada ciclo) y cero. También puede expresarse como porcentaje cuando el cálculo se realiza:

$$\text{Eficiencia} = (10^{(-1/\text{Pendiente})} - 1) \cdot 100$$

Expresión de los resultados de los estudios de expresión génica

El análisis de expresión génica se realizó a partir de los valores Ct (ciclo umbral) obtenidos en los ensayos de amplificación mediante PCR cuantitativa. Se empleó el método $\Delta\Delta\text{Ct}$ (Pfaffl 2001), el cual permite determinar valores de expresión relativa para un gen concreto en dos condiciones dadas (control y tratamiento), normalizando la expresión de dicho gen en cada una de las condiciones en relación a los valores de expresión de uno o varios genes control.

Previamente a los cálculos y análisis, se confirmó la validez del gen control seleccionado (ACTB, gen de la β -actina) comprobando que los valores Ct obtenidos en la amplificación de este gen a partir de ADNc en las muestras control y en las muestras tratadas, en todos los ensayos realizados, eran similares y no mostraban una variabilidad significativa.

Con los valores de Ct se aplicaron las siguientes fórmulas para el cálculo de expresión génica, en las que Ct_m representa el valor Ct de la muestra, Ct_c es el valor Ct del gen control (ACTB), ΔCt_m representa el valor ΔCt de cada muestra evaluada y ΔCt_{mc} es el valor ΔCt de la muestra seleccionada como calibrador:

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_m - \text{Ct}_c$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_m - \Delta\text{Ct}_{mc}$$

Una vez determinado el valor $\Delta\Delta\text{Ct}$, la expresión génica se calculó mediante la fórmula:

$$\text{Expresión relativa} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

Con objeto de normalizar los datos de expresión génica obtenidos y reducir la variabilidad inherente a este tipo de estudios y a los ensayos con muestras biológicas, se aplicaron distintas transformaciones a los valores de expresión génica, siguiendo el método descrito por (Willems y col. 2008). En la Tabla 3-5 se muestran ejemplos de los cálculos realizados a partir de tres experimentos independientes para obtener dichas transformaciones.

En un primer paso, los datos fueron tratados mediante una transformación logarítmica con la que se redujo la varianza de los valores derivada de la naturaleza exponencial de la curva de PCR cuantitativa.

Cuando los datos de expresión génica procedían de varios experimentos independientes y la transformación logarítmica no era suficiente para reducir la variabilidad, se aplicaron las siguientes transformaciones: en primer lugar se realizó un centrado de medias, dividiendo todos los valores de expresión obtenidos en un experimento por la media de los valores de expresión de cada experimento. A continuación, se realizó un “autoescalado”, dividiendo cada uno de los valores obtenidos por la desviación estándar de cada experimento y multiplicando el dato obtenido por la media de todas las desviaciones estándar de cada uno de los experimentos.

Tabla 3-5. Transformaciones empleadas para normalizar los datos de expresión génica.

<i>Paso 1. Transformación logarítmica</i>					
Exp ¹	Muestra ²	Expresión ³ \$	Cálculo ⁴		Expresión ³
1	C	A ₁	Log(A ₁)		A ₂
	T1	B ₁	Log(B ₁)		B ₂
	T2	C ₁	Log(C ₁)		C ₂
2	C	D ₁	Log(D ₁)		D ₂
	T1	E ₁	Log(E ₁)		E ₂
	T2	F ₁	Log(F ₁)		F ₂
3	C	G ₁	Log(G ₁)		G ₂
	T1	H ₁	Log(H ₁)		H ₂
	T2	I ₁	Log(I ₁)		I ₂
<i>Paso 2. Centrado de medias</i>					
Exp ¹	Muestra ²	Expresión ³	Cálculo ⁴		Expresión ³
1	C	A ₂	Media (A ₂ ,B ₂ ,C ₂)=X	A ₂ /X	A ₃
	T1	B ₂		B ₂ /X	B ₃
	T2	C ₂		C ₂ /X	C ₃
2	C	D ₂	Media (D ₂ ,E ₂ ,F ₂)=Y	D ₂ /Y	D ₃
	T1	E ₂		E ₂ /Y	E ₃
	T2	F ₂		F ₂ /Y	F ₃
3	C	G ₂	Media (G ₂ ,H ₂ ,I ₂)=Z	G ₂ /Z	G ₃
	T1	H ₂		H ₂ /Z	H ₃
	T2	I ₂		I ₂ /Z	I ₃
<i>Paso 3. Autoescalado</i>					
Exp ¹	Muestra ²	Expresión ³	Cálculo ⁴		Expresión ³
1	C	A ₃	SD(A ₃ ,B ₃ ,C ₃)= α	A ₃ ·δ/α	A ₄
	T1	B ₃		B ₃ ·δ/α	B ₄
	T2	C ₃		C ₃ ·δ/α	C ₄
2	C	D ₃	SD(D ₃ ,E ₃ ,F ₃)= β	D ₃ ·δ/β	D ₄
	T1	E ₃		E ₃ ·δ/β	E ₄
	T2	F ₃		F ₃ ·δ/β	F ₄
3	C	G ₃	SD(G ₃ ,H ₃ ,I ₃)= γ	G ₃ ·δ/γ	G ₄
	T1	H ₃		H ₃ ·δ/γ	H ₄
	T2	I ₃		I ₃ ·δ/γ	I ₄
SD(α,β,γ)=δ					
<i>Expresión final de cada tratamiento</i>					
Control = Media (A ₄ ,D ₄ ,G ₄)					
Tratamiento 1 = Media (B ₄ ,E ₄ ,H ₄)					
Tratamiento 2 = Media (C ₄ ,F ₄ ,I ₄)					

¹Experimentos. ²Condiciones del ensayo: (C) control y (T) tratamiento. ³Valores de expresión relativa en forma de factor de incremento o disminución de la expresión respecto a una de las condiciones ensayadas. ⁴Valores iniciales de expresión obtenidos mediante el método $\Delta\Delta Ct$. ⁴Cálculos realizados.

Determinación de la concentración de AMPc celular mediante ELISA

La determinación de la concentración de AMPc (adenosina 3',5'-monofosfato cíclico) se hizo mediante el kit *Cyclic AMP competitive ELISA* (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) de Thermo Scientific Corporation (EE.UU.) siguiendo el protocolo determinado por el fabricante. El ensayo se basa en la competición que existe entre el AMPc presente en las muestras y el AMPc conjugado con la enzima fosfatasa alcalina (AMPc-AP). Los dos antígenos compiten por una cantidad limitada de anticuerpo monoclonal frente a AMPc ligado a una placa de ensayo. Según aumenta la concentración de AMPc en las muestras, disminuye la cantidad de AMPc-AP capturado por el anticuerpo ligado a la placa generando un precipitado de color azul al actuar sobre sustrato p-NPP (p-nitrofenil fosfato). De esta forma, existe una relación inversa entre la densidad óptica y la cantidad de AMPc en la muestra.

Después de una incubación de 24 horas con el extracto, se retiró el medio de los pocillos. Para cuantificar la concentración intracelular de AMPc en células 3T3-L1, los cultivos se lavaron con PBS para eliminar los restos de medio de cultivo y se lisaron con 500 μ L de HCl 0,1 M durante 20 minutos. A continuación, se centrifugaron a 600 g durante 10 minutos a temperatura ambiente y el sobrenadante obtenido tras la centrifugación se utilizó para la detección de AMPc.

El protocolo seguido fue el recomendado por el fabricante y se detalla a continuación:

- Adición de 50 μ L del agente neutralizante a cada pocillo, exceptuando los pocillos designados como blanco y controles de máxima actividad enzimática.
- Adición de 100 μ L de HCl 0,1 M en los pocillos designados como controles de la máxima unión de AMPc-AP y 100 μ L de muestras y patrones.
- Adición de 50 μ L de AMPc-AP conjugado a cada pocillo, exceptuando los pocillos designados como blanco y controles de máxima actividad enzimática.
- Adición de 50 μ L de anticuerpo AMPc a cada pocillo, exceptuando los pocillos designados como blanco y controles de máxima actividad enzimática.
- Incubación a temperatura ambiente en agitación durante 2 horas.

- Vaciado de los pocillos y 3 lavados de los mismos con 200 μ L de tampón de lavado.
- Adición de 5 μ L de AMPc-AP conjugado a los controles de máxima actividad enzimática.
- Adición de 200 μ L del sustrato p-NNN a cada pocillo. Incubación a temperatura ambiente durante 45 min sin agitación.
- Adición de 50 μ L de solución de parada. Lectura de la absorbancia en espectrofotómetro a 405 nm.

3.3. Modelos de experimentación *in vivo*

Los ensayos en animales de experimentación se llevaron a cabo en el estabulario de la Universidad de Granada y en colaboración con la Dra. Olga Martínez del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada. Los ensayos fueron aprobados por el comité ético de experimentación animal.

Los resultados presentados en esta memoria se obtuvieron de tres estudios realizados con animales: un estudio en el que se evaluó el efecto de extractos vegetales con capacidad de inhibir la enzima lipasa pancreática y dos estudios en los que analizamos extractos con capacidad de inducir en proceso de lipólisis en adipocitos 3T3-L1.

3.3.1. Animales y condiciones de mantenimiento de los mismos

Estudio de inhibidores de lipasa pancreática

Los animales utilizados para el experimento de inhibición de absorción de grasa fueron ratas Wistar machos de 12 semanas de edad y de unos 200 g de peso de media. Las ratas estuvieron en habitaciones con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas y separadas en jaulas individuales. Tras una semana de acondicionamiento a las instalaciones en la que los animales fueron alimentados con dieta de mantenimiento 2014 (Harlan Laboratories, EE.UU.) se inició el estudio consistente en la

administración de dieta de cafetería en la que se incluyeron las muestras de extractos vegetales a ensayar.

La duración de cada intervención fue de cuatro días, transcurridos los cuales los animales se alimentaron durante tres días con dieta de cafetería sin muestras de extractos. Las ratas tuvieron acceso libre a comida y agua durante todo el tiempo que duró el experimento.

Experimentos de inducción de lipolisis

Se utilizó un modelo de obesidad genética de rata Zucker, por ser el más utilizado en estudios de obesidad (MacKellar y col. 2010). Las ratas Zucker obesas son homocigotas para el alelo *fa*, lo que va a dar lugar a un receptor de la leptina no funcional y se caracterizan por desarrollar obesidad, hiperlipidemia, hiperinsulinemia e hiperleptinemia. La rata Zucker *fa/fa* presenta obesidad desde la quinta semana de edad y, a las 14 semanas de edad, su composición corporal consta de un 40% de lípidos. Por otro lado, las ratas heterocigotas, en las que el receptor de la leptina es funcional, son delgadas y presentan un perfil lipídico, insulínico y leptínico normal, lo que permite su utilización como control sano de este modelo.

Las ratas Zucker utilizadas en estos experimentos fueron machos obesas (*fa/fa*) de 12 semanas de edad y como grupo control se utilizaron ratas Zucker machos no obesas (*Fa/fa*). Las ratas estuvieron en habitaciones con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas. Tras una semana de acondicionamiento a las instalaciones se iniciaron los estudios, que tuvieron una duración de 10 semanas en el caso del primer experimento y 11 semanas en el caso del segundo, durante las cuales las ratas tuvieron acceso libre a comida y agua durante todo el tiempo que duró el experimento. Pasadas las semanas, se les retiró la comida y, tras 24 horas de ayuno, se sacrificaron.

3.3.2. Composición de las dietas empleadas

Estudio de inhibidores de lipasa pancreática: dieta de cafetería

La dieta de cafetería, de alto contenido calórico (en forma de grasa e hidratos de carbono) se preparó triturando todos los ingredientes en una mezcladora. Posteriormente esta dieta se amasó y se prepararon muestras en forma de albóndigas para dársela a los animales. La composición de la dieta y la concentración de los extractos vegetales estudiados, seleccionados como inhibidores de la enzima lipasa pancreática, se presentan en las Tabla 3-6 y Tabla 3-7 respectivamente.

Tabla 3-6. Composición de la dieta de cafetería.

	g/Kg dieta
Pienso 2014 (Harlan)	142,9
Paté	285,7
Galletas	142,9
Patatas fritas	142,9
Chocolate	142,9
Bacon	142,9

Tabla 3-7. Extractos añadidos a la dieta de cafetería.

	g/Kg dieta
Extracto de <i>Betula pendula</i>	5
Extracto de <i>Hamamelis virginiana</i>	30
Extracto de <i>Krameria trianda</i>	15
Extracto de <i>Tilia sp</i>	20
Extracto de <i>Vitis vinifera</i>	50
Orlistat	0,2

Estudios de inductores de lipolisis

La dieta con la que se alimentó a las ratas Zucker en los estudios de inducción de lipolisis estaba compuesta por la dieta de mantenimiento 2014 (Harlan Industries, EE.UU.) al que se le añadió cada uno de los extractos seleccionados. Para ello, se molieron 4 Kg de pienso y se añadió el extracto. A esta mezcla se le añadió 3 L de agua y se amasó para formar las tortas, las cuales se secaron mediante liofilización en un equipo Lioalfa-20 (Telstar, España) o en un horno de secado industrial a 50°C durante 2-3 días, hasta que los piensos mostraron una humedad del 5 %. En el caso de la dieta de los grupos control (sin extractos añadidos), se trituró el pienso y se le añadieron los 3 litros de agua completando el mismo procesamiento que fue seguido para los piensos con extracto.

3.3.3. Sacrificio de los animales y recogida de muestras

Estudio de inhibidores de lipasa pancreática

Durante el periodo de acondicionamiento y durante el ensayo, se recogieron muestras de heces de cada una de las ratas. Diariamente se determinó la ingesta alimentaria y se recogieron todas las heces excretadas por cada uno de los animales.

Estudios de inductores de lipolisis

Previo al sacrificio, los animales se mantuvieron durante 24 horas en ayunas, con acceso libre al agua. Transcurridas las 24 horas, se anestesiaron con éter etílico inhalado y se sacrificaron mediante exanguinación a partir de la arteria aorta descendente donde se procedió a la extracción de sangre, utilizando una jeringuilla previamente tratada con heparina. Las muestras de sangre se centrifugaron a 3.500 rpm durante 10 minutos y el plasma se guardó inmediatamente después en nitrógeno líquido. Posteriormente fue almacenado a -80°C hasta su utilización para la determinación de parámetros bioquímicos.

A continuación se extrajeron los distintos tipos de grasa (visceral del estómago, epididimal, retroperitoneal, mesentérica y subcutánea) y los distintos órganos

(corazón, hígado, riñón, bazo y colon), los cuales fueron lavados con PBS y, una vez pesados, se dividieron en fragmentos que se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Posteriormente se conservaron congelados a -80°C .

3.3.4. Parámetros analizados

Estudios de inhibidores de lipasa pancreática

1. Determinación de grasa en heces por gravimetría.

La determinación de grasa en heces se hizo mediante una extracción de grasa total de las heces basado en el método de Folch para la extracción de lípidos utilizando una mezcla de cloroformo y metanol (Folch y col. 1957).

La extracción se llevó a cabo pesando 1 gramo de heces en un tubo tarado y homogenizando la muestra en 2 mL de HCl 1 N. Una vez homogenizada la muestra, se añadieron 20 mL de una solución de cloroformo:metanol (2:1) y se mantuvo en agitación durante una hora. Pasada la hora, se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos y se recogió la fase inferior, filtrándola posteriormente con un filtro PTFE de $0,2\ \mu\text{m}$ y se dejó secando a 50°C y vacío (SPD2010 Speedvac System, ThermoSavant) durante toda la noche. La cantidad de grasa obtenida se calculó por gravimetría, pesando el tubo una vez evaporado el disolvente y restándole la tara del tubo vacío.

Estudios de inductores de lipolisis

En los experimentos animales con ratas Zucker se determinaron parámetros nutricionales, morfológicos y bioquímicos.

1. Determinación de parámetros nutricionales.

Se pesó la cantidad de comida ingerida por los animales cada tres o cuatro días. Los resultados de la ingesta se expresan como la media aritmética \pm error estándar

de la media (SEM) del número de muestras (n) en cada caso (SEM = desviación estándar/raíz (n)).

2. Determinación de parámetros morfológicos.

Se pesaron los animales el día de inicio del estudio, cada semana para medir el incremento de peso hasta el día de su sacrificio. Además, se pesaron los órganos extraídos (bazo, colon, corazón, hígado y riñón) y cada tipo de grasa extraída (epididimal, mesentérica, retroperitoneal, subcutánea y visceral de estómago).

Los resultados que muestran los datos de peso se expresan como la media aritmética \pm error estándar de la media (SEM) del número de muestras (n) en cada caso. El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante un ANOVA, en el que una $P < 0,05$ se consideró una diferencia significativa estadísticamente. Para llevar a cabo este análisis se utilizó el programa estadístico STATGRAPHICS Plus 5.1, con el que además se realizó el test Wilcoxon, donde $P < 0,05$ se consideró diferencia significativa estadísticamente.

▪ Determinación del contenido lipídico en hígado.

La extracción de lípidos totales se llevó a cabo mediante el método de Bligh y Dyer (Bligh y Dyer 1959). Los pasos seguidos para este procedimiento se detallan a continuación:

- Se pesaron 250 mg de tejido hepático al que se le añadieron 0,75 mL de una solución cloroformo:metanol (1:2).
- Agitación de la muestra durante 15 minutos y se les añadieron 250 μ L de cloroformo y 250 μ L de agua destilada.
- Centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos para separar las fases acuosa y orgánica. Se transfirió la fase inferior orgánica a otro tubo de 1,5 mL y se lavó la fase superior acuosa con 375 μ L de cloroformo.
- Agitación de la mezcla compuesta por la fase acuosa y el cloroformo y centrifugación de la misma a 3000 rpm durante 10 minutos. Se juntaron la

fase inferior recogida anteriormente con la nueva fase inferior obtenida en la nueva centrifugación.

- Evaporación de 100 μ L de cada muestra en un baño a 55°C y en atmósfera de nitrógeno, de forma que al final de la evaporación lo que quedaba en fondo del tubo de 1,5 mL era el extracto lipídico.
- Este extracto lipídico se disolvió en 50 μ L de isopropanol y de esta disolución se tomó una muestra para medir la concentración de triglicéridos mediante el Kit triglycerides-LQ (SPINREACT S.A., España), utilizado para medir los triglicéridos en plasma.

Los resultados obtenidos se expresan como porcentaje de variación con respecto al grupo control obeso. Las barras de error corresponden al error estándar relativo (RSE) escalado ($RSE = SEM / media$).

3. Determinación de parámetros bioquímicos.

La determinación de los parámetros bioquímicos se realizó siguiendo los procedimientos que se describen a continuación:

a) *Determinación de lípidos plasmáticos.*

a.1) *Determinación cuantitativa de triglicéridos.*

Para su determinación se utilizó el kit *Triglycerides-LQ* (SPINREACT S.A., España) siguiendo las instrucciones dadas por el fabricante. Este protocolo se basa en que los triglicéridos presentes en la muestra originan, según las reacciones acopladas descritas a continuación, un compuesto coloreado que se cuantifica por espectrofotometría a una longitud de onda de 505 nm. La intensidad de color del compuesto formado es proporcional a la concentración de triglicéridos presentes en la muestra ensayada.

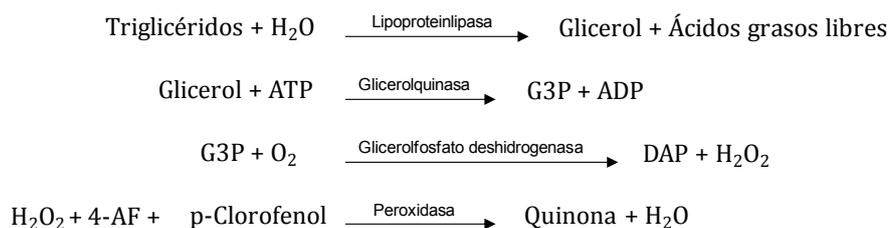


Figura 3.10. Esquema de las reacciones enzimáticas que tienen lugar en el ensayo de determinación de triglicéridos. ATP: adenosina trifosfato; G3P: glicerol 3 fosfato; ADP: adenosina difosfato; DAP: dihidroxiacetona fosfato; 4-AF: 4-aminoantipirina.

a.2) *Determinación cuantitativa de colesterol total.*

Para su determinación se utiliza el kit *Cholesterol-LQ* (SPINREACT S.A., España) siguiendo las instrucciones dadas por el fabricante. Este protocolo se basa en que a partir del colesterol presente en la muestra, mediante las reacciones acopladas descritas a continuación, se origina un complejo coloreado que se cuantifica por espectrofotometría a una longitud de onda de 505 nm. La intensidad de color del complejo formado es proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra ensayada.

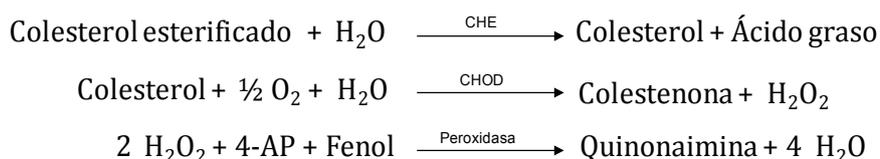


Figura 3.11. Esquema de las reacciones enzimáticas que tienen lugar en el ensayo de determinación del colesterol. 4-AF: 4-aminoantipirina; CHE: colesterol esterasa; CHOD: colesterol oxidasa.

a.3) *Determinación de colesterol-HDL.*

La determinación del colesterol-HDL se llevó a cabo utilizando el kit *Cholesterol HDL* (BioSystems, España) y siguiendo el protocolo suministrado por el fabricante. Este protocolo se basa en que las lipoproteínas VLDL y las LDL presentes en la muestra, precipitan en presencia de sales de fosfotungstato e iones magnesio y en el

sobrenadante quedan las lipoproteínas HDL, cuyo colesterol se cuantifica espectrofotométricamente a una longitud de onda de 500 nm mediante las reacciones descritas anteriormente (Figura 3.11).

a.4) *Determinación cuantitativa de ácidos grasos libres.*

Para su determinación se utilizó el *Kit NEFA-HR(2)* (Wako Diagnostics, EE. UU.) del que se siguieron las instrucciones adaptando los volúmenes de cada reactivo al volumen del pocillo de la placa. Este protocolo se basa en que los ácidos grasos no esterificados presentes en la muestra originan, según las reacciones acopladas descritas a continuación, un compuesto coloreado (*blue purple pigment*) que se cuantifica por espectrofotometría a una longitud de onda de 550 nm. La intensidad del compuesto formado es proporcional a la concentración de ácidos grasos no esterificados presentes en la muestra.

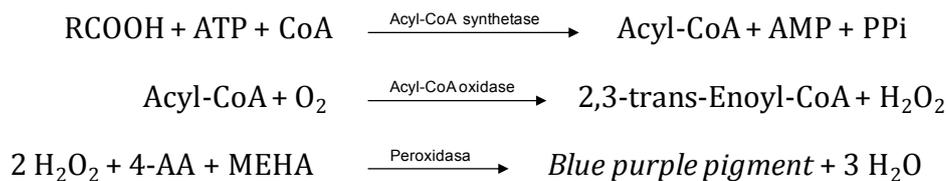


Figura 3.12. Esquema de las reacciones enzimáticas que tienen lugar en el ensayo de determinación ácidos grasos libres. ATP: adenosina trifosfato; CoA: Coenzima-A; AMP: adenosina monofosfato; PPi: pirofosfato; 4-AA:4-aminoantipirina; MEHA: 3-metil-N-etil-N-(β-hidroxi-etilo)-anilina.

b) *Determinación de parámetros plasmáticos relacionados con el metabolismo de la glucosa y la resistencia a la insulina.*

El grado de resistencia a la insulina se determinó aplicando el modelo matemático HOMA_{IR} (*Homeostasis Model Assesment*) el cual permite realizar estimaciones de resistencia insulínica mediante las concentraciones de glucosa e insulina plasmáticas en ayunas.

b.1) *Determinación cuantitativa de la glucosa.*

Para su determinación se utilizó el kit *Glucose-LQ* (SPINREACT S.A., España) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este protocolo se basa en que la glucosa presente en la muestra genera una quinona tras una serie de reacciones de óxido-reducción, la cual puede ser cuantificada espectroscópicamente midiendo absorbancia a una longitud de onda de 505 nm. La intensidad de color del compuesto formado es proporcional a la concentración de glucosa en la muestra ensayada.

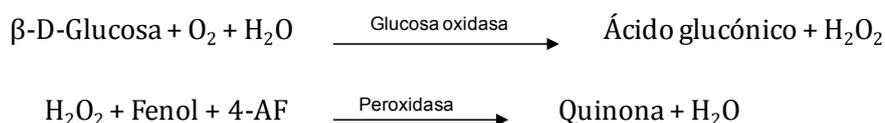


Figura 3.13. Esquema de las reacciones enzimáticas que tienen lugar en el ensayo de determinación de glucosa. 4-AF: 4-aminofenazona.

b.2) *Determinación cuantitativa de insulina.*

Para la determinación de la insulina se utilizó el *Rat Insulin Enzyme Immunoassay Kit* (SPI Bio, Bertin Pharma, Francia) y para su realización se siguieron las instrucciones del fabricante. Este kit consiste en la realización de un ELISA competitivo en el que la intensidad final del color formado, determinado en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 405 nm, es inversamente proporcional a la cantidad de insulina de rata libre que hay presente en cada pocillo.

b.3) *Determinación del índice HOMA.*

La determinación del índice HOMA se llevó a cabo mediante la fórmula (Matthews y col. 1985):

$$\text{HOMA} = \frac{\text{Insulina en ayunas } (\mu\text{U/mL}) * \text{glucosa plasmática en ayunas (mmol/L)}}{22,5}$$

Según este método, un elevado índice HOMA significa una baja sensibilidad a la insulina.

c) *Determinación de parámetros plasmáticos relacionados con la ingesta/saciedad.*

c.1) *Determinación cuantitativa de leptina.*

Para la determinación de la leptina se utilizó el *RayBio Rat Leptin ELISA Kit* (Ray Biotech. Inc, EE.UU.) y para su realización se siguieron las instrucciones del fabricante. Este kit consiste en la realización de un ELISA tipo *sandwich* en el que se utiliza un anticuerpo específico de leptina de rata, permitiendo la determinación de la concentración de leptina en plasma. El color final que se forma con la adición de la solución de parada fue determinado en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm.

3.4. Análisis estadístico

Los datos obtenidos de varios ensayos realizados en las mismas condiciones (réplicas) presentes en tablas y figuras provienen de la media aritmética calculada a partir de los valores de las réplicas realizadas. La dispersión de los datos se muestra como el intervalo de confianza ($\alpha=0,05$) o el error estándar de la media (SEM) en aquellos casos en los datos que se muestran valores absolutos.

Los resultados fueron tratados utilizando el programa estadístico STATGRAPHICS Plus 5.1 con el que se realizaron los distintos contrastes de hipótesis. Dependiendo de los datos y el tipo de experimento, llevamos a cabo análisis de varianza y test de Student, considerando en ambos casos una $P<0,05$ como diferencia significativa estadísticamente. Cuando las características de los datos obtenidos (en cuanto a número de observaciones y/o ajuste a normalidad) no fueron adecuadas para llevar a cabo un contraste paramétrico, empleamos el test Wilcoxon (comparación de medianas), tomando de nuevo $P<0,05$ como diferencia significativa estadísticamente.

Capítulo 4. Resultados

En este capítulo se exponen los resultados obtenidos en cada uno de los ensayos in vitro llevados a cabo durante la selección de extractos naturales con potencial actividad para el tratamiento y/o prevención de la obesidad. Además, se presentan los resultados obtenidos en los experimentos realizados con animales para la determinación del significado biológico de algunos de los extractos naturales seleccionados en los ensayos in vitro previos.

4.1. Creación de la librería de extractos

Se preparó una librería de extractos vegetales para buscar en ellos compuestos activos sobre la prevención y/o el tratamiento de la obesidad. Para la obtención de estos extractos se hicieron distintas extracciones, en agua, metanol y hexano, a partir de 340 muestras vegetales de los proveedores Amorós Nature S.L. (Gerona, España), Productos Plantarom S.L (Lérida, España) y Granadiet S.L. (Granada, España) (Tabla Anexo I).

Los extractos se obtuvieron mediante una extracción acelerada con disolventes (agua, metanol, hexano) en un equipo Dionex ASE200 a una presión de 1500 PSI y una temperatura de 80°C durante 10 minutos. Las condiciones de la extracción se determinaron después de comprobar experimentalmente que la máxima eficiencia de la extracción, medida en forma de residuo seco, se alcanzaba a los 10 minutos de residencia del solvente. La temperatura se seleccionó como un valor que permitiera mantener una adecuada eficiencia de extracción, estabilidad de los principios activos y fuera fácilmente implementable en un proceso industrial.

Cada extracto se obtuvo a partir de entre 1-5 gramos de muestra vegetal, de los que se obtuvieron entre 10-20 mL de extracto, dependiendo de la muestra. Los extractos acuosos y metanólicos se guardaron directamente a -20°C, mientras que los extractos obtenidos con hexano se evaporaron y posteriormente se resuspendieron en DMSO para su posterior almacenamiento a -20°C.

Como resultado de los procesos de extracción se obtuvo una colección de muestras formada por 987 extractos, de los cuales, 338 fueron extractos acuosos, 332 extractos metanólicos y 317 extractos obtenidos con hexano. Los extractos se catalogaron mediante un código formado por las letras EB (extracto Biosearch) seguido de un número de tres o cuatro dígitos.

Se cuantificó la cantidad de residuo seco únicamente en los extractos positivos en los distintos ensayos y que podían ser seleccionados para investigar su actividad en experimentos con animales. Este parámetro se determinó mediante la

evaporación de 5 mL de extracto, en un tubo tarado, en un concentrador Speed-vac (SPD121P, Savant). Finalizada la evaporación, se pesó la cantidad que quedaba de residuo seco y a esta cantidad se le restó la tara del tubo para saber la cantidad exacta de residuo seco (Tabla 4-1, Tabla 4-2 y Tabla 4-3). No se determinó el extracto seco de todos los extractos debido al elevado número de muestras y al tiempo que hubiese sido necesario para conseguir la evaporación de todos ellos. Además, la solubilización del residuo seco de algunos extractos es difícil, lo que introduciría más complejidad a los ensayos.

Tabla 4-1. Residuo seco de los extractos con capacidad inhibitoria de actividad lipasa.

Muestra vegetal	Solvente	% Residuo seco (p/v)
<i>Betula alba</i>	Metanol	3,25
<i>Betula pendula</i>	Agua	1,42
<i>Cupressus sempervirens</i>	Agua	1,42
<i>Hamamelis virginiana</i>	Agua	2,02
<i>Krameria trianda</i>	Agua	1,19
<i>Tilia sp</i>	Metanol	3,13
<i>Vitis vinifera</i>	Metanol	2,42

Tabla 4-2. Residuo seco de los extractos seleccionados en la búsqueda de inhibidores de actividad α -amilasa.

Muestra vegetal	Solvente	% Residuo seco (p/v)
<i>Helichysum italicum</i>	Metanol	2,25
<i>Helicrisum aeranium</i>	Metanol	1,94
<i>Citrus maxima</i>	Metanol	3,25
<i>Rhodiola rosea</i>	Metanol	0,95

Tabla 4-3. Residuo seco de los extractos seleccionados en la búsqueda de inductores de adipolisis.

Extracto	% Residuo seco (p/v)
EB1223	6,15
EB1267	1,48
EB1372	12,95
EB1223*	4,77
EB1267*	0,45

*Extractos preparados en planta piloto

Para facilitar el manejo de la colección de extractos, se ordenó en placas *deep well* de 96 pocillos, situando en cada placa un total de 30 extractos por triplicado y dejando seis pocillos vacíos que se corresponderían con los controles de cada experimento. Previa a la utilización de los extractos en cada experimento, se prepararon placas de 96 pocillos con las diluciones de los extractos determinadas para cada ensayo.

Una vez seleccionados los extractos que presentaron alguna actividad y dado que el objetivo final del estudio es la selección de extractos para el consumo humano, se obtuvieron extractos comerciales provenientes de las mismas especies vegetales para comprobar su actividad y poder disponer de productos aptos para el consumo humano.

4.2. Búsqueda de compuestos con potencial actividad sobre la obesidad

Para llevar a cabo la búsqueda de compuestos con actividad sobre la obesidad se diseñó una estrategia que contempla diversos factores o mecanismos implicados en la acumulación excesiva de grasa. Entre estos factores se encuentran el exceso de energía que se ingiere con la dieta, principalmente en forma de lípidos o de hidratos de carbono. Cuando esta ingesta sobrepasa las necesidades metabólicas inmediatas,

el exceso de energía no se utiliza y se almacena en su mayor parte en forma de triglicéridos en el tejido adiposo. Al reducir la cantidad de lípidos e hidratos de carbono provenientes de la dieta que absorbe el individuo, se reduce la cantidad de energía que puede terminar almacenándose en el tejido adiposo. Por esta razón, dos de los programas de búsqueda de compuestos activos para el tratamiento de la obesidad que llevamos a cabo se centraron en la búsqueda de inhibidores de las principales enzimas que actúan en la hidrólisis de lípidos y de hidratos de carbono, procesos indispensables para que estos nutrientes puedan ser absorbidos. Estas enzimas son la lipasa pancreática y la α -amilasa.

Por otro lado, el aumento del tejido adiposo se debe a un aumento del número de células precursoras diferenciadas a adipocitos (adipogénesis) y a la acumulación de grasa en el interior de las mismas mediante la síntesis de triglicéridos (lipogénesis). De esta forma, una reducción en el número de células que se diferencian a adipocitos y la reducción de la síntesis de triglicéridos, además de una inducción de la hidrólisis de los mismos (lipólisis) pueden ser estrategias acertadas para frenar el desarrollo de la obesidad, por lo que los otros dos programas de búsqueda de compuestos activos para el tratamiento de la obesidad se centraron en estos dos procesos.

4.2.1. Búsqueda de inhibidores de lipasa pancreática

La lipasa pancreática es una de las enzimas implicadas en la digestión de la grasa, catalizando la hidrólisis de los triglicéridos procedentes de la dieta, permitiendo de esta forma su absorción. La inhibición de la actividad de esta enzima daría como resultado una menor hidrólisis de la grasa ingerida en la dieta que no podría ser absorbida, reduciéndose de esta forma el aporte al organismo de lípidos susceptibles de acumularse en el tejido adiposo.

Con el objetivo de identificar extractos vegetales con potencial actividad inhibidora de la absorción de grasa, llevamos a cabo un ensayo enzimático en el que cuantificamos la actividad de la lipasa pancreática porcina, cuando se adiciona un extracto a la mezcla de reacción y determinando esta actividad por

espectrofotometría. En los ensayos se utilizó lipasa pancreática porcina que presenta una estructura y centro activo muy similar a la lipasa pancreática humana (Nolasco y col. 2006). Seleccionamos la enzima lipasa pancreática por ser responsable de entre un 50 – 70% de la hidrólisis de la grasa total que se ingiere en la dieta.

Puesta a punto del método *in vitro* para cuantificar la actividad lipasa

La determinación de la actividad inhibitoria de lipasa se llevó a cabo utilizando un kit de medida de actividad lipasa de Roche (Roche Diagnostics). Este kit basa su método en la hidrólisis de un substrato cromático específico para la lipasa, formando un producto intermedio inestable el cual, en solución alcalina, se descompone espontáneamente liberando un compuesto que absorbe a 595 nm, de forma que la actividad lipasa puede ser cuantificada espectroscópicamente.

Las condiciones del ensayo se determinaron mediante un experimento en el que se ensayaron varias concentraciones de enzima y distintos tiempos de incubación, para establecer las condiciones en las que el color obtenido tras la reacción respecto a la actividad del enzima, generaba una línea de correlación significativa (Figura 4.1).

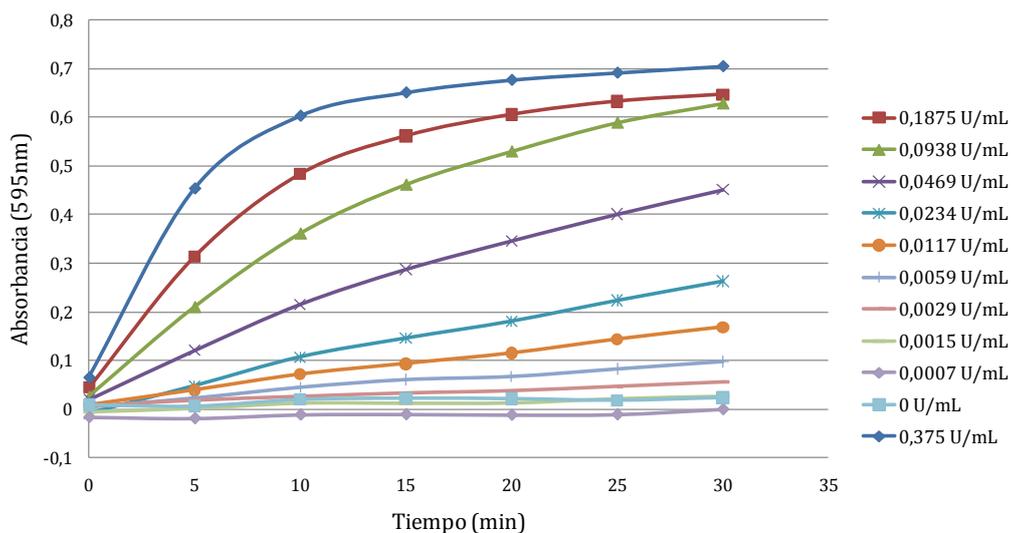


Figura 4.1. Actividad de la lipasa pancreática a distintos tiempos de incubación. En la figura se representa la actividad vs tiempo de distintas concentraciones de enzima.

A partir de estos resultados, seleccionamos la concentración de 0,05 U/mL y un tiempo de incubación de 15 minutos por ser los valores cuya representación frente a los valores de absorbancia, se ajustaba mejor a una recta (Figura 4.2A) y el incremento en absorbancia permitía detectar fenómenos de inhibición con suficiente sensibilidad (Figura 4.2B).

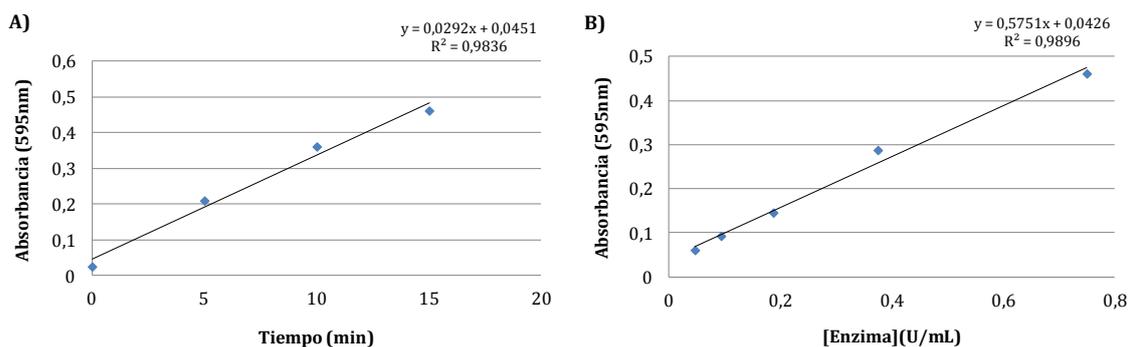


Figura 4.2. Representación de las rectas de absorbancia vs tiempo (A) y absorbancia vs concentración de enzima lipasa (B).

En todos los ensayos, se incluyó una recta de calibrado empleando las concentraciones de enzima reflejadas en la Figura 4.2B, de forma que pudimos calcular la actividad lipasa aparente en las reacciones en presencia de muestras y, a partir de estos valores, determinar el porcentaje de inhibición inducido por cada uno de los extractos. Como control positivo de inhibición de actividad lipasa utilizamos orlistat, un inhibidor comercial de lipasa pancreática. La comprobación del método se realizó con distintas concentraciones de orlistat, calculando además la CI50 del mismo, la cual resultó ser 0,18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 4.3). En los ensayos, empleamos una concentración de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, lo que induce una inhibición de la actividad por encima del 95%.

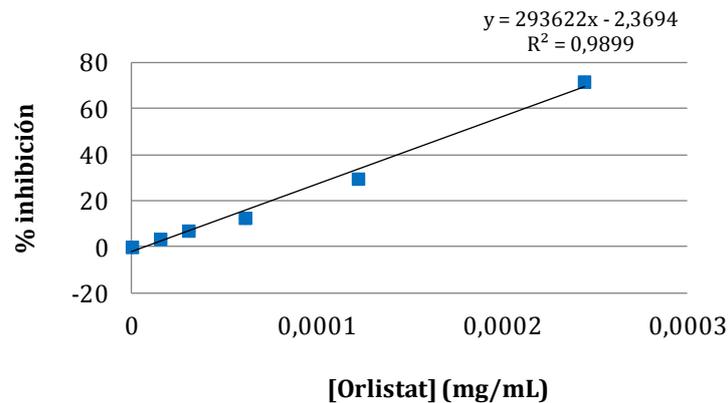


Figura 4.3. Inhibición de la lipasa pancreática por varias concentraciones de orlistat.

Evaluación de la actividad inhibidora de lipasa pancreática de extractos vegetales

La búsqueda de extractos inhibidores de actividad lipasa se llevó a cabo en placas de 96 pocillos de fondo plano siguiendo el protocolo descrito anteriormente y las concentraciones de enzima y control positivo determinadas previamente.

En el ensayo se analizaron por triplicado todos los extractos que formaban nuestra colección de muestras. Además, se incluyeron por triplicado un control positivo y controles negativos con los distintos disolventes en los que se encontraban los extractos. El cálculo del porcentaje de actividad inhibitoria se hizo interpolando los valores de absorbancia obtenidos sobre una recta de calibrado realizada con varias concentraciones de enzima.

Los resultados obtenidos en una primera ronda de análisis revelaron que 38 extractos parecían exhibir capacidad de inhibir la lipasa pancreática porcina. Estos resultados se confirmaron con un segundo análisis, en las mismas condiciones y con los mismos extractos. Analizados los resultados de ambos ensayos se seleccionaron diecisiete extractos que presentaron mayor capacidad inhibitoria de la actividad lipasa pancreática superior siempre al 60% de inhibición. Los resultados de la capacidad inhibitoria de dichos extractos presentada como la media del porcentaje de inhibición aparecen representados en la Figura 4.4 y como control positivo se

presenta el porcentaje de inhibición obtenido con el orlistat. En la gráfica se observa como siete de los extractos presentaron una capacidad de inhibición superior al 80%, por lo que seleccionamos estos extractos para los siguientes experimentos.

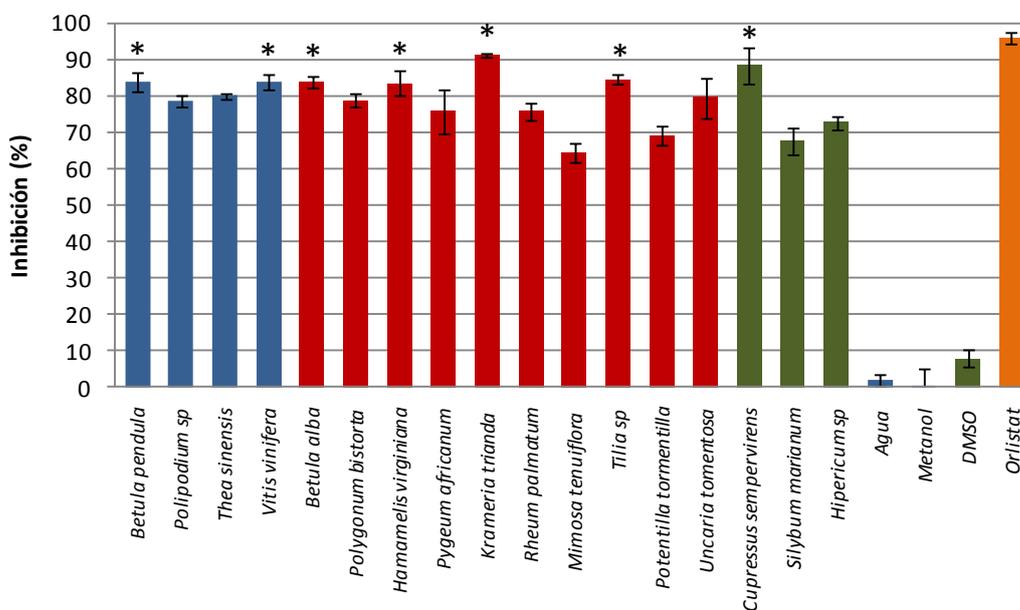


Figura 4.4. Actividad inhibitoria de lipasa pancreática de los extractos seleccionados a partir de los primeros ensayos de inhibición de lipasa, expresada ésta como media del porcentaje de inhibición. Intervalo de confianza ($\alpha=0,05$). ■ Extracto acuoso ■ Extracto metanólico ■ Extracto en hexano. *extractos con capacidad inhibitoria superior al 80%.

Actividad inhibidora de lipasa pancreática de los extractos obtenidos por infusión en planta piloto

A continuación, calculamos el residuo seco obtenido de cada uno de los extractos (Tabla 4-1) y, a partir de unas curvas dosis-respuesta, determinamos la concentración de extracto necesaria para inducir una inhibición de la actividad lipasa del 50% (CI50). Además, ensayamos la capacidad de inhibir la enzima lipasa pancreática que mostraron extractos comerciales fabricados a partir de las mismas especies vegetales. Los resultados de estos ensayos nos permitieron comprobar que los extractos comerciales exhibían la actividad detectada en nuestros experimentos. Las diferencias que obtuvimos en los valores de las CI50 entre los extractos comerciales y los obtenidos en el laboratorio pueden deberse a las diferencias en las condiciones de extracción y de secado utilizados en la preparación de cada tipo de

extracto (Tabla 4-4). Dado que los valores CI50 de los extractos comerciales fueron similares o mejores que los obtenidos con nuestra librería de muestras, decidimos emplear estos extractos para posteriores ensayos en animales, seleccionando los extractos de *Betula pendula* (abedul), *Hamamelis virginiana*, *Krameria triandra* (ratania), *Tilia sp.*, y *Vitis vinifera* (vid roja) por ser los más activos en el ensayo enzimático.

Tabla 4-4. Valores CI50 de los extractos positivos con actividad inhibitoria de lipasa pancreática.

Extracto	CI50 ($\mu\text{g/mL}$)	
	Colección muestras ¹	Comercial ²
<i>Betula alba</i>	1634 \pm 72	1250 \pm 47,9
<i>Betula pendula</i>	76 \pm 19	16,1 \pm 0,3
<i>Cupresses sempervirens</i>	1042 \pm 93	532,1 \pm 33,8
<i>Hamamelis virginiana</i>	988 \pm 11	45,5 \pm 2,5
<i>Krameria triandra</i>	206 \pm 13	22,0 \pm 0,8
<i>Tilia sp</i>	601 \pm 34	26,7 \pm 1,1
<i>Vitis vinifera</i>	904 \pm 12	72,1 \pm 3,7
Orlistat		0,18 \pm 0,01

CI50 e intervalo de confianza ($\alpha=0,05$) expresados en $\mu\text{g/mL}$. ¹Extractos obtenidos en el laboratorio. ²Extractos comerciales o preparados en la planta piloto utilizados en experimentación animal.

4.2.2. Búsqueda de inhibidores de α -amilasa

Los hidratos de carbono complejos ingeridos en la dieta deben ser degradados a moléculas más sencillas para poder ser absorbidos en el tubo digestivo. En la hidrólisis del almidón participan varias enzimas, entre ellas la enzima α -amilasa, la cual en humanos presenta dos isoformas: la amilasa salival y la amilasa pancreática. La inhibición de cualquiera de las isoformas de esta enzima conduciría a una disminución de la cantidad de hidratos de carbono absorbidos de la dieta y, por tanto, a una disminución del aporte calórico que nos proporcionan.

En la boca, la amilasa salival hidroliza sólo el 5% del almidón ingerido. Sin embargo, esta enzima forma parte del bolo alimenticio y mantiene su actividad durante el tránsito hasta el estómago, donde es inactivada debido al pH ácido, catalizando la hidrólisis de entre un 30-40% del almidón durante este trayecto. La amilasa pancreática secretada al intestino delgado es responsable de la mayor parte de la hidrólisis del almidón. A pesar de ser esta isoforma la responsable de la mayor parte de la hidrólisis del almidón, decidimos emplear la isoforma procedente de saliva humana en nuestros ensayos debido a que procede del mismo organismo para el cual estarían destinados los extractos con actividad inhibitoria. Existe α -amilasa pancreática humana disponible comercialmente, pero su excesivo coste hizo inviable utilizarla en nuestros experimentos. Como alternativa, decidimos confirmar la actividad de los extractos capaces de inhibir la enzima de saliva humana en ensayos empleando α -amilasa de páncreas porcino.

Puesta a punto del método *in vitro* para cuantificar la actividad α -amilasa

El método utilizado para medir la actividad α -amilasa se basó en la hidrólisis de un sustrato, la amilopectina, por acción de esta enzima, dando como resultado una mezcla de azúcares reductores, los cuales producen la reducción del ferricianuro, un compuesto cromóforo de color amarillo el cual, al reducirse, pierde su capacidad cromogénica siendo incoloro. De esta forma, la pérdida de color en la reacción es proporcional a la concentración de azúcares reductores formados y, por tanto, a la actividad de la enzima α -amilasa.

Las condiciones de reacción se determinaron mediante un ensayo en el que se comprobó cual era el valor máximo de concentración de enzima en la recta obtenida al representar absorbancia a 450 nm frente a actividad α -amilasa (Figura 4.5). A partir de estos resultados, seleccionamos la concentración de 1,2 U/mL como la más apropiada para nuestro ensayo, ya que cualquier incremento en los valores de absorbancia inducidos por los extractos podía ser fácilmente traducido en un descenso en la actividad enzimática.

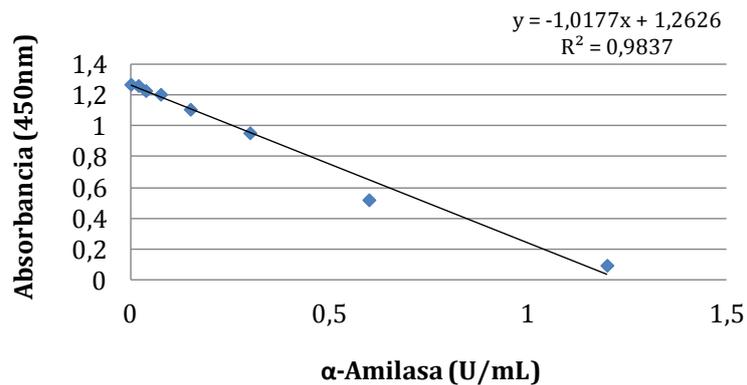


Figura 4.5. Recta de calibrado de actividad α -amilasa determinada mediante espectrofotometría.

Como control positivo, en todos los ensayos, además de la recta de calibrado realizada con varias concentraciones de enzima, se incluyó acarbosa (un inhibidor de amilasa de procedencia microbiano) a una concentración de 37,5 $\mu\text{g/mL}$, que provoca la inhibición de más del 75% de la actividad enzimática. Tal y como se procedió en el caso del ensayo con la lipasa pancreática, el grado de inhibición que indujo cada extracto se determinó calculando la actividad α -amilasa aparente interpolando los valores de absorbancia en la recta de calibrado mencionada.

La comprobación del funcionamiento del método se realizó previamente al análisis de la colección de extractos, ensayando distintas concentraciones de acarbosa (Figura 4.6), lo que nos permitió calcular además su CI_{50} que, bajo nuestras condiciones, resultó ser 8,86 $\mu\text{g/mL}$.

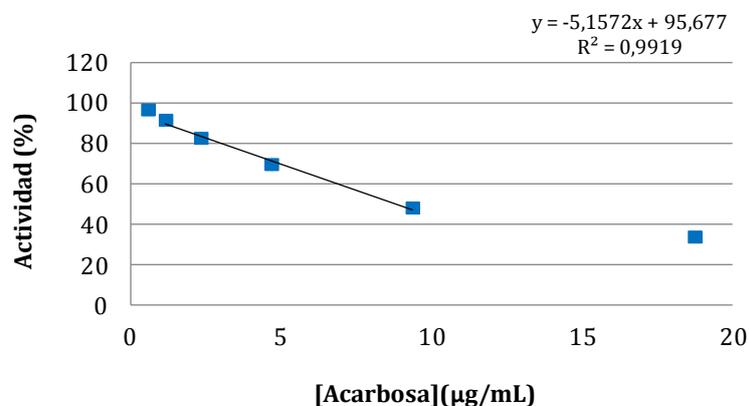


Figura 4.6. Inhibición de actividad α -amilasa a distintas concentraciones de acarbosa.

Evaluación de la actividad inhibidora de α -amilasa de extractos vegetales

Una vez establecidas las condiciones del ensayo para la búsqueda de extractos inhibidores de actividad α -amilasa, se determinó la capacidad inhibitoria de los extractos analizando cada uno de ellos por triplicado. Los resultados obtenidos con los extractos fueron comprobados en dos ensayos más con todos los extractos y en las mismas condiciones, tras los cuales el 87% de los extractos presentó una actividad inhibitoria inferior al 20%, un 12% de los extractos una actividad entre el 20-50% y sólo el 1% de los extractos una actividad superior al 50%. Analizados estos resultados se seleccionaron 10 extractos que mostraban una mayor actividad inhibitoria frente a la enzima α -amilasa con un porcentaje de inhibición superior a 50%. Estos 10 extractos fueron analizados de nuevo, y este análisis nos permitió descartar seis de los extractos como falsos positivos. Los valores de porcentaje de inhibición de los cuatro extractos metanólicos positivos seleccionados se muestran en la (Figura 4.7).

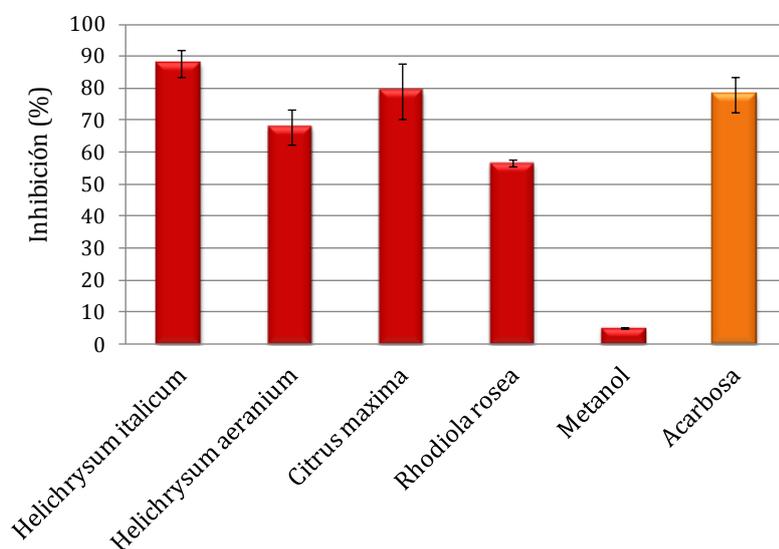


Figura 4.7. Actividad inhibitoria de α -amilasa de los extractos seleccionados a partir de los primeros ensayos de inhibición de α -amilasa, expresada ésta como media del porcentaje de inhibición. Intervalo de confianza ($\alpha=0,05$).

Se utilizaron muestras de los cuatro extractos seleccionados para calcular el residuo seco (Tabla 4-2) y, mediante ensayos de dosis-respuesta, determinar la CI50 de cada uno de ellos (Tabla 4-5). Al igual que en el caso de los extractos positivos en la búsqueda de inhibidores de la lipasa pancreática, obtuvimos extractos comerciales de tres de las especies identificadas: tres de ellos de *Helichrysum italicum* (Sol de Oro), uno de *Citrus maxima* (Pomelo) y uno de *Rhodiola rosea*. Estos extractos comerciales fueron empleados para realizar un nuevo ensayo de inhibición de α -amilasa en el que determinamos la presencia de la actividad inhibitoria así como la CI50 de cada uno de ellos (Tabla 4-5).

Tabla 4-5. Valores CI50 de los extractos positivos.

Extracto	CI50 ($\mu\text{g/mL}$)	
	Colección de muestras ¹	Comercial ²
<i>H. italicum</i>	168,7	475,76/845,6/1268,6 ³
<i>H. aernium</i>	155,5	-
<i>C. maxima</i>	234,5	314,55
<i>R. rosea</i>	12,5	121,15
Acarbosa	-	4,2

CI50 expresada en $\mu\text{g/mL}$. ¹Extractos obtenidos en el laboratorio. ²Extractos comerciales. ³Valores de CI50 obtenidos con los tres extractos comerciales distintos obtenidos de la misma especie vegetal.

Como se puede observar en la Tabla 4-5 y en la Figura 4.8 en la cual se comparan los CI50 de los extractos comerciales con los obtenidos con los extractos de nuestra colección, todos los extractos comerciales presentaban capacidad inhibitoria de actividad α -amilasa. Sin embargo, esta capacidad era menor a la presentada por los extractos empleados en nuestro programa de búsqueda. Esta disparidad puede deberse a las diferencias en los métodos de extracción y secado, y en el caso de los tres extractos de Sol de Oro, también pueden estar relacionados con las variaciones en la composición del extracto causadas por variabilidad de los lotes de la materia prima vegetal.

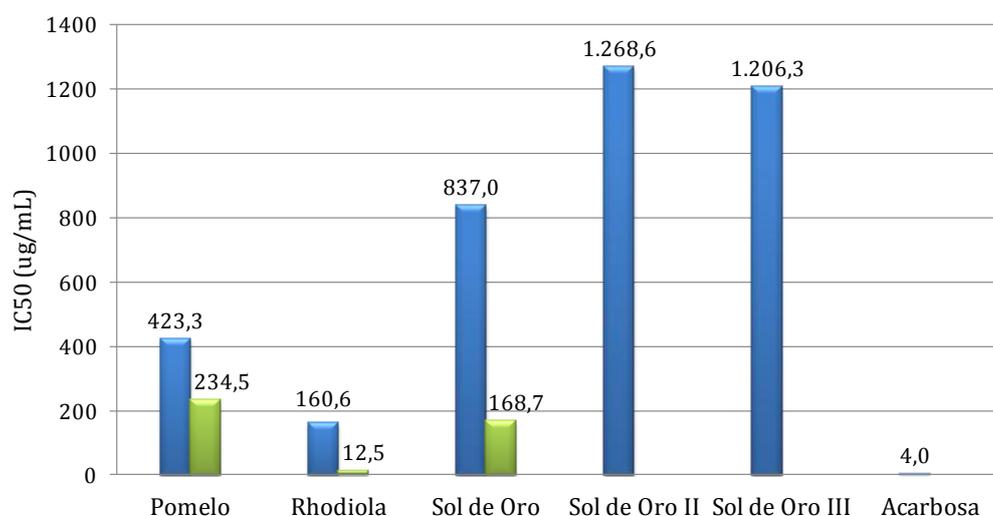


Figura 4.8. CI50 de los extractos comerciales, los extractos obtenidos en el Dionex200 y de la acarbosa. ■ Extracto comercial ■ Extracto obtenido en el Dionex200.

A pesar de que los valores de CI50 de los extractos comerciales fueron mayores de lo esperado, pudimos concluir nuestros ensayos destinados a buscar extractos inhibidores de la enzima α -amilasa con tres productos (Rhodiola, Pomelo y Sol de Oro) candidatos para el tratamiento de la obesidad a través de la inhibición de la absorción de hidratos de carbono procedentes del almidón.

Evaluación de la actividad inhibidora de los extractos sobre la α -amilasa pancreática

Como se ha comentado en el inicio del Apartado 1.6, en el ser humano existen dos isoformas de la enzima α -amilasa, la de saliva y la pancreática. Debido a que la fracción de almidón procedente de la dieta hidrolizado por la enzima pancreática es ligeramente superior a la hidrolizada por la enzima de saliva, se determinó la capacidad inhibitoria sobre la enzima pancreática de los tres extractos seleccionados.

Al comparar la actividad de la enzima α -amilasa de saliva humana y la α -amilasa pancreática porcina se observa que ambas enzimas exhiben un comportamiento similar al representar liberación de azúcares reductores procedentes de almidón (expresados como absorbancia a 450 nm) frente a concentración de enzima (Figura

4.9), comprobando que el método empleado hasta el momento era aplicable a la enzima pancreática.

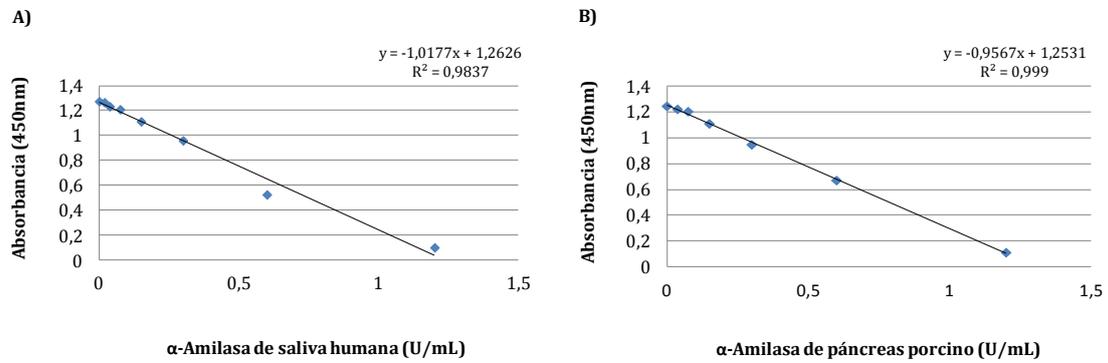


Figura 4.9. Comparación de la actividad α -amilasa de saliva humana (A) con la actividad α -amilasa de páncreas porcino.

Una vez comprobado que ambas enzimas presentaban una actividad similar en nuestro ensayo, cuantificamos el grado de inhibición que los extractos de Rhodiola, Pomelo y Sol de Oro inducían en la enzima pancreática. Los resultados obtenidos (Tabla 4-6) expresados como CI50 nos permitieron confirmar que los tres extractos exhibían actividad inhibitoria muy similar sobre las dos enzimas.

Tabla 4-6. Valores CI50 de los extractos comerciales y de la acarbosa frente a la actividad α -amilasa de saliva humana y α -amilasa pancreática porcina.

	CI50 ($\mu\text{g/mL}$)	
	α -Amilasa saliva humana	α -Amilasa pancreática porcina
Rhodiola	121,15	127,30
Pomelo	314,55	334,59
Sol de Oro	475,76	507,10
Acarbosa	8,86	18,18

4.2.3. Búsqueda de extractos inhibidores de la adipogénesis

La acumulación de energía en el tejido adiposo se lleva a cabo mediante la diferenciación de nuevas células adiposas (adipogénesis) y la síntesis (lipogénesis) y acumulación de triglicéridos que llevan a cabo en su interior dichas células. Durante el proceso de diferenciación, los adipocitos van adquiriendo la capacidad de sintetizar triglicéridos, los cuales se irán acumulando en su interior. Cuando este proceso de diferenciación se ve inhibido, los adipocitos disminuyen su capacidad de síntesis de triglicéridos y no llegan a acumular tanta grasa como ocurriría en el caso de una diferenciación completa.

De esta forma, una inhibición de la diferenciación de los adipocitos o de su capacidad de síntesis de triglicéridos, tendría como resultado una reducción de la cantidad de grasa acumulada en el tejido adiposo, provocando una menor ganancia de peso del individuo. Por esta razón, un extracto capaz de inhibir el crecimiento del tejido adiposo, a través de la inhibición de la diferenciación de adipocitos y/o a través de la inhibición de la lipogénesis, puede considerarse un buen candidato para posibles tratamientos frente a la obesidad.

La búsqueda de inhibidores de adipogénesis se llevó a cabo mediante ensayos en los que se utilizaron células 3T3-L1, preadipocitos de ratón con morfología similar a la de los fibroblastos, las cuales, tras un tratamiento con inductores adecuados, se diferencian a adipocitos maduros acumuladores de triglicéridos y de morfología redondeada. La línea celular 3T3-L1 pierde su capacidad de diferenciación a medida que las células acumulan ciclos de división celular. Este fenómeno pudo ser comprobado en nuestros experimentos, observándose que cultivos celulares con más de 10 procesos de subcultivo ("pases") permitían obtener menos del 50 % de las células diferenciadas correctamente. Por esta razón, nuestros ensayos se realizaron siempre con células con un número de pases no superior a ocho, con los que el grado de diferenciación fue siempre de al menos el 80%.

La visualización mediante microscopía visible de células 3T3-L1 diferenciadas permite observar las inclusiones de grasa intracelulares. Sin embargo, esta técnica no permite cuantificar dicha grasa intracelular. Para poder cuantificar el grado de

diferenciación de nuestros cultivos, en forma de porcentaje de grasa intracelular, decidimos ensayar los dos métodos más habituales en la bibliografía científica para la tinción y determinación de dicha grasa: la tinción con Oil Red O y la tinción con Rojo Nilo.

Los dos métodos ensayados nos permitieron cuantificar la grasa intracelular de cultivos de adipocitos 3T3-L1 mediante espectroscopia a 450 nm en el caso de la tinción con Oil Red O y mediante espectroscopia de fluorescencia (longitud de onda de excitación de 485 nm y longitud de onda de emisión de 535 nm) en el caso de la tinción con Rojo Nilo. Sin embargo, el último método es mucho más sencillo de realizar y permite, además, emplear los mismos cultivos para ensayos adicionales (de viabilidad celular, por ejemplo), ya que la tinción con Rojo Nilo no resulta tóxica para las células cultivadas. Por esta razón, este método fue el empleado en nuestros ensayos de búsqueda de compuestos inhibidores de la adipogénesis (Figura 4.10).

La cuantificación de la grasa intracelular en adipocitos 3T3-L1 se llevó a cabo de forma relativa, expresando este parámetro como porcentaje con respecto a cultivos control no expuestos a ningún agente inhibidor. Para validar este procedimiento, empleamos controles positivos en los que sometimos a los cultivos a la presencia de genisteína a una concentración de 100 μ M. Esta isoflavona de soja ha sido objeto de varios estudios que demuestran su efectividad en la inhibición de la diferenciación de adipocitos (Harmon y Harp 2001; Harmon y col. 2002; Park y col. 2009). Los resultados de varios experimentos realizados en nuestro laboratorio parecían indicar que este compuesto inducía, como media, una reducción del 20-30 % de la grasa intracelular de cultivos de células 3T3-L1, al estar presente en las primeras etapas (primeras 48 h) de inducción de la diferenciación.

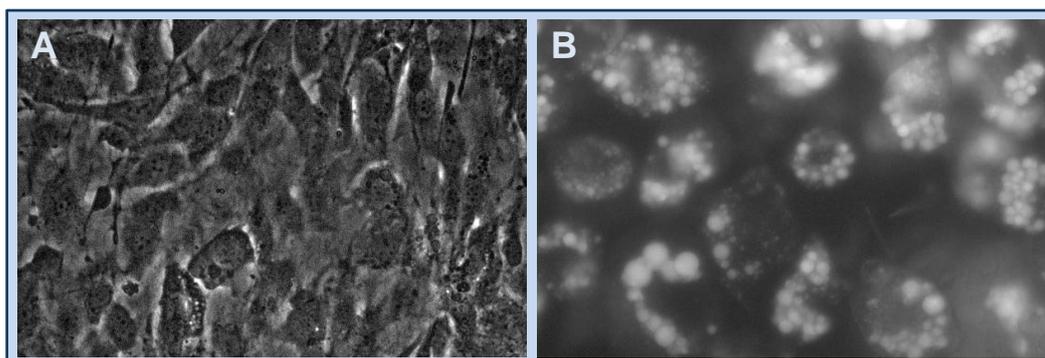


Figura 4.10. A. Células 3T3-L1 sin diferenciar. B. Células 3T3-L1 diferenciadas durante siete días y teñidas con rojo Nilo.

Una vez puesto a punto el método de diferenciación, se llevó a cabo la búsqueda de extractos vegetales inhibidores de la misma empleando nuestra colección de muestras. El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos, en las que se sembraron las células 3T3-L1 y, el día del inicio de la diferenciación, se adicionaron al medio de cultivo los extractos. Todas las placas de ensayo presentaron controles negativos (células con inductores de la diferenciación y sin extractos vegetales) y controles positivos (células a las que se les adicionó inductores de la diferenciación y genisteína). Pasadas 48 horas del inicio de la diferenciación, el medio de cultivo se sustituyó por medio de continuación, esta vez sin extractos.

Como hemos visto, los cultivos celulares de adipocitos 3T3-L1 estuvieron en contacto con los extractos vegetales únicamente durante las primeras 48 horas del proceso de diferenciación. Durante estas 48 horas, tiene lugar la expansión clonal, proceso esencial para la diferenciación a adipocitos maduros. Durante este periodo, además, comienza la expresión de genes específicos de adipocitos, como los factores de transcripción C/EBP α y PPAR γ , relacionados con la expresión de genes característicos de adipocitos maduros, entre ellos los relacionados con la síntesis y acumulación de triglicéridos en su interior. Por esta razón, nuestro objetivo se centró en inhibir estos procesos esenciales para la completa diferenciación de los adipocitos y, en consecuencia, inhibir la acumulación de grasa en el interior de los mismos.

Una vez finalizado el proceso de diferenciación, se realizó la tinción de la grasa intracelular siguiendo el procedimiento descrito en el Apartado 3.2, lo que nos permitió cuantificar dicha grasa mediante espectroscopía de fluorescencia. Una vez finalizada la lectura de fluorescencia, los mismos cultivos celulares se emplearon para determinar la viabilidad celular mediante la adición de MTT y cuantificando la producción de formazán espectroscópicamente midiendo absorbancia a 595 nm.

Los cultivos celulares reservados como controles negativos nos sirvieron para establecer valores de referencia de grasa intracelular, en forma de fluorescencia, y de viabilidad, en forma de absorbancia a 595 nm. El grado de diferenciación o grasa intracelular y la viabilidad celular de los cultivos celulares que estuvieron en contacto con la colección de extractos celulares, se calcularon y expresaron en forma de porcentaje en base a los valores de referencia de los controles negativos.

Siguiendo el procedimiento descrito hasta ahora, se ensayaron todos los extractos que conformaban nuestra colección de muestras. Los valores de viabilidad celular que obtuvimos en los primeros experimentos, nos guiaron para emplear, en un volumen final de medio de cultivo de 200 μ L, entre 10 y 25 μ L de extractos diluidos 1/10 en el caso de extractos acuosos y metanólicos, y 25 μ L de diluciones 1/100 de los extractos realizados en hexano y disueltos en DMSO. De los 987 extractos de nuestra colección, un 4,4 % indujeron una viabilidad inferior al 50 % y fueron considerados tóxicos, un 21,9% produjeron que los cultivos celulares presentaran viabilidades situadas entre el 50 y el 80 %, y un 73,6 % mostraron viabilidades superiores al 80 %.

Los métodos basados en la cuantificación de la viabilidad celular por medio de la determinación de la actividad de enzimas mitocondriales, como el empleado en nuestro caso, permiten detectar un efecto tóxico de las condiciones ensayadas cuando se observa una reducción en la viabilidad por debajo del 80 %. En nuestros ensayos no descartamos los extractos vegetales que indujeron viabilidades inferiores a este valor, en las primeras rondas de búsqueda de inhibidores de adipogénesis, debido a que cabía la posibilidad de que este aparente efecto tóxico fuera en realidad un fenómeno de inhibición del proceso de expansión clonal.

La variabilidad intrínseca a cualquier ensayo basado en cultivos celulares, unido a la variabilidad que muestran los adipocitos 3T3-L1 en su proceso de diferenciación, hicieron necesario realizar tres rondas de ensayo con cada uno de los extractos, siendo analizados por triplicado en cada uno de los tres ensayos. De esta forma, una vez que contamos con, al menos, 9 valores de viabilidad y grasa intracelular inducidos por cada una de las muestras, procedimos a seleccionar aquellos extractos que mostraran capacidad de inhibir el proceso de diferenciación celular. Para ello, descartamos en primera instancia los extractos que provocaron mortalidades superiores al 50 %. A continuación, seleccionamos aquellos extractos que provocaron una reducción en la grasa intracelular, con respecto a los controles negativos, de al menos el 15 %. Además, como un parámetro adicional que pudiera sernos útil para observar el efecto causado por los extractos ensayados, normalizamos los valores de grasa intracelular, cuantificamos mediante fluorescencia, en base a la viabilidad celular (% grasa intracelular/% viabilidad). Este nuevo índice nos informó si la reducción de la grasa intracelular era ocasionada por un menor número de células en los cultivos (causada por un posible efecto tóxico o por inhibición de la expansión clonal) o por una menor cantidad de grasa intracelular.

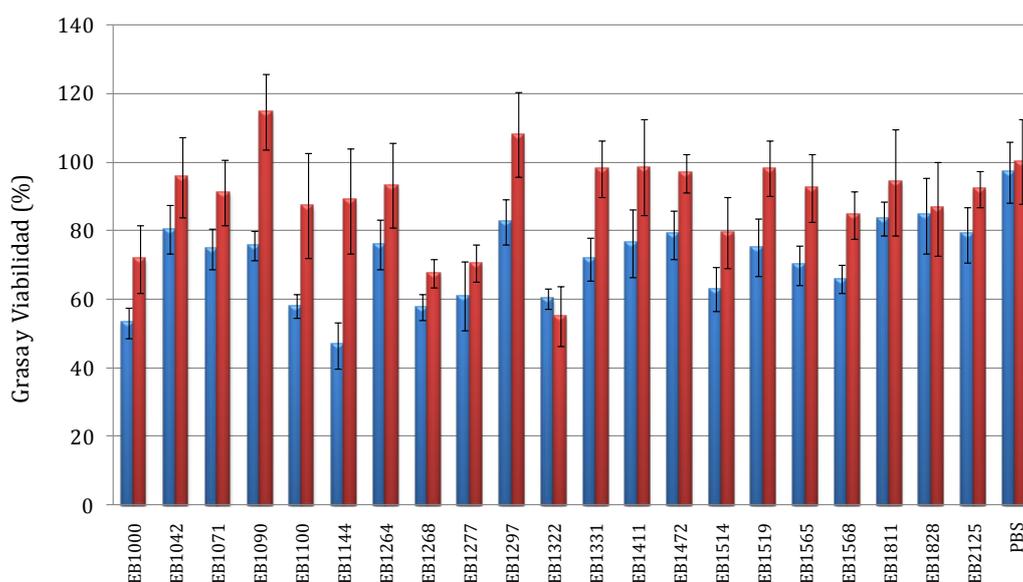


Figura 4.11. Grasa intracelular y viabilidad de los extractos vegetales seleccionados como posibles inhibidores de la adipogénesis en células 3T3-L1. ■ Contenido en grasa. ■ Porcentaje de viabilidad respecto al control PBS. Las barras de error representan el intervalo de confianza para $\alpha=0,05$.

Tras el análisis descrito y, atendiendo principalmente a los valores de viabilidad celular y grasa intracelular, seleccionamos 21 muestras como posibles extractos vegetales con capacidad de inhibir el proceso de adipogénesis en adipocitos 3T3-L1. Los valores promedio de grasa intracelular, viabilidad celular y el índice grasa/viabilidad obtenidos con los 21 extractos seleccionados se muestran en la Figura 4.11 y en la Tabla 4-7.

Tabla 4-7. Valores de grasa intracelular, viabilidad e índice grasa/viabilidad de los extractos seleccionados como posibles inhibidores de la adipogénesis de células 3T3-L1.

	<i>Grasa intracelular (%)¹</i>	<i>Viabilidad celular (%)¹</i>	<i>Grasa/viabilidad (%)²</i>
EB1000	53,15	71,62	74,21
EB1042	80,32	95,57	84,04
EB1071	74,56	91,00	81,93
EB1090	75,71	114,67	66,02
EB1100	57,88	87,25	66,34
EB1144	46,50	88,65	52,46
EB1264	75,96	93,21	81,50
EB1268	57,59	67,55	85,25
EB1277	60,94	70,52	86,43
EB1297	82,50	108,06	76,34
EB1322	60,12	55,02	109,27
EB1331	71,66	97,93	73,17
EB1411	76,34	98,49	77,51
EB1472	78,86	96,76	81,50
EB1514	62,85	79,41	79,15
EB1519	75,12	98,15	76,54
EB1565	69,93	92,38	75,70
EB1568	65,79	84,47	77,89
EB1811	83,48	94,19	88,63
EB1828	84,38	86,42	97,65
EB2125	78,80	92,22	85,44
Control	97,02	100,06	96,96

¹Valores expresados en porcentaje con respecto al control negativo (PBS). ²Índice de grasa intracelular normalizada, calculada dividiendo los valores de grasa intracelular entre los valores de viabilidad y expresados como porcentaje con respecto al control negativo

En la adquisición del fenotipo característico de adipocitos maduros están involucrados varios factores de transcripción, destacando entre ellos el factor de transcripción PPAR γ y el C/EBP α . Dado el papel clave que juegan estos dos genes en el proceso de adipogénesis, decidimos realizar un experimento de análisis de su expresión en adipocitos 3T3-L1, en presencia de los extractos seleccionados en el apartado anterior. Los resultados de este análisis nos servirían como comprobación del fenómeno de inhibición de la adipogénesis que provocan los extractos mencionados y, adicionalmente, nos permitirían dar los primeros pasos para definir el posible mecanismo de acción de cada uno de ellos.

Para realizar este análisis, realizamos dos experimentos independientes en los que sometimos a cultivos celulares de adipocitos 3T3-L1 a incubación en presencia de los extractos seleccionados durante las primeras 48 h de diferenciación, en las mismas condiciones en las que se realizaron los experimentos de cuantificación de grasa intracelular. Finalizado este periodo de tiempo, las células fueron utilizadas para aislar ARN total, cuya integridad y concentración fue determinada mediante espectroscopia UV y electroforesis capilar (Figura 4.12). Una vez estandarizada la concentración de cada una de las muestras de ARN (500 ng), se realizó la retrotranscripción a ADNc utilizando como cebadores una mezcla de hexanucleótidos de secuencia aleatoria y oligo d(T)₁₅. A continuación, se realizaron los ensayos de amplificación y cuantificación de los transcritos mediante qPCR, empleando *primers* y sondas TaqMan marcadas con los fluoróforos FAM, JOE y ROX, y específicas de los genes PPAR γ , C/EBP α y β -actina (gen control) respectivamente (Tabla 3-2 del Apartado 3.2.4).

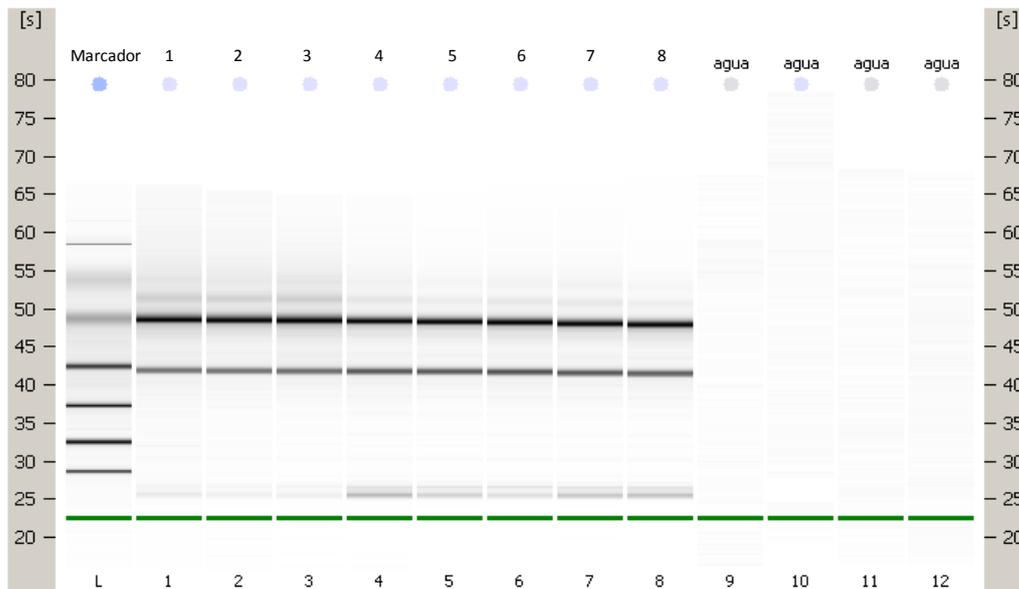


Figura 4.12. Resultados de la electroforesis capilar de muestras de ARN total aislado de adipocitos 3T3-L1 incubados en presencia de los siguientes extractos: 1,2 y 3, EB1071. 4,5 y 6, EB1090. 7 y 8, EB1100.

Previamente a los ensayos de cuantificación de expresión, llevamos a cabo una serie de experimentos en los que determinamos la eficiencia de amplificación de cada uno de los grupos de *primers* y sonda. Los resultados de estos experimentos demostraron que la eficiencia de amplificación era similar y cercana al máximo teórico en los tres genes objetos de estudio (Tabla 4-8), lo que asegura obtener datos de expresión génica más fiables. Tratamos, además, de realizar los ensayos de cuantificación mediante qPCR multiplex. Sin embargo, la eficiencia de amplificación de cada uno de los tres amplicones demostró ser significativamente inferior cuando se realizaron los ensayos con mezclas de reacción que contenían las tres parejas de *primers* y las tres sondas TaqMan diseñadas para nuestros estudios. Por este motivo, finalmente, cuantificamos los transcritos correspondientes a los genes PPAR γ y C/EBP α y al gen control β -actina, en reacciones de amplificación independientes.

Tabla 4-8. Eficiencias de la amplificación de los genes PPAR γ y C/EBP α y β -actina

Gen	Eficiencia (%)
Actina	100
PPAR γ	100
C/EBP α	95,2

Antes de analizar los resultados obtenidos en la amplificación de los transcritos de PPAR γ y C/EBP α , comprobamos que los valores Ct en las distintas reacciones de amplificación de β -actina no mostraban excesiva variabilidad. Estos valores se situaron en todas las muestras analizadas entre los ciclos 18 y 19, lo que validó la utilidad del gen de la β -actina como gen control en nuestro estudio. Los datos de amplificación, expresados como ciclo umbral (o Ct) se emplearon para calcular los valores de expresión relativa (respecto a β -actina) mediante el método $\Delta\Delta$ Ct (Apartado 3.2.4) y normalizando los resultados mediante transformación logarítmica. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.13, en la que se observa cómo la expresión relativa del factor de transcripción PPAR γ se ve reducida con 8 de los extractos y la expresión del factor de transcripción C/EBP α se ve reducida con otros 8 extractos, siendo los extractos EB1000, EB1090, EB1100, EB1144, EB1277 y EB1411 los que producen una reducción de ambos factores de transcripción.

Las muestras de ADNc obtenidas de adipocitos 3T3-L1 incubados en presencia de los extractos mencionados fueron empleadas para hacer un nuevo análisis de expresión génica. En este nuevo experimento se cuantificó la expresión de los genes aP2 y LPL, cuyas proteínas son consideradas como marcadoras moleculares de la diferenciación de adipocitos. En esta ocasión, la amplificación y cuantificación se llevó a cabo utilizando los oligonucleótidos recogidos en la Tabla 3-3, el perfil térmico descrito en el mismo apartado y el fluoróforo SYBR Green para detectar la síntesis de nuevo ADN en las reacciones.

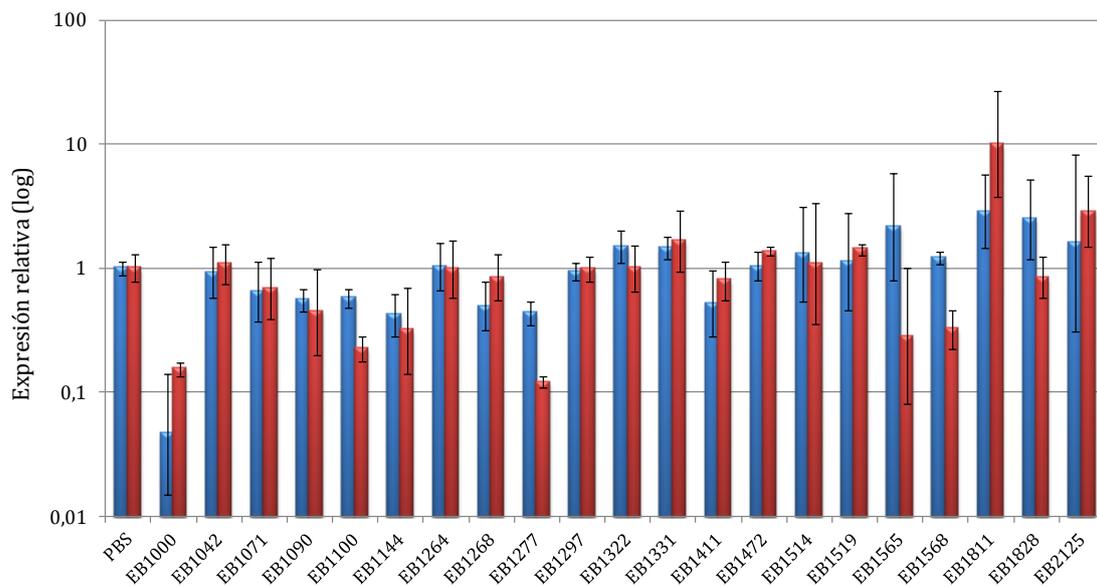


Figura 4.13. Expresión génica relativa de PPAR γ y C/EBP α durante la diferenciación de células 3T3-L1 con los extractos seleccionados. Las barras de error representan el intervalo de confianza para $\alpha=0,05$.

Como en el caso de la cuantificación de la expresión de los genes PPAR γ y C/EBP α , antes de llevar a cabo la cuantificación en todas las muestras, se calculó la eficiencia de amplificación de estos genes y del gen de referencia utilizado, la β -actina (Tabla 4-9), confirmando además la presencia de un único amplicón para cada uno de los genes analizados mediante curvas de disociación.

Tabla 4-9. Eficiencias de la amplificación de los genes aP2, LPL y β -actina.

Gen	Eficiencia (%)	Tm
Actina	96,9	84,8
aP2	97	80,1
LPL	96,6	79,5

Los resultados de la cuantificación de la expresión génica de dichos genes, calculada de nuevo mediante el método $\Delta\Delta Ct$ y transformación logarítmica, se muestran en la Figura 4.14, en la que se observa que el tratamiento con el extracto

EB1000 y el extracto EB1100 produce una reducción de la expresión génica de aP2 y LPL. Además, los extractos EB1144 y EB1277 producen una reducción de la expresión de aP2.

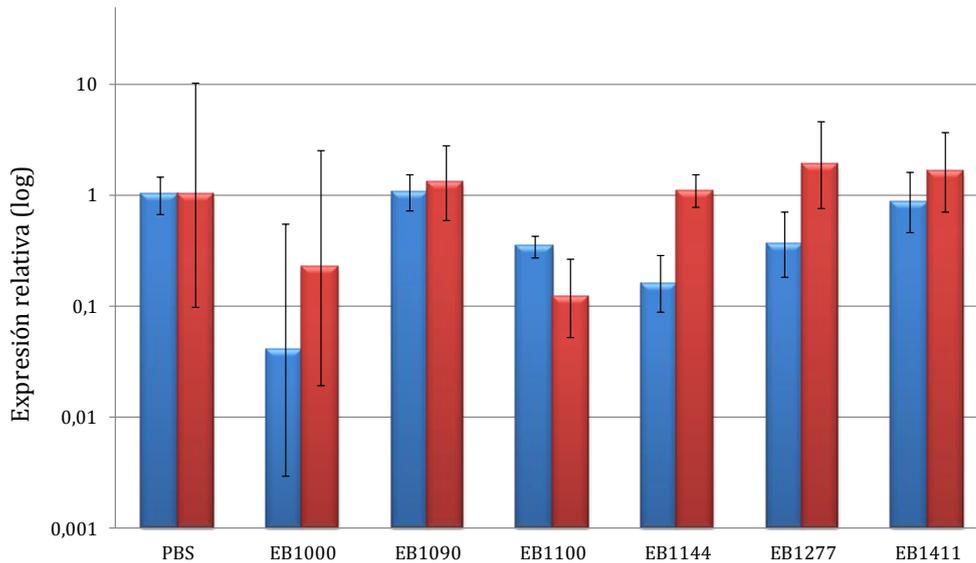


Figura 4.14. Expresión génica relativa de las proteínas aP2 ■ y LPL ■ durante la diferenciación de células 3T3-L1 con los extractos seleccionados. Las barras de error representan el intervalo de confianza para $\alpha=0,05$.

Con todos los resultados obtenidos en los ensayos realizados *in vitro* para la búsqueda de inhibidores de adipogénesis, se pueden considerar los extractos EB1000 y EB1100 como los mejores candidatos para actuar como inhibidores de la adipogénesis. Los dos extractos reducen el contenido en grasa de las células en aproximadamente un 50% con respecto a un control no tratado con extractos. Esta modificación en una de las características fenotípicas más importantes de los adipocitos maduros parece estar acompañada y quizá sustentada por una reducción en la expresión de dos marcadores moleculares de diferenciación: los genes aP2 y LPL. Además, los dos extractos parecen inducir una represión de la expresión de los factores de transcripción PPAR γ y C/EBP α implicados, como hemos visto previamente (Apartado 1.3.1), en la regulación del proceso de diferenciación de adipocitos.

Los siguientes pasos para confirmar la actividad de estos dos extractos y averiguar si podrían ser útiles como agentes farmacológicos contra la obesidad, se

encaminarían a identificar el o los principios activos responsables de su capacidad de inhibir la adipogénesis de adipocitos 3T3-L1. Además, dilucidar su mecanismo de acción o diana molecular permitiría diseñar y realizar los ensayos en modelos animales, necesarios para confirmar su actividad *in vivo*, con una mayor garantía de éxito. Por último, por supuesto, los ensayos clínicos en humanos serían la última etapa necesaria para confirmar o descartar la actividad de ambos extractos. Los recursos materiales y humanos destinados a la realización de esta Tesis doctoral no han permitido llevar a cabo los estudios mencionados. Sin embargo, los prometedores resultados obtenidos en nuestros ensayos hacen muy probable que los extractos EB1000 y EB1100 sean objeto de nuevos análisis en un futuro cercano.

4.2.4. Búsqueda de extractos inductores de lipólisis

La hidrólisis de los triglicéridos acumulados en los adipocitos (lipólisis) conduce a una reducción en la cantidad de grasa acumulada en el tejido adiposo y es un mecanismo fisiológico por el cual el tejido adiposo libera la energía acumulada en forma de grasa, generalmente en periodos de déficit energético, generando glicerol y ácidos grasos libres. La reducción del tejido adiposo a través de la inducción de este proceso podría ser una estrategia adecuada para combatir la obesidad. Por esta razón, englobado en nuestro objetivo general de buscar compuestos naturales activos frente a la obesidad, nos planteamos la búsqueda de extractos vegetales capaces de inducir la lipólisis en adipocitos 3T3-L1.

La búsqueda de extractos con capacidad inductora de lipólisis se llevó a cabo utilizando cultivos celulares de adipocitos 3T3-L1, en placas de 96 pocillos, completamente diferenciados tal y como se ha descrito anteriormente (Apartado 3.2.2). Como se ha visto previamente, las células 3T3-L1 pierden gran parte de sus características fenotípicas cuando sufren excesivos procesos de subcultivo (pases). Para garantizar en cierta medida los resultados de nuestros estudios y homogeneizar los datos de distintos ensayos, empleamos en todo momento cultivos celulares con menos de 8 pasos.

Una vez confirmada mediante observación directa al microscopio la correcta diferenciación de los cultivos (más del 80 % de las células con gotas de grasa intracelulares), generalmente tras siete días de incubación, los cultivos celulares fueron incubados durante 24 h en presencia de las muestras vegetales y los solventes empleados para su disolución (agua, metanol o DMSO) como controles negativos. Como control positivo de la inducción de lipólisis se utilizó isoproterenol a una concentración de 10 μM . Este compuesto es un potente agonista β -adrenérgico que activa estos receptores estimulando la lipólisis (Martin y col. 2005).

El proceso de lipólisis, además de la hidrólisis de triglicéridos, tiene como resultado la liberación del glicerol, procedente de esta hidrólisis, al medio extracelular. Este hecho permite cuantificar el grado de lipólisis que se ha producido en un cultivo celular determinando la concentración extracelular de glicerol. Para realizar esta cuantificación decidimos emplear un método colorimétrico basado en tres reacciones enzimáticas acopladas que finalizan con la generación de un compuesto coloreado a través de una reacción de Trinder (Trinder 1969). La comprobación de la eficacia del método enzimático se realizó mediante la cuantificación de diluciones seriadas de glicerol a partir de una concentración 0,25 mM, tras la que se obtuvo una recta de calibrado que nos sirvió para comprobar la linealidad del método (Figura 4.15). En todos los ensayos también se dispuso una recta de calibrado de glicerol con el objetivo de validar los resultados obtenidos en la cuantificación del glicerol.

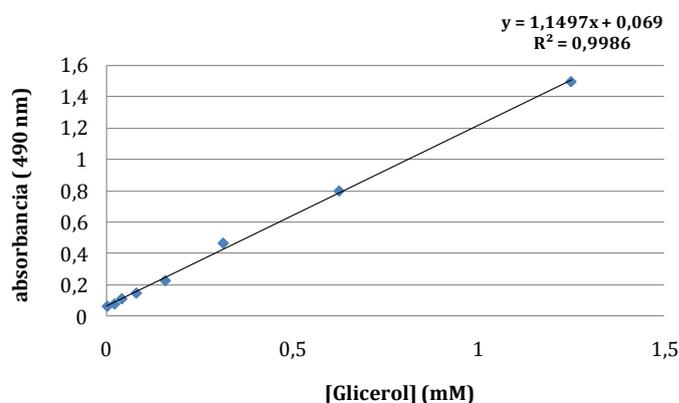


Figura 4.15. Recta patrón de glicerol.

La actividad inductora de lipólisis del control positivo se comprobó mediante la determinación del glicerol en el medio de cultivo tras la incubación de adipocitos con isoproterenol, obteniendo como resultado concentraciones de glicerol entre dos y tres veces superiores a las obtenidas en los controles negativos.

Además, una vez recogido el medio de cultivo celular utilizado como muestra para la determinación del glicerol, se llevaron a cabo ensayos de citotoxicidad, tal y como se detallada en el Apartado 3.2.3, para descartar aquellos extractos que resultasen tóxicos para los adipocitos.

Una vez puesto a punto el método de inducción de lipólisis en células 3T3-L1 y de cuantificación del glicerol en sobrenadantes de medio de cultivo, se llevaron a cabo los ensayos para la búsqueda de extractos vegetales con esta actividad biológica. Como hemos descrito en la puesta a punto del método, los ensayos se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos con células completamente diferenciadas. Una vez comprobada la presencia de grasa intracelular en los cultivos celulares, los extractos vegetales se ensayaron por triplicado y mezclados con medio fresco a diferentes diluciones, dependiendo del solvente de las distintas muestras (agua, metanol o DMSO). En cada placa de ensayo se dispusieron tres pocillos como controles negativos, conteniendo el solvente de las muestras ensayadas en dicha placa y tres controles positivos con isoproterenol 10 μ M. Transcurridas 24 h de incubación, se tomaron muestras de sobrenadante para determinar la concentración de glicerol mediante el método descrito previamente (Apartado 3.2.2) y los cultivos celulares se emplearon para cuantificar viabilidad celular, mediante el método del MTT (Apartado 3.2.3) y estimar la toxicidad de las muestras en base a los valores obtenidos.

Después de una primera ronda de ensayo con los extractos obtenidos en el Dionex ASE200, se seleccionaron 89 extractos cuya adición a las células produjo una liberación de glicerol al medio de cultivo superior a la observada en los controles negativos. Estos resultados se comprobaron en dos ensayos más, realizados en las mismas condiciones y tras los cuales, después de descartar muestras falsos positivos, pudimos reducir el número de muestras positivas a 19 extractos. Los valores de concentración de glicerol y de citotoxicidad, expresados como porcentaje

respecto a los mismos parámetros determinados en los controles negativos, obtenidos con los 19 extractos seleccionados se muestran en la Figura 4.16.

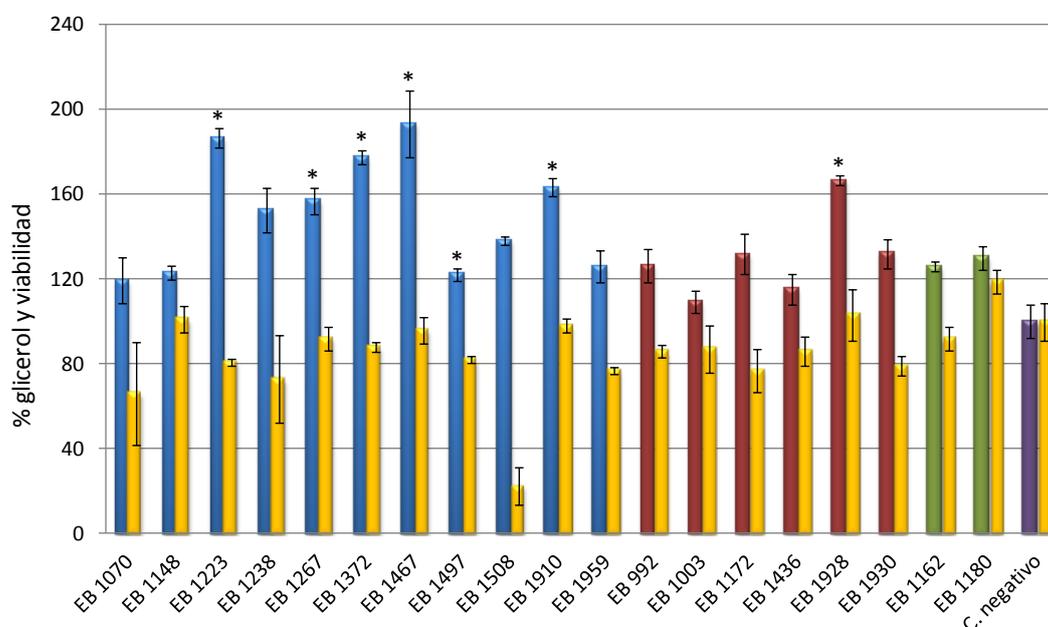


Figura 4.16. Porcentaje de glicerol liberado al medio de cultivo después de 24 horas de incubación con los extractos seleccionados y su respectivo valor de viabilidad. * Extractos seleccionados. ■ Extractos acuosos ■ Extractos metanólicos ■ Extractos en hexano ■ Control negativo ■ Valores de viabilidad. Las barras de error representan el RSE (error estándar relativo escalado).

Basando nuestro criterio de selección en el grado de liberación de glicerol y en la toxicidad exhibida por las distintas muestras, seleccionamos en este punto los siete extractos que produjeron una mayor liberación de glicerol, señalados en la Figura 4.16. Los extractos acuosos EB1910 y EB1372 fueron preparados a partir de la misma especie vegetal, obtenida de dos proveedores distintos. Dado que el extracto EB1372 parecía mostrar una mayor actividad inductora de lipólisis, descartamos la muestra EB1910 para posteriores estudios. El extracto metanólico EB1928 procedía de una especie vegetal cuya actividad lipolítica ha sido descrita en varias publicaciones científicas. Por este motivo, decidimos descartar también este extracto para posteriores ensayos.

De esta forma, finalmente, seleccionamos cinco extractos vegetales con actividad inductora de lipólisis con los que continuar nuestros estudios. El último ensayo que llevamos a cabo y que podría incluirse en este apartado de búsqueda de muestras con actividad lipolítica fue tratar de establecer una relación dosis/efecto con los extractos seleccionados. En este experimento comprobamos el máximo efecto lipolítico que eran capaces de mostrar los cinco extractos a concentraciones no tóxicas para los cultivos celulares. En la Figura 4.17 se presentan los resultados obtenidos con dos de las concentraciones ensayadas, pudiendo observarse que algunos de los extractos (EB1223 y EB1372) indujeron liberación de glicerol, a la máxima concentración ensayada, a niveles muy similares a los determinados en el control positivo. En la Figura 4.18 se presentan los datos de toxicidad de dichas concentraciones, pudiendo observar que ninguno de los extractos a la máxima concentración resultó citotóxico obteniendo en todos los casos niveles de viabilidad superiores al 80%.

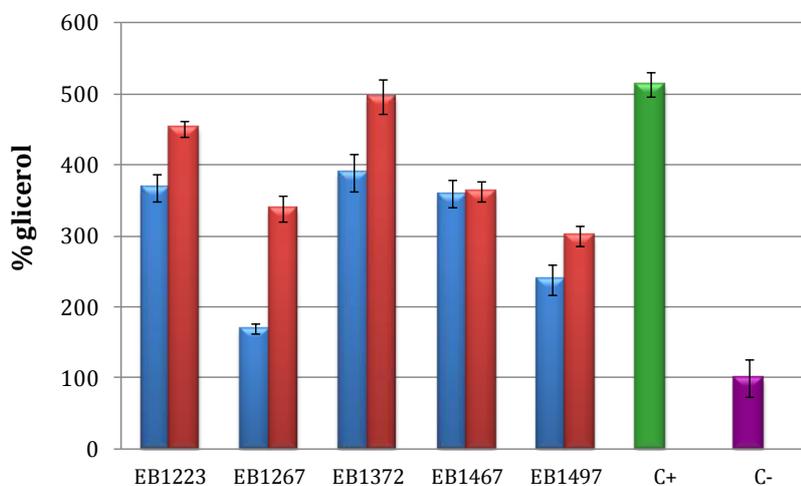


Figura 4.17. Porcentaje de glicerol liberado al medio de cultivo después de 24 horas de incubación con los extractos seleccionados. ■ 1% (v/v) de extracto añadido. ■ 2% (v/v) de extracto añadido ■ Isoproterenol 10 μ M ■ PBS.

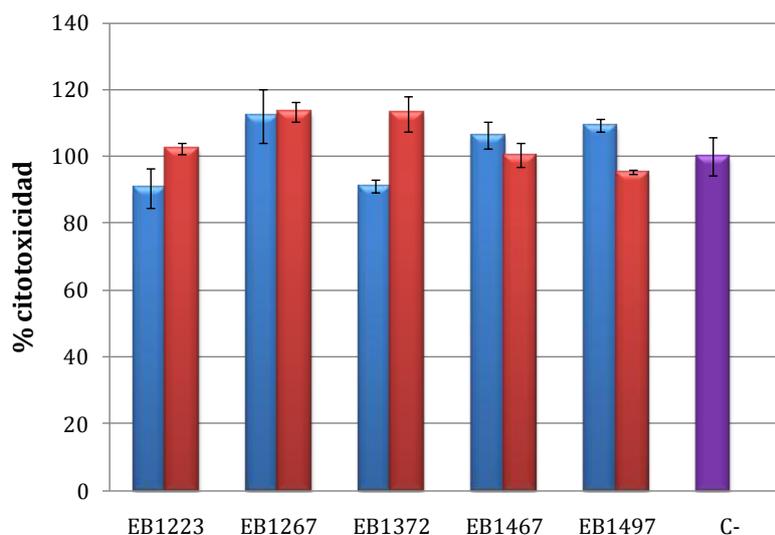


Figura 4.18. Porcentaje de citotoxicidad de los extractos después de 24 horas de incubación con ellos. ■ 1% (v/v) de extracto añadido ■ 2% (v/v) de extracto añadido ■ PBS.

Entre los cinco extractos que destacaron por su actividad inductora de lipólisis se seleccionaron tres de ellos para futuros experimentos en animales. Los extractos seleccionados fueron EB1223 y EB1372, por ser los que provocaban una mayor liberación de glicerol al medio y el extracto EB1267 el cual, aunque no presentaba una actividad inductora de lipólisis tan marcada como los otros dos extractos seleccionados, también fue uno de los extractos destacados por actividad inhibidora de lipasa pancreática, razón por la que resultó ser un extracto muy interesante para evaluar su potencial actividad en estudios de experimentación animal.

Al igual que el resto de los extractos de nuestra colección, estos tres extractos seleccionados habían sido obtenidos bajo unas condiciones de presión y temperatura difícilmente reproducibles a nivel industrial, razón por la que, previo a su utilización en estudios de experimentación animal, se decidieron preparar nuevos extractos a partir de las mismas plantas, a mayor escala y bajo condiciones estándar de fabricación industrial. El análisis de estos nuevos extractos, en las mismas condiciones que las descritas hasta ahora, confirmó la existencia de actividad lipolítica.

4.3. Selección de extractos para experimentación animal

Una vez llevada a cabo la búsqueda mediante ensayos *in vitro* de extractos vegetales que presentaran alguna actividad biológica que permitiese considerarlos válidos para el tratamiento y/o prevención de la obesidad, se llevó a cabo una selección entre todos los extractos positivos identificados en cada uno de los ensayos para comprobar su eficacia en ensayos con animales de experimentación.

En primer lugar, decidimos seleccionar extractos con actividad inhibidora de lipasa, para nuestros ensayos en animales, debido a que esta estrategia ha demostrado ser efectiva para otros compuestos, como el orlistat. De los siete extractos identificados como inhibidores de la lipasa pancreática en nuestros ensayos *in vitro*, decidimos incluir en ensayos en animales los 5 extractos con menor CI50 (Tabla 4-10).

Por otro lado, decidimos ensayar también extractos con actividad biológica directa sobre el tejido adiposo. De los dos ensayos realizados en células 3T3-L1 (inducción de lipólisis e inhibición de adipogénesis) la búsqueda de inductores de lipólisis se finalizó antes, lo que hizo que fueran los extractos identificados en estos experimentos los seleccionados para ensayos en animales.

Decidimos analizar el efecto *in vivo* de los extractos EB-1223 y EB-1373 debido a que fueron los extractos que indujeron una mayor actividad lipolítica, además de contar con pocas o ninguna publicación científica previa describiendo dicha actividad. Además, como hemos mencionado previamente, el extracto EB-1267, mostró capacidad de inducir lipólisis y de inhibir la actividad lipasa pancreática. Esta característica hizo que también fuera incluido en nuestros estudios *in vivo* (Tabla 4-10).

Tabla 4-10. Selección de extractos utilizados en experimentación animal.

Extracto	Experimento
<i>Betula pendula</i>	Inhibición de lipasa
<i>Hamamelis virginiana</i>	
<i>Krameria triandra</i>	
<i>Tilia sp</i>	
<i>Vitis vinifera</i>	
EB1223	Inducción de lipolisis
EB1267	
EB1372	

4.4. Efectos del tratamiento con extractos vegetales en modelos de experimentación animal

4.4.1. Efecto del consumo de extractos sobre la absorción de grasa en ratas Wistar alimentadas con dieta de cafetería

La siguiente etapa en la evaluación de una posible aplicación de los extractos vegetales identificados como inhibidores de la lipasa pancreática, como agentes para el tratamiento de la obesidad, fue determinar si la actividad inhibitoria mostrada en los ensayos *in vitro* se manifestaba también *in vivo*. El objetivo del experimento diseñado para ello, fue analizar si la administración de los compuestos potencialmente activos, en la dieta de ratas Wistar, inducía un aumento de la excreción de la grasa a través de las heces, siendo debido este exceso de grasa a una disminución en la absorción provocada por una reducción en la tasa de hidrólisis de dicha grasa.

Como hemos mencionado antes, se seleccionaron cinco extractos a partir de los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro*, por ser los que presentaron una CI50 menor. Se utilizó dieta de cafetería a la que se le añadió el extracto seleccionado correspondiente y orlistat en el caso del control positivo. En bibliografía la cantidad

de orlistat para estudios en animales estaba entre 0,2 y 0,8 g/kg (Gooijert y col. 2007; Hira y col. 2007). En nuestros ensayos decidimos utilizar 0,1 g/kg de dieta, lo que en condiciones estándar podría traducirse en unos 10 mg de orlistat/kg de peso corporal, valor más cercano a la dosis habitual de este medicamento en seres humanos. La cantidad de extracto añadido se calculó a partir de las CI50 obtenidas en los ensayos enzimáticos (Tabla 4-11) con el fin de administrarlos a una concentración tal que igualara la actividad del orlistat. Como control negativo se utilizó la dieta de cafetería sin ningún extracto añadido y también una dieta estándar de ratas con la proporción normal de grasa.

Tabla 4-11. Concentración de orlistat y de los extractos añadidos a la dieta de cafetería utilizada en el estudio de inhibición de absorción de grasa.

	Concentración (g/Kg)	Dosis diaria¹ (mg/kg)
Extracto de <i>Betula pendula</i>	5	500
Extracto de <i>Hamamelis</i>	30	3000
Extracto de <i>Krameria</i>	15	1500
Extracto de <i>Tilia sp</i>	20	2000
Extacto de <i>Vitis vinífera</i>	50	5000
Orlistat	0,1	10

¹Asumiendo un consumo de pienso de 20 g/día y un peso de 200 g por animal.

Resultados

Durante el experimento, se cuantificó la ingesta diaria de cada animal y se comprobó que no había diferencias significativas en este parámetro entre las diferentes dietas (Tabla 4-12).

Tabla 4-12. Ingesta diaria.

Dieta	Ingesta (g/rata/día)
Cafetería (CF)	20,4 ± 0,62
Orlistat	20,0 ± 0,68
CF + <i>Betula pendula</i>	21,1 ± 0,63
CF + <i>Hamamelis virginiana</i>	18,6 ± 0,73
CF + <i>Krameria triandra</i>	19,2 ± 0,66
CF + <i>Tilia sp</i>	21,8 ± 0,99
CF + <i>Vitis vinifera</i>	21,2 ± 1,16

Los valores representan la media ± SEM.

Para determinar la cantidad de grasa no absorbida por las ratas durante el experimento, se recogieron las heces de cada una de las ratas a las 72 horas de haberse iniciado la intervención, y se determinó la concentración de grasa en las mismas por gravimetría.

El porcentaje de grasa excretado en heces respecto al peso de las heces analizadas para cada grupo se representa en la figura 4.15. Las diferencias observadas entre las ratas que consumieron pienso estándar o dieta de cafetería demuestran que el efecto de un incremento en el aporte de grasa en la dieta se traduce en un incremento en la excreción de grasa. Cuando la dieta de cafetería se administra junto con el inhibidor de lipasa orlistat se observa un incremento significativo en el porcentaje de grasa excretado evidenciando una disminución en la absorción de ésta. De los cinco extractos evaluados pudimos comprobar que el extracto de abedul (*Betula pendula*) y el extracto de vid roja (*Vitis vinifera*) mostraron actividad inhibidora de la absorción de grasa en los animales al incrementar la concentración de grasa en heces entre un 6 y un 8%. Los resultados obtenidos con la dieta complementada con orlistat (control positivo) validaron el ensayo, ya que este compuesto indujo un incremento del 21% en la grasa en heces.

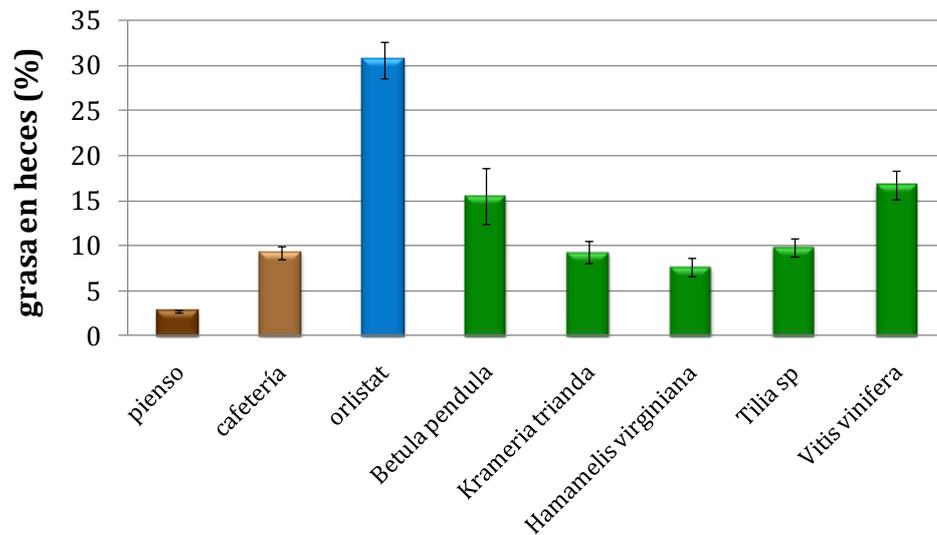


Figura 4.19. Porcentaje de grasa en heces después de tres días de alimentación. ■ Dieta a partir de pienso estándar. ■ Dieta de cafetería. ■ Dieta de cafetería con extracto añadido. ■ Dieta de cafetería con orlistat.

Los resultados obtenidos indican que la ingesta del extracto de abedul y del extracto de vid roja produce una reducción de la absorción de grasa procedente de la dieta, al menos en nuestras condiciones de ensayo, confirmando para estas dos muestras los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro*.

4.4.2. Evaluación del efecto de tres extractos inductores de la lipólisis en el modelo de obesidad genética de ratas Zucker

Al igual que en el caso de los extractos con capacidad de inhibir la lipasa pancreática, decidimos comprobar si la actividad inductora de lipólisis reflejada por algunos extractos en los ensayos *in vitro* se manifestaba también *in vivo*, como paso ineludible para valorar si dichos extractos podrían formar parte de un posible tratamiento frente a la obesidad.

Se seleccionaron, como hemos mencionado anteriormente (ver Apartado 4.3), los extractos EB1223 y EB1372, por ser los que inducían una mayor hidrólisis de grasa intracelular, reflejada en forma de glicerol extracelular, y el extracto EB1267 que, aunque presentaba un nivel de actividad inductora de la lipólisis no tan

acusado, también mostró actividad inhibidora de lipasa pancreática, lo cual podría potenciar sinérgicamente su efecto sobre la obesidad.

Como modelo animal de obesidad se seleccionó la rata Zucker, por ser es el más utilizado en estudios de obesidad. Las ratas Zucker obesas son homocigotas para el alelo *fa*, lo que va a dar lugar a un receptor de la leptina no funcional y se caracterizan por desarrollar obesidad, hiperlipidemia, hiperinsulinemia e hiperleptinemia. Por otro lado, las ratas heterocigotas, en las que el receptor de la leptina es funcional, son delgadas y presentan un perfil lipídico, insulínico y leptínico normal, lo que permite su utilización como control sano de este modelo.

Los animales se dividieron en cinco grupos de 10 u 11 ratas que recibieron durante 10 semanas una dieta estándar a la que se adicionó, en cada grupo, un extracto a las concentraciones que se detallan en la Tabla 4-13.

Tabla 4-13. Estudio I en el modelo de ratas Zucker: distribución de animales por grupos de ensayo.

Grupo	Dieta	Nº animales	Fenotipo
Control A	Estándar (st)	10	No obesas
Control B	Estándar (st)	10	Obesas
Extracto 1	St + 2% EB1223	11	Obesas
Extracto 2	St + 2 % EB1267	10	Obesas
Extracto 3	St + 2 % EB1372	10	Obesas

La concentración de extracto utilizada se eligió basándonos en su toxicidad en los ensayos *in vitro*, en estudios similares realizados con otros extractos (Poudyal y col. 2010; Saraswat y col. 2010), y tratando de no modificar en exceso las características organolépticas del pienso, para evitar diferencias en la ingesta de los distintos grupos de experimentación.

1. Parámetros nutricionales: ingesta de pienso

Durante el periodo de intervención del estudio, los animales tuvieron acceso libre a comida y agua, y cada semana se fue controlando la cantidad de pienso que ingerían y el peso que iba ganando cada rata. Se comprobó que la cantidad de comida que ingerían los animales obesos fue superior a la ingerida por el grupo control no obeso, lo que ponía de manifiesto la hiperfagia que caracteriza a este modelo. Sin embargo, entre los grupos de animales obesos no se observaron diferencias significativas, independientemente de si la dieta llevaba o no adicionado alguno de los extractos (Tabla 4-14).

2. Parámetros morfológicos

a) *Peso corporal*

Al comienzo del estudio, con 12 semanas de edad, las ratas obesas presentaban un peso medio un 34% superior al de las ratas no obesas (Tabla 4-14). Acorde a las características descritas para este modelo, tras las 10 semanas de intervención la ganancia de peso de las ratas fa/fa (fenotipo obeso) era significativamente mayor al de las ratas Fa/fa (fenotipo delgado), demostrando que la intervención había cursado de forma correcta y los controles se habían comportado de acuerdo a las características de este modelo (Figura 4.20).

Los animales que consumieron el extracto EB1267 experimentaron un incremento de peso menor con respecto al grupo obeso control. No hubo sin embargo diferencias en la ganancia de peso de los animales que recibieron el extracto EB1223 o el extracto EB1372 manteniendo unos niveles de ganancia similares al de los animales controles obesos (Figura 4.20).

Tabla 4-14 Estudio I en el modelo de ratas Zucker: Ingesta y peso corporal medio de los grupos de experimentación.

Grupo	Ingesta (g/rata/día)	Peso corporal inicial (g)	Peso corporal final (g)
Control no obeso	23,2 ± 0,7	316,6 ± 3,82	430,2 ± 7,37
Control obeso	28,7 ± 0,8	418,2 ± 4,79	583,9 ± 8,6
Extracto EB-1223	28,7 ± 0,9	425,4 ± 8,59	590,1 ± 7,87
Extracto EB-1267	27,6 ± 0,9	456,5 ± 7,96	587,8 ± 15,77
Extracto EB-1372	27,5 ± 1,1	400,7 ± 11,13	576,8 ± 18,15

Los valores están expresados como la media ± SEM.

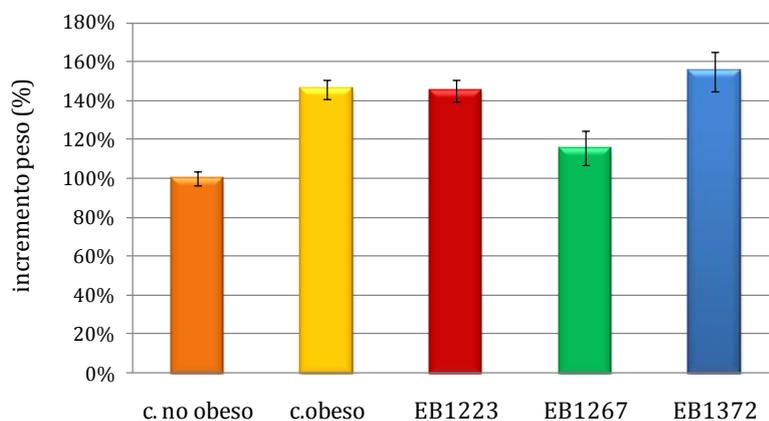


Figura 4.20. Incremento de peso con respecto al control no obeso al final del primer estudio de adipolisis en ratas Zucker. Las barras de error corresponden al RSE.

b) Peso de la grasa

Finalizado el periodo de intervención se sacrificó a los animales y se extrajo y pesó grasa de diferentes localizaciones (mesentérica, subcutánea, epididimal, visceral y retroperitoneal). La cantidad de grasa extraída en los grupos de ratas obesas fue siempre mayor que la extraída del grupo control no obeso. No hubo diferencias entre el grupo control obeso y los obesos que recibieron los extractos, a excepción de un incremento en la grasa visceral del grupo que consumió EB1223 y en la grasa subcutánea del que consumió el extracto EB1267 respecto a los valores del control obeso (Tabla 4-15). Los datos relativos a la grasa mesentérica y retroperitoneal

mostraron una elevada variabilidad, posiblemente debido a la dificultad de extraer de los animales muestras representativas de estos tejidos. Por esta razón, los datos obtenidos de estas muestras fueron excluidos de los resultados de nuestros ensayos.

Tabla 4-15. Estudio I en el modelo de ratas Zucker: Peso de las muestras de grasa.

Grupo	Epididimal (g)	Visceral (g)	Subcutánea (g)
C. no obeso	2,27±0,15	0,23±0,06	7,23±0,4
C. obeso	9,45±0,96*	0,47±0,07*	36,89±1,12*
Ext. EB1223	10,00±0,73*	0,53±0,1*#	38,39±1,85*
Ext. EB1267	9,73±0,54*	1,33±0,26*	46,26±2,43*#
Ext. EB1372	7,97±0,61*	0,35±0,06*	42,83±2,9*

El peso está expresado en media ± SEM. *Existen diferencias significativas entre el grupo señalado y el control no obeso ($p < 0,05$). #Existen diferencias significativas entre el grupo señalado y el control obeso ($p < 0,05$).

c) Peso de los órganos

Después del sacrificio de los animales, se procedió a la extracción del hígado, corazón, bazo, colon y riñón. El análisis del peso de estos órganos mostró que las ratas obesas control presentaron un incremento en el peso del hígado con respecto al grupo de ratas delgadas de un 50% aproximadamente (Tabla 4-16), siendo esta diferencia una de las características de este modelo animal. Este incremento en los grupos de ratas alimentados con los extractos resultó similar al presentado por las ratas obesas control. Además, todos los grupos de ratas obesas presentaron un incremento de peso del bazo de un 19% aproximadamente y sólo el grupo alimentado con el extracto EB1372 incrementó este porcentaje hasta un 25% sobre la media del peso del bazo del control no obeso. Aunque los parámetros morfológicos del corazón, colon y riñón, presentaron una tendencia a incrementar su peso en los grupos obesos con respecto al control no obeso, estos incrementos no llegaron a ser significativos, excepto en el caso del grupo alimentado con el extracto EB1372, el cual mostró una reducción significativa del peso del colon.

Tabla 4-16. Estudio I en el modelo de ratas Zucker: Peso de los órganos extraídos.

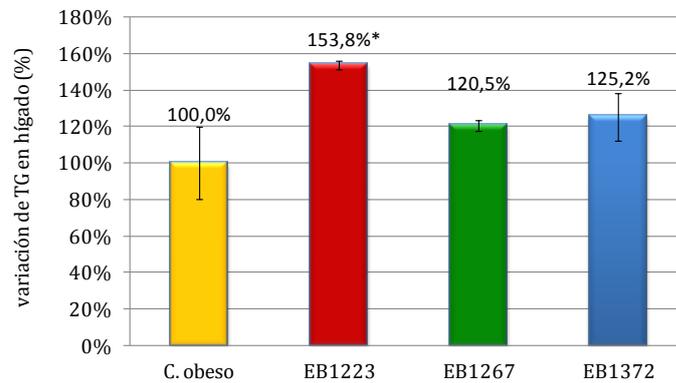
Grupo	Hígado (g)	Corazón (g)	Bazo (g)	Colon (g)	Riñón (g)
C. no obeso	11,71±0,56	1,25±0,03	0,60±0,01	1,66±0,08	1,19±0,05
C. obeso	23,23±0,35*	1,35±0,02	0,69±0,02*	1,80±0,05	1,32±0,08
Ext EB-1223	25,58±1,49*	1,38±0,07	0,77±0,04*	1,78±0,11	1,37±0,06
Ext EB-1267	22,88±0,72*	1,41±0,03	0,74±0,03*	1,73±0,07	1,23±0,04
Ext EB-1372	24,90±1,47*	1,33±0,04	0,81±0,03*#	1,47±0,05#	1,27±0,08

El peso está expresado en media \pm SEM. *Existen diferencias significativas entre el grupo y el control no obeso ($p < 0,05$). #Existen diferencias significativas entre el grupo y el control obeso ($p < 0,05$).

d) Contenido de triglicéridos en hígado

La acumulación de triglicéridos en el hígado (esteatosis) se relaciona con la resistencia a la insulina. El modelo de rata Zucker homocigota se caracteriza por presentar unos niveles de lípidos almacenados en el tejido hepático superiores a la rata heterocigota, lo que se comprobó determinando el contenido en TG en el tejido hepático de los grupos control. Para ello, se extrajeron los ácidos grasos de una muestra de tejido hepático de cada uno de los animales y se determinó la concentración de triglicéridos en la muestra mediante el kit *triglycerides-LQ*. El porcentaje de triglicéridos almacenados en el tejido hepático se vio incrementado un 600% en el grupo control obeso con respecto al grupo control no obeso.

La acumulación de TG en hígado fue incluso mayor en los grupos alimentados con pienso complementado con extractos, aunque este incremento solo alcanzó a ser significativo, con respecto al control obeso, en el caso del extracto EB1223 (Figura 4.21).



*Figura 4.21. Concentración de TG en hígado al finalizar el primer estudio de adipolisis. *Existen diferencias significativas respecto al control obeso ($p < 0,05$). Las barras de error corresponden al RSE*

3. Parámetros bioquímicos plasmáticos

El modelo de rata Zucker homocigota se caracteriza a nivel plasmático por presentar elevados niveles de triglicéridos, colesterol y ácidos grasos, además de hiperinsulinemia e hiperleptinemia, esta última consecuencia del defecto que presenta en el receptor de esta hormona.

Efectivamente, los resultados de nuestros análisis revelaron que los animales del grupo control obeso presentaron niveles plasmáticos de estos parámetros muy por encima de los niveles presentados en los animales del grupo control no obeso (heterocigotos) (Figura 4.22).

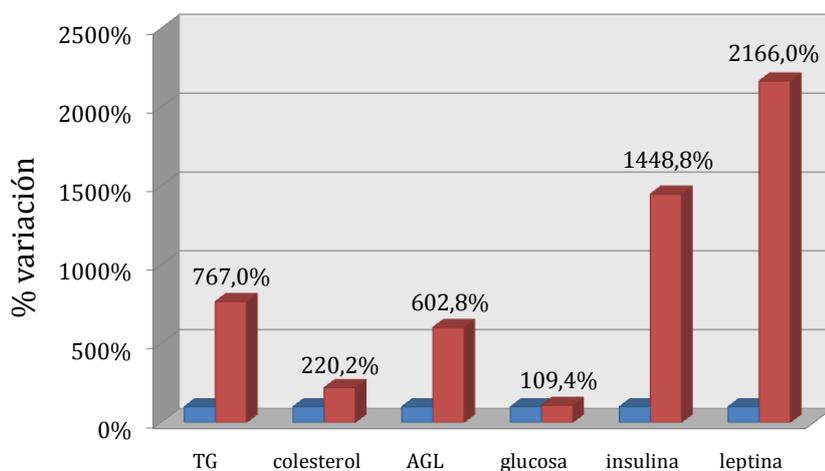


Figura 4.22. Comparación de los niveles plasmáticos de TG, colesterol, AGL, glucosa, insulina y leptina. ■ Grupo control no obeso ■ Grupo control obeso.

Además, como era de esperar, el grupo control obeso presentó unos valores de índice HOMA incrementados en un 1500% con respecto al grupo control no obeso, indicando un elevado grado de resistencia a la insulina.

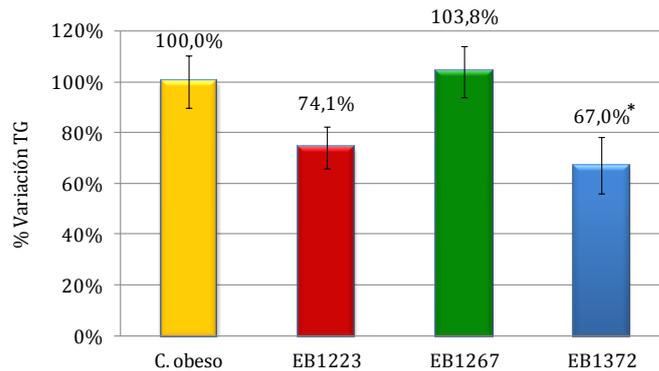
En cuanto a los grupos de intervención con extractos seguidamente se detallan los resultados obtenidos en cuanto a los niveles de estos parámetros.

a) Lípidos plasmáticos

La dislipidemia se valoró mediante la determinación de la concentración de triglicéridos, colesterol total y AGL en plasma en ayunas, a partir de una muestra de sangre obtenida el día del sacrificio de los animales.

a.1) Triglicéridos

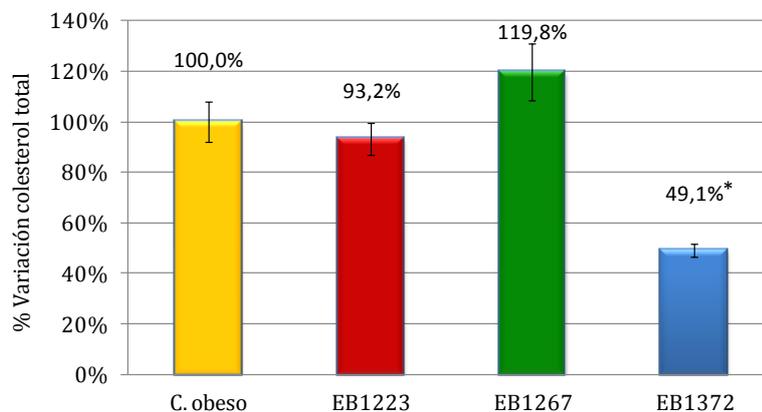
La administración de los extractos EB1223 y EB1372 redujeron los niveles de triglicéridos plasmáticos con respecto al control obeso en un 25% y en un 33% respectivamente. Por el contrario, con el consumo del extracto EB1267 no se observaron diferencias con respecto al control obeso (Figura 4.23).



*Figura 4.23. Concentración de triglicéridos en plasma al finalizar la intervención. *Existen diferencias significativas respecto al control obeso ($p < 0,05$). Las barras de error corresponden al RSE.*

a.2) Colesterol total

El grupo de animales alimentado con extracto EB1372 presentó unos niveles de colesterol aproximadamente un 50% inferiores a los presentados por el grupo control obeso. Por otro lado, el grupo de animales alimentado con el extracto EB1267 incrementó un 19% estos niveles. En el caso de los animales alimentados con el extracto EB1223 los niveles de colesterol en plasma no presentaron una variación significativa, aunque la tendencia de los datos refleja una pequeña reducción de los niveles (Figura 4.24).



*Figura 4.24. Concentración de colesterol total en plasma al finalizar la intervención. *Existen diferencias significativas respecto al control obeso ($p < 0,05$). Las barras de error corresponden al RSE.*

a.3) Ácidos grasos libres

La liberación de AGL desde el tejido adiposo al plasma sanguíneo suele aparecer incrementada durante la obesidad. La administración de los extractos EB1223 y EB1267 redujo los niveles de AGL en plasma respecto al control obeso en un 33% y un 24% respectivamente. Sin embargo, el grupo de animales que consumió el extracto EB1372 experimentó un incremento del 32% en sus niveles de AGL (Figura 4.25).

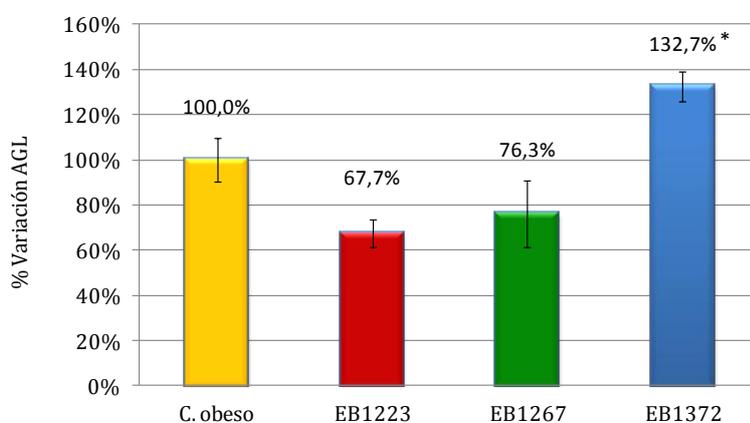


Figura 4.25. Concentración de AGL en plasma al finalizar la intervención.*Existen diferencias significativas respecto al control obeso ($p < 0,05$).#Cercano a la significación ($p < 0,1$). Las barras de error corresponden al RSE.

b) Parámetros plasmáticos relacionados con el metabolismo de la glucosa y la resistencia a la insulina

b.1) Glucosa

Las ratas alimentadas con los extractos EB1223 y EB1372 presentaron unos niveles de glucosa en sangre un 18% y 25% inferiores al presentado por el grupo control obeso. La administración del extracto EB1267 no afectó a los niveles de glucosa en plasma (Figura 4.26).

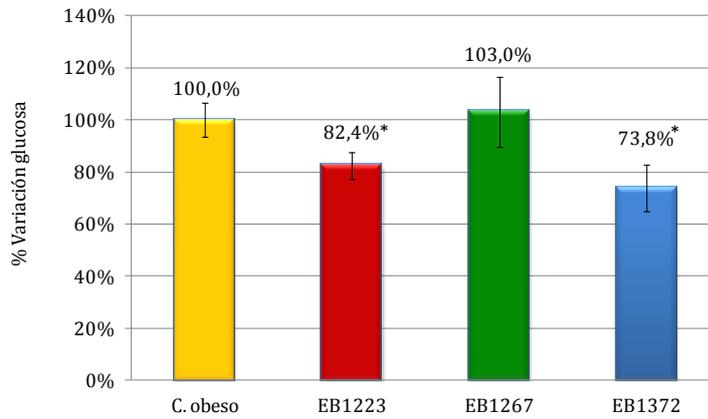


Figura 4.26. Concentración de glucosa en plasma al finalizar la intervención. #Cercano a la significación ($p < 0,1$). Las barras de error corresponden al RSE.

b.2) Insulina

La administración de los extractos redujo en todos los casos los niveles de insulina respecto al control obeso presentando valores de reducción entre el 21%, en el caso del extracto EB1267 y el 44% alcanzado con el consumo del extracto EB1372 (Figura 4.27).

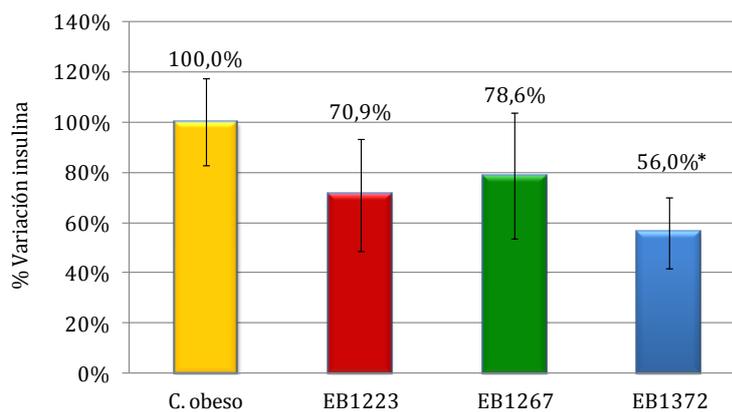


Figura 4.27. Concentración de insulina en plasma al finalizar la intervención. *Existen diferencias significativas respecto al control obeso ($p < 0,05$). Las barras de error corresponden al RSE.

b.3) Índice HOMA

La administración de extractos redujo los valores del índice HOMA en todos los grupos, siendo esta reducción significativa en los grupos de extractos EB1223 y EB1372 (Figura 4.28).

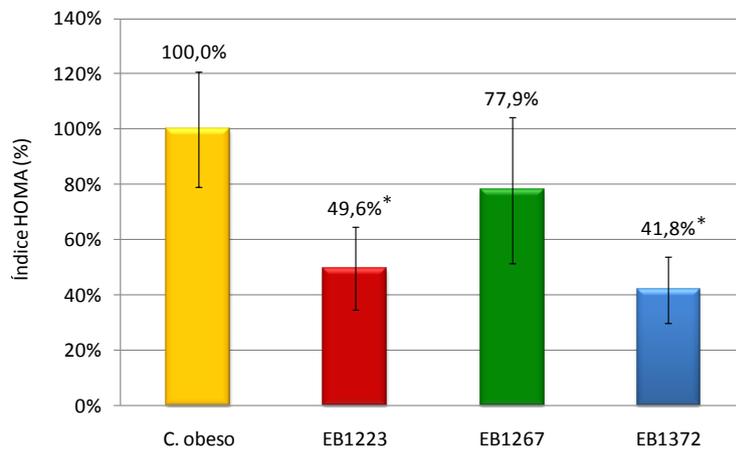


Figura 4.28. Variación del índice HOMA con respecto al control obeso *Existen diferencias significativas respecto al control obeso ($p < 0,05$). Las barras de error corresponden al RSE.

c) Regulación de la ingesta/saciedad

c.1) Leptina

Los niveles de leptina no se modificaron en ninguno de los grupos tratados con extractos presentando niveles similares al grupo control obeso (Figura 4.29).

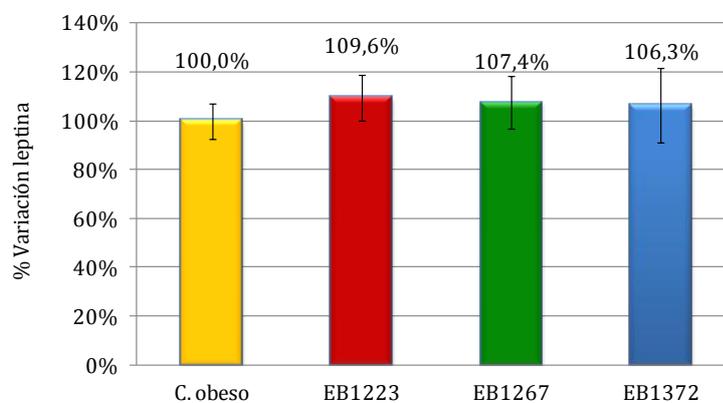


Figura 4.29. Concentración de leptina en plasma al finalizar la intervención. Las barras de error corresponden al RSE.

En la Tabla 4-17 se resumen los resultados obtenidos en este estudio y de cada uno de los extractos analizados. A partir de estos resultados se decidió seleccionar el extracto EB1223 para continuar evaluando y caracterizando su actividad ya que fue el extracto que destacaba más por su reducción de los niveles de lípidos plasmáticos y su reducción de la resistencia a la insulina con respecto al control obeso. El extracto EB1372 también redujo estos parámetros, en algunos de ellos de una forma más significativa. La limitación de tiempo y recursos para realizar los estudios presentados en esta memoria, nos obligaron a seleccionar solo uno de los dos extractos mencionados para un nuevo estudio en el modelo Zucker. El hecho de que el extracto EB1372 produjo una ganancia de peso que no se observó en el grupo del extracto EB1223, hicieron que nos decantáramos por este último extracto para realizar el nuevo estudio, sin descartar corroborar los resultados obtenidos con el extracto EB1372 en un futuro cercano.

Tabla 4-17. Estudio I en el modelo de ratas Zucker: Resumen de los resultados obtenidos.

Parámetros		Extracto			
		EB1223	EB1267	EB1372	
Morfológicas	Ingesta comida	=	=	=	
	Incremento peso	=	+	-	
	Concentración de TG en el tejido hepático	- (*)	-	-	
Bioquímicos	Lípidos plasmáticos	TG	+	=	+ (*)
		Colesterol total	=	-	+ (*)
		AGL	+ (*)	+	- (*)
	Metabolismo glucosa y resistencia a la insulina	Glucosa	+ (*)	=	+ (*)
		Insulina	+	+	+ (*)
		Índice HOMA	+ (*)	+	+ (*)
	Ingesta/saciedad	Leptina	=	=	=

(=) No existen diferencias. (+) El tratamiento mejora los niveles respecto al control obeso. (-) El tratamiento empeora los niveles respecto al control obeso. (*)Existen diferencias significativas entre el grupo y el control obeso ($p < 0,05$).

4.4.3. Evaluación del efecto del extracto EB1223 sobre la obesidad en ratas Zucker

La duración del segundo estudio llevado a cabo en ratas Zucker, y diseñado para confirmar los resultados obtenidos con el primer estudio, fue de 11 semanas. Los

animales se dividieron en tres grupos: grupo control delgado constituido por ratas heterocigotas (*Fa/fa*), grupo control obeso constituido por ratas homocigotas (*fa/fa*) y un tercer grupo de ratas obesas que recibió incluido en la dieta estándar el extracto EB1223 a una concentración de 20 g/Kg dieta (Tabla 4-18). Cada grupo estuvo constituido por entre 8-11 animales. El procedimiento seguido en este segundo estudio así como la preparación de las dietas fue similar al seguido durante el primer estudio.

Tabla 4-18. Estudio II en el modelo de ratas Zucker: distribución de animales por grupo de experimentación.

Grupo	Dieta	Nº animales	Fenotipo
Control no obeso	Estándar (st)	8	No obesas
Control obeso	Estándar (st)	10	Obesas
Extracto EB1223	St + 2% EB1223	11	Obesas

1. Parámetros nutricionales y morfológicos

a) Ingesta de comida y peso corporal

Durante el periodo de tiempo que duró el estudio, los animales tuvieron acceso libre a comida y agua, y cada semana se fue controlando la comida que ingerían y el peso que iba ganando cada rata. Con la recogida de estos datos se comprobó que la cantidad de comida que ingerían los animales obesos fue superior a la de los animales delgados, lo que confirma la hiperfagia que caracteriza a este modelo. Sin embargo, entre el grupo control obeso y el grupo que consumió extracto no se observaron diferencias significativas (Tabla 4-19).

Tabla 4-19. Estudio II en el modelo de ratas Zucker: Ingesta y peso corporal medio de los grupos de experimentación.

Grupo	Ingesta (g/rata/día)	Peso corporal inicial (g)	Peso corporal final (g)
Control no obeso	19,0 ± 0,5	319,9 ± 9,12	399,3 ± 11,11
Control obeso	23,3 ± 0,7	412,6 ± 9,63	514,7 ± 11,96
Extracto EB-1223	25,3 ± 1,2	409,2 ± 8,96	524,6 ± 14,14

El peso está expresado como media ± SEM.

Al comienzo del estudio, con 12 semanas de edad, las ratas obesas presentaban un peso medio un 29% mayor que las ratas no obesas (Tabla 4-19). Pasadas las 11 semanas del estudio, el incremento de peso en las ratas no obesas fue inferior al de los grupos de ratas obesas tal y como corresponde al modelo. No se observaron diferencias significativas entre el control obeso y el grupo que recibió el extracto EB1223 (Figura 4.30).

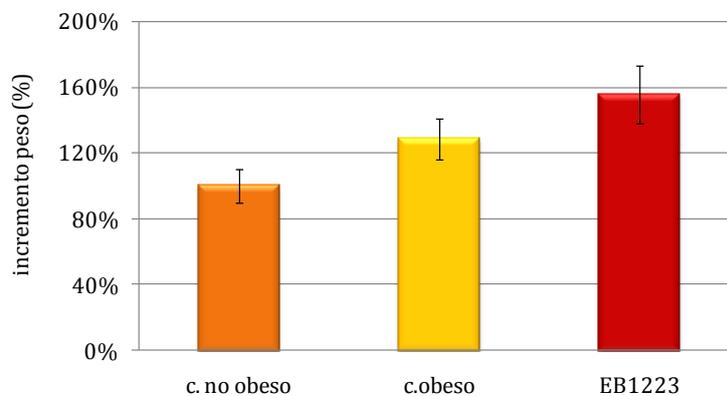


Figura 4.30. Incremento de peso al final de la intervención. Las barras de error corresponden al RSE.

b) Peso de la grasa

Después del sacrificio, se extrajo la grasa mesentérica, subcutánea, epididimal, visceral y retroperitoneal de cada uno de los animales. En este caso, y tras la experiencia adquirida en el primer estudio, la extracción de las muestras de grasa

mesentérica y retroperitoneal se realizó con especial atención, lo cual se reflejó en los datos válidos y representativos de estos tejidos que obtuvimos.

Tal y como se esperaba la cantidad de grasa extraída, de todos los tipos de tejido adiposo, fue siempre superior en las ratas de fenotipo obeso respecto a las ratas control delgado. Por otro lado, al igual que observamos en el primer estudio, la presencia del extracto EB1223 en el pienso no afectó a la acumulación de grasa en los animales (Tabla 4-20).

Tabla 4-20. Estudio II en el modelo de ratas Zucker: Peso de las muestras de grasa.

Grupo	Epididimal (g)	Visceral (g)	Subcutánea (g)	Mesentérica (g)	Retroperitoneal (g)
C. no obeso	2,54±0,29	0,11±0,04	5,93±0,49	2,10±0,24	0,29±0,03
C. obeso	5,83±0,37*	0,19±0,02*	42,88±1,42*	6,37±0,38*	1,82±0,18*
Ext EB-1223	7,12±0,44*	0,22±0,02*	42,67±1,90*	6,19±0,47*	1,61±0,14*

El peso está expresado en media ± SEM. *Existen diferencias significativas entre el grupo señalado y el control no obeso (p<0,05).

c) Peso de los órganos

Después del sacrificio de los animales, de nuevo, se procedió a la extracción de los siguientes órganos: hígado, corazón, bazo, colon y riñón. Los dos grupos de ratas obesas presentaron un incremento en el peso del hígado con respecto al grupo de ratas delgadas de un 60% aproximadamente, siendo este incremento similar en ambos grupos (control obeso y EB1223). En esta ocasión se observó un aumento en el peso del corazón respecto a las ratas del control no obeso tanto en las ratas control obesas como en las ratas obesas que recibieron el extracto. En el caso del peso del bazo, las ratas del control obeso incrementaron en un 14% el peso del mismo con respecto al control no obeso, mientras que las ratas alimentadas con extracto presentaron un incremento del 32% con respecto al control no obeso. No se observaron diferencias entre los grupos en los tamaños de colon y riñón.

Tabla 4-21. Estudio II en el modelo de ratas Zucker: Peso de los órganos extraídos.

Grupo	Hígado (g)	Corazón (g)	Bazo (g)	Colon (g)	Riñón (g)
C. no obeso	10,48±0,40	1,04±0,03	0,62±0,02	1,60±0,07	1,14±0,06
C. obeso	26,63±1,47*	1,25±0,03*	0,72±0,01*	1,82±0,09	1,31±0,08
Ext. EB1223	25,19±0,95*	1,32±0,05*	0,92±0,04*#	1,71±0,08	1,20±0,04

El peso está expresado en media \pm SEM. *Existen diferencias significativas entre el grupo señalado y el control no obeso ($p < 0,05$). #Existen diferencias significativas entre el grupo señalado y el control obeso ($p < 0,05$).

d) Contenido de triglicéridos en hígado

Una vez extraídos y cuantificados los ácidos grasos, en forma de triglicéridos, de una muestra de tejido hepático de cada uno de los animales, observamos que el consumo del extracto EB1223 produjo un incremento de TG en hígado del 73% con respecto al control obeso, aunque este incremento no resultó significativo (Figura 4.31).

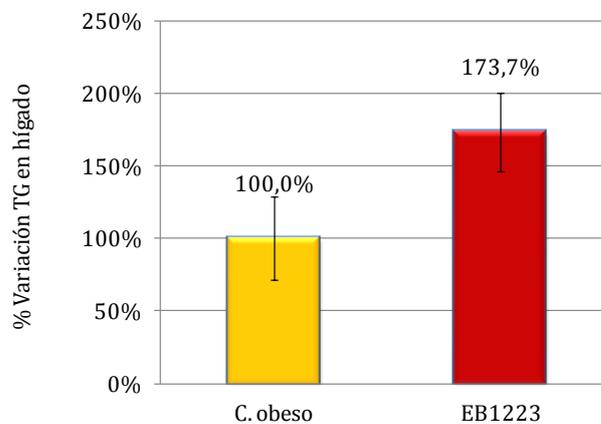


Figura 4.31. Concentración de TG en hígado al finalizar la intervención. Las barras de error corresponden al RSE.

2. Parámetros bioquímicos plasmáticos

Comprobación del modelo experimental elegido

En este experimento se analizaron de nuevo los parámetros bioquímicos relativos a la concentración de lípidos en plasma (triglicéridos, colesterol y ácidos grasos libres), los relacionados con el metabolismo de la glucosa (glucosa e insulina) y la concentración de leptina que presentaban las ratas del control no obeso y las del control obeso, observando de nuevo en todos los casos como las diferencias características de este modelo seguían presentes (Figura 4.32).

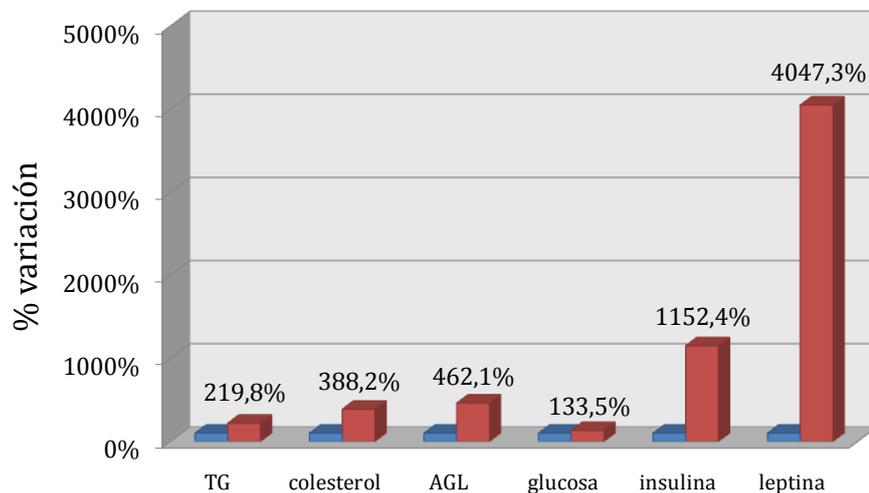


Figura 4.32. Comparación de los niveles plasmáticos de TG, colesterol, AGL, glucosa, insulina y leptina. ■ Grupo control no obeso ■ Grupo control obeso.

Además se determinó el valor del índice HOMA el cual, al igual que ocurrió en el experimento anterior, cuantificó la resistencia a insulina del grupo control obeso en forma de un valor HOMA superior en un 1500% al grupo control no obeso.

En cuanto al grupo de intervención con el extracto EB1223 a continuación se detallan los resultados obtenidos para cada uno de los parámetros medidos en plasma.

a) Lípidos plasmáticos

La dislipidemia se valoró mediante la determinación de la concentración de triglicéridos, colesterol total y AGL en plasma, además, se determinó la concentración de colesterol-HDL, a partir de una muestra de sangre obtenida el día del sacrificio de los animales.

a.1) Triglicéridos

La administración de extracto EB1223 no produjo diferencias significativas en los niveles de triglicéridos plasmáticos con respecto a las ratas del grupo control obeso (Figura 4.33).

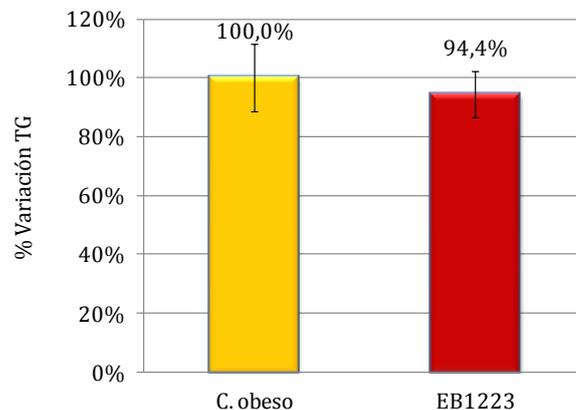


Figura 4.33. Concentración de triglicéridos en plasma al finalizar la intervención. Las barras de error corresponden al RSE.

a.2) Colesterol total

Los niveles de colesterol en plasma se vieron reducidos en el grupo de ratas obesas que consumieron el extracto EB1223 con respecto al grupo control obeso, aunque esta reducción no fue significativa (Figura 4.34-A).

a.3) Colesterol-HDL

En cuanto a los valores de los niveles de colesterol-HDL en plasma no se observaron diferencias entre grupo de ratas control obeso y el grupo que consumió el extracto EB1223 (Figura 4.34-B). Dado que los niveles de colesterol total se vieron reducidos

en el grupo que consumió el extracto EB1223 y los niveles de colesterol-HDL se mantuvieron constantes, se deduce una reducción en los niveles de colesterol-LDL.

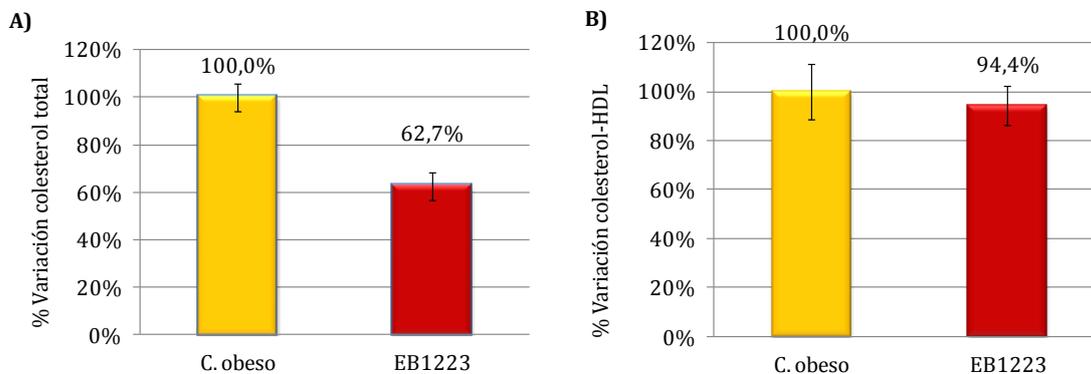


Figura 4.34. A) Concentración de colesterol en plasma al finalizar la intervención .B) Concentración de colesterol-HDL en plasma al finalizar la intervención. Las barras de error corresponden al RSE.

a.4) Ácidos grasos libres

La liberación de AGL desde el tejido adiposo suele aparecer incrementada durante la obesidad y es una característica de este modelo. Con el consumo de extracto EB1223 se observó una reducción de los niveles de AGL en plasma, aunque esta reducción no fue estadísticamente significativa (Figura 4.35).

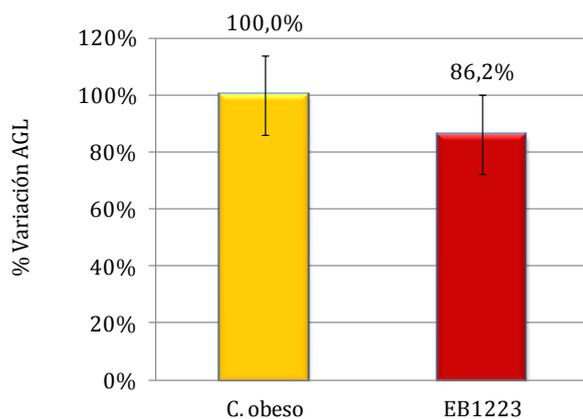


Figura 4.35. Concentración de AGL en plasma al finalizar la intervención. Las barras de error corresponden al RSE.

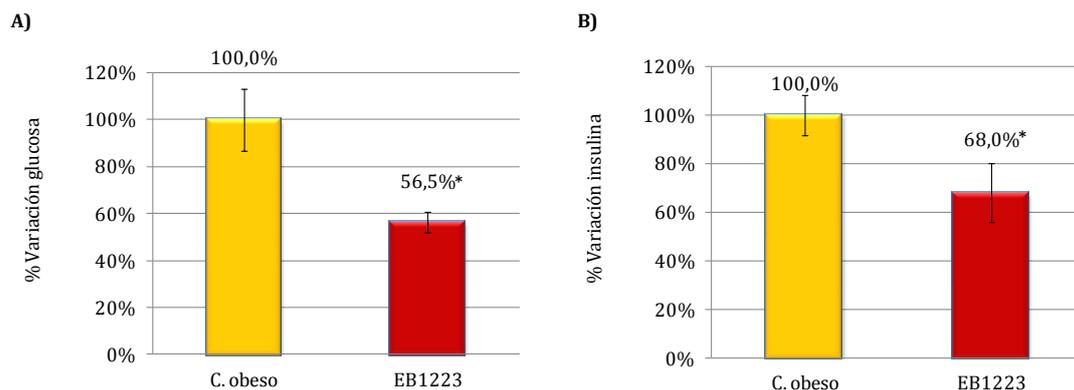
b) Parámetros relacionados con el metabolismo de la glucosa y la resistencia a la insulina

b.1) Glucosa

Las ratas alimentadas con el extracto EB1223 presentaron unos niveles de glucosa en sangre un 40% inferior al presentado por el grupo control obeso (Figura 4.36-A). Estos resultados coinciden con los obtenidos en el primer estudio con ratas Zucker.

b.2) Insulina

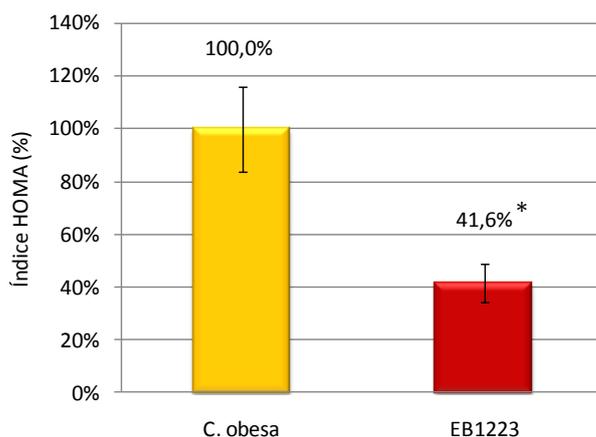
En los niveles de insulina en plasma se observó una reducción de un 30% aproximadamente en el grupo de ratas obesas que consumieron extracto con respecto al grupo control obeso (Figura 4.36-B), de forma análoga a lo que ocurría en el primer experimento con ratas Zucker.



*Figura 4.36. A) Concentración de glucosa en plasma al finalizar la intervención. B) Concentración de insulina en plasma al finalizar la intervención *Existen diferencias significativas respecto al control obeso ($p < 0,05$). Las barras de error corresponden al RSE.*

b.3) Índice HOMA

La administración del extracto EB1223 redujo de forma significativa los valores del índice HOMA, indicando una reducción de la resistencia a la insulina (Figura 4.37).



*Figura 4.37. Variación del índice HOMA con respecto al control obeso *Existen diferencias significativas respecto al control obeso ($p < 0,05$). Las barras de error corresponden al RSE.*

c) Regulación de la ingesta/saciedad

c.1) Leptina

En este experimento, al igual que ocurrió en el primero, tampoco se observó ninguna variación en los niveles de leptina en plasma entre los dos grupos de ratas obesas (Figura 4.38), de forma que este tratamiento no consigue reducir la hiperleptinemia característica de este modelo animal.

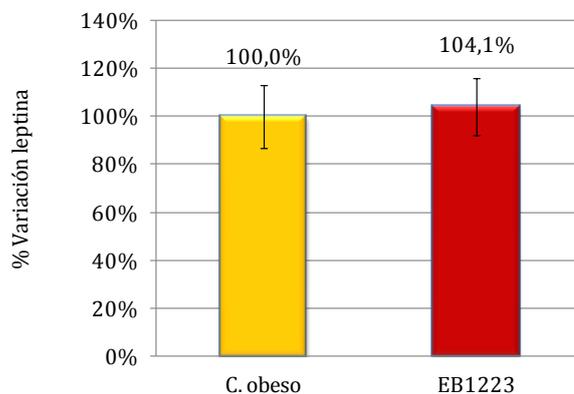


Figura 4.38. Concentración de leptina en plasma al finalizar la intervención. Las barras de error corresponden al RSE.

4.5. Ensayos a nivel molecular para analizar el efecto de los extractos utilizados en experimentación animal con ratas Zucker

Tanto los resultados en ensayos *in vitro* en células 3T3-L1, como los resultados obtenidos en los experimentos *in vivo* con ratas Zucker, revelaron que los extractos EB1223, EB1267 y EB1372 provocan una serie de respuestas fisiológicas que pueden estar relacionadas con su capacidad de inducir lipólisis. Decidimos, para tratar de dilucidar el mecanismo de acción, llevar a cabo ensayos a nivel molecular y disponer de una mayor información de los tres extractos para su posible aplicación en un futuro en el tratamiento de la obesidad en seres humanos.

4.5.1. Efecto de la adición de extractos sobre la concentración de AMPc

En la lipólisis, los triglicéridos son hidrolizados hasta ácidos grasos libres y glicerol. La regulación de este proceso depende de varios factores, y entre ellos es clave la concentración intracelular de AMPc: nucleótido que actúa como segundo mensajero en la cascada de activación de algunas enzimas involucradas en la hidrólisis de triglicéridos. La unión de ciertas hormonas (catecolaminas) a sus receptores en la membrana de los adipocitos, provoca la activación de la proteína G estimulante, lo que activa la enzima adenilato ciclasa. Esto provoca la síntesis de AMPc, el cual activa a la enzima PKA, la cual fosforila a la HSL y a la perilipina A, activando el proceso de lipólisis.

Detectar un incremento en la concentración de AMPc intracelular, provocado por los extractos seleccionados, sería una información que nos permitiría acotar la vía por la que estos extractos ejercen su actividad. Por esta razón, analizamos el contenido intracelular de AMPc en cultivos de células 3T3-L1, en presencia de los tres extractos y en las mismas condiciones en las que se realizaron los ensayos de inducción de lipólisis. Los resultados del ELISA competitivo realizado con este fin, revelaron que, tal y como se muestra en la Figura 4.39, los extractos EB1223 y EB1372 apenas produjeron diferencias en la concentración de AMPc con respecto al control. La incubación con el extracto EB1267 sí produjo un pequeño aumento en la concentración de la misma, si bien la cuantía de este incremento no nos permitió

concluir que el efecto lipolítico de este extracto sea mediado por un incremento en la concentración de este metabolito.

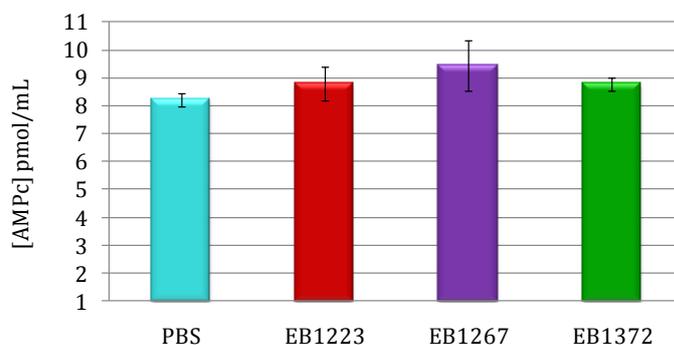


Figura 4.39. Concentración de AMPc en células 3T3-L1 diferenciadas, después de una incubación con extractos para inducir adipolisis. Las barras de error corresponden a SEM.

4.5.2. Efecto del tratamiento con el extracto EB1223 sobre la expresión de genes implicados en lipolisis

Los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* e *in vivo*, hasta el momento, han apuntado al extracto EB1223 como el extracto con una mayor probabilidad de ser efectivo en el tratamiento de la obesidad. Por esta razón, nuestros estudios de análisis de la modificación de la expresión génica, en adipocitos 3T3-L1 y ratas Zucker, se centraron en analizar el efecto que ejerce este extracto sobre diversos genes implicados en el proceso de lipolisis. Los genes seleccionados para este análisis fueron los que codifican Abhd5, Atgl, HSL, Perilipina A, aP2, LPL y leptina, utilizando como gen de control de expresión el gen de la β -actina.

Los análisis de expresión génica se llevaron a cabo con el ARN total obtenido en ensayos con células 3T3-L1 y con ARN total purificado del tejido adiposo subcutáneo de las ratas Zucker del segundo estudio en animales presentado en esta memoria. Para la obtención de muestras de ARN a partir de células 3T3-L1, éstas se

diferenciaron hasta adipocitos y, una vez diferenciadas, se incubaron durante 24 horas con un 1% (v/v) de extracto EB1223. Como controles negativos, se emplearon células diferenciadas a las que no se les añadió ningún extracto. Una vez confirmado el efecto lipolítico, se procedió a la purificación del ARN. La obtención de ARN de tejido adiposo se llevó a cabo a partir de las muestras de tejido subcutáneo, obtenidas de los animales el día del sacrificio y almacenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

Una vez realizada la purificación de ARN total de ambos tipos de muestras (células 3T3-L1 y tejido adiposo procedente de las ratas Zucker), y previamente a los procedimientos de retrotranscripción y qPCR, la integridad de dichas muestras de ARN fue evaluada mediante electroforesis capilar. En la Figura 4.40 y en la Figura 4.41 se muestra un ejemplo de los resultados obtenidos en dichas electroforesis, que indicaron que todas las muestras de ARN poseían grados de integridad superiores a los mínimos necesarios para realizar análisis de expresión génica mediante qPCR.

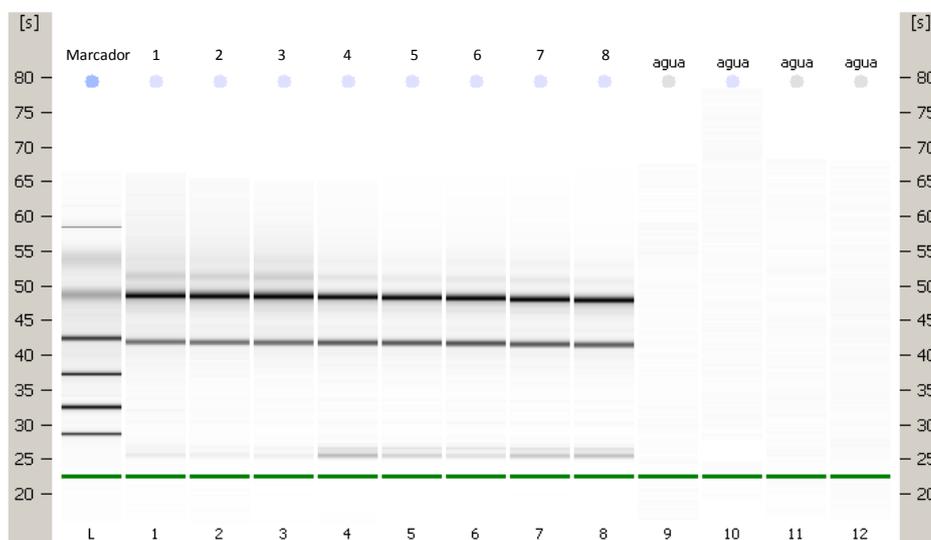


Figura 4.40. Resultados de la electroforesis capilar de adipocitos 3T3-L1. Carriles 1 a 4: muestras ARN procedentes de 3T3-L1 en presencia de extracto EB1223. Carriles 5 a 6: muestras de ARN procedentes de 3T3-L1 control.

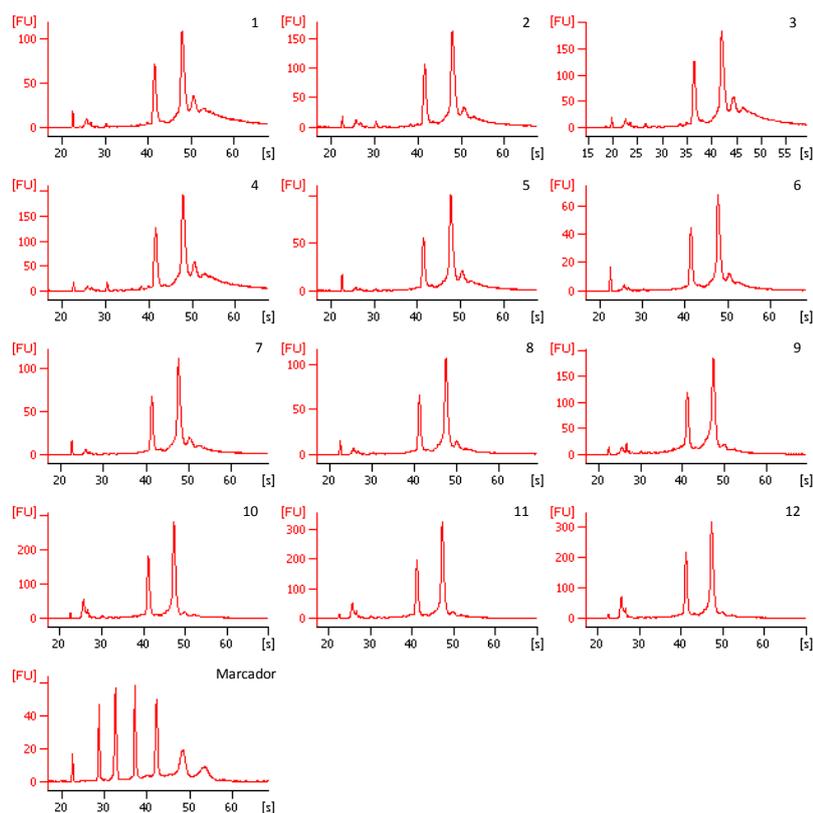


Figura 4.41. Electroferogramas obtenidos tras la migración en electroforesis capilar del ARN procedente de tejido adiposo. Muestras 1 a 6: ARN procedente de ratas obesas tratadas con extracto EB1223. Muestras 7 a 12: ARN procedente de ratas control obesas.

Una vez comprobada la calidad del ARN, se llevó a cabo la síntesis de ADNc, partiendo de 500 ng de ARN total en todos los casos, y empleando como cebadores de la reacción una mezcla de hexanucleótidos de secuencia aleatoria y olido d(T)₁₅. Como hemos mencionado previamente, el cálculo de la expresión génica relativa mediante el método del $\Delta\Delta C_t$, tiene como condición que la eficiencia de la amplificación del gen de referencia y del gen estudiado debe ser aproximadamente igual. Por esta razón, antes de llevar a cabo todos los análisis, calculamos la eficiencia de la amplificación, con los cebadores seleccionados, de cada uno de los genes que íbamos a estudiar, obteniendo como resultado las eficiencias mostradas en la Tabla 4-22.

Tabla 4-22. Eficiencias de la amplificación de los genes analizados en la PCR.

Gen	Eficiencia (%)
β -actina	96.9
Abhd5	104.6
Atgl	84.6
aP2	97
Hsl	96.3
Leptina	100.5
LPL	96.6
Perilipin A	98.3

El resultado de estos ensayos reveló que todas las reacciones de amplificación diseñadas presentaban eficiencias similares y cercanas al máximo teórico, por lo que pudimos continuar con los experimentos de cuantificación de expresión génica.

Una vez llevados a cabo los distintos ensayos de amplificación, y calculados y normalizados los valores de expresión mediante el procedimiento descrito por (Willems y col. 2008), observamos que, en aquellas muestras obtenidas de adipocitos 3T3-L1 no existían diferencias en la expresión de las lipasas Atgl y HSL entre las muestras control y las muestras con extracto EB1223. Sin embargo, en las mismas células, la expresión de Abhd5, perilipina A y aP2 aumentaba en las muestras incubadas con extracto con respecto a las muestras control sin extracto, siendo estas diferencias significativas en todos los casos ($p < 0,05$). Además, se observó que la expresión de LPL disminuía de forma significativa en los adipocitos incubados con extracto con respecto a las células control sin extracto (Figura 4.42 A). En el caso de la expresión de la leptina, se observó una disminución muy significativa de su expresión en las muestras obtenidas de cultivos celulares incubados con extracto (Figura 4.42 B).

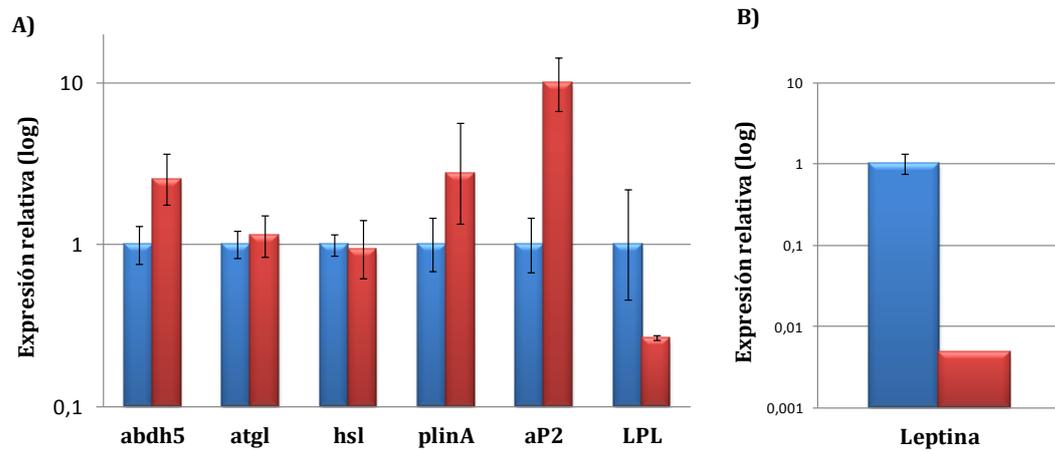


Figura 4.42. Expresión relativa de los genes (A) *Abhd5*, *Atgl*, *HSL*, *perilipina A*, *aP2* *LPL* y (B) *leptina* en el ensayo de adipolisis con el extracto EB1223 en células 3T3-L1. ■ Control sin extracto, ■ muestras con un 10% de extracto EB1223.

Al estudiar la expresión de los genes *Abhd5*, *Atgl*, *HSL*, *perilipina A*, *aP2*, *leptina* y *LPL*, en el tejido adiposo de ratas Zucker, sólo se obtuvieron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el grupo control obeso y el grupo alimentado con el extracto EB1223, en los valores de expresión de *Atgl* y *HSL*, los cuales aumentaron en el grupo alimentado con este extracto (Figura 4.43).

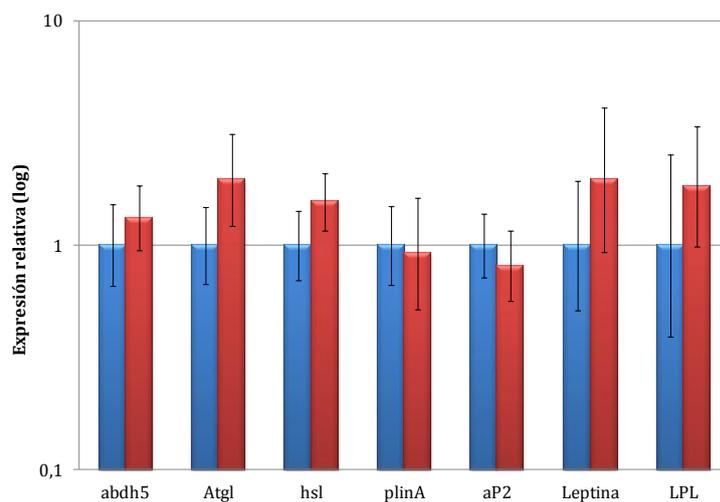


Figura 4.43. Expresión relativa de los genes *Abhd5*, *Atgl*, *HSL*, *perilipina A*, *aP*, *leptina* y *LPL* en el ensayo de adipolisis con el extracto EB1223 en ratas Zucker. ■ Ratas alimentadas sin extracto. ■ Ratas alimentadas con extracto.

4.5.3. Conclusiones de los ensayos a nivel molecular sobre el mecanismo de acción de los extractos utilizados en experimentación animal con ratas Zucker

Los resultados obtenidos en los ensayos a nivel molecular con los extractos utilizados en los experimentos con ratas Zucker, no nos permiten apuntar cual podría ser el mecanismo de acción de dichos extractos. Los valores de AMPc intracelular no difieren significativamente entre los cultivos de adipocitos tratados con extractos con respecto a los cultivos control.

Por otro lado, los resultados de expresión génica en adipocitos 3T3-L1 y tejido adiposo de rata Zucker no arrojaron datos similares. Debido a las distintas condiciones de ensayo (ensayo *in vitro*, tratamiento agudo y en ausencia de otros tejidos en el caso de los ensayos en células 3T3-L1, y ensayo *in vivo*, de mayor duración y teniendo en cuenta la influencia de otros tejidos en el caso de las ratas Zucker) no podemos decir que los resultados sean necesariamente contradictorios, pero, obviamente, no nos permiten tampoco definir el mecanismo de acción de los extractos ensayados.

Por todo lo mencionado, son necesarios más estudios con el fin de obtener más información para tratar de averiguar cómo los tres extractos estudiados en el modelo de rata Zucker son capaces de inducir, por un lado, la hidrólisis de triglicéridos en adipocitos 3T3-L1, y por otro, los efectos fisiológicos observados en los ensayos *in vivo*.

Capítulo 5. Discusión

Este capítulo recoge la discusión en la que se analiza el problema de la obesidad, sus consecuencias y la permanente necesidad de encontrar una estrategia con la que combatir su prevalencia. Además, se examinan los resultados obtenidos con los extractos naturales seleccionados como candidatos para el tratamiento y/o prevención de la obesidad, analizando los efectos derivados de su utilización.

La obesidad se reconoce como una de las grandes epidemias del siglo XXI. El incremento de su prevalencia plantea el riesgo de que en el año 2020 la población obesa sea mayor que la desnutrida por lo que actualmente se considera la obesidad como la mayor amenaza para la salud global, con múltiples repercusiones que suponen un problema social y de salud pública de primera magnitud, convirtiéndola en la principal enfermedad metabólica a nivel mundial.

La obesidad se define como un exceso de grasa corporal que se acumula en el tejido adiposo blanco. El crecimiento del tejido adiposo puede deberse a tres motivos: un incremento de la cantidad de lípidos acumulados en el interior de las células adiposas, la generación de nuevas células adiposas, o una combinación de ambos. En los humanos, aproximadamente un 10% de las células adiposas son renovadas cada año existiendo, en condiciones normales, un balance entre las células nuevas que se generan y las que mueren. En un individuo, el número total de células adiposas se mantiene constante, por lo que una reducción de peso va acompañada de una reducción de volumen de las células adiposas, pero no de su número (Arner 2010).

En la actualidad todavía no existe un tratamiento definitivo frente a la obesidad, siendo la dieta y el ejercicio los recursos más utilizados. Por esta razón, una de las estrategias empleadas para combatir el desarrollo de la obesidad es la producción de alimentos que ayuden al mantenimiento del peso corporal del consumidor o que puedan ayudar a reducirlo (Glandt y Raz 2011).

El objetivo de este trabajo de investigación se centra en la búsqueda de compuestos naturales que puedan ser utilizados para el tratamiento y/o prevención de la obesidad, interviniendo en algunos de los principales procesos metabólicos y celulares que se relacionan con el incremento de tejido adiposo.

Se plantearon así cuatro estrategias de trabajo en la búsqueda de nuevos compuestos activos frente a la obesidad. Por un lado, puesto que en la obesidad existe un desequilibrio entre el aporte de energía a través de la dieta y el gasto energético, se planteó una estrategia basada en la reducción de la absorción de grasas e hidratos de carbono procedentes de la dieta. Por otro lado se decidió incidir

sobre el tejido adiposo responsable del almacenamiento de la grasa en el organismo. En ese sentido se planteó la búsqueda de compuestos inhibidores de la diferenciación de los adipocitos que conllevaría a una reducción del número de células acumuladoras de lípidos en su interior. Por último, en esta misma línea, se ha trabajado en una cuarta estrategia destinada a reducir la cantidad de grasa almacenada en el tejido adiposo a través de la inducción de la hidrólisis de los triglicéridos acumulados en el interior de los adipocitos.

5.1. Búsqueda de inhibidores de la absorción de grasa

Como se ha comentado anteriormente, uno de los factores que más contribuyen al desarrollo de la obesidad es el exceso de energía que se ingiere en la dieta. Por esta razón, la inhibición de la actividad de la lipasa pancreática es uno de los mecanismos más utilizados para el tratamiento de la obesidad (Martins y col. 2010; de la Garza y col. 2011). La principal consecuencia de la inhibición de la actividad de la lipasa pancreática es la reducción de la hidrólisis de la grasa procedente de la dieta, lo que conduce a una reducción en su absorción en el intestino. En el Capítulo 1 se mencionó la existencia de un medicamento en el mercado basado en esta actividad denominado Orlistat. Este medicamento reduce en un 30% la absorción de la grasa lo cual se traduce, en tratamientos largos de mínimo 12 semanas de duración, en una reducción de peso corporal (Rossner y col. 2000; Hainer 2011; Jain y col. 2011). El Orlistat es a día de hoy el medicamento de elección en tratamientos de obesidad en los que el ejercicio y una dieta adecuada no han sido efectivos por sí solos. El principio activo de este medicamento fue originariamente aislado de un microorganismo (*Streptomyces toxytricini*) y posteriormente mejorado por síntesis química (Ioannides-Demos y col. 2011). De hecho se está trabajando con un nuevo compuesto (Cetilistat) que se encuentra en fase III de investigación clínica y que presenta mayor actividad, reduciendo además los efectos adversos (Kopelman y col. 2007; Padwal 2008; Kopelman y col. 2010).

Las plantas medicinales ofrecen ciertas ventajas frente a los medicamentos tales como menor coste, origen natural y un historial de uso que da garantías de seguridad. Por sus características ofrecen adicionalmente la posibilidad no sólo de

usarse en un tratamiento, como es el caso de los medicamentos, sino también como preventivos.

En el campo de la alimentación funcional, el uso de un inhibidor de la absorción de la grasa podría reducir la biodisponibilidad de la grasa de alimentos en los que, por sus características intrínsecas, la reducción o mejora de su perfil lipídico es difícil. La legislación no permite la introducción de Orlistat ni ningún otro medicamento en los alimentos, sin embargo, si permite la utilización de un compuesto de origen natural que sea de consumo habitual por humanos para poder incluirlo como ingrediente activo en una matriz alimentaria. Por tanto, no se trata únicamente de buscar un medicamento sustituto del Orlistat con actividad similar o mayor, sino de encontrar un compuesto natural que pueda ser incluido en alimentación o utilizado como suplemento nutricional y que induzca un efecto beneficioso en la prevención y/o tratamiento de la obesidad.

En nuestro laboratorio, la búsqueda de extractos que puedan ser utilizados como inhibidores de la absorción de grasa procedente de la dieta se llevó a cabo mediante un ensayo enzimático en el que se midió la actividad de la lipasa pancreática en presencia de cada uno de los extractos, tomando como control de referencia la inhibición producida por el Orlistat. De los 987 extractos analizados 17 extractos presentaron capacidad de inhibir la actividad de la enzima lipasa pancreática (Figura 4.4). Entre los extractos de plantas con actividad se encontraban *Betula alba*, *Betula pendula*, *Rheum palmatum*, *Thea sinensis* y *Vitis vinifera* los cuales han sido previamente descritos por otros autores como inhibidores de lipasa pancreática (Moreno y col. 2003; Nakai y col. 2005; Slanc y col. 2009; Zheng y col. 2010; de la Garza y col. 2011). Otros extractos con actividad inhibitoria identificados en nuestros ensayos pertenecen a las familias de plantas Asteraceae (*Silybum marianum*), Rosaceae (*Pygeum africanum*, *Potentilla tormentilla*) o Rubiaceae (*Uncaria tomentosa*). Estos extractos no han sido previamente descritos como inhibidores de lipasa, sin embargo, si se conoce la existencia de miembros de las mismas familias que presentan esta actividad (Sheng y col. 2006; Zhang y col. 2008; Moller y col. 2009; Slanc y col. 2009).

Los siete extractos con mejor actividad, alcanzando una actividad inhibitoria superior al 80% en nuestras condiciones de ensayo, fueron obtenidos de las plantas *Betula alba*, *Betula pendula*, *Cupressus sempervirens*, *Hamamelis virginiana*, *Krameria triandra*, *Tilia sp* y *Vitis vinifera*. Estos extractos, a excepción de los procedentes de *B. alba* y *C. sempervirens*, los cuales presentaron un valor CI50 de 1250 y 532,1 µg/mL respectivamente, presentaron valores CI50 comprendidos entre los 72,1 µg/mL de *V. vinifera* y los 16,1 µg/mL de *B. pendula* (Tabla 4-4). En nuestros ensayos, el Orlistat mostró una CI50 de 0,2 µg/mL. Los valores obtenidos con los extractos positivos fueron sensiblemente superiores al valor CI50 del Orlistat, sin embargo, nuestras muestras están formadas por mezclas de compuestos en las que la concentración del principio activo está por determinar. Por esta razón, los resultados obtenidos en nuestros ensayos *in vitro* resultaron prometedores en cuanto a la posibilidad de identificar extractos capaces de inhibir la absorción de lípidos, más aun, al observar los resultados obtenidos en otros ensayos similares, como los calculados con los extractos metanólicos de *Sapindus rarak* y *Kaempferia parviflora*, cuyos valores CI50 fueron 420 µg/mL y 487 µg/mL respectivamente (Morikawa y col. 2009; Shimada y col. 2011), el extracto etanólico de *Taraxacum officinale* (CI50 = 78,2 µg/mL) (Zhang y col. 2008), el extracto acuoso de *Gypsophila oldhamiana* (CI50 = 540 µg/mL) (Zheng y col. 2007) y el extracto acuoso de polifenoles del té negro (CI50 = 36,4 µg/mL), compuestos conocidos por su potente actividad como inhibidores de lipasa pancreática (Nakai y col. 2005; Uchiyama y col. 2011). Existen, sin embargo, datos de extractos con mejores resultados *in vitro*, como es el caso del extracto etanólico de *Morus bombycis* que presenta un valor CI50 de 2,07 µg/mL frente al valor CI50 de 0,076 µg/mL exhibido por el Orlistat en los ensayos realizados por Kim y col. (Kim y col. 2010b). Esta planta está muy extendida en Asia y ha sido utilizada en medicina tradicional por sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antibióticas y por su capacidad para reducir la hiperlipidemia. Además, en estudios con animales ha demostrado la capacidad de mejorar la hiperglicemia y la presión arterial (Heo y col. 2007; Jin y col. 2007; Oh y col. 2007).

Los cinco extractos con menor CI50, *B. pendula*, *H. virginiana*, *K. triandra*, *Tilia sp* y *V. vinifera*, fueron evaluados en un modelo *in vivo* para corroborar si la actividad

observada en el ensayo enzimático se mantenía en un sistema vivo. Se eligió un modelo animal en ratas Wistar que ha sido utilizado por otros autores para la evaluación de la absorción de grasa de la dieta. Se trata de un modelo sencillo que consiste en cuantificar en las heces la grasa no absorbida tras la administración del compuesto activo junto con la dieta. En este ensayo, comprobamos que el consumo de dos de los extractos analizados, *B. pendula* y *V. vinifera*, produjo una excreción de grasa en heces un 6% y 8% mayor a la que se producía en ausencia de extractos (Figura 4.19). Estos resultados son similares a los obtenidos por otros investigadores con los extractos acuosos de *Aesculus turbinata* y los polifenoles del té negro, los cuales produjeron aproximadamente un incremento del 10% de grasa en heces en sendos experimentos con ratones alimentados con dieta de cafetería complementada con un 2% y 5%, respectivamente, de estos extractos (Hu y col. 2008; Uchiyama y col. 2011).

La actividad inhibitoria detectada en los ensayos *in vitro* y confirmada en los ensayos *in vivo* del extracto de *B. pendula* puede deberse a su contenido en polifenoles como la luteolina y catequinas, compuestos presentes en esta especie vegetal (Keinänen y Julkunen-Tiitto 1998; Mammela 2001; Muilenburg y col. 2011) y de las cuales se ha descrito que tienen actividad inhibidora de lipasa pancreática (Nakai y col. 2005; Lee y col. 2010; Uchiyama y col. 2011). La betulina, triterpeno característico de esta especie posee también actividad inhibitoria (Jager y col. 2009; Sugimoto y col. 2009), sin embargo, el método de producción de los extractos empleados en nuestros estudios no facilita la extracción de este tipo de compuestos, hecho confirmado por el análisis cromatográfico realizado en nuestro laboratorio que reveló la no presencia de triterpenos en este extracto (resultados no mostrados). Por tanto, hasta que no finalicen los estudios del fraccionamiento del extracto de *B. pendula* que se están llevando a cabo en nuestro laboratorio, no podemos confirmar ni descartar que los polifenoles probablemente presentes en este extracto sean los principios activos responsables de su capacidad de inhibir la enzima lipasa pancreática.

En el caso de *V. vinifera*, se conoce su contenido en flavonoides (proantocianidinas, catequinas y ácido gálico) (Cefalu y col. 2008; Park y col. 2008;

Zhao y col. 2010). Como ya se ha comentado, las catequinas han demostrado en estudios anteriores, llevados a cabo sobre todo con extractos procedentes del té, una potente actividad inhibitoria de la lipasa. Por otro lado el ácido gálico procedente del extracto metanólico de *Rosmarinus officinalis* posee una potente actividad inhibidora de lipasa pancreática *in vitro* (Bustanji y col. 2010), al igual que las proantocianidinas de *Acacia Bark* (Kusano y col. 2011). Por tanto, en el caso de *V. vinifera*, pueden ser también distintos compuestos polifenólicos los responsables de la actividad biológica detectada.

Una vez demostrada la actividad de estos extractos en animales de experimentación el siguiente paso, fuera de los objetivos de esta tesis, deberá ser evaluar el efecto de dichos extractos en seres humanos, con objeto de comprobar su utilidad como ingrediente activo en el tratamiento de la obesidad o en el control del peso corporal. Diversos estudios en humanos, llevados a cabo con extractos que tienen actividad inhibidora de lipasa, demuestran un efecto beneficioso sobre la obesidad y parámetros relacionados (He y col. 2009). Sin embargo, debido a la complejidad en la composición de este tipo de productos y al elevado número de efectos beneficiosos descritos para los distintos principios activos (principalmente polifenólicos), es extremadamente difícil poder atribuir únicamente a la actividad inhibidora de la lipasa pancreática los efectos positivos observados en dichos estudios.

5.2. Búsqueda de inhibidores de la absorción de hidratos de carbono

La principal fuente de la energía que se ingiere con la dieta son los hidratos de carbono. Para poder ser absorbidos, los hidratos de carbono complejos deben ser previamente hidrolizados hasta azúcares simples, en cuyo proceso participa la enzima α -amilasa. Por esta razón, la inhibición de la actividad de esta enzima es otra de las estrategias utilizadas para el tratamiento de la obesidad (Tarling y col. 2008; Tundis y col. 2010). Como resultado de la inhibición de la actividad de la α -amilasa se produce una reducción de la absorción de los hidratos de carbono que no han sido hidrolizados, reduciendo los niveles de glucosa incrementados después de las comidas y retrasando el vaciado gástrico, lo que produce sensación de saciedad y

conduce a una reducción de la ingesta (Carai y col. 2009; Tucci y col. 2010). Existen en el mercado medicamentos, como Glucobay™ (con acarbosa) y Glyset™ (con miglitol), utilizados en el tratamiento de la diabetes tipo 2, los cuales retrasan la absorción de hidratos de carbono mediante la inhibición de la α -glucosidasa, enzima de la mucosa intestinal cuya función es la degradación de disacáridos, reduciendo de esta forma el incremento en los niveles de glucosa que se produce después de las comidas. Sin embargo, la utilización de estos medicamentos va acompañada de efectos secundarios como la inhibición de otras α -glucosidasas no digestivas (Tarling y col. 2008). Por esta razón, la inhibición de la α -amilasa se presenta como alternativa a un mecanismo inhibitorio de la absorción de hidratos de carbono sin que ello pueda afectar a otras glucosidasas del organismo.

Los inhibidores de enzimas α -amilasas de mamíferos forman parte de los mecanismos de defensa frente a depredadores de numerosas plantas, razón por la que, junto con unos menores efectos secundarios y un menor coste, las plantas medicinales son utilizadas para la búsqueda de inhibidores de dichas enzimas.

Existen estudios clínicos llevados a cabo con el producto *Phase 2 Carb Controller* (Pharmachem Laboratories, Kearny, NJ), el cual proviene del extracto acuoso de *Phaseolus vulgaris* y se comercializa como suplemento dietético, en los que se demuestra su actividad como reductor de la absorción de hidratos de carbono (Carai y col. 2009; Barrett y Udani 2011; El-Beshbishy y Bahashwan 2011).

En nuestro laboratorio, la búsqueda de extractos que puedan ser utilizados como inhibidores de la absorción de hidratos de carbono procedentes de la dieta se llevó a cabo mediante un método enzimático en el que se midió la actividad de la α -amilasa en presencia de cada uno de los extractos de nuestra colección, empleando como control de la inhibición la acarbosa, un oligosacárido con capacidad inhibitoria de α -amilasa utilizado en tratamientos para la diabetes. Entre los 987 extractos analizados que conforman nuestra colección de muestras, se destacaron los extractos metanólicos de *Helichrysum italicum*, *Helichrysum aernium*, *Citrus maxima* (pomelo) y *Rhodiola rosea* por ser aquellos que producían una inhibición superior al 50% de la actividad de la enzima y presentar unos valores de CI50 comprendidos entre los 12,5 $\mu\text{g/mL}$ de *Rhodiola* y los 234,5 $\mu\text{g/mL}$ del pomelo (*C.*

maxima) (Tabla 4-5), los cuales, aunque eran superiores al valor obtenido por la acarbosa (CI50= 4,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), indican el potencial inhibidor de dichos extractos. La capacidad inhibitoria de actividad α -amilasa de *R. rosea* ha sido anteriormente descrita (Kobayashi y col. 2003), sin embargo nuestros resultados mejoran los valores CI50 presentados por el extracto etanólico (CI50 = 173,4) y el acuoso (CI50 = 52,3) obtenidos por Kwon y col. (Kwon y col. 2006). Por otro lado, el extracto de *C. maxima* pertenece al género *Citrus*, del cual ha sido previamente descrita la capacidad inhibidora de α -amilasa de la especie *Citrus medica* (Menichini y col. 2011).

Los extractos de *H. italicum* y *H. aeranium* no han sido anteriormente descritos como inhibidores de α -amilasa, sin embargo, pertenecen a la familia Asteraceae de la que si se conoce la existencia de miembros que presentan dicha actividad, como *Centaurea centaurium L.* y *Senecio* (Conforti y col. 2006; Conforti y col. 2008).

Una vez seleccionados estos extractos, se analizó la capacidad inhibitoria de α -amilasa de los extractos comerciales procedentes de las mismas plantas, obteniendo en todos los casos unos valores de CI50 superiores a los obtenidos con los extractos de nuestra colección. Estos resultados pueden deberse a las diferencias en los métodos de extracción y secado, además de, en el caso de los tres extractos de Sol de Oro (*H. italicum*), las variaciones en la composición del extracto producidas por la variabilidad en los lotes de la materia prima (Figura 4.8).

Como se ha comentado en el Apartado 1.7, en el ser humano existen dos isoformas de α -amilasa, la salival y la pancreática, que participan en la digestión de los hidratos de carbono complejos. Por esta razón, se comprobó que los extractos seleccionados presentaban actividad inhibidora frente a las dos isoformas de enzima α -amilasa. Para ello, se llevó a cabo el mismo experimento midiendo la actividad de cada uno de los extractos frente a la enzima α -amilasa de saliva humana y la enzima α -amilasa pancreática porcina, comprobando que ésta era similar en ambos casos (Tabla 4-6) y determinando el valor CI50 en cada caso, lo que nos permite compararlos con los obtenidos por otros autores.

Los valores CI50 de los extractos comerciales de *Rhodiola*, pomelo y Sol de Oro (121,15 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 314,55 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 475,76 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente) frente a la actividad α -amilasa pancreática porcina mejoran los resultados obtenidos por otros autores frente a la misma enzima con los extractos acuosos de *Cinnamon*, *Ocimum basilicum* y *Gynura divaricata*, cuyos valores CI50 fueron 1230 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 42500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 1360 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente (Adisakwattana y col. 2011; El-Beshbishy y Bahashwan 2011; Wu y col. 2011) y el extracto etanólico de *Allium cepa L.* (CI50 > 3000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Kim y col. 2011b). Además, el extracto de *Rhodiola* mejora los resultados obtenidos por Tundis y col. con el extracto metanólico de *Senecio stabianus Lacaita* (CI50 = 290 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y su fracción rica en terpenos, la cual presentó un valor CI50 de 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Tundis y col. 2011). Existen referencias de otros extractos con mejores resultados en cuanto a CI50, como los obtenidos con los extractos de éter de petróleo, etil acetato y metanol de *Dioscorea bulbifera*, los cuales presentaron un valor CI50 comprendido entre 31,82 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 34,88 $\mu\text{g}/\text{mL}$, dependiendo del solvente y la parte de la planta (hoja o flor), y que han demostrado actividad antihiper glucémica en estudios con ratas Wistar (Ghosh y col. 2012). Por otro lado, el valor de CI50 calculado en nuestros ensayos para el extracto de *Rhodiola* de la colección de muestras, es significativamente inferior (12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), por lo que no se puede descartar que sea posible obtener un extracto de esta especie vegetal con mayor actividad inhibitoria que los descritos hasta ahora en la literatura científica.

Sobre los compuestos activos responsables de la actividad inhibitoria de α -amilasa, se conoce el contenido de flavonoides en el Helicriso (Facino y col. 1990) y *Rhodiola* (Staneva y col. 2009), en cuyas raíces también se encuentran proantocianidinas y derivados del ácido gálico (Panossian y col. 2010). Estos compuestos fenólicos son conocidos por interaccionar con algunas proteínas inhibiendo su actividad enzimática, como ocurre en el caso de la α -amilasa (El-Beshbishy y Bahashwan 2011; Johnson y col. 2011; Tsujita y col. 2011). Sin embargo, para identificar certeramente los compuestos responsables de la actividad, habría que llevar a cabo más estudios de fraccionamiento y análisis, sin descartar que puedan existir, en los extractos identificados, sustancias no polifenólicas responsables de la actividad inhibitoria de la enzima alfa-amilasa.

A pesar de los resultados positivos encontrados en nuestros experimentos *in vitro*, no cabe duda de que son necesarios estudios en seres humanos enfocados a evaluar un posible efecto beneficioso, de los tres extractos seleccionados, sobre los niveles de glucemia y el peso corporal. Estos estudios en seres humanos deberían ir precedidos en todo caso de ensayos *in vivo* con animales en los que analizar los parámetros citados, similares a los ya realizados por otros autores con los extractos de *Allium cepa*, *Dioscorea bulbifera*, *Diospyros kaki* y *Schizandra chinensis* (Ahmed y col. 2009; Kawakami y col. 2010; Jo y col. 2011; Kim y col. 2011b).

5.3. Búsqueda de inhibidores de la adipogénesis

La diferenciación de los adipocitos y la acumulación de grasa en su interior son hechos muy relacionados con el desarrollo de la obesidad, razón por la que la inhibición de la adipogénesis es una de las estrategias utilizadas en la búsqueda de compuestos para el tratamiento de la obesidad. Numerosos investigadores han seleccionado los extractos vegetales como fuente de compuestos naturales que interfieran en dicho proceso para el tratamiento de la obesidad (Hasani-Ranjbar y col. 2009; Jadeja y col. 2011; Kim y col. 2011a).

La búsqueda de extractos con capacidad inhibitoria de adipogénesis en nuestro laboratorio se llevó a cabo utilizando como modelo de estudio células 3T3-L1, un línea celular muy utilizada para el estudio de la diferenciación celular y el metabolismo de la obesidad (Kim y col. 2010a; Liu y col. 2011). De los 987 extractos analizados se seleccionaron 21 extractos por ser los que producían una mayor reducción del contenido de grasa intracelular, entre un 16 y un 53%, y una viabilidad superior al 70% (Figura 4.11).

Los principales factores de transcripción que intervienen en la diferenciación de los adipocitos son el factor de transcripción C/EBP α y PPAR γ , los cuales regulan la expresión de determinados genes característicos de los adipocitos, relacionados, un elevado número de ellos, con la capacidad de acumulación de grasa en el interior de la célula (Vijayakumar y col. 2010). El análisis de la expresión de estos dos genes, en nuestros ensayos con adipocitos 3T3-L1, reveló que siete de los 21 extractos

analizados produjeron una inhibición de ambos factores de transcripción, entre un 35 y un 95% de reducción de PPAR γ y un 21 y un 88% C/EBP α , resultados que indican que la inhibición de la acumulación de grasa intracelular producida por estos siete extractos se debe, al menos en parte, a la inhibición de la expresión génica de los factores de transcripción C/EBP α y PPAR γ . La inhibición de estos factores de transcripción se relaciona con una inhibición del transporte de ácidos grasos en el interior del adipocito y una inhibición de la síntesis de *novo* de ácidos grasos, y ha sido descrito como el posible mecanismo de acción para otros extractos vegetales con capacidad de inhibir la adipogénesis (Oben y col. 2008; Kubota y col. 2009; Suzuki y col. 2011).

El mecanismo por el cual los 14 extractos restantes inhiben la diferenciación de los adipocitos parece no estar relacionado con la alteración de la expresión de PPAR γ y C/EBP α . La inhibición de la adipogénesis inducida por estos extractos podría ser mediada por otras vías de señalización, como la vía de señalización Wnt/ β -catenina, cuya inhibición estimula la adipogénesis (Prestwich y Macdougald 2007), y la proteína quinasa p38, cuya fosforilación está implicada en la activación del factor de transcripción C/EBP β que participa en la diferenciación (Zhang y col. 2009). Por otro lado, existen proteínas cuya regulación puede estar mediada, además de a nivel de transcripción génica, por activación de una proenzima o inhibición por agentes inhibidores endógenos, como es el caso de las MMP (metaloproteinasas de la matriz) implicadas en la degradación de moléculas de la matriz celular y generación de factores bioactivos (Chavey y col. 2003).

Como se ha comentado anteriormente, los factores de transcripción C/EBP α y PPAR γ participan en la regulación de la expresión de genes específicos de adipocitos como el de la proteína de unión a ácidos grasos (aP2) y LPL (Figura 5.1) (Jadeja y col. 2011; Yim y col. 2011). Por este motivo, se analizó la expresión génica de estos dos genes en presencia de seis extractos (EB1000, EB1090, EB1100, EB1144, EB1277 Y EB1411) obteniendo como resultado una inhibición de la expresión de aP2 con los extractos EB1144, EB1000 y EB1277 y una inhibición de la expresión de ambos genes con el extracto EB1100 (Figura 4.14).

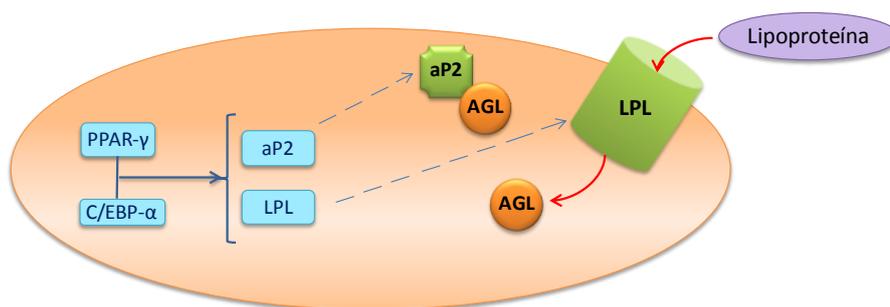


Figura 5.1. Regulación de la expresión de aP2 y LPL por PPAR γ y C/EBP α . La proteína aP2 transporta los AGL en el interior del adipocito y la proteína LPL hidroliza las lipoproteínas circulantes liberando los AGL al interior del adipocito. LPL: lipoproteína lipasa. AGL: ácidos grasos libres.

La proteína aP2 participa en el transporte y almacenamiento de ácidos grasos en el interior de los adipocitos (Juman y col. 2010) y una inhibición de su expresión se relaciona con una reducción en el tamaño de los adipocitos en estudios realizados *in vivo* (Tong y col. 2010). Por otro lado, la LPL es la proteína que interviene en la hidrólisis de las lipoproteínas circulantes para liberar los ácidos grasos que serán absorbidos por dichas células, participando en un proceso esencial para el almacenamiento y el correcto funcionamiento del metabolismo energético (Figura 5.1). Podríamos pensar que la inhibición de la acumulación de grasa intracelular inducida por los extractos EB1000, EB1100, EB1144 y EB1277 podría deberse a la reducción en la actividad de aP2 y LPL, mediada quizá por la represión de C/EBP α y PPAR γ , que se tradujera finalmente en una menor tasa de hidrólisis de TG extracelulares y/o transporte de los AGL al interior del adipocito. Sin embargo, la reducción de los niveles de expresión de C/EBP α y PPAR γ no se ha visto acompañada, en todos los extractos seleccionados, con una reducción en la expresión de aP2 y LPL. Únicamente los 4 extractos con menor nivel de expresión de C/EBP α (EB1000, EB1100, EB1144 y EB1277) exhibieron una reducción en la expresión de aP2, por lo que puede que sea la reducción en la expresión de C/EBP α lo que, en este caso, induzca una menor expresión de aP2. La complejidad de los mecanismos de regulación del proceso de diferenciación de adipocitos hace que sean necesarios más análisis, incluyendo cuantificación de las proteínas posiblemente implicadas y de su actividad biológica, para poder definir como los

extractos mencionamos reducen el contenido intracelular de grasa en adipocitos 3T3-L1.

Otros extractos seleccionados, capaces de reducir el contenido intracelular de grasa en adipocitos 3T3-L1, y cuyo nivel de expresión génica de C/EBP α y PPAR γ se vio alterado, no mostraron variaciones en la expresión de aP2 y LPL. Se trata de los extractos EB1090 y EB1411. En este caso, otros genes regulados por los factores de transcripción C/EBP α y PPAR γ como FAS (sintasa de ácidos grasos) (Wang y col. 2006; Zhou y col. 2007) podrían estar implicados en la actividad de estos extractos, siendo inhibida la acumulación de grasa en los adipocitos por una reducción en la síntesis *de novo* de ácidos grasos.

Analizando todos los resultados obtenidos, los extractos EB1100 y EB1000 destacaron por ser aquellos que, sin ser citotóxicos, presentaban mayor actividad inhibidora de adipogénesis, reflejada en una mayor reducción del contenido de grasa intracelular producida, posiblemente, por la inhibición de la expresión de los factores de transcripción C/EBP α y PPAR γ y los genes de las proteínas LPL y, en el caso del extracto EB1100, la proteína aP2. Los dos vegetales de los que proceden los extractos han sido descritos con anterioridad por ejercer algún efecto beneficioso sobre la salud. EB1100 se ha utilizado tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* para el tratamiento de los cálculos de riñón y vías urinarias, y EB1000 tiene propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, además de haberse descrito su potencial para el tratamiento de la enfermedad cardiovascular. Sin embargo, ninguno de los dos posee una historia de uso tradicional para combatir la obesidad o trastornos asociados.

Como vemos, son necesarios más estudios con los extractos EB1100 y EB1000, principalmente destinados a averiguar su modo de acción y, por otro lado, para evaluar su actividad en modelos animales de obesidad. Y una vez confirmada la actividad detectada en nuestros ensayos *in vitro*, tratar de identificar el o los principios activos responsables de dicha actividad, sin descartar que puedan tratarse de compuestos fenólicos y/o carotenoides, presentes en una gran cantidad de plantas, como algunos ya identificados por otros investigadores como inhibidores de la adipogénesis (Kim y col. 2010a; An y col. 2011; Yim y col. 2011).

5.4. Búsqueda de inductores de lipólisis

Como se ha comentado anteriormente, la acumulación de grasa en el interior de los adipocitos está muy relacionada con el desarrollo de la obesidad, razón por la que la inducción de la hidrólisis de esta grasa que se ha depositado en exceso es otra de las estrategias utilizadas en la búsqueda de compuestos para el tratamiento de la obesidad.

La búsqueda de extractos con capacidad inductora de lipólisis en nuestro laboratorio se llevó a cabo utilizando como modelo de estudio células 3T3-L1. Tras diversos ensayos que evaluaron la capacidad para inducir la hidrólisis de 987 muestras se seleccionaron siete extractos que presentaron mayor actividad lipolítica. Algunos de estos extractos, como EB1467 y EB1928, proceden de vegetales de los que se ha descrito su actividad lipolítica con anterioridad. Otros dos extractos, EB1910 y EB1372 procedían de la misma especie vegetal. Estos resultados, a pesar de reducir el número de muestras útiles, nos permitieron confirmar la validez de nuestro método experimental, y por lo tanto, tener una mayor certeza sobre la capacidad lipolítica de los cinco extractos finalmente seleccionados: EB1223, EB1267, EB1372, EB1467 y EB1497.

En las últimas décadas, se está investigando la actividad de un gran número de plantas como tratamiento frente a la obesidad y enfermedades relacionadas. Fruto de estos trabajos, se han identificado diversos extractos vegetales con capacidad lipolítica (Hsu y col. 2003; Tsujita y Takaku 2007; Sohle y col. 2009) así como algunas aminos de origen vegetal (sinefrina, octopamina) capaces de activar receptores β -adrenérgicos en adipocitos. En algunos casos, los ensayos *in vitro* han sido confirmados por resultados positivos en animales de experimentación (Yoshikawa y col. 2002; Lemaure y col. 2007). A pesar del gran número de programas de búsqueda de metabolitos vegetales con actividad contra la obesidad llevados a cabo, las especies vegetales utilizadas para la síntesis de los cinco extractos identificados como inductores de lipólisis en 3T3-L1 no disponen de referencias científicas que describan dicha actividad, o las que existen no profundizan en el estudio y la aplicación de estos extractos como posibles

tratamientos contra esta enfermedad. Además de los otros motivos mencionados previamente, la novedad de los resultados obtenidos en nuestros ensayos de búsqueda de extractos lipolíticos, nos hicieron seleccionar tres de los extractos identificados para nuestros ensayos en el modelo de obesidad basado en ratas Zucker.

El modelo de rata Zucker obesa (*fa/fa*), seleccionado para evaluar *in vivo* la actividad de los extractos con capacidad lipolítica, se caracteriza por presentar, además de obesidad, niveles elevados de lípidos en plasma (George y col. 2011), hiperinsulinemia e hiperleptinemia (Rivera y col. 2009; Fantini y col. 2011; Liepinsh y col. 2011). Los resultados de nuestros análisis, realizados en los dos estudios llevados a cabo con este modelo, se ajustaron a los valores esperados para este modelo, validando tanto el propio modelo como nuestros métodos analíticos.

La deficiencia en el receptor de leptina provocada por la mutación *fa* es el desencadenante de las características fenotípicas de este modelo. La elevada concentración de leptina plasmática, provocada por la resistencia a esta adipoquina, detectada en los grupos control obeso no fue modificada por el tratamiento con los tres extractos ensayados. Si bien, un resultado que indicara una mejora en esta disfunción hubiera sido deseable, no era un efecto que esperábamos observar. Además de la dificultad de revertir los trascendentes efectos metabólicos de esta mutación con una modificación de la dieta, también era de esperar que los niveles de leptina no fueran alterados, debido a que esta adipoquina es producida fundamentalmente por el tejido adiposo, siendo un buen marcador molecular de la cantidad de grasa corporal, y como hemos visto en los resultados de nuestros estudios, ninguno de los extractos analizados indujo una reducción en la grasa corporal de los animales tratados.

Otra de las características que acompaña a estos animales es una marcada hepatomegalia (Tovar y col. 2005; Rivera y col. 2009; Xu y col. 2009), acompañada de un elevado contenido de TG en este órgano (esteatosis hepática). Esta alteración también fue constatada en nuestros ensayos, en los que comprobamos un mayor peso del hígado y un mayor contenido en en todas las ratas obesas frente a las ratas delgadas. Los AG que se almacenan en el hígado en forma de TG proceden de tres

fuentes: los AGL plasmáticos, procedentes en su mayoría del tejido adiposo, restos de lipoproteínas (quilomicrones y VLDL) y en menor medida la lipogénesis *de novo* (Gibbons y col. 2000). La acumulación de lípidos en el hígado tiene lugar cuando la absorción de ácidos grasos del plasma por parte del hígado y la cantidad que sintetiza *de novo* es mayor que la secreción de VLDL (a partir de los TG) y la oxidación lipídica (Taskinen 2010) favorecida por la acción de la leptina. Por tanto, el contenido de lípidos en el hígado está relacionado con la resistencia a la leptina (Lee y col. 2001). En el caso de las ratas Zucker obesas, la lipogénesis como la oxidación lipídica son procesos que se encuentran alterados, debido a la mutación del receptor de esta hormona, favoreciéndose la acumulación de lípidos en el tejido hepático. La esteatosis hepática puede ser la causa de otra alteración característica de las ratas Zucker obesas observada en nuestros ensayos: la hipertrofia del bazo (Gutiérrez y Pavón 2002; Ruth y col. 2008). La administración de los tres extractos no mejoró ninguna de estas dos alteraciones relacionadas, siendo en el caso del extracto EB1372 ligeramente acentuada la hipertrofia del bazo. Este extracto fue el único que provocó un aumento significativo de ácidos grasos libres, que podría ser ocasionado por su capacidad lipolítica. En el caso de los otros dos extractos ensayados, su posible actividad lipolítica y liberación de ácidos grasos pudo verse compensada por una mayor absorción de dichas moléculas por parte del hígado, lo que favorecería la esteatosis hepática. Esta posibilidad puede verse respaldada por el mayor contenido de TG en hígado que mostraron las ratas obesas alimentadas con extracto EB1223.

Otros parámetros característicos de este modelo animal que mejoraron tras la administración de estos tres extractos fueron los relacionados con el metabolismo de la glucosa. La administración de los tres extractos estudiados mejoró los niveles de glucosa en sangre así como los niveles de insulina traduciéndose en la mejora de índice HOMA, índice que se utiliza para cuantificar la resistencia a insulina. Estas mejoras fueron más importantes en el caso de la administración de los extractos EB1223 y EB1372. Una posible explicación a estos resultados podrían sustentarse en la dislipemia que sufren las ratas Zucker. Debido a esta alteración, el músculo esquelético recibe un exceso de lípidos desde la circulación, incrementándose las concentraciones musculares de acil-CoA de cadena larga que pueden alterar el efecto

de la insulina sobre el metabolismo de la glucosa, posiblemente vía su conversión en diacilglicerol (DAG). El DAG activaría isoformas de las protein quinasa C (PKCs), dando como resultado una alteración en la fosforilación del IRS-1 y de la actividad PI3 quinasa, lo cual afectaría el transporte de la glucosa a través del mecanismo de translocación del transportador de glucosa GLUT-4 a la membrana celular y la fosforilación de enzimas tales como glucógeno sintetasa (Timmers y col. 2008). Además, los extractos EB1223 y EB1372 redujeron de manera importante los niveles de TG en sangre, lo que podría haber contribuido a prevenir el desarrollo de la resistencia a la insulina. Una mejora del metabolismo de la glucosa es importante en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la obesidad, como la diabetes tipo 2, razón por la que esta actividad de estos extractos merece ser destacada y estudiada en profundidad en el futuro para identificar correctamente el mecanismo de acción mediante el cual estos extractos ejercen dicho efecto.

Los resultados de los estudios del efecto de la presencia de los tres extractos en la dieta de ratas Zucker obesas, permitieron comprobar que la administración del extracto EB1267 redujo la ganancia de peso de los animales. Sin embargo, esta reducción no se pudo relacionar con una disminución en la acumulación de grasa en el tejido adiposo y sólo fue acompañada de una bajada del 24% de los AGL en plasma y un 21% de los niveles de insulina. La medida de la grasa acumulada se hizo por extracción de los tejidos grasos en diferentes localizaciones. Este método arroja datos con una gran variabilidad, por lo que no descartamos que otros métodos más precisos como la medida por bioimpedancia eléctrica o mediante tecnología de imagen, como la absorciometría de rayos X de doble energía (DXA) utilizada para determinar la grasa abdominal en ratas (Gerbaix y col. 2010), pudieran demostrar que el menor peso que adquirieron los animales alimentados con extracto EB1267 se debiera a una menor acumulación de grasa corporal. Este extracto también presentó actividad en los ensayos de inhibición de lipasa, por lo que no se puede descartar que la reducción de la ganancia de peso se deba, en parte, a su acción como inhibidor de la absorción de grasa procedente de la dieta.

La administración del extracto EB1372 no redujo la ganancia de peso, sin embargo sí redujo de forma significativa los niveles de TG y colesterol en plasma un

33% y 50%, respectivamente, mejorando los resultados obtenidos por otros investigadores con el resveratrol, un compuesto fenólico del que se conoce su actividad beneficiosa frente a enfermedades metabólicas, el cual redujo los niveles de TG y colesterol total un 32% y 30% respectivamente (Rivera y col. 2009). La dislipidemia, especialmente niveles elevados de colesterol, es un factor de riesgo de enfermedad cardiovascular por lo que esta actividad presentada por el extracto EB1372 puede tener un interés especial en el tratamiento y prevención de dicha enfermedad.

El fenómeno de la lipólisis libera ácidos grasos libres. En el caso de que estos ácidos grasos liberados no sean utilizados por el tejido muscular y otros tejidos, éstos se acumularían en músculos, hígado, etc, produciendo lipotoxicidad, que finalmente desencadena resistencia a la insulina (Rodríguez-Rodríguez y col. 2009). En el caso del extracto EB1372 se ha detectado un incremento en la concentración de ácidos grasos libres en sangre. Este hecho podría ser atribuido a un aumento de la actividad lipolítica que el extracto mostró en los ensayos *in vitro*. Una vía de inducción de la lipólisis se produce a través de la activación de la adenilato ciclasa, lo que conduce a un incremento del AMPc intracelular, el cual activa a la PKA que fosforila a la perilipina A y la HSL (Zhou y col. 2011), aunque los resultados de concentración de AMPc obtenidos en adipocitos incubados con este extracto no aportan ninguna aclaración sobre si la acción inductora de lipólisis de nuestro extracto está relacionada con esta vía de activación de la adenilato ciclasa. Debido a que el modelo animal con el que se ha trabajado implica la inactividad de los animales, el aumento de la actividad lipolítica produciría una mayor liberación de ácidos grasos libres que, debido a la falta de actividad física, no serían quemados en el músculo, provocando su acumulación. Es necesario estudiar si la administración del extracto en condiciones de actividad física mejoraría este parámetro al consumirse los ácidos grasos libres para la obtención de energía. Otra posibilidad a ser explorada es la administración conjunta del extracto lipolítico con un compuesto que incrementara la oxidación de la grasa, lo que mejoraría, probablemente, la eficacia del primer extracto.

La administración del extracto EB1223 tampoco redujo la ganancia de peso con respecto al control obeso pero, al igual que el extracto EB1372, mejoró el perfil lipídico reduciendo los niveles de TG (26% - 6%), AGL (32% - 14%) y colesterol total (7% - 37%) en plasma. La reducción de los niveles de colesterol total, unida a la conservación de unos niveles de colesterol-HDL similares al control obeso, se puede interpretar como una reducción de los niveles de colesterol-LDL, reconocidos como factor de riesgo cardiovascular (Sanchez-Muniz y Bastida 2008; Karanth y Jeevaratnam 2009). Este extracto produjo un incremento de TG en hígado. Como se ha comentado anteriormente, parte de los TG que se acumulan en el interior del hígado provienen de los AGL plasmáticos, los cuales proceden en su mayoría del tejido adiposo. El incremento en la acumulación de lípidos en el hígado que tiene lugar durante la administración de este extracto puede estar relacionado con un mecanismo de inhibición de la oxidación lipídica que se produce en dicho órgano, aunque nuestros resultados no permiten aclarar esta cuestión.

Una vez analizado el efecto *in vivo* de los tres extractos, se llevaron a cabo estudios de expresión génica mediante PCR cuantitativa para investigar el mecanismo de acción a nivel molecular. En estos ensayos se analizaron los efectos del tratamiento con el extracto EB1223 sobre la expresión de genes involucrados en hidrólisis de los TG acumulados tanto en los adipocitos del tejido adiposo de las ratas Zucker como en células 3T3-L1.

El tratamiento de células 3T3-L1 con el extracto EB1223 produjo un incremento de la expresión de Abhd5 y perilipina A, ambas enzimas implicadas en la activación de la Atgl (Granneman y col. 2009; Zhou y col. 2011), enzima que participa en la hidrólisis de TG, por lo que podría explicar una mayor actividad lipasa intracelular. También se observó incrementada la expresión de aP2, implicada en el transporte de ácidos grasos a través del citosol (que participaría en el transporte de los AGL liberados al medio extracelular) y se redujo la expresión de LPL, enzima responsable de la hidrólisis de TG circulantes, hecho lógico en condiciones celulares en las cuales habría un exceso de AGL. El descenso más significativo se produjo en la expresión de la leptina, hormona secretada en función a la cantidad de grasa acumulada, y por

tanto, explicable por un menor contenido intracelular de TG ocasionado por una mayor tasa de hidrólisis.

Al analizar los resultados obtenidos con los adipocitos del tejido adiposo de las ratas Zucker, se observa un incremento en la expresión de Atgl y HSL. La enzima Atgl cataliza el paso inicial en la hidrólisis de TG en el adipocito, produciendo diglicéridos (DG) y AGL; la enzima HSL es responsable de la hidrólisis de DG y, en menor cantidad, de TG. Ambas enzimas, junto con la enzima monoglicérido lipasa, participan de forma conjunta en la completa hidrólisis de los TG (Rodríguez y col. 2010; Watt y Spriet 2010). Estudios en ratones han demostrado que una reducción de la expresión de Atgl induce obesidad, mientras que el incremento de la misma está relacionado con el desarrollo de un fenotipo delgado reduciendo el contenido de TG en los adipocitos. Además, se ha descrito que mutaciones en el gen Atgl en humanos están relacionadas con defectos en la función del enzima y la consecuente acumulación de lípidos en diferentes tejidos (Liu y col. 2009; Watt y Spriet 2010). De esta forma, podríamos relacionar el incremento de la expresión de Atgl producido en las ratas Zucker tras la intervención con este extracto con una inducción de la hidrólisis de los TG acumulados en sus adipocitos. Sin embargo, no se puede asegurar que el incremento en la expresión de Atgl vaya acompañado del incremento de la expresión de dicha proteína, debido a la existencia de varios estudios cuyos resultados no concuerdan entre ellos. Mientras que en unos se relaciona la cantidad de ARNm con la cantidad de proteína, en otros se afirma que la cantidad de ARNm es irrelevante con respecto a la expresión de la proteína, y existen estudios en los que se reduce la cantidad de proteína mientras que se incrementa la cantidad de ARNm (Li y col. 2010). Se deberá analizar la concentración de esta proteína para confirmar el papel de Atgl en el efecto observado.

Al comparar estos resultados de expresión génica con los obtenidos después de una incubación de células 3T3-L1 con este extracto se observa que, en las células, la expresión de Atgl y HSL permanece al mismo nivel que en el control de células sin extracto. Estudios realizados en tejido adiposo de ratón han demostrado que los niveles de Atgl transcrito están relacionados con el estado metabólico del organismo

(Kim y col. 2006), razón por la que la expresión en células cultivadas *in vitro* puede diferir de aquella observada en los estudios *in vivo*. Además, las características de las ratas Zucker, con alteraciones significativas en los niveles de moléculas que afectan significativamente al proceso de lipólisis, como la insulina y la adiponectina por ejemplo, pueden alterar o enmascarar ciertas respuestas moleculares impidiendo corroborar los resultados obtenidos en un sistema *in vitro*.

Existe una enfermedad poco frecuente en humanos caracterizada por la acumulación de TG en tejidos diferentes del adiposo, como el hepático, cuyos individuos no son obesos ni desarrollan resistencia a la insulina. Esta enfermedad se conoce como miopatía por acúmulo de lípidos neutros (NLSDM), en cuyo caso existe la hipótesis de que una abundante expresión de Abhd5, un coactivador de Atgl, colabore en el mantenimiento de la actividad de Atgl (Zimmermann y col. 2009; Lu y col. 2010; Watt y Spriet 2010). La proteína Abhd5 participa en la hidrólisis de TG asociándose a la Atgl y provocando la completa activación de la misma. En condiciones basales, Abhd5 se encuentra unida a la Perilipina A, cuya fosforilación permite la liberación de la Abhd5 y la unión de ésta con la Atgl (Figura 5.2) (Miyoshi y col. 2008). En nuestros experimentos con ratas Zucker la expresión de Abhd5 aparece ligeramente incrementada, aunque este incremento no resultó significativo.

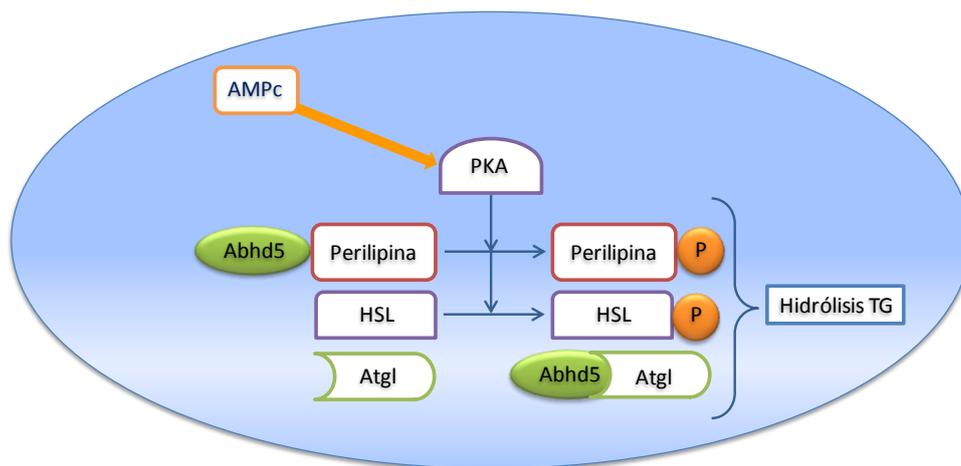


Figura 5.2. Activación de la PKA por el AMPc. La PKA activada fosforila a la HSL y la Perilipina A, liberando a la Abhd5 que se une a la Atgl completando su activación. La activación de estas tres enzimas conduce a la hidrólisis de TG.

Por otro lado, estudios con ratones deficientes en HSL demuestran que una reducción de la expresión de HSL, a pesar de producir una acumulación de DG en varios tejidos, reduce los niveles de AGL y no se asocia con el desarrollo de obesidad (Lu y col. 2010; Rodríguez y col. 2010). Este hecho plantea la hipótesis de que la reducción de HSL interfiera en la diferenciación de los adipocitos y/o acumulación de lípidos debido a la ausencia de productos liberados de los AGL producidos durante la lipólisis, los cuales actuarían como activadores de la expresión de PPAR γ , promoviendo la expresión de enzimas involucradas en la síntesis de TG (Shen y col. 2011). Por otro lado, también se conoce la actuación de PPAR γ como regulador de la expresión de Atgl (Chakrabarti y Kandror 2009; Li y col. 2010). Teniendo en cuenta estas observaciones, el incremento de la expresión de HSL observado en nuestros experimentos con ratas Zucker se asociaría al incremento de enzimas involucrados en la síntesis de TG, aunque reduciría los depósitos de DG producidos tras la hidrólisis de los TG, liberando glicerol y ácidos grasos, al tiempo que regularía la expresión de Atgl.

Existe una relación entre la insulina y la expresión de Atgl y HSL, llegando a considerar la reducción en la expresión de Atgl y HSL como uno de los efectos producidos por la resistencia a la insulina (Jocken y col. 2007), aunque existen otros autores que relacionan la resistencia a la insulina con un aumento de la expresión de Atgl (Steinberg y col. 2007). Nuestros experimentos confirman la relación entre la mejora de la resistencia a la insulina, manifestada como reducción del índice HOMA, con el incremento en los niveles de expresión de Atgl y HSL observados en los animales intervenidos con el extracto EB1223 con respecto al control, el cual presenta mayor resistencia a la insulina y una menor expresión de dichas enzimas.

La expresión de aP2, aunque no de forma significativa, presentaba una tendencia a ser reducida. Existen estudios que demuestran que ratones deficientes en aP2 parecen estar protegidos frente al desarrollo de resistencia a la insulina (Bastarrachea-Sosa y col. 2002b; Doege y Stahl 2006), alterando la absorción de ácidos grasos en los adipocitos y promoviendo su absorción en el tejido hepático. De esta forma, aunque la reducción en la expresión de aP2 en tejido adiposo no sea significativa, esta tendencia la podríamos relacionarla con el incremento de TG

acumulados en el tejido hepático de las ratas Zucker durante nuestro experimento. Por el contrario, la expresión de LPL tendía a incrementarse. La LPL es la enzima responsable de la hidrólisis de los triglicéridos circulantes tanto unidos a las lipoproteínas como los que van unidos a los quilomicrones y las VLDL. Se ha demostrado que una reducción en la actividad de la LPL conduce a una inhibición de la lipólisis de los quilomicrones y de las VLDL, lo que conduciría al desarrollo de una hipertrigliceridemia y la consecuente dislipidemia que puede observarse en el síndrome metabólico (Lim y col. 2009; Eu y col. 2010). Por esta razón, este incremento en la expresión de LPL que se observa en los resultados de PCR cuantitativa del tejido adiposo se considera como un efecto positivo, teniendo en cuenta que su actividad disminuye el riesgo de desarrollar hipertrigliceridemia. Además, debido a su actividad hidrolizando triglicéridos, la LPL juega un papel importante en el metabolismo del HDL, cuyos precursores adquieren los fosfolípidos y colesterol de los productos de la hidrólisis de triglicéridos así como de las membranas celulares (Pillarsetti y Saxena 2003).

Finalmente, aunque la concentración de leptina en plasma no se vio alterada tras el tratamiento con este extracto, su nivel de expresión en el tejido adiposo apenas se vio algo incrementado con respecto al control obeso, mientras que en las células 3T3-L1 la expresión de leptina si presentó un descenso muy marcado y significativo. Esta hormona es secretada por el tejido adiposo en relación a su contenido en grasa por lo que era de esperar su elevada expresión en las ratas Zucker, dado su alto contenido en grasa y la deficiencia que presentan en su receptor (Friedman 1999; Durazo y Capelini 2009; Li 2011; Maenhaut y Van de Voorde 2011). Dada la relación existente entre la cantidad de grasa y la secreción de leptina por parte del tejido adiposo, podemos suponer que la reducción de su expresión en las células 3T3-L1 esté relacionada con la reducción de su contenido en TG.

Analizando todos estos resultados de forma conjunta, consideramos que la dieta suplementada con el extracto EB1223 ejerce efectos claramente beneficiosos en un modelo animal de obesidad. Aunque la administración del extracto no produce la reducción de peso esperada sí que induce la mejora de las alteraciones del perfil lipídico y resistencia a la insulina, alteraciones típicamente asociadas a la obesidad y

que son las principales responsables de los problemas de salud relacionados con el exceso de peso.

Entre los principios activos que se relacionan con una reducción de la cantidad de grasa, además de mejorar los niveles de TG y colesterol plasmático, se encuentran varios polifenoles, como catequinas y proantocianidinas, de las cuales existen estudios en animales y humanos que demuestran sus propiedades beneficiosas (Nagao y col. 2007; Lee y col. 2008; Quesada y col. 2009). Actualmente se está trabajando en el fraccionamiento de dicho extracto con el fin de identificar el compuesto o compuestos activos responsable de la actividad del extracto.

·
·
·

Capítulo 6. Conclusiones

En este capítulo se sintetizan los resultados obtenidos durante este trabajo de investigación, destacando los extractos naturales con los que se han obtenido mejores resultados en cada uno de los ensayos realizados.

Tras el análisis de los resultados obtenidos durante la investigación que se describe en esta Tesis Doctoral se ha llegado a las siguientes conclusiones:

1. Los extractos de *Betula pendula* y *Vitis vinifera* presentan capacidad inhibitoria frente a la actividad de la enzima lipasa pancreática, como se ha demostrado tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*.
2. Los extractos de Rhodiola, Pomelo y Helicriso presentan en los ensayos realizados *in vitro* capacidad inhibitoria frente a la actividad alfa-amilasa que los convierte en candidatos adecuados para estudiar su capacidad de inhibir la absorción de hidratos de carbono en ensayos en animales.
3. Los extractos EB1000 y EB1100 presentan la capacidad de reducir la cantidad de grasa que se acumula en el interior de los adipocitos durante el proceso de diferenciación en los ensayos realizados *in vitro*, modificando el patrón de expresión de genes clave en el proceso de adipogénesis. Por esta razón, son candidatos adecuados para ensayar en modelos animales en etapas tempranas del desarrollo de la obesidad.
4. Los extractos EB1223 y EB1372 presentan capacidad inductora de lipólisis en los ensayos *in vitro*. Además, se ha demostrado en experimentos *in vivo* su capacidad como reductores de los niveles plasmáticos de lípidos y de glucosa e insulina, estos dos últimos relacionados con la resistencia a la insulina.
5. Todos los extractos seleccionados no han exhibido toxicidad ni en los ensayos celulares ni en los ensayos en animales realizados. Proviene, además, de especies vegetales con tradición de uso en alimentación y/o medicina tradicional. Por ello y por las actividades biológicas identificadas relacionadas con la lucha contra la obesidad, pueden ser herramientas potenciales para la preparación de suplementos o alimentos funcionales orientados al tratamiento y prevención de la obesidad.

Anexo I: Listado de muestras vegetales

Tabla I. Listado de muestras vegetales y solventes utilizados con cada una de ellas

<i>Muestra Vegetal</i>	<i>Solvente</i>		
	Agua	Hexano	Metanol
Abedul1	•	•	•
Abedul2	•	•	•
Abrojos	•	•	•
Abrotano macho	•	•	•
Achicoria	•	•	•
Achicoria planta	•	•	•
Aciano1	•	•	•
Aciano2	•	•	•
Acibar	•	•	•
Agrimonia	•	•	•
Agripalma	•	•	•
Ajedrea	•	•	•
Ajenjo	•	•	•
Ajenjo mayor	•	•	
Ajonjoli dorado	•	•	•
Albahaca	•	•	•
Alcachofa	•	•	•
Alcachofera	•	•	•
Alcachofera extra	•	•	•
Alcaravea	•	•	
Alchemilla	•	•	•
Alfalfa1	•	•	•
Alfalfa2	•	•	•
Algarrobo	•	•	•
Alholva	•	•	•
Alpiste	•	•	
Altea	•	•	•
Altea mondada	•	•	•
Amapola1	•	•	
Amapola2	•	•	•
Ambreta	•	•	•
Anemona pulsatilla	•	•	•
Angélica1	•	•	•
Angélica2	•	•	•
Angostura	•	•	•

Anís estrellado1	•	•	•
Anís estrellado2	•	•	•
Apio	•	•	•
Apio levisco	•	•	•
Arándano	•	•	•
Arenaria rubra	•	•	•
Arnica mexicana	•	•	•
Artemisa	•	•	•
Asperula olorosa	•		
Asperula olorosa		•	•
Assa foetida	•	•	•
Azahar	•	•	•
Bardana1	•		•
Bardana2	•	•	•
Benjui almendrado	•		
Benjui bloque	•	•	•
Betonica	•	•	•
Bistorta	•	•	•
Boldo	•		•
Bolsa Pastor	•	•	•
Borraja1	•	•	
Borraja2	•	•	•
Brezo	•	•	
Brusco	•	•	•
Brutonica	•	•	•
Buchu	•		
Buchu		•	•
Calabaza	•	•	•
Calaguala1	•	•	•
Calaguala2	•	•	•
Calamos	•	•	•
Calendula	•	•	•
Canela ceylan 5/0	•	•	•
Cantueso	•	•	•
Capuchina	•	•	•
Cardamomo	•	•	•
Cardo Mariano	•	•	•
Cardo Santo	•	•	•
Cartamo	•	•	
Carvi	•	•	•
Cáscara sagrada1	•	•	
Cáscara sagrada2	•		
Cáscara sagrada3	•	•	•
Cassia vera	•	•	•
Castaño de indias	•	•	•

Cayena	•	•	•
Celidonia	•	•	•
Centaurea menor	•	•	•
Centella	•	•	•
Cerezo	•	•	•
Cilantro	•	•	•
Ciprés	•	•	•
Citronela	•	•	•
Clavo	•	•	•
Coclearia	•	•	•
Cola caballo	•	•	•
Colombo	•	•	•
Combretum	•	•	•
Comino	•	•	•
Condurango1	•	•	•
Condurango2	•	•	•
Consuelda	•	•	•
Convalaria mayalis	•	•	•
Copalchi	•	•	•
Corazon de peña	•	•	•
Coriandros	•	•	•
Cornejo	•	•	•
Correhuela	•	•	•
Crataegus	•	•	•
Cuasia amara1	•	•	•
Cuasia amara2	•	•	•
Culantrillo	•	•	•
Curcuma	•	•	•
Damiana	•	•	•
Desmodium	•	•	•
Diente León1	•	•	•
Diente León2	•	•	•
Drosera	•	•	•
Drosera Madagascar	•	•	•
Dulcamara1	•	•	•
Dulcamara2	•	•	•
Echinacea	•	•	•
Eleuterococo1	•	•	•
Eleuterococo2	•	•	•
Encina	•	•	•
Eneldo semilla	•		
Eneldo semilla		•	•
Eneldo1	•	•	•
Eneldo2	•	•	•
Enula1	•	•	•

Enula2	•	•	•
Epilobo	•	•	•
Equinacea purpurea	•	•	•
Equisetum arvense	•	•	•
Erisimo	•	•	•
Escabiosa	•	•	•
Escaramujo1	•	•	•
Escaramujo2	•	•	•
Escutelaria	•	•	•
Esparraguera	•	•	•
Espino blanco	•	•	
Estevia	•	•	•
Estragon	•	•	•
Eucalipto	•	•	•
Eufrasia	•	•	•
Foixarda	•	•	•
Frambuesa	•	•	•
Frangula1	•	•	•
Frangula2	•	•	•
Fresa	•	•	•
Fresno	•	•	•
Fucus	•	•	•
Fumaria	•	•	•
Fuxarda	•	•	•
Galanga	•	•	•
Galega	•		
Galega		•	•
Galio	•	•	•
Gatuña	•	•	•
Gayuba	•	•	•
Genciana	•	•	•
Geranio	•	•	•
Ginkgo	•	•	•
Ginseng blanco	•	•	•
Girasol	•	•	•
Globularia	•	•	•
Glucomanano polvo	•	•	•
Goma incienso	•	•	•
Gordolobo	•	•	•
Gramma extra	•	•	•
Gramma1	•	•	•
Gramma2	•	•	•
Grindelia	•	•	•
Grosellero	•	•	•
Grosellero negro	•	•	•

Gymnema	•	•	•
Habas tonkas	•	•	•
Hamamelis	•	•	•
Harpagofito	•	•	•
Harpagophito	•	•	•
Helecho macho	•	•	•
Helenio	•	•	•
Helicriso italicum	•	•	•
Herniaria	•	•	•
Hibisco1	•	•	
Hibisco2	•	•	•
Hiedra	•	•	•
Hierba cuajo	•	•	•
Hierba luisa	•		
Hierba luisa hojas extra	•	•	•
Hierba mate	•	•	•
Hierba sepulcro	•	•	•
Hierbabuena	•	•	•
Higochumbo1	•	•	•
Higochumbo2	•	•	•
Hinojo semilla	•	•	•
Hinojo1	•	•	
Hinojo2	•	•	•
Hipérico	•	•	•
Hisopo	•	•	•
Ispaghul polvo	•	•	•
Ispagula	•	•	
Jara	•	•	
Jengibre	•	•	•
Jenjibre	•	•	•
Judias	•	•	•
Konjac	•	•	•
Lamium album	•	•	•
Laurel	•	•	•
Lavandin	•	•	•
Lepidium	•	•	•
Limon	•	•	•
Limón	•	•	•
Linaza	•	•	•
Linaza dorada	•	•	•
Lino	•	•	•
Liquen carraghaen	•	•	
Liquen de Pino	•	•	•
Liquen islandia	•	•	•
Liquen islandico	•	•	•

Lirio florencia	•	•	•
Llantén	•	•	•
Lúpulo	•	•	•
Macis	•	•	•
Macis flor Papua	•	•	•
Maiz	•	•	•
Malva1	•	•	•
Malva2	•	•	•
Malvavisco1	•	•	•
Malvavisco2		•	•
Manzanilla amarga	•	•	•
Manzanilla dulce	•	•	
Manzanilla Mahon	•	•	•
Manzanilla romana	•	•	•
María Luisa	•	•	•
Marrubio	•	•	•
Mejorana	•	•	•
Mejorana Hoja cultivada	•	•	•
Meliloto	•	•	•
Melisa1	•	•	•
Melisa2	•	•	•
Menta piperita1	•	•	•
Menta piperita2	•	•	•
Mijo	•	•	•
Milenrama flor	•	•	•
Milenrama1	•		
Milenrama2	•	•	•
Mirto	•	•	•
Moringa	•	•	•
Mostaza	•	•	•
Muérdago	•	•	•
Muirá puama	•		•
Naranja amarga cintas	•	•	•
Naranja Dulce	•	•	•
Naranja Verde	•	•	•
Naranjo1	•	•	•
Naranjo2	•	•	•
Nogal	•	•	•
Nuez de Cola	•	•	•
Nuez moscada	•	•	•
Nuez verde	•	•	•
Ñora	•	•	
Olivo	•	•	•
Oregano	•	•	•
Oregano chileno	•	•	•

Ortiga Blanca1	•	•	•
Ortiga Blanca2	•	•	•
Ortiga Verde	•	•	•
Ortosifon	•	•	•
Paliure	•	•	•
Paliure Frutos	•	•	•
Palo jabón	•	•	•
Parietaria	•	•	•
Pasionaria	•	•	•
Passiflora incarnata	•	•	•
Pau darco	•	•	•
Pau d'arco	•		
Pau d'arco		•	•
Pelitre	•	•	•
Perejil	•	•	•
Perifollo	•	•	•
Petasites	•	•	•
Pie de león	•	•	•
Pigeum	•	•	•
Pilosella	•	•	•
Pimentón dulce	•	•	•
Pimienta blanca	•	•	•
Pimienta jamaica	•	•	•
Pimienta negra	•	•	•
Pimienta verde	•	•	•
Pino	•	•	•
Pino Flor	•	•	•
Poleo	•	•	•
Poleo menta	•	•	•
Polipodio	•	•	
Pulmonaria	•	•	•
Pygeum africanum	•	•	•
Quina calisaya	•	•	•
Quina roja	•	•	•
Rábano negro	•	•	•
Rabo de gato	•	•	•
Ratania	•	•	•
Regaliz1	•	•	•
Regaliz2	•	•	•
Regaliz3	•	•	•
Reina de los prados	•	•	
Retama	•	•	•
Roble	•	•	•
Romaguera	•	•	•
Romero	•	•	•

Rompepiedra	•	•	•
Rosa	•		
Rosa Jericó	•	•	•
Rubia	•	•	•
Ruda	•	•	•
Ruibarbo1	•	•	
Ruibarbo2	•	•	•
Rusco	•	•	•
Sabal serulata	•	•	•
Salicaria	•	•	•
Salvia	•	•	•
Salvia sclarea	•		
Salvia sclarea		•	•
San Sepulcro	•	•	•
Saponaria	•	•	•
Sasafras	•	•	•
Sauce	•	•	•
Sauco	•	•	•
Scholtzia hierba	•	•	•
Sen1	•	•	•
Sen2	•	•	•
Serpol	•	•	•
Siempreviva	•	•	•
Siete Sangrías	•	•	•
Smilax médica	•	•	•
Soja	•	•	•
Solidago	•		
Solidago		•	•
Spirulina polvo	•	•	•
Tamarindo	•	•	•
Tanacetum partenium	•	•	•
Té de Roca	•	•	•
Té java	•	•	•
Té negro	•	•	•
Té rojo	•	•	•
Té verde	•	•	•
Tepezcohuite	•	•	•
Tila argentium	•	•	•
Tila carpentras	•	•	•
Tilo	•	•	•
Tilo rojo	•	•	•
Tomillo	•	•	
Tormentilla1	•	•	•
Tormentilla2	•	•	•
Travalera	•	•	•

Trébol de agua	•	•	•
Trigo1	•	•	•
Trigo2	•	•	•
Tusilago	•	•	•
Ulmaria	•	•	•
Unciana	•	•	•
Uña de gato1	•	•	•
Uña de gato2	•	•	•
Valeriana officinalis	•	•	•
Vara de oro	•	•	•
Verónica	•	•	•
Vid roja	•		
Vid roja		•	•
Vinca pervinca	•	•	•
Viola	•	•	•
Vitex agnus-castus	•	•	•
Yohimbre	•	•	•
Zahareña	•	•	•
Zaragatona	•	•	•
Zarzaparrilla Mexicana		•	•
Zedoaria	•	•	•

Bibliografía

- Adisakwattana, S., Lerdsuwankij, O., Poputtachai, U., Minipun, A. y Suparpprom, C. (2011). "Inhibitory activity of cinnamon bark species and their combination effect with acarbose against intestinal alpha-glucosidase and pancreatic alpha-amylase." *Plant Foods Hum Nutr* 66(2): 143-148.
- Ahmed, Z., Chishti, M. Z., Johri, R. K., Bhagat, A., Gupta, K. K. y Ram, G. (2009). "Antihyperglycemic and antidyslipidemic activity of aqueous extract of Dioscorea Bulbifera tubers." *Diabetologia Croatica* 38(3): 63-72.
- Ailhaud, G. y Hauner, H. (2004). Development of white adipose tissue. *Handbook of obesity. Etiology and pathophysiology*: 481-514.
- Akkrachiyasit, S., Yibchok-Anun, S., Wacharasindhu, S. y Adisakwattana, S. (2011). "In vitro inhibitory effects of cyanidin-3-rutinoside on pancreatic alpha-amylase and its combined effect with acarbose." *Molecules* 16(3): 2075-2083.
- Albright, A. y Stern, S. (1998). Adipose tissue. *Encyclopedia of sports medicine and science*. T. D. Fahey.
- Amini, Z., Boyd, B., Doucet, J., Ribnicky, D. M. y Stephens, J. M. (2009). "St. John's Wort inhibits adipocyte differentiation and induces insulin resistance in adipocytes." *Biochem Biophys Res Commun* 388(1): 146-149.
- An, Y., Zhang, Y., Li, C., Qian, Q., He, W. y Wang, T. (2011). "Inhibitory effects of flavonoids from Abelmoschus manihot flowers on triglyceride accumulation in 3T3-L1 adipocytes." *Fitoterapia* 82(4): 595-600.
- Aranceta, J., Foz, M., Gil, M., Jover, E., Mantilla, T., Millánd, J., Monereo, S. y Moreno, B. (2003). "Documento de consenso: obesidad y riesgo cardiovascular." *Clínica e investigación en Arteriosclerosis* 15(5): 196-233.
- Arner, P. (2010). "Turnover of human adipocytes. Mechanisms and clinical consequences." *Clínica e investigación en Arteriosclerosis* 22(2): 39-41.
- Arvidsson, E., Blomqvist, L. y Ryden, M. (2004). "Depot-specific differences in perilipin mRNA but not protein expression in obesity." *J Intern Med* 255(5): 595-601.
- Ballesteros Arribas, J. M., Dal-Ré Saavedra, M. A., Pérez Farinós, N. y Villar Villalba, C. (2007). "La estrategia para la nutrición, actividad física y prevención de la obesidad : estrategia NAOS." *Revista española de salud pública* 81(5): 443-449.

- Banegas, J. R., López-García, E., Gutiérrez-Fisac, J. L., Guallar-Castillón, P. y Rodríguez-Artalejo, F. (2003). "A simple estimate of mortality attributable to excess weight in the European Union." *European Journal of Clinical Nutrition* 57(2): 201-208.
- Barbany, M. y Foz, M. (2002). "Obesidad: concepto, clasificación y diagnóstico." *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* 25(1): 7-16.
- Barrett, M. L. y Udani, J. K. (2011). "A proprietary alpha-amylase inhibitor from white bean (*Phaseolus vulgaris*): a review of clinical studies on weight loss and glycemic control." *Nutr J* 10: 24.
- Bastarrachea-Sosa, R., Laviada-Molina, H. y Machado-Domínguez, I. (2002a). "Nutrigenómica y obesidad." *Revista de Endocrinología y Nutrición* 10(3): 128-134.
- Bastarrachea-Sosa, R., Laviada, H. y Machado-Domínguez, I. (2002b). "El eje adipopancreático: Hacia un nuevo enfoque terapéutico para prevenir la resistencia a la insulina y la diabetes tipo 2." *Revista de Endocrinología y Nutrición* 10(3): 128-134.
- Bastos, A. A., González Boto, R., Molinero González, O. y Salguero del Valle, A. (2005). "Obesidad, nutrición y actividad física." *Revista Internacional de Medicina y Ciencias de la Actividad Física y el Deporte* 5(18): 140-153.
- Becerra, A. (2005). "Concepto, criterios diagnósticos y epidemiología del síndrome metabólico." *Revista Española de Obesidad* 3: 7-16.
- Bello, N. T. y Liang, N. C. (2011). "The use of serotonergic drugs to treat obesity - is there any hope?" *Drug Des Devel Ther* 5: 95-109.
- Bergstrom, A., Pisani, P., Tenet, V., Wolk, A. y Adami, H. O. (2001). "Overweight as an avoidable cause of cancer in Europe. (vol 91, pg 421, 2001)." *International Journal of Cancer* 92(6): 927-927.
- Bligh, E. G. y Dyer, W. J. (1959). "A rapid method of total lipid extraction and purification." *Can J Biochem Physiol* 37(8): 911-917.
- Brownlee, I. A., Forster, D. J., Wilcox, M. D., Dettmar, P. W., Seal, C. J. y Pearson, J. P. (2010). "Physiological parameters governing the action of pancreatic lipase." *Nutr Res Rev* 23(1): 146-154.
- Bustanji, Y., Issa, A., Mohammad, M., Hudaib, M., Tawah, K., Alkhatib, H., Almasri, I. y Al-Khalidi, B. (2010). "Inhibition of hormone sensitive lipase and pancreatic lipase by *Rosmarinus officinalis* extract and selected phenolic constituents." *Journal of Medicinal Plants Research* 4(21): 2235-2242.
- Campion, J. y Martinez, J. A. (2004). "Ketoconazole, an antifungal agent, protects against adiposity induced by a cafeteria diet." *Horm Metab Res* 36(7): 485-491.
- Cao, H., Polansky, M. M. y Anderson, R. A. (2007). "Cinnamon extract and polyphenols affect the expression of tristetraprolin, insulin receptor, and

- glucose transporter 4 in mouse 3T3-L1 adipocytes." *Arch Biochem Biophys* 459(2): 214-222.
- Carai, M. A., Fantini, N., Loi, B., Colombo, G., Riva, A. y Morazzoni, P. (2009). "Potential efficacy of preparations derived from *Phaseolus vulgaris* in the control of appetite, energy intake, and carbohydrate metabolism." *Diabetes Metab Syndr Obes* 2: 145-153.
- Cattaneo, A., Monasta, L., Stamatakis, E., Lioret, S., Castetbon, K., Frenken, F., y col. (2010). "Overweight and obesity in infants and pre-school children in the European Union: a review of existing data." *Obes Rev* 11(5): 389-398.
- Cefalu, W. T., Ye, J., Zuberi, A., Ribnicky, D. M., Raskin, I., Liu, Z., Wang, Z. Q., Brantley, P. J., Howard, L. y Lefevre, M. (2008). "Botanicals and the metabolic syndrome." *Am J Clin Nutr* 87(2): 481S-487S.
- Clavijo, M. A., Gómez, D. y Gómez, C. (2007). "Adipogénesis in vitro de células 3T3-L1." *Revista Med* 15(2): 170-176.
- Comuzzie, A. G., Williams, J. T., Martin, L. J. y Blangero, J. (2001). "Searching for genes underlying normal variation in human adiposity." *J Mol Med* 79(1): 57-70.
- Conforti, F., Loizzo, M. R., Statti, G. A., Houghton, P. J. y Menichini, F. (2006). "Biological properties of different extracts of two *Senecio* species." *Int J Food Sci Nutr* 57(1-2): 1-8.
- Conforti, F., Menichini, F., Loizzo, M. R., Statti, A. G., Rapisarda, A. y Houghton, P. J. (2008). "Antioxidant, alpha-amylase inhibitory and brine-shrimp toxicity studies on *Centaurea centaurium* L. methanolic root extract." *Nat Prod Res* 22(16): 1457-1466.
- Corbatón Anchuelo, A. y Serrano Ríos, M. (2006). "Criterios de clasificación y significación clínica del síndrome metabólico." *Revista Clínica Española* 206(9): 447-450.
- Chakrabarti, P. y Kandror, K. V. (2009). "FoxO1 controls insulin-dependent adipose triglyceride lipase (ATGL) expression and lipolysis in adipocytes." *J Biol Chem* 284(20): 13296-13300.
- Chavey, C., Mari, B., Monthouel, M. N., Bonnafous, S., Anglard, P., Van Obberghen, E. y Tartare-Deckert, S. (2003). "Matrix metalloproteinases are differentially expressed in adipose tissue during obesity and modulate adipocyte differentiation." *J Biol Chem* 278(14): 11888-11896.
- Cho, E. J., Rahman, A., Kim, S. W., Baek, Y. M., Hwang, H. J., Oh, J. Y., Hwang, H. S., Lee, S. H. y Yun, J. W. (2008). "Chitosan oligosaccharides inhibit adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes." *Journal of Microbiology and Biotechnology* 18(1): 80-87.
- Chomczynski, P. y Sacchi, N. (2006). "The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on." *Nat Protoc* 1(2): 581-585.

- Christodoulides, C. y Vidal-Puig, A. (2010). "PPARs and adipocyte function." *Mol Cell Endocrinol* 318(1-2): 61-68.
- Chua, S. C., Jr., Chung, W. K., Wu-Peng, X. S., Zhang, Y., Liu, S. M., Tartaglia, L. y Leibel, R. L. (1996). "Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor." *Science* 271(5251): 994-996.
- Chun, M. R., Lee, Y. J., Kim, K. H., Kim, Y. W., Park, S. Y., Lee, K. M., Kim, J. Y. y Park, Y. K. (2010). "Differential effects of high-carbohydrate and high-fat diet composition on muscle insulin resistance in rats." *J Korean Med Sci* 25(7): 1053-1059.
- de la Garza, A. L., Milagro, F. I., Boque, N., Campion, J. y Martinez, J. A. (2011). "Natural inhibitors of pancreatic lipase as new players in obesity treatment." *Planta Med* 77(8): 773-785.
- Denizot, F. y Lang, R. (1986). "Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability." *J Immunol Methods* 89(2): 271-277.
- Dewanjee, S., Maiti, A., Sahu, R., Dua, T. K. y Mandal, V. (2009). "Effective Control of Type 2 Diabetes through Antioxidant Defense by Edible Fruits of *Diospyros peregrina*." *Evid Based Complement Alternat Med*.
- Doerge, H. y Stahl, A. (2006). "Protein-mediated fatty acid uptake: novel insights from in vivo models." *Physiology (Bethesda)* 21: 259-268.
- Ducharme, N. A. y Bickel, P. E. (2008). "Lipid droplets in lipogenesis and lipolysis." *Endocrinology* 149(3): 942-949.
- Durazo, Q. y Capelini, F. (2009). "Leptina y obesidad." *Revista Mexicana de Patología Clínica* 56(4): 262-264.
- El-Beshbishy, H. A. y Bahashwan, S. A. (2011). "Hypoglycemic effect of basil (*Ocimum basilicum*) aqueous extract is mediated through inhibition of α -glucosidase and α -amylase activities: An in vitro study." *Toxicol Ind Health*.
- Eu, C. H., Lim, W. Y., Ton, S. H. y bin Abdul Kadir, K. (2010). "Glycyrrhizic acid improved lipoprotein lipase expression, insulin sensitivity, serum lipid and lipid deposition in high-fat diet-induced obese rats." *Lipids Health Dis* 9: 81.
- European Food Safety Authority. (2011). "Guidance on the scientific requirements for health claims related to appetite ratings, weight management, and blood glucose concentrations." de <http://www.efsa.europa.eu/en/consultations/call/nda110426.pdf>.
- Facino, R. M., Carini, M., Franzoi, L., Pirola, O. y Bosisio, E. (1990). "Phytochemical characterization and radical scavenger activity of flavonoids from *Helichrysum italicum* G. Don (Compositae)." *Pharmacol Res* 22(6): 709-721.

- Fantini, N., Colombo, G., Giori, A., Riva, A., Morazzoni, P., Bombardelli, E. y Carai, M. A. (2011). "Evidence of glycemia-lowering effect by a *Cynara scolymus* L. extract in normal and obese rats." *Phytother Res* 25(3): 463-466.
- Ferrazzano, G. F., Amato, I., Ingenito, A., Zarrelli, A., Pinto, G. y Pollio, A. (2011). "Plant polyphenols and their anti-cariogenic properties: a review." *Molecules* 16(2): 1486-1507.
- Folch, J., Lees, M. y Sloane Stanley, G. H. (1957). "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues." *J Biol Chem* 226(1): 497-509.
- Friedman, J. M. (1999). "Leptin and the regulation of body weight." *Harvey Lect* 95: 107-136.
- Fu, W. J., Haynes, T. E., Kohli, R., Hu, J., Shi, W., Spencer, T. E., Carroll, R. J., Meininger, C. J. y Wu, G. (2005). "Dietary L-arginine supplementation reduces fat mass in Zucker diabetic fatty rats." *J Nutr* 135(4): 714-721.
- Furuyashiki, T., Nagayasu, H., Aoki, Y., Bessho, H., Hashimoto, T., Kanazawa, K. y Ashida, H. (2004). "Tea catechin suppresses adipocyte differentiation accompanied by down-regulation of PPARgamma2 and C/EBPalpha in 3T3-L1 cells." *Biosci Biotechnol Biochem* 68(11): 2353-2359.
- Gao, Y., Zhou, Y., Xu, A. y Wu, D. (2008). "Effects of an AMP-activated protein kinase inhibitor, compound C, on adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells." *Biol Pharm Bull* 31(9): 1716-1722.
- Garcia, A., Subramanian, V., Sekowski, A., Bhattacharyya, S., Love, M. W. y Brasaemle, D. L. (2004). "The amino and carboxyl termini of perilipin a facilitate the storage of triacylglycerols." *J Biol Chem* 279(9): 8409-8416.
- George, C., Lochner, A. y Huisamen, B. (2011). "The efficacy of *Prosopis glandulosa* as antidiabetic treatment in rat models of diabetes and insulin resistance." *J Ethnopharmacol* 137(1): 298-304.
- Gerbaix, M., Metz, L., Ringot, E. y Courteix, D. (2010). "Visceral fat mass determination in rodent: validation of dual-energy X-ray absorptiometry and anthropometric techniques in fat and lean rats." *Lipids Health Dis* 9: 140.
- Ghosh, S., Ahire, M., Patil, S., Jabgunde, A., Bhat Dusane, M., Joshi, B. N., Pardesi, K., Jachak, S., Dhavale, D. D. y Chopade, B. A. (2012). "Antidiabetic Activity of *Gnidia glauca* and *Dioscorea bulbifera*: Potent Amylase and Glucosidase Inhibitors." *Evid Based Complement Alternat Med* 2012: 929051.
- Gibbons, G. F., Islam, K. y Pease, R. J. (2000). "Mobilisation of triacylglycerol stores." *Biochim Biophys Acta* 1483(1): 37-57.
- Gibney, M. J., Macdonald, I. A., Roche, H. M. y Nutrition Society The (2006). *Nutrición y metabolismo*. Zaragoza, Acribia.
- Gil, A. (2002). "Obesidad y genes." *Vox Pediátrica* 10(2): 40-45.

- Gil Hernández, A. (2010). *Tratado de nutrición. Tomo 1, Bases Fisiológicas y Bioquímicas de la Nutrición*. Madrid [etc.], Panamericana.
- Giridharan, N. V. (1998). "Animal models of obesity & their usefulness in molecular approach to obesity." *Indian J Med Res* 108: 225-242.
- Glandt, M. y Raz, I. (2011). "Present and future: pharmacologic treatment of obesity." *J Obes* 2011: 636181.
- González Caballero, M. (2009). *Obesidad infantil: nutrición inteligente para tus hijos*. Alcalá la Real, Jaén, Formación Alcalá.
- Gooijert, K. E., Havinga, R., Oosterloo-Duinkerken, A. R., Venekamp-Hoolsema, E. E., Kuipers, F. y Verkade, H. J. (2007). "Stimulation of fecal fat excretion and the disposal of protoporphyrin in a murine model for erythropoietic protoporphyria." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293(2): G510-516.
- Goyenechea, E., Abete, I., Martínez-Urbistondo, D. y Alfredo Martínez, J. (2010). "Respuesta a la dieta en función del genotipo: hacia una nutrición personalizada en el obeso." *Clínica e investigación en Arteriosclerosis* 22(2): 10-13.
- Granneman, J. G., Moore, H. P., Granneman, R. L., Greenberg, A. S., Obin, M. S. y Zhu, Z. (2007). "Analysis of lipolytic protein trafficking and interactions in adipocytes." *J Biol Chem* 282(8): 5726-5735.
- Granneman, J. G., Moore, H. P., Krishnamoorthy, R. y Rathod, M. (2009). "Perilipin controls lipolysis by regulating the interactions of AB-hydrolase containing 5 (Abhd5) and adipose triglyceride lipase (Atgl)." *J Biol Chem* 284(50): 34538-34544.
- Greenspan, P., Mayer, E. P. y Fowler, S. D. (1985). "Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets." *J Cell Biol* 100(3): 965-973.
- Gregoire, F. M., Smas, C. M. y Sul, H. S. (1998). "Understanding adipocyte differentiation." *Physiological Reviews* 78(3): 783-809.
- Griera, J. L. (2005). "Obesidad y síndrome metabólico." *Revista Española de Obesidad* 3: 36-54.
- Grussu, D., Stewart, D. y McDougall, G. J. (2011). "Berry Polyphenols Inhibit alpha-Amylase in Vitro: Identifying Active Components in Rowanberry and Raspberry." *J Agric Food Chem*.
- Gutiérrez, C. y Pavón, M. P. (2002). Hepatosplenomegalia. *Protocolos diagnósticos y terapéuticos en pediatría*. Pfizer: 229-239.
- Hainer, V. (2011). "Comparative efficiency and safety of pharmacological approaches to the management of obesity." *Diabetes Care* 34 Suppl 2: S349-354.
- Han, L. K., Zheng, Y. N., Yoshikawa, M., Okuda, H. y Kimura, Y. (2005). "Anti-obesity effects of chikusetsusaponins isolated from *Panax japonicus* rhizomes." *BMC Complement Altern Med* 5: 9.

- Harmon, A. W. y Harp, J. B. (2001). "Differential effects of flavonoids on 3T3-L1 adipogenesis and lipolysis." *Am J Physiol Cell Physiol* 280(4): C807-813.
- Harmon, A. W., Patel, Y. M. y Harp, J. B. (2002). "Genistein inhibits CCAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBPbeta) activity and 3T3-L1 adipogenesis by increasing C/EBP homologous protein expression." *Biochem J* 367(Pt 1): 203-208.
- Hasani-Ranjbar, S., Nayebi, N., Larijani, B. y Abdollahi, M. (2009). "A systematic review of the efficacy and safety of herbal medicines used in the treatment of obesity." *World J Gastroenterol* 15(25): 3073-3085.
- Hauner, H. (2005). "Secretory factors from human adipose tissue and their functional role." *Proceedings of the Nutrition Society* 64(2): 163-169.
- He, R. R., Chen, L., Lin, B. H., Matsui, Y., Yao, X. S. y Kurihara, H. (2009). "Beneficial effects of oolong tea consumption on diet-induced overweight and obese subjects." *Chin J Integr Med* 15(1): 34-41.
- Heo, S. I., Jin, Y. S., Jung, M. J. y Wang, M. H. (2007). "Antidiabetic properties of 2,5-dihydroxy-4,3'-di(beta-D-glucopyranosyloxy)-trans-stilbene from mulberry (*Morus bombycis koidzumi*) root in streptozotocin-induced diabetic rats." *J Med Food* 10(4): 602-607.
- Hernán, C. (2002). "La obesidad: un desorden metabólico de alto riesgo para la salud." *Colombia Médica* 33(2): 72-80.
- Hernández, A., Morillas, C. y Solá, E. (2005). "Obesidad y diabetes mellitus." *Revista Española de Obesidad* 3: 55-60.
- Hira, T., Takahashi, K. y Hara, H. (2007). "Sucrose fatty acid esters suppress pancreatic secretion accompanied by peptide YY release in pancreatico-biliary diverted rats." *Exp Physiol* 92(4): 687-694.
- Hsu, C. L. y Yen, G. C. (2007). "Effects of flavonoids and phenolic acids on the inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes." *J Agric Food Chem* 55(21): 8404-8410.
- Hsu, H. K., Yang, Y. C., Hwang, J. H. y Hong, S. J. (2003). "Effects of *Toona sinensis* leaf extract on lipolysis in differentiated 3T3-L1 adipocytes." *Kaohsiung J Med Sci* 19(8): 385-390.
- Hu, J. N., Zhu, X. M., Han, L. K., Saito, M., Sun, Y. S., Yoshikawa, M., Kimura, Y. y Zheng, Y. N. (2008). "Anti-obesity effects of escins extracted from the seeds of *Aesculus turbinata* BLUME (Hippocastanaceae)." *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 56(1): 12-16.
- Hutley, L., Shurety, W., Newell, F., McGeary, R., Pelton, N., Grant, J., Herington, A., Cameron, D., Whitehead, J. y Prins, J. (2004). "Fibroblast growth factor 1 - A key regulator of human adipogenesis." *Diabetes* 53(12): 3097-3106.
- Instituto Nacional de Estadística, G. d. E. (2009). "Encuesta Europea de Salud en España." de <http://www.ine.es/prensa/np582.pdf>.

- Ioannides-Demos, L. L., Piccenna, L. y McNeil, J. J. (2011). "Pharmacotherapies for obesity: past, current, and future therapies." *J Obes* 2011: 179674.
- Iribarra, V., Germain, A., Cuevas, A., Faundez, L. y Valdes, G. (2000). "[Endothelial dysfunction as a primary disorder in vascular diseases]." *Rev Med Chil* 128(6): 659-670.
- Jadeja, R. N., Thounaojam, M. C., Ramani, U. V., Devkar, R. V. y Ramachandran, A. V. (2011). "Anti-obesity potential of *Clerodendron glandulosum*. Coleb leaf aqueous extract." *J Ethnopharmacol* 135(2): 338-343.
- Jager, S., Trojan, H., Kopp, T., Laszczyk, M. N. y Scheffler, A. (2009). "Pentacyclic triterpene distribution in various plants - rich sources for a new group of multi-potent plant extracts." *Molecules* 14(6): 2016-2031.
- Jain, S. S., Ramanand, S. J., Ramanand, J. B., Akat, P. B., Patwardhan, M. H. y Joshi, S. R. (2011). "Evaluation of efficacy and safety of orlistat in obese patients." *Indian J Endocrinol Metab* 15(2): 99-104.
- Jin, Y. S., Kim, M. K., Heo, S. I., Han, W. y Wang, M. H. (2007). "Identification and properties of 2,5-dihydroxy-4,3'-di(beta-D-glucopyranosyloxy)-trans-stilbene from *Morus bombycis* Koidzumi roots." *Phytother Res* 21(7): 605-608.
- Jo, S. H., Ha, K. S., Moon, K. S., Lee, O. H., Jang, H. D. y Kwon, Y. I. (2011). "In Vitro and in Vivo Anti-Hyperglycemic Effects of Omija (*Schizandra chinensis*) Fruit." *Int J Mol Sci* 12(2): 1359-1370.
- Jocken, J. W., Langin, D., Smit, E., Saris, W. H., Valle, C., Hul, G. B., Holm, C., Arner, P. y Blaak, E. E. (2007). "Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase protein expression is decreased in the obese insulin-resistant state." *J Clin Endocrinol Metab* 92(6): 2292-2299.
- Johnson, M. H., Lucius, A., Meyer, T. y de Mejia, E. G. (2011). "Cultivar evaluation and effect of fermentation on antioxidant capacity and in vitro inhibition of alpha-amylase and alpha-glucosidase by highbush blueberry (*Vaccinium corombosum*)." *J Agric Food Chem* 59(16): 8923-8930.
- Jones, P. y Papamandjaris, A. (2001). Lipids: Cellular metabolism. *Present Knowledge in Nutrition*. I. Press. Washington, International Life Sciences Institute: 101-114.
- Juman, S., Yasui, N., Okuda, H., Ueda, A., Negishi, H., Miki, T. y Ikeda, K. (2010). "Caffeic acid phenethyl ester inhibits differentiation to adipocytes in 3T3-L1 mouse fibroblasts." *Biol Pharm Bull* 33(9): 1484-1488.
- Karant, J. y Jeevaratnam, K. (2009). "Effect of dietary lipid, carnitine and exercise on lipid profile in rat blood, liver and muscle." *Indian J Exp Biol* 47(9): 748-753.
- Karnieli, E. y Armoni, M. (2008). "Transcriptional regulation of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 gene: from physiology to pathology." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295(1): E38-45.

- Kawakami, K., Aketa, S., Nakanami, M., Iizuka, S. y Hirayama, M. (2010). "Major water-soluble polyphenols, proanthocyanidins, in leaves of persimmon (*Diospyros kaki*) and their alpha-amylase inhibitory activity." *Biosci Biotechnol Biochem* 74(7): 1380-1385.
- Keinänen, M. y Julkunen-Tiitto, R. (1998). "High-performance liquid chromatographic determination of flavonoids in *Betula pendula* and *Betula pubescens* leaves." *Journal of Chromatography A* 793(2): 370-377.
- Kennedy, A. J., Ellacott, K. L., King, V. L. y Hasty, A. H. (2010). "Mouse models of the metabolic syndrome." *Dis Model Mech* 3(3-4): 156-166.
- Kershaw, E. E., Hamm, J. K., Verhagen, L. A., Peroni, O., Katic, M. y Flier, J. S. (2006). "Adipose triglyceride lipase: function, regulation by insulin, and comparison with adiponutrin." *Diabetes* 55(1): 148-157.
- Kim, C. K., Kim, M., Oh, S. D., Lee, S. M., Sun, B., Choi, G. S., Kim, S. K., Bae, H., Kang, C. y Min, B. I. (2011a). "Effects of *Atractylodes macrocephala* Koidzumi rhizome on 3T3-L1 adipogenesis and an animal model of obesity." *J Ethnopharmacol* 137(1): 396-402.
- Kim, E. J., Lee, H. I., Chung, K. J., Noh, Y. H., Ro, Y. y Koo, J. H. (2009). "The ginsenoside-Rb2 lowers cholesterol and triacylglycerol levels in 3T3-L1 adipocytes cultured under high cholesterol or fatty acids conditions." *BMB Rep* 42(4): 194-199.
- Kim, J., Lee, I., Seo, J., Jung, M., Kim, Y., Yim, N. y Bae, K. (2010a). "Vitexin, orientin and other flavonoids from *Spirodela polyrhiza* inhibit adipogenesis in 3T3-L1 cells." *Phytother Res* 24(10): 1543-1548.
- Kim, J. Y., Tillison, K., Lee, J. H., Rearick, D. A. y Smas, C. M. (2006). "The adipose tissue triglyceride lipase ATGL/PNPLA2 is downregulated by insulin and TNF-alpha in 3T3-L1 adipocytes and is a target for transactivation by PPARgamma." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291(1): E115-127.
- Kim, S. H., Jo, S. H., Kwon, Y. I. y Hwang, J. K. (2011b). "Effects of Onion (*Allium cepa* L.) Extract Administration on Intestinal alpha-Glucosidases Activities and Spikes in Postprandial Blood Glucose Levels in SD Rats Model." *Int J Mol Sci* 12(6): 3757-3769.
- Kim, Y. S., Lee, Y. M., Kim, H., Kim, J., Jang, D. S., Kim, J. H. y Kim, J. S. (2010b). "Anti-obesity effect of *Morus bombycis* root extract: anti-lipase activity and lipolytic effect." *Journal of Ethnopharmacology*.
- Kobayashi, K., Baba, E., Fushiya, S., Takano, F., Batkhuu, J., Dash, T., Sanchir, C. y Yoshizaki, F. (2003). "Screening of Mongolian plants for influence on amylase activity in mouse plasma and gastrointestinal tube." *Biol Pharm Bull* 26(7): 1045-1048.
- Kong, C. S., Kim, J. A. y Kim, S. K. (2009). "Anti-obesity effect of sulfated glucosamine by AMPK signal pathway in 3T3-L1 adipocytes." *Food Chem Toxicol* 47(10): 2401-2406.

- Kopelman, P., Bryson, A., Hickling, R., Rissanen, A., Rossner, S., Toubro, S. y Valensi, P. (2007). "Cetilistat (ATL-962), a novel lipase inhibitor: a 12-week randomized, placebo-controlled study of weight reduction in obese patients." *International Journal of Obesity* 31(3): 494-499.
- Kopelman, P., Groot, G. D., Rissanen, A., Rossner, S., Toubro, S., Palmer, R., Hallam, R., Bryson, A. y Hickling, R. I. (2010). "Weight Loss, HbA(1c) Reduction, and Tolerability of Cetilistat in a Randomized, Placebo-controlled Phase 2 Trial in Obese Diabetics: Comparison With Orlistat (Xenical)." *Obesity* 18(1): 108-115.
- Kopelman, P. G. (2000). "Obesity as a medical problem." *Nature* 404(6778): 635-643.
- Kovsan, J., Ben-Romano, R., Souza, S. C., Greenberg, A. S. y Rudich, A. (2007). "Regulation of adipocyte lipolysis by degradation of the perilipin protein: nelfinavir enhances lysosome-mediated perilipin proteolysis." *J Biol Chem* 282(30): 21704-21711.
- Kubota, H., Morii, R., Kojima-Yuasa, A., Huang, X., Yano, Y. y Matsui-Yuasa, I. (2009). "Effect of Zizyphus jujuba extract on the inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes." *Am J Chin Med* 37(3): 597-608.
- Kusano, R., Ogawa, S., Matsuo, Y., Tanaka, T., Yazaki, Y. y Kouno, I. (2011). "alpha-Amylase and Lipase Inhibitory Activity and Structural Characterization of Acacia Bark Proanthocyanidins." *J Nat Prod* 74(2): 119-128.
- Kwon, Y. I., Jang, H. D. y Shetty, K. (2006). "Evaluation of Rhodiola crenulata and Rhodiola rosea for management of type II diabetes and hypertension." *Asia Pac J Clin Nutr* 15(3): 425-432.
- Langin, D., Dicker, A., Tavernier, G., Hoffstedt, J., Mairal, A., Ryden, M., Arner, E., Sicard, A., Jenkins, C. M., Viguerie, N., van Harmelen, V., Gross, R. W., Holm, C. y Arner, P. (2005). "Adipocyte lipases and defect of lipolysis in human obesity." *Diabetes* 54(11): 3190-3197.
- Laurent-Winter, C., Dugail, I., Quignard-Boulangé, A., Le Liepvre, X. y Lavau, M. (1992). "Differential polypeptide expression in adipose tissue of lean and obese Zucker rats. Evidence of specifically repressed peptides in 7-day-old pre-obese rats." *Biochem J* 284 (Pt 3): 813-817.
- Lavie, C. J., Milani, R. V. y Ventura, H. O. (2009). "Obesity and cardiovascular disease: risk factor, paradox, and impact of weight loss." *J Am Coll Cardiol* 53(21): 1925-1932.
- Lee, E. M., Lee, S. S., Chung, B. Y., Cho, J. Y., Lee, I. C., Ahn, S. R., Jang, S. J. y Kim, T. H. (2010). "Pancreatic lipase inhibition by C-glycosidic flavones Isolated from Eremochloa ophiuroides." *Molecules* 15(11): 8251-8259.
- Lee, Y., Wang, M. Y., Kakuma, T., Wang, Z. W., Babcock, E., McCorkle, K., Higa, M., Zhou, Y. T. y Unger, R. H. (2001). "Liporegulation in diet-induced obesity. The antisteatotic role of hyperleptinemia." *J Biol Chem* 276(8): 5629-5635.

- Lee, Y. J., Chung, H. Y., Kwak, H. K. y Yoon, S. (2008). "The effects of *A. senticosus* supplementation on serum lipid profiles, biomarkers of oxidative stress, and lymphocyte DNA damage in postmenopausal women." *Biochem Biophys Res Commun* 375(1): 44-48.
- Lemaure, B., Touche, A., Zbinden, I., Moulin, J., Courtois, D., Mace, K. y Darimont, C. (2007). "Administration of *Cyperus rotundus* tubers extract prevents weight gain in obese Zucker rats." *Phytother Res* 21(8): 724-730.
- Li, J., Yu, X., Pan, W. y Unger, R. H. (2002). "Gene expression profile of rat adipose tissue at the onset of high-fat-diet obesity." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282(6): E1334-1341.
- Li, M. D. (2011). "Leptin and beyond: an odyssey to the central control of body weight." *Yale J Biol Med* 84(1): 1-7.
- Li, Y. C., Zheng, X. L., Liu, B. T. y Yang, G. S. (2010). "Regulation of ATGL expression mediated by leptin in vitro in porcine adipocyte lipolysis." *Mol Cell Biochem* 333(1-2): 121-128.
- Liepinsh, E., Skapare, E., Svalbe, B., Makrecka, M., Cirule, H. y Dambrova, M. (2011). "Anti-diabetic effects of mildronate alone or in combination with metformin in obese Zucker rats." *Eur J Pharmacol* 658(2-3): 277-283.
- Lim, W. Y., Chia, Y. Y., Liong, S. Y., Ton, S. H., Kadir, K. A. y Husain, S. N. (2009). "Lipoprotein lipase expression, serum lipid and tissue lipid deposition in orally-administered glycyrrhizic acid-treated rats." *Lipids Health Dis* 8: 31.
- Lin, F. T. y Lane, M. D. (1992). "Antisense CCAAT/enhancer-binding protein RNA suppresses coordinate gene expression and triglyceride accumulation during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes." *Genes Dev* 6(4): 533-544.
- Lin, F. T. y Lane, M. D. (1994). "CCAAT/enhancer binding protein alpha is sufficient to initiate the 3T3-L1 adipocyte differentiation program." *Proc Natl Acad Sci USA* 91(19): 8757-8761.
- Liu, L. F., Purushotham, A., Wendel, A. A., Koba, K., DeIuliis, J., Lee, K. y Belury, M. A. (2009). "Regulation of adipose triglyceride lipase by rosiglitazone." *Diabetes Obes Metab* 11(2): 131-142.
- Liu, Q., Zhang, X. L., Tao, R. Y., Niu, Y. J., Chen, X. G., Tian, J. Y. y Ye, F. (2011). "Rhein, an inhibitor of adipocyte differentiation and adipogenesis." *J Asian Nat Prod Res* 13(8): 714-723.
- Londos, C. (2004). Hormone-Sensitive Lipase, Perilipins, and the Control of Lipolysis in Adipocytes. *Diabetes mellitus a fundamental and clinical text*. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.
- López de Fez, C. M., Gaztelu, M. T., Rubio, T. y Castaño, A. (2004). "Mecanismos de hipertensión en obesidad." *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* 27(2): 211-219.

- Lu, X., Yang, X. y Liu, J. (2010). "Differential control of ATGL-mediated lipid droplet degradation by CGI-58 and G0S2." *Cell Cycle* 9(14): 2719-2725.
- MacKellar, J., Cushman, S. W. y Periwal, V. (2010). "Waves of adipose tissue growth in the genetically obese Zucker fatty rat." *PLoS One* 5(1): e8197.
- Maenhaut, N. y Van de Voorde, J. (2011). "Regulation of vascular tone by adipocytes." *BMC Med* 9: 25.
- Mallo Ferrer, F., Casanueva, F. y Diéguez González, C. (1994). Modelos animales y experimentales de obesidad. . *La obesidad : monografía de la Sociedad Española de Endocrinología*. Madrid, Díaz de Santos: 303 p.
- Mammela, P. (2001). "Phenolics in selected European hardwood species by liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry." *Analyst* 126(9): 1535-1538.
- Martí, A., Moreno-Aliaga, M. J., Ochoa, M. C., Marrades, P., Santos, J. L. y Martínez, J. A. (2004). "Genética de la obesidad en humanos: rumbos de investigación." *Revista Española de Obesidad* 2(6): 351-362.
- Martin, S., Driessen, K., Nixon, S. J., Zerial, M. y Parton, R. G. (2005). "Regulated localization of Rab18 to lipid droplets: effects of lipolytic stimulation and inhibition of lipid droplet catabolism." *J Biol Chem* 280(51): 42325-42335.
- Martins, F., Noso, T. M., Porto, V. B., Curiel, A., Gambero, A., Bastos, D. H., Ribeiro, M. L. y Carvalho Pde, O. (2010). "Mate tea inhibits in vitro pancreatic lipase activity and has hypolipidemic effect on high-fat diet-induced obese mice." *Obesity (Silver Spring)* 18(1): 42-47.
- Matthews, D. R., Hosker, J. P., Rudenski, A. S., Naylor, B. A., Treacher, D. F. y Turner, R. C. (1985). "Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man." *Diabetologia* 28(7): 412-419.
- McGowan, M. W., Artiss, J. D., Strandbergh, D. R. y Zak, B. (1983). "A peroxidase-coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides." *Clin Chem* 29(3): 538-542.
- Menichini, F., Loizzo, M. R., Bonesi, M., Conforti, F., De Luca, D., Statti, G. A., de Cindio, B. y Tundis, R. (2011). "Phytochemical profile, antioxidant, anti-inflammatory and hypoglycemic potential of hydroalcoholic extracts from *Citrus medica* L. cv Diamante flowers, leaves and fruits at two maturity stages." *Food Chem Toxicol* 49(7): 1549-1555.
- Ministerio de Sanidad Política Social e Igualdad. (2011). "*Estudio de prevalencia de obesidad infantil "ALADINO"*" de <http://www.who.int/dietphysicalactivity/childhood/es/>.
- Miyoshi, H., Perfield, J. W., 2nd, Obin, M. S. y Greenberg, A. S. (2008). "Adipose triglyceride lipase regulates basal lipolysis and lipid droplet size in adipocytes." *J Cell Biochem* 105(6): 1430-1436.

- Miyoshi, H., Souza, S. C., Zhang, H. H., Strissel, K. J., Christoffolete, M. A., Kovsan, J., Rudich, A., Kraemer, F. B., Bianco, A. C., Obin, M. S. y Greenberg, A. S. (2006). "Perilipin promotes hormone-sensitive lipase-mediated adipocyte lipolysis via phosphorylation-dependent and -independent mechanisms." *J Biol Chem* 281(23): 15837-15844.
- Moller, N. P., Roos, N. y Schrezenmeir, J. (2009). "Lipase inhibitory activity in alcohol extracts of worldwide occurring plants and propolis." *Phytother Res* 23(4): 585-586.
- Moreno, D. A., Ilic, N., Poulev, A., Brasaemle, D. L., Fried, S. K. y Raskin, I. (2003). "Inhibitory effects of grape seed extract on lipases." *Nutrition* 19(10): 876-879.
- Moreno, M. J. y Martínez, J. A. (2002). "El tejido adiposo: órgano de almacenamiento y órgano secretor." *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* 25(1): 29-39.
- Morikawa, T., Xie, Y., Asao, Y., Okamoto, M., Yamashita, C., Muraoka, O., Matsuda, H., Pongpiriyadacha, Y., Yuan, D. y Yoshikawa, M. (2009). "Oleanane-type triterpene oligoglycosides with pancreatic lipase inhibitory activity from the pericarps of *Sapindus rarak*." *Phytochemistry* 70(9): 1166-1172.
- Moro, C. O. y Basile, G. (2000). "Obesity and medicinal plants." *Fitoterapia* 71: S73-S82.
- Muilenburg, V. L., Phelan, P. L., Bonello, P. y Herms, D. A. (2011). "Inter- and Intra-Specific Variation in Stem Phloem Phenolics of Paper Birch (*Betula papyrifera*) and European White Birch (*Betula pendula*)." *J Chem Ecol*.
- Musri, M. M., Gomis, R., Casamitjana i Abellà, R., Enrich Bastús, C. y Universitat de Barcelona. Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica (2007). Expresión de adiponectina y sus receptores en tejido adiposo regulación epigenética en la adipogénesis. Barcelona, Universitat de Barcelona.
- Nagao, T., Hase, T. y Tokimitsu, I. (2007). "A green tea extract high in catechins reduces body fat and cardiovascular risks in humans." *Obesity (Silver Spring)* 15(6): 1473-1483.
- Nakai, M., Fukui, Y., Asami, S., Toyoda-Ono, Y., Iwashita, T., Shibata, H., Mitsunaga, T., Hashimoto, F. y Kiso, Y. (2005). "Inhibitory effects of oolong tea polyphenols on pancreatic lipase in vitro." *J Agric Food Chem* 53(11): 4593-4598.
- Naz, S., Siddiqi, R., Dew, T. P. y Williamson, G. (2011). "Epigallocatechin-3-gallate Inhibits Lactase but Is Alleviated by Salivary Proline-Rich Proteins." *J Agric Food Chem*.
- Nishino, N., Tamori, Y. y Kasuga, M. (2007). "Insulin efficiently stores triglycerides in adipocytes by inhibiting lipolysis and repressing PGC-1 α induction." *Kobe J Med Sci* 53(3): 99-106.

- Nolasco, H., Del Monte, A., Hinojosa, P., Civera-Cerecedo, R. y Vega-Villasante, F. (2006). "Digestibilidad in vitro de lípidos alimentarios para el camarón." *Avances en Nutrición Acuícola* 7: 377-395.
- Ntambi, J. M. y Young-Cheul, K. (2000). "Adipocyte differentiation and gene expression." *J Nutr* 130(12): 3122S-3126S.
- Oben, J. E., Ngondi, J. L. y Blum, K. (2008). "Inhibition of Irvingia gabonensis seed extract (OB131) on adipogenesis as mediated via down regulation of the PPARgamma and leptin genes and up-regulation of the adiponectin gene." *Lipids Health Dis* 7: 44.
- Oh, K. S., Han, W., Wang, M. H. y Lee, B. H. (2007). "The effects of chronic treatment with Morus bombycis KOIDZUMI in spontaneously hypertensive rats." *Biol Pharm Bull* 30(7): 1278-1283.
- Oliva, J., González, L., Labeaga, J. M. y Dardet, C. A. (2008). "Public health, obesity and economics: the good, the bad and the ugly." *Gaceta Sanitaria* 22(6): 507-510.
- Oliveira, S., Dal Pai-Silva, M., Martinez, P. F., Campos, D. H., Lima-Leopoldo, A. P., Leopoldo, A., Nascimento A, Okoshi, M., Okoshi, K., Padovani, C. R. y Cicogna, A. C. (2010). "Differential nutritional, endocrine, and cardiovascular effects in obesity-prone and obesity-resistant rats fed standard and hypercaloric diets." *Medical Science Monitor* 16(7): 208-217.
- Organización Mundial de la Salud, O. (2000). "Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation." *World Health Organ Tech Rep Ser* 894: i-xii, 1-253.
- Organización Mundial de la Salud, O. (2011). "*Sobrepeso y obesidad infantiles*." de <http://www.who.int/dietphysicalactivity/childhood/es/>.
- Padwal, R. (2008). "Cetilistat, a new lipase inhibitor for the treatment of obesity." *Curr Opin Investig Drugs* 9(4): 414-421.
- Palomer, X., Pérez, A. y Blanco-Vaca, F. (2005). "Adiponectina: un nuevo nexo entre obesidad, resistencia a la insulina y enfermedad cardiovascular." *Medicina Clínica* 124(10): 388-395.
- Palou, A., Bonet, M. y Rodríguez, A. (2004). "Nutrigenómica y obesidad." *Revista de Medicina de la Universidad de Navarra* 48(2): 36-48.
- Pan, C., Yoo, H. J. y Ho, L. T. (2011). "Perspectives of CB1 Antagonist in Treatment of Obesity: Experience of RIO-Asia." *J Obes* 2011: 957268.
- Panossian, A., Wikman, G. y Sarris, J. (2010). "Rosenroot (Rhodiola rosea): traditional use, chemical composition, pharmacology and clinical efficacy." *Phytomedicine* 17(7): 481-493.
- Park, H. J., Della-Fera, M. A., Hausman, D. B., Rayalam, S., Ambati, S. y Baile, C. A. (2009). "Genistein inhibits differentiation of primary human adipocytes." *J Nutr Biochem* 20(2): 140-148.

- Park, M. K., Jung, U. y Roh, C. (2011). "Fucoïdan from marine brown algae inhibits lipid accumulation." *Mar Drugs* 9(8): 1359-1367.
- Park, S. H., Park, T. S. y Cha, Y. S. (2008). "Grape seed extract (*Vitis vinifera*) partially reverses high fat diet-induced obesity in C57BL/6J mice." *Nutr Res Pract* 2(4): 227-233.
- Peluso, M. R. (2006). "Flavonoids attenuate cardiovascular disease, inhibit phosphodiesterase, and modulate lipid homeostasis in adipose tissue and liver." *Exp Biol Med (Maywood)* 231(8): 1287-1299.
- Pereira, J. L. y García Luna, P. P. (2005). "Costes económicos de la obesidad." *Revista Española de Obesidad* 3: 11-12.
- Pérez Gallardo, L. L. (2010). *Los perfiles nutricionales de los alimentos y la obesidad en Europa*. Valladolid, Universidad de Valladolid, Secretariado de Publicaciones e Intercambio Editorial.
- Pessole, M., Roberto, G., dos Santos, R., Biondo-Simoes, R., Ritzdorf, F. y de Noronha, L. (2010). "Obesity and abdominal wound healing in rats." *Acta Cirurgica Brasileira* 25(1): 86-92.
- Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." *Nucleic Acids Res* 29(9): e45.
- Pillarsetti, S. y Saxena, U. (2003). "Lipoprotein lipase as a therapeutic target for dyslipidemia." *Front Biosci* 8: d238-241.
- Poudyal, H., Campbell, F. y Brown, L. (2010). "Olive leaf extract attenuates cardiac, hepatic, and metabolic changes in high carbohydrate-, high fat-fed rats." *J Nutr* 140(5): 946-953.
- Prestwich, T. C. y Macdougald, O. A. (2007). "Wnt/beta-catenin signaling in adipogenesis and metabolism." *Curr Opin Cell Biol* 19(6): 612-617.
- Pulido, M. R., Diaz-Ruiz, A., Jimenez-Gomez, Y., Garcia-Navarro, S., Gracia-Navarro, F., Tinahones, F., Lopez-Miranda, J., Fruhbeck, G., Vazquez-Martinez, R. y Malagon, M. M. (2011). "Rab18 dynamics in adipocytes in relation to lipogenesis, lipolysis and obesity." *PLoS One* 6(7): e22931.
- Qin, X., Ren, L., Yang, X., Bai, F., Wang, L., Geng, P., Bai, G. y Shen, Y. (2010). "Structures of human pancreatic alpha-amylase in complex with acarviosatins: Implications for drug design against type II diabetes." *J Struct Biol*.
- Quesada, H., del Bas, J. M., Pajuelo, D., Diaz, S., Fernandez-Larrea, J., Pinent, M., Arola, L., Salvado, M. J. y Blade, C. (2009). "Grape seed proanthocyanidins correct dyslipidemia associated with a high-fat diet in rats and repress genes controlling lipogenesis and VLDL assembling in liver." *Int J Obes (Lond)* 33(9): 1007-1012.

- Rivera, L., Moron, R., Zarzuelo, A. y Galisteo, M. (2009). "Long-term resveratrol administration reduces metabolic disturbances and lowers blood pressure in obese Zucker rats." *Biochem Pharmacol* 77(6): 1053-1063.
- Rodríguez-Rodríguez, E., Perea, J. M., López-Sobaler, A. M. y Ortega, R. M. (2009). "Obesidad, resistencia a la insulina y aumento de los niveles de adipocinas: importancia de la dieta y el ejercicio físico." *Nutr Hosp* 24(4): 415-421.
- Rodriguez, J. A., Ben Ali, Y., Abdelkafi, S., Mendoza, L. D., Leclaire, J., Fotiadu, F., Buono, G., Carriere, F. y Abousalham, A. (2010). "In vitro stereoselective hydrolysis of diacylglycerols by hormone-sensitive lipase." *Biochim Biophys Acta* 1801(1): 77-83.
- Rosen, E. D., Hsu, C. H., Wang, X., Sakai, S., Freeman, M. W., Gonzalez, F. J. y Spiegelman, B. M. (2002). "C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway." *Genes Dev* 16(1): 22-26.
- Rossner, S., Sjostrom, L., Noack, R., Meinders, A. E. y Nosedá, G. (2000). "Weight loss, weight maintenance, and improved cardiovascular risk factors after 2 years treatment with orlistat for obesity. European Orlistat Obesity Study Group." *Obes Res* 8(1): 49-61.
- Rubin, C. S., Hirsch, A., Fung, C. y Rosen, O. M. (1978). "Development of hormone receptors and hormonal responsiveness in vitro. Insulin receptors and insulin sensitivity in the preadipocyte and adipocyte forms of 3T3-L1 cells." *J Biol Chem* 253(20): 7570-7578.
- Rubio, M. A. (2007). *Consenso SEEDO 2007 para la evaluación del sobrepeso y la obesidad y el establecimiento de criterios de intervención terapéutica (versión íntegra)*.
- Ruth, M. R., Taylor, C. G., Zahradka, P. y Field, C. J. (2008). "Abnormal immune responses in fa/fa Zucker rats and effects of feeding conjugated linoleic acid." *Obesity (Silver Spring)* 16(8): 1770-1779.
- Sanchez-Muniz, F. J. y Bastida, S. (2008). "Do not use the Friedewald formula to calculate LDL-cholesterol in hypercholesterolaemic rats." *European Journal of Lipid Science and Technology* 110(4): 295-301.
- Saraswat, M., Suryanarayana, P., Reddy, P. Y., Patil, M. A., Balakrishna, N. y Reddy, G. B. (2010). "Antiglycating potential of Zingiber officinalis and delay of diabetic cataract in rats." *Mol Vis* 16: 1525-1537.
- Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M. y Ragg, T. (2006). "The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements." *BMC Mol Biol* 7: 3.
- Serra Majem, L., Ribas Barba, L., Aranceta Bartrina, J., Pérez Rodrigo, C., Saavedra Santana, P. y Peña Quintana, L. (2003). "Obesidad infantil y juvenil : Estudio enKid (1998-2000)." *Medicina Clínica* 121: 725-732.

- Shen, P., Liu, M. H., Ng, T. Y., Chan, Y. H. y Yong, E. L. (2006). "Differential effects of isoflavones, from *Astragalus membranaceus* and *Pueraria thomsonii*, on the activation of PPARalpha, PPARgamma, and adipocyte differentiation in vitro." *J Nutr* 136(4): 899-905.
- Shen, W. J., Yu, Z., Patel, S., Jue, D., Liu, L. F. y Kraemer, F. B. (2011). "Hormone-sensitive lipase modulates adipose metabolism through PPARgamma." *Biochim Biophys Acta* 1811(1): 9-16.
- Sheng, L., Qian, Z., Zheng, S. y Xi, L. (2006). "Mechanism of hypolipidemic effect of crocin in rats: crocin inhibits pancreatic lipase." *Eur J Pharmacol* 543(1-3): 116-122.
- Shimada, T., Horikawa, T., Ikeya, Y., Matsuo, H., Kinoshita, K., Taguchi, T., Ichinose, K., Takahashi, K. y Aburada, M. (2011). "Preventive effect of *Kaempferia parviflora* ethyl acetate extract and its major components polymethoxyflavonoid on metabolic diseases." *Fitoterapia*.
- Silventoinen, K., Sans, S., Tolonen, H., Monterde, D., Kuulasmaa, K., Kesteloot, H. y Tuomilehto, J. (2004). "Trends in obesity and energy supply in the WHO MONICA Project." *Int J Obes Relat Metab Disord* 28(5): 710-718.
- Slanc, P., Doljak, B., Kreft, S., Lunder, M., Janes, D. y Strukelj, B. (2009). "Screening of selected food and medicinal plant extracts for pancreatic lipase inhibition." *Phytother Res* 23(6): 874-877.
- Smas, C. M. y Sul, H. S. (1995). "Control of Adipocyte Differentiation." *Biochemical Journal* 309: 697-710.
- Smirin, P., Taler, D., Abitbol, G., Brutman-Barazani, T., Kerem, Z., Sampson, S. R. y Rosenzweig, T. (2010). "Sarcopoterium spinosum extract as an antidiabetic agent: in vitro and in vivo study." *J Ethnopharmacol* 129(1): 10-17.
- Sohle, J., Knott, A., Holtzmann, U., Siegner, R., Gronniger, E., Schepky, A., Gallinat, S., Wenck, H., Stab, F. y Winnefeld, M. (2009). "White Tea extract induces lipolytic activity and inhibits adipogenesis in human subcutaneous (pre)-adipocytes." *Nutr Metab (Lond)* 6: 20.
- Souza, S. C., Muliro, K. V., Liscum, L., Lien, P., Yamamoto, M. T., Schaffer, J. E., Dallal, G. E., Wang, X., Kraemer, F. B., Obin, M. y Greenberg, A. S. (2002). "Modulation of hormone-sensitive lipase and protein kinase A-mediated lipolysis by perilipin A in an adenoviral reconstituted system." *J Biol Chem* 277(10): 8267-8272.
- Speakman, J., Hambly, C., Mitchell, S. y Krol, E. (2008). "The contribution of animal models to the study of obesity." *Lab Anim* 42(4): 413-432.
- Staneva, J., Todorova, M., Neykov, N. y Evstatieva, L. (2009). "Ultrasonically assisted extraction of total phenols and flavonoids from *Rhodiola rosea*." *Nat Prod Commun* 4(7): 935-938.

- Steinberg, G. R., Kemp, B. E. y Watt, M. J. (2007). "Adipocyte triglyceride lipase expression in human obesity." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293(4): E958-964.
- Sudha, P., Zinjarde, S., Bhargava, S. y Kumar, A. (2011). "Potent alpha-amylase inhibitory activity of Indian Ayurvedic medicinal plants." *BMC Complementary and Alternative Medicine* 11(1): 5.
- Sugimoto, S., Nakamura, S., Yamamoto, S., Yamashita, C., Oda, Y., Matsuda, H. y Yoshikawa, M. (2009). "Brazilian natural medicines. III. structures of triterpene oligoglycosides and lipase inhibitors from mate, leaves of *Ilex paraguariensis*." *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 57(3): 257-261.
- Suzuki, R., Tanaka, M., Takanashi, M., Hussain, A., Yuan, B., Toyoda, H. y Kuroda, M. (2011). "Anthocyanidins-enriched bilberry extracts inhibit 3T3-L1 adipocyte differentiation via the insulin pathway." *Nutr Metab (Lond)* 8: 14.
- Tanaka, K., Tamaru, S., Nishizono, S., Miyata, Y., Tamaya, K., Matsui, T., Tanaka, T., Echizen, Y. y Ikeda, I. (2010). "Hypotriacylglycerolemic and antiobesity properties of a new fermented tea product obtained by tea-rolling processing of third-crop green tea (*Camellia sinensis*) leaves and loquat (*Eriobotrya japonica*) leaves." *Biosci Biotechnol Biochem* 74(8): 1606-1612.
- Tarling, C. A., Woods, K., Zhang, R., Brastianos, H. C., Brayer, G. D., Andersen, R. J. y Withers, S. G. (2008). "The search for novel human pancreatic alpha-amylase inhibitors: high-throughput screening of terrestrial and marine natural product extracts." *Chembiochem* 9(3): 433-438.
- Taskinen, M.-R. (2010). "Abnormalities of triglyceride rich lipoproteins (TRLs) in type 2 diabetes and insulin resistance." *Clínica e investigación en Arteriosclerosis* 22(2): 36-38.
- Timmers, S., Schrauwen, P. y de Vogel, J. (2008). "Muscular diacylglycerol metabolism and insulin resistance." *Physiol Behav* 94(2): 242-251.
- Tong, L. T., Katakura, Y., Kawamura, S., Baba, S., Tanaka, Y., Udono, M., Kondo, Y., Nakamura, K., Imaizumi, K. y Sato, M. (2010). "Effects of Kurozu concentrated liquid on adipocyte size in rats." *Lipids Health Dis* 9: 134.
- Tovar, A. R., Torre-Villalvazo, I., Ochoa, M., Elias, A. L., Ortiz, V., Aguilar-Salinas, C. A. y Torres, N. (2005). "Soy protein reduces hepatic lipotoxicity in hyperinsulinemic obese Zucker fa/fa rats." *J Lipid Res* 46(9): 1823-1832.
- Trinder, P. (1969). "Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen." *J Clin Pathol* 22(2): 158-161.
- Tsujita, T., Takaichi, H., Takaku, T., Aoyama, S. y Hiraki, J. (2006). "Antiobesity action of epsilon-polylysine, a potent inhibitor of pancreatic lipase." *J Lipid Res* 47(8): 1852-1858.
- Tsujita, T. y Takaku, T. (2007). "Lipolysis induced by segment wall extract from Satsuma mandarin orange (*Citrus unshu* Mark)." *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 53(6): 547-551.

- Tsujita, T., Yamada, M., Takaku, T., Shintani, T., Teramoto, K. y Sato, T. (2011). "Purification and characterization of polyphenols from chestnut astringent skin." *J Agric Food Chem* 59(16): 8646-8654.
- Tucci, S. A., Boyland, E. J. y Halford, J. C. (2010). "The role of lipid and carbohydrate digestive enzyme inhibitors in the management of obesity: a review of current and emerging therapeutic agents." *Diabetes Metab Syndr Obes* 3: 125-143.
- Tundis, R., Loizzo, M. R. y Menichini, F. (2010). "Natural products as alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibitors and their hypoglycaemic potential in the treatment of diabetes: an update." *Mini Rev Med Chem* 10(4): 315-331.
- Tundis, R., Menichini, F., Loizzo, M. R., Bonesi, M. y Solimene, U. (2011). "Studies on the potential antioxidant properties of *Senecio stabianus* Lacaíta (Asteraceae) and its inhibitory activity against carbohydrate-hydrolysing enzymes." *Nat Prod Res*: 1-12.
- Uchiyama, S., Taniguchi, Y., Saka, A., Yoshida, A. y Yajima, H. (2011). "Prevention of diet-induced obesity by dietary black tea polyphenols extract in vitro and in vivo." *Nutrition* 27(3): 287-292.
- Vaquero, M. d. P., Arola, I. y Instituto Tomás Pascual Sanz (Madrid) (2008). *Genética, nutrición y enfermedad*. Madrid, EDIMSA.
- Varo, J., Martínez-González, M. A. y Martínez, J. A. (2002). "Prevalencia de obesidad en Europa." *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* 25(1): 102-108.
- Vijayakumar, M. V., Pandey, V., Mishra, G. C. y Bhat, M. K. (2010). "Hypolipidemic effect of fenugreek seeds is mediated through inhibition of fat accumulation and upregulation of LDL receptor." *Obesity (Silver Spring)* 18(4): 667-674.
- Viveros, A., Laviada, H. y Bastarrachea-Sosa, R. (2004). "Factores de transcripción celular que influyen en la diferenciación del adipocito." *Salud pública y Nutrición* 2.
- Walker, J. A. y Harmon, D. L. (1996). "Technical note: a simple, rapid assay for alpha-amylase in bovine pancreatic juice." *J Anim Sci* 74(3): 658-662.
- Wang, Y., Kim, K. A., Kim, J. H. y Sul, H. S. (2006). "Pref-1, a preadipocyte secreted factor that inhibits adipogenesis." *J Nutr* 136(12): 2953-2956.
- Watt, M. J. y Spriet, L. L. (2010). "Triacylglycerol lipases and metabolic control: implications for health and disease." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299(2): E162-168.
- West, D. B. y York, B. (1998). "Dietary fat, genetic predisposition, and obesity: lessons from animal models." *Am J Clin Nutr* 67(3 Suppl): 505S-512S.
- White, B. D. y Martin, R. J. (1997). "Evidence for a central mechanism of obesity in the Zucker rat: role of neuropeptide Y and leptin." *Proc Soc Exp Biol Med* 214(3): 222-232.

- Willems, E., Leyns, L. y Vandesompele, J. (2008). "Standardization of real-time PCR gene expression data from independent biological replicates." *Anal Biochem* 379(1): 127-129.
- Wu, T., Zhou, X., Deng, Y., Jing, Q., Li, M. y Yuan, L. (2011). "In vitro studies of *Gynura divaricata* (L.) DC extracts as inhibitors of key enzymes relevant for type 2 diabetes and hypertension." *J Ethnopharmacol* 136(2): 305-308.
- Wu, Z., Rosen, E. D., Brun, R., Hauser, S., Adelmant, G., Troy, A. E., McKeon, C., Darlington, G. J. y Spiegelman, B. M. (1999). "Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity." *Mol Cell* 3(2): 151-158.
- Xu, K. Z., Zhu, C., Kim, M. S., Yamahara, J. y Li, Y. (2009). "Pomegranate flower ameliorates fatty liver in an animal model of type 2 diabetes and obesity." *J Ethnopharmacol* 123(2): 280-287.
- Yamaguchi, T., Omatsu, N., Morimoto, E., Nakashima, H., Ueno, K., Tanaka, T., Satouchi, K., Hirose, F. y Osumi, T. (2007). "CGI-58 facilitates lipolysis on lipid droplets but is not involved in the vesiculation of lipid droplets caused by hormonal stimulation." *J Lipid Res* 48(5): 1078-1089.
- Yim, M. J., Hosokawa, M., Mizushina, Y., Yoshida, H., Saito, Y. y Miyashita, K. (2011). "Suppressive effects of Amarouciaxanthin A on 3T3-L1 adipocyte differentiation through down-regulation of PPARgamma and C/EBPalpha mRNA expression." *J Agric Food Chem* 59(5): 1646-1652.
- Yoshikawa, M., Shimoda, H., Nishida, N., Takada, M. y Matsuda, H. (2002). "Salacia reticulata and its polyphenolic constituents with lipase inhibitory and lipolytic activities have mild antiobesity effects in rats." *J Nutr* 132(7): 1819-1824.
- Young, T. K., Bjerregaard, P., Dewailly, E., Risica, P. M., Jorgensen, M. E. y Ebbesson, S. E. (2007). "Prevalence of obesity and its metabolic correlates among the circumpolar inuit in 3 countries." *Am J Public Health* 97(4): 691-695.
- Yun, J. W. (2010). "Possible anti-obesity therapeutics from nature--a review." *Phytochemistry* 71(14-15): 1625-1641.
- Zayas-Torriente, G. M., Chiong-Molina, D., Díaz, Y., Torriente-Fernández, A. y Herrera-Algüelles, X. (2002). "Obesidad en la infancia: diagnóstico y tratamiento." *Revista Cubana de Pediatría* 74(3): 233-239.
- Zhang, J., Kang, M. J., Kim, M. J., Kim, M. E., Song, J. H., Lee, Y. M. y Kim, J. I. (2008). "Pancreatic lipase inhibitory activity of taraxacum officinale in vitro and in vivo." *Nutr Res Pract* 2(4): 200-203.
- Zhang, M., Ikeda, K., Xu, J. W., Yamori, Y., Gao, X. M. y Zhang, B. L. (2009). "Genistein suppresses adipogenesis of 3T3-L1 cells via multiple signal pathways." *Phytother Res* 23(5): 713-718.

- Zhao, J., Pang, Y. y Dixon, R. A. (2010). "The mysteries of proanthocyanidin transport and polymerization." *Plant Physiol* 153(2): 437-443.
- Zheng, C. D., Duan, Y. Q., Gao, J. M. y Ruan, Z. G. (2010). "Screening for anti-lipase properties of 37 traditional Chinese medicinal herbs." *J Chin Med Assoc* 73(6): 319-324.
- Zheng, Q., Li, W., Han, L. y Koike, K. (2007). "Pancreatic lipase-inhibiting triterpenoid saponins from *Gypsophila oldhamiana*." *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 55(4): 646-650.
- Zhou, L., Wang, X., Yang, Y., Wu, L., Li, F., Zhang, R., Yuan, G., Wang, N., Chen, M. y Ning, G. (2011). "Berberine attenuates cAMP-induced lipolysis via reducing the inhibition of phosphodiesterase in 3T3-L1 adipocytes." *Biochim Biophys Acta* 1812(4): 527-535.
- Zhou, X., Li, D., Yin, J., Ni, J., Dong, B., Zhang, J. y Du, M. (2007). "CLA differently regulates adipogenesis in stromal vascular cells from porcine subcutaneous adipose and skeletal muscle." *J Lipid Res* 48(8): 1701-1709.
- Zhou, Y., Wang, D., Zhu, Q., Gao, X., Yang, S., Xu, A. y Wu, D. (2009). "Inhibitory effects of A-769662, a novel activator of AMP-activated protein kinase, on 3T3-L1 adipogenesis." *Biol Pharm Bull* 32(6): 993-998.
- Zimmermann, R., Lass, A., Haemmerle, G. y Zechner, R. (2009). "Fate of fat: the role of adipose triglyceride lipase in lipolysis." *Biochim Biophys Acta* 1791(6): 494-500.
- Zimmermann, R., Strauss, J. G., Haemmerle, G., Schoiswohl, G., Birner-Gruenberger, R., Riederer, M., Lass, A., Neuberger, G., Eisenhaber, F., Hermetter, A. y Zechner, R. (2004). "Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase." *Science* 306(5700): 1383-1386.
- Zucker, L. M. y Zucker, T. F. (1961). "Fatty, a new mutation in the rat." *Journal of Heredity* 52(6): 275-278.

