

Universidad de Granada
Facultad de Farmacia
Departamento de Farmacología



**Efectos de polifenoles de la dieta en
el modelo experimental de síndrome
metabólico de rata Zucker**

Tesis Doctoral para aspirar al Grado de Doctor en Farmacia presentada por

Leonor Rivera Soria
2009

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Leonor Rivera Soria
D.L.: GR. 2608-2009
ISBN: 978-84-692-3877-6

D. Julio Gálvez Peralta, Profesor Titular y Director del Departamento de Farmacología de la Universidad de Granada,

Certifica: Que el trabajo de Tesis Doctoral titulado: "Efectos de polifenoles de la dieta en el modelo experimental de síndrome metabólico de ratas Zucker obesas" ha sido realizado por la Licenciada en Farmacia Leonor Rivera Soria en los laboratorios de este departamento.

Y a los efectos legales se firma la siguiente constancia en Granada, a cuatro de Mayo de 2009.

Dr. Julio Gálvez Peralta

Dña. Milagros Galisteo Moya, Profesora Contratada Doctora, D. Antonio Zarzuelo Zurita, Profesor Catedrático del Departamento de Farmacología de la Universidad de Granada, D. Juan Duarte Pérez, Profesor Catedrático del Departamento de Farmacología de la Universidad de Granada, como directores

Certifican: Que la Tesis Doctoral titulada: "Efectos de polifenoles de la dieta en el modelo experimental de síndrome metabólico de ratas Zucker obesas" presentada por la Licenciada en Farmacia Leonor Rivera Soria, ha sido llevada a cabo bajo su dirección y reúne todos y cada uno de los requisitos necesarios para ser defendida y optar al grado de Doctor.

Y a los efectos legales se firma la siguiente constancia en Granada, a cuatro de Mayo de 2009.

Dra. Milagros Galisteo Moya

Dr. Antonio Zarzuelo Zurita

Dr. Juan Duarte Pérez

Índice

ABREVIATURAS	25
INTRODUCCIÓN	29
1. Concepto de síndrome metabólico	31
1.1. Definición de síndrome metabólico	32
1.2. Etiopatogénesis del síndrome metabólico	36
1.2.1. Obesidad	37
1.2.2. Resistencia a la insulina	39
1.2.2.1. Papel fisiológico de la insulina	39
1.2.2.2. Resistencia a la insulina	41
1.2.3. Componente inflamatorio del síndrome metabólico	43
1.2.3.1. Implicación de adipocitoquinas	45
1.2.3.1.1. Factor de necrosis tumoral- α (TNF- α)	45
1.2.3.1.2. Adiponectina	48
1.2.3.1.3. Leptina	50
1.3. Implicaciones energéticas de protein kinasa activada por 5'-AMP (AMPK)	55
2. Compuestos polifenólicos	60
2.1. Flavonoides	62
2.1.1. Quercetina	64
2.1.1.1. Efectos de la quercetina	64
2.2. Estilbenos: resveratrol	67
2.2.1. Efectos del resveratrol	69
OBJETIVOS	73

MATERIAL Y MÉTODOS.....	79
1. Animales de experimentación	81
1.1 Tratamiento con quercetina	81
1.2. Tratamiento con resveratrol	82
2. Métodos experimentales	82
2.1. Determinación de la presión arterial sistólica	82
2.2. Sacrificio de los animales y recogida de muestras	83
2.3 Valoración del estado oxidativo	83
2.3.1. Determinación de malonildialdehído en hígado	83
2.3.2. Determinación de malonildialdehído en plasma	85
2.4. Determinación de parámetros plasmáticos	85
2.4.1. Lípidos plasmáticos	85
2.4.1.1. Colesterol	85
2.4.1.2. Triglicéridos	86
2.4.1.3. Ácidos grasos libres	87
2.4.2. Parámetros plasmáticos relacionados con la resistencia a la insulina	87
2.4.2.1. Glucosa	88
2.4.2.2. Insulina	88
2.4.2.3. HOMA _{IR}	89
2.4.3. Otros parámetros plasmáticos	89
2.4.3.1. Adiponectina	89
2.4.3.2. Nitratos más nitritos (NO _x)	90
2.5. Parámetros tisulares	91
2.5.1. Extracción y determinación de lípidos hepáticos	91

2.5.2. Determinación de factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) en tejido adiposo	92
2.5.3. Determinación de adiponectina en tejido adiposo	93
2.5.4. Determinación de NOx en tejido adiposo	93
2.5.5. Determinación de la expresión de iNOS y eNOS en tejidos por Western Blot	94
2.5.6. Determinación de la expresión y fosforilación de AMPK por Western Blot	96
2.5.7. Determinación de la expresión y fosforilación de ACC por Western Blot	98
2.5.8. Determinación de proteínas	98
3. Análisis estadístico	99
RESULTADOS.....	101
1. Efectos del tratamiento crónico con quercetina en ratas Zucker obesas	103
1.1. Variables morfológicas	103
1.1.1. Peso corporal e ingesta de comida	103
1.1.2. Peso relativo de los órganos	105
1.2. Parámetros bioquímicos en plasma	106
1.2.1. Lípidos plasmáticos	106
1.2.1.1. Colesterol	106
1.2.1.2. Triglicéridos	107
1.2.1.3. Ácidos grasos libres	107
1.2.2. Resistencia a la insulina	108
1.2.2.1. Glucosa	108
1.2.2.2. Insulina	108
1.2.2.3. HOMA _{IR}	108
1.2.3. Resistencia a la leptina	109
1.2.4. Nitratos más nitritos (NOx)	110
1.2.5. Adiponectina	111

1.3. Efectos de la quercetina en tejidos insulino-resistentes	112
1.3.1. Tejido adiposo visceral	112
1.3.1.1. Factor de necrosis tumoral- α (TNF- α)	113
1.3.1.2. Expresión de iNOS y eNOS en tejido adiposo visceral	114
1.3.2. Hígado	115
1.3.2.1. Acumulación hepática de lípidos	115
1.3.2.3.1. Colesterol total	115
1.3.2.3.2. Triglicéridos	115
1.3.2.2. Expresión de AMPK total y fosforilada	116
1.3.2.3. Expresión de ACC total y fosforilada	118
1.4. Efectos de la quercetina en la presión arterial	119
1.4.1. Presión arterial sistólica	119
1.4.2. Expresión de eNOS en aorta	120
1.5. Actividad antioxidante	121
1.5.1. Concentración de MDA en hígado y plasma	122
2. Efectos del tratamiento crónico con resveratrol en ratas Zucker obesas	123
2.1. Variables morfológicas	123
2.1.1. Peso corporal e ingesta de comida	123
2.1.2. Peso relativo de los órganos	124
2.2. Parámetros bioquímicos en plasma	126
2.2.1. Lípidos plasmáticos	126
2.2.1.1. Lípidos plasmáticos basales (Antes del tratamiento)	126
2.2.1.1.1. Colesterol	126
2.2.1.1.2. Triglicéridos	126
2.2.1.1.3. Ácidos grasos libres	126
2.2.1.2. Lípidos plasmáticos a las 4 semanas	127

2.2.1.2.1. Colesterol	127
2.2.1.2.2. Triglicéridos	127
2.2.1.2.3. Ácidos grasos libres	128
2.2.1.3. Lípidos plasmáticos a las 8 semanas (Final del tratamiento)	128
2.2.1.3.1. Colesterol	128
2.2.1.3.2. Triglicéridos	129
2.2.1.3.3. Ácidos grasos libres	129
2.2.2. Resistencia a la insulina	130
2.2.2.1. Resistencia a la insulina basal	130
2.2.2.1.1. Glucosa	130
2.2.2.1.2. Insulina	130
2.2.2.1.3. HOMA _{IR}	130
2.2.2.2. Resistencia a la insulina a las 4 semanas	130
2.2.2.2.1. Glucosa	130
2.2.2.2.2. Insulina	130
2.2.2.2.3. HOMA _{IR}	131
2.2.2.3. Resistencia a la insulina a las 8 semanas	131
2.2.2.3.1. Glucosa	131
2.2.2.3.2. Insulina	131
2.2.2.3.3. HOMA _{IR}	131
2.2.3. Resistencia a la leptina	132
2.2.3.1. Resistencia a la leptina basal	133
2.2.3.2. Resistencia a la leptina a las 4 semanas	133
2.2.3.3. Resistencia a la leptina a las 8 semanas	133
2.2.4. Adiponectina en plasma	134
2.3. Efectos del resveratrol en tejido insulino-resistentes	135
2.3.1. Tejido adiposo visceral	135
2.3.1.1. Adiponectina	136

2.3.1.2. Factor de necrosis tumoral- α (TNF- α)	136
2.3.1.3. Expresión de eNOS en tejido adiposo visceral	137
2.3.1.4. Nitratos más nitritos (NOx)	138
2.3.1.5. Expresión de AMPK total y fosforilada	139
2.3.1.6. Expresión de ACC total y fosforilada	140
2.3.2. Hígado	141
2.3.2.1. Acumulación hepática de lípidos	142
2.3.2.1.1. Colesterol total	142
2.3.2.1.2. Triglicéridos	142
2.3.2.2. Fosforilación de AMPK	143
2.3.2.3. Fosforilación de ACC	144
2.4. Efectos del resveratrol sobre la presión arterial	145
2.4.1. Presión arterial	145
2.4.2. Expresión de eNOS en aorta	146
2.5. Actividad antioxidante	148
2.5.1. Concentración de MDA en hígado	148
DISCUSIÓN.....	149
1. Rata Zucker obesa: modelo experimental de síndrome metabólico	151
1.1. Variables morfológicas	151
1.2. Alteraciones bioquímicas en plasma	152
1.3. Alteraciones en tejido insulino-resistentes	154
1.4. Alteraciones en la presión arterial	156
2. Efectos del tratamiento crónico con quercetina en ratas Zucker obesas	157
2.1. Efectos de la quercetina sobre variables morfológicas	157

2.2. Efectos de la quercetina sobre alteraciones bioquímicas en plasma	158
2.3. Efectos de la quercetina en tejidos insulino-resistentes	160
2.4. Efectos de la quercetina sobre la presión arterial	162
3. Efectos del tratamiento crónico con resveratrol en ratas Zucker obesas	165
3.1. Efectos del resveratrol sobre variables morfológicas	166
3.2. Efectos del resveratrol sobre alteraciones bioquímicas en plasma	167
3.3. Efectos del resveratrol en tejidos insulino-resistentes	169
3.4. Efectos del resveratrol sobre la presión arterial	170
CONCLUSIONES.....	173
BIBLIOGRAFÍA.....	177

Abreviaturas

4-AF	4-Aminofenazona
Ac	Anticuerpo
ACC	Acetil Co-A carboxilasa
ACOD	Acyl-CoA-Oxido
ACS	Acyl-CoA-Sintetasa
AdipoR₁	Receptor de adiponectina 1
AdipoR₂	Receptor de adiponectina 2
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGL	Ácidos grasos libres
AMP	Adenosin monofosfato
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
AMPK	Protein kinasa activada por 5'-AMP
AP-1	Activador de proteína-1
Apo B	Apoproteína B
APPL-1	Proteína adaptadora que contiene un dominio de homología pleckstrin, un dominio de unión a fosfotirosina (PTB) y un motivo zipper de leucina
ATP	Adenosin trifosfato
CHE	Colesterol esterasa
CHOD	Colesterol oxidasa
CoA-SH	Coenzima-A
COX	Ciclooxigenasa
CPT-1	Carnitina palmitoil-transferasa-1
Cu⁺²	Catión cobre
DAG	Diacilglicerol

DAP	Dihidroxiacetona fosfato
DKa	Kilodalton
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilen-diamino tetraacético
EGTA	Ácido etilen-glicol tetraacético
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial (constitutiva)
FAD	Flavín adenín dinucleótido
FAS	Sintasa de ácidos grasos
FID	Federación internacional de diabetes
G3P	Glicerol-3-fosfato
GK	Glicerol kinasa
GLUT-4	Transportador de glucosa-4
GOD	Glucosa oxidasa
GPAT	Glicerol-fosfato acil-transferasa
GPO	Glicerolfosfato deshidrogenasa
GS	Glucógeno sintasa
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HEPES	ácido (N-[2-hidroxietil] piperazina-N'-[2-etanol sulfónico])
HMGG-CoA	Hidroximetil-glutaril-CoA reductasa
HOMA_{IR}	<i>Homeostasis Assessment Model</i> para resistencia a la insulina
HSL	Lipasa sensible a hormonas
ICAM	Moléculas de adhesión intercelular
IL-1	Interleuquina-1
IL-6	Interleuquina-6
IMC	Índice de masa corporal

iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IRS	Sustrato del receptor de la insulina
Iκ-B	Inhibidor del NF-κB
IκKB	Kinasa del inhibidor del NF-κB
JAK	Janus kinasa
JNK	Jun N-terminal kinasa
LDH	Lactato deshidrogenasa
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LKB1	Serin/treonin kinasa
LOX	Lipooxigenasa
LPL	Lipoproteinlipasa
LPS	Lipopolisacárido
MAPK	Protein kinasa activada por mitógeno
MEHA	3-Metil-N-Etil- N-(β-hidroxietil)anilina
MPO	Mieloperoxidasa
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
NAD⁺	Nicotín-adenín-dinucleótido (forma oxidada)
NADPH	Nicotín-adenín-dinucleótido fosfato (forma reducida)
NF-κB	Factor nuclear κB
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
p47	Subunidad p47 de la enzima NADPH-oxidasa
PAI-1	Inhibidor del activador de plasminógeno-1
PAS	Presión arterial sistólica
PBS	Solución tampón fosfato
PCR	Proteína C reactiva

PI3K	Fosfatidil inositol 3-kinasa
PIP2	Fosfatidil inositol bifosfato
PIP3	Fosfatidil inositol trifosfato
PKA	Protein kinasa A o protein kinasa dependiente de AMPc
PKC	Protein kinasa C
PKF	Fosfofructo-kinasa
PMSF	Fluoruro de fenil-metil-sulfonilo
POD	Peroxidasa
PP2C	Proteína fosfatasa 2C
PPi	Pirofosfato
ROS	Especies reactivas del oxígeno
SDS	Lauril sulfato sódico
Ser	Serina
SIRT-1	Sirtuina-1
SOCS	Supresores de señalización de citoquinas
STAT	Transductor de señales y activador de transcripción
Thr	Treonina
TLR-4	Receptor <i>toll-like</i> 4
TNF-α	Factor de necrosis tumoral- α
VCAM	Molécula de adhesión vascular
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana

Introducción

1. CONCEPTO DE SÍNDROME METABOLICO

La creciente epidemia de obesidad y diabetes mellitus de tipo 2 en los países desarrollados y en vías de desarrollo está dando lugar a la aparición, cada vez más frecuente, del llamado síndrome metabólico. El concepto de síndrome metabólico ha evolucionado mucho desde su introducción en la década de los años 1920 hasta la actualidad. Aunque los distintos organismos y grupos de expertos científico-médicos no coinciden exactamente en su definición ni en sus componentes, atendiendo a criterios clínicos y epidemiológicos, la mayoría conviene en considerarlo como un desorden metabólico que agrupa toda una serie de alteraciones metabólicas y funcionales estrechamente relacionadas entre sí, incluyendo como principales: obesidad de distribución central, resistencia a la insulina, hiperglucemia, dislipidemia aterogénica, con elevación de triglicéridos y disminución de colesterol-HDL e hipertensión.

Todos los componentes del síndrome metabólico constituyen, de forma independiente, factores de riesgo para el desarrollo de enfermedad cardiovascular y diabetes de tipo 2, razón por la que la manifestación conjunta de varias de estas anomalías metabólicas en un mismo individuo, dando lugar a este síndrome, incrementa de forma importante el riesgo de padecer estas patologías. La presencia del síndrome metabólico se ha asociado a un incremento de 5 veces en la prevalencia de diabetes de tipo 2 y de 2 a 3 veces en la de enfermedad cardiovascular (Zimmet *y cols.*, 2001; Eckel *y cols.*, 2005).

Por otra parte, en los últimos años se ha puesto de manifiesto una relación directa entre la existencia de este síndrome y el riesgo de padecer ciertos tipos de cáncer, como son el colorrectal y el de mama (Ahmed *y cols.*, 2006; Lorincz *y cols.*, 2006), y estudios recientes también sugieren la existencia de una asociación directa entre síndrome metabólico y enfermedad de Alzheimer (Milionis *y cols.*, 2008; Profeno *y cols.*, 2009).

La prevalencia del síndrome metabólico se está viendo incrementada de forma drástica en todo el mundo, no sólo en las poblaciones de adultos y ancianos (Meigs *y cols.*, 2003; Ford *y cols.*, 2004), sino también en jóvenes y niños, experimentando un crecimiento

paralelo a la presencia de obesidad y diabetes de tipo 2 (Cook y cols., 2003; Weiss y cols., 2004). Esto hace de este síndrome un importante problema de salud pública a nivel mundial que demanda una urgente intervención terapéutica.

1.1. DEFINICIÓN DE SÍNDROME METABÓLICO

Desde que fue descrito por primera vez por Kylin en los años 1920 como la agrupación de hipertensión, hiperglucemia y gota (Kylin y cols., 1923), el concepto de síndrome metabólico ha evolucionado, incluyendo la obesidad con acumulación excesiva de tejido adiposo en la parte superior del cuerpo como la anomalía metabólica más frecuente relacionada con la diabetes de tipo 2 y la enfermedad cardiovascular (Zimmet y cols., 2001).

Posteriormente, se han acuñado otras denominaciones para este síndrome, como síndrome X (Reaven y cols., 1988), síndrome de resistencia a la insulina (De Fronzo y cols., 1991), o "cuarteto de la muerte" (Kaplan y cols., 1989), si bien estos conceptos no han sido coincidentes en cuanto a las anomalías metabólicas que englobaban.

Aunque el término de síndrome metabólico se ha ido afianzando y ha sido finalmente aceptado por la comunidad científica como el más utilizado pese a la existencia de controversias, hasta 1998 no se produjo una iniciativa clara para desarrollar una definición reconocida internacionalmente de este síndrome y de sus manifestaciones clínicas y epidemiológicas. En este sentido, distintos grupos de expertos han propuesto definiciones, siendo las más aceptadas las desarrolladas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (WHO 1999), el *European Group for the Study of Insulin Resistance* (EGIR) (Balkau y cols., 1999) y el *National Cholesterol Education Program-Third Adult Treatment Panel* (NCEP ATP III, 2001) (Tabla 1). Todas ellas coinciden en señalar como sus componentes esenciales obesidad, definida como un índice de masa corporal (IMC) igual o superior a 30 kg/m², resistencia a la insulina, dislipidemia e hipertensión, aunque discrepancias en criterios clínicos y epidemiológicos han generado una confusión considerable, que no sólo ha reducido la utilidad de estas definiciones en el contexto clínico, sino que también ha dificultado la

comparación de la incidencia del síndrome metabólico en los distintos grupos de población (Tabla 1).

Tabla 1. Criterios definitorios del síndrome metabólico según 3 organizaciones (Alberti *y cols.*, 2006).

	OMS (1999)	EGIR (1999)	NCEP ATP III (2001)
	Intolerancia a la glucosa, diabetes o resistencia a la insulina junto con dos o más de los siguientes factores:	Resistencia a la insulina* más dos de los siguientes factores:	Tres o más de los siguientes factores:
Glucosa plasmática en ayunas		≥ 6,1 mM (110 mg/dl) pero no diabético	≥ 5,6 mM (100mg/dl)
Presión arterial	≥ 140/90 mmHg	≥ 140/90 mm/Hg o en tratamiento	≥130/ ≥85 mm/Hg
Triglicéridos	≥ 1,7 mM (150 mg/dl)	≥ 2 mM (178 mg/dl) o en tratamiento	≥ 1,7 mM (150 mg/dl)
Colesterol-HDL	♂ < 0,9 mM (35 mg/dl) ♀ < 1,0 mM (39 mg/dl)	< 1,0 mM (39 mg/dl) o en tratamiento	♂ < 1,03 mM (40 mg/dl) ♀ < 1,29 mM (50 mg/dl)
Obesidad	♂ Ratio cintura-cadera: > 0,90 ♀ Ratio cintura-cadera: > 0,85 IMC > 30 kg/m ²	♂ Perímetro de cintura > 94 cm. ♀ Perímetro de cintura > 80 cm.	♂ Perímetro de cintura > 102 cm. ♀ Perímetro de cintura > 88 cm.
Microalbuminuria	Excreción de albúmina ≥ 20 µg/min. Excreción de creatinina ≥ 30 mg/g		

*(Hiperinsulinemia: niveles de insulina en ayunas hasta un 25% más altos que los de la población no-diabética).

Por esta razón, a propuesta de la Federación Internacional de Diabetes (FID) se constituyó un grupo de consenso formado por miembros de la FID pertenecientes a todas las regiones geográficas y por representantes de distintas organizaciones profesionales, incluidas las que habían propuesto las definiciones previas del síndrome metabólico, y se ha emitido recientemente una nueva definición del mismo (Tabla 2).

Tabla 2. Definición de síndrome metabólico de la Federación Internacional de Diabetes (FID).

Obesidad central	Perímetro de cintura > 94 cm junto con dos de los siguientes factores:
Triglicéridos en plasma	≥ 1,7 mM (150 mg/dl) o en tratamiento antihiperlipidémico
Colesterol-HDL	♂ < 1,03 mM (40 mg/dl) ♀ < 1,29 mM (59 mg/dl). O en tratamiento específico
Presión arterial	Sistólica ≥ 130 mm/Hg y diastólica ≥ 85 mm/Hg o en tratamiento.
Glucosa plasmática en ayunas	≥ 5,6 mM (100mg/dl) o diabetes tipo 2 previamente diagnosticada. Si los niveles de glucosa en ayunas son mayores de 5,6 mM se recomienda test de tolerancia a la glucosa pero no es necesario para el diagnóstico.

Además de la nueva definición, los participantes de la FID identificaron otros parámetros adicionales que parecen estar relacionados con el síndrome metabólico. Estos factores pueden permitir futuros cambios en su definición y facilitan la investigación y el diagnóstico en este campo. En esta última propuesta se incluyen características como la existencia de estados proinflamatorio y protrombótico (Alberti y cols., 2006) (Tabla 3).

Tabla 3. Criterios adicionales para la investigación del síndrome metabólico.

1. Distribución anormal de la grasa corporal.
a. Distribución generalizada de la grasa corporal (DEXA)
b. Distribución central de la grasa corporal (CT)
c. Biomarcadores del tejido adiposo: adiponectina y leptina
d. Contenido graso del hígado
2. Dislipidemia aterogénica (Además de las alteraciones en los niveles de triglicéridos y colesterol-HDL)
a. Apo B (o no-HDL)
b. Partículas pequeñas de LDL
3. Intolerancia a la glucosa
4. Resistencia a la insulina
a. Niveles de insulina/proinsulina en ayunas
b. HOMA _{IR}
c. Resistencia a la insulina dada por el modelo mínimo de Bergman
d. Elevados niveles de ácidos grasos libres (AGL) en ayunas o durante el test de tolerancia a la glucosa.
e. Valor-M en clamp
5. Alteración vascular (Además de la hipertensión)
a. Disfunción endotelial
b. Microalbuminuria
6. Estado proinflamatorio
a. Proteína C reactiva (PCR) elevada
b. Citoquinas inflamatorias elevadas (TNF- α , IL-6, etc.)
c. Descenso en los niveles de adiponectina
7. Estado protrombótico
a. Factores fibrinolíticos (PAI-1, etc.)
b. Factores protromóticos (Fibrinógeno, etc.)
8. Factores hormonales

1.2. ETIOPATOGÉNESIS DEL SÍNDROME METABÓLICO

Las causas que conducen al desarrollo del síndrome metabólico son múltiples, complejas y aún no han sido bien clarificadas. La mayoría de los expertos coincide en señalar a la obesidad central, junto con la resistencia a la insulina como los principales factores etiológicos de este síndrome (Eckel y cols., 2005; Anderson y cols., 2001; Grundy y cols., 2004). Sin embargo, no se puede descartar la influencia que otros agentes causales pueden jugar en su desarrollo. Entre estos destacan factores adquiridos como la inactividad física, la edad -que está asociada a un aumento de su prevalencia- o el consumo de una dieta inadecuada (Eckel y cols., 2005; Anderson y cols., 2001; Grundy y cols., 2004; Ukkola y cols., 2001), sin olvidar el perfil genético. En este sentido, se ha observado que existen diferencias en cuanto a la frecuencia de aparición de las alteraciones constitutivas del síndrome metabólico en determinados grupos étnicos. Se ha constatado que ciertas poblaciones de Sudamérica o del sur de Asia parecen ser más susceptibles de padecer este síndrome, mientras que en la raza negra se detecta una menor incidencia, quizá debido a una menor prevalencia de dislipidemia en este grupo étnico. Además, existen polimorfismos en determinados genes que están relacionados con la aparición del síndrome metabólico, aunque su contribución a la incidencia sobre la población general es escasa y poco conocida (Dandona y cols., 2005).

En otros casos, se puede asociar la aparición de síndrome metabólico al empleo de distintos grupos de fármacos, como corticosteroides, antidepresivos, antipsicóticos y antirretrovirales, fundamentalmente porque producen ganancia de peso o redistribución del tejido adiposo que predispone a las principales manifestaciones de la enfermedad, obesidad y resistencia a la insulina (Grundy y cols., 2004).

Como se indica anteriormente, entre los principales factores etiológicos del síndrome metabólico se encuentran la obesidad, particularmente la de distribución central, y la resistencia a la insulina. A lo largo de los últimos años se han hallado indicios que colocaban a uno y a otro en el origen de la enfermedad, aunque los autores no han conseguido establecer

cuál se produce primero. Tratando de arrojar luz al respecto, distintos estudios sugieren la implicación de un estado inflamatorio entre los agentes causales de este síndrome.

1.2.1. OBESIDAD

La incidencia de obesidad ha crecido de forma exponencial en las últimas décadas. Tanto la obesidad como los desórdenes metabólicos que van asociados a ella constituyen un serio problema que afecta a la salud de la población mundial. La OMS estima que actualmente existen en el mundo 1000 millones de personas con sobrepeso, 300 millones de los cuales presentan obesidad clínica ($IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$) (WHO, 2002). Estudios recientes alertan de que este aumento de peso se está produciendo cada vez con más frecuencia en niños (Rocchini 2002). Kopelman y cols. sostienen que si esta tendencia continúa, para el año 2025, el 45% de la población de Estados Unidos y el 30% de la de Inglaterra será obesa (Kopelman y cols. 2000).

Este incremento en la incidencia de obesidad se atribuye principalmente a los cambios en el estilo de vida que han aparecido en las últimas décadas en los países desarrollados y en vías de desarrollo. El acusado descenso en la actividad física, y la ingesta crónica de un exceso de energía derivan en una situación para la que el organismo no está preparado fisiológicamente. A lo largo de la evolución los mamíferos desarrollaron sistemas de ahorro y almacenamiento de energía para garantizar la supervivencia en períodos en los que el acceso a la comida era intermitente, pero no han tenido tiempo para adaptarse a la nueva situación de constante abundancia (Hotamisligil, y cols., 2006).

En los últimos años, el tejido adiposo ha pasado de ser considerado como un mero almacén de energía a constituir un órgano fundamental para la regulación de la homeostasis energética del organismo y de la sensibilidad a la insulina (Kahn y cols., 2000; Havel y cols., 2002). Existe una nueva visión del adipocito como una célula endocrina que libera ácidos grasos libres (AGL) y un gran número de factores llamados adipocitoquinas, entre los que se encuentran el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), la proteína C reactiva (PCR), el inhibidor del

activador de plasminógeno-1 (PAI-1), interleukinas como IL-1 e IL-6 y otras moléculas como leptina, resistina y adiponectina, entre otros. Estos factores regulan numerosas funciones como la homeostasis energética, el metabolismo glucídico y lipídico, la sensibilidad a la insulina, participan en el control del apetito y la modulación de la respuesta inmune e inflamatoria, e intervienen en la función endotelial, la reproducción y el control hormonal. Estas acciones reguladoras las ejercen tanto a nivel central como periférico en tejidos como el músculo esquelético, el hígado e incluso el propio tejido adiposo. Además, expresa numerosos receptores que le permiten responder a señales aferentes de diferentes órganos endocrinos y del sistema nervioso central.

La obesidad consiste en un aumento en el número y en el tamaño de los adipocitos que forman el tejido adiposo del cuerpo, lo que se traduce en un incremento de la masa de grasa en distintas partes del organismo. Esto provoca cambios en las funciones endocrinas y metabólicas de este tejido, lo que genera alteraciones a nivel sistémico que hacen que la obesidad sea un factor de riesgo en la aparición de patologías como la diabetes de tipo 2, trastornos cardiovasculares, etc. Cuando la obesidad presenta una distribución predominantemente central, los efectos perjudiciales que ejerce sobre la salud del individuo se ven incrementados:

- Numerosos estudios han puesto de manifiesto la contribución de la acumulación de tejido adiposo visceral al desarrollo de alteraciones metabólicas como resistencia a la insulina e hiperlipidemia (Richelsen y *cols.*, 1991; Lönnqvist y *cols.*, 1995; Matsuzawa, 2005)
- La acumulación de grasa visceral provoca cambios tanto cuantitativos como cualitativos en los niveles de lípidos plasmáticos. Está relacionada con el aumento de la relación entre colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (cLDL) y colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (cHDL), con el incremento de otros lípidos como AGL, diacilglicerol (DAG), etc. (Matsuzawa, 2005).
- Se ha demostrado que el tejido adiposo visceral es mucho más resistente a la acción de la insulina que el tejido adiposo subcutáneo (Yamashita y *cols.*, 1996).

- El depósito de grasa visceral es el que más contribuye al aumento de los niveles circulantes de AGL, ya que tiene una alta tasa de lipólisis comparado con el depósito de grasa subcutánea (Richelsen y cols., 1991). Esta diferencia se debe a que la acción lipolítica de las catecolaminas se encuentra incrementada en el tejido adiposo visceral y su resistencia a la acción de la insulina lo hace menos susceptible a los efectos antilipolíticos de esta hormona (Raz y cols., 2005).
- El tejido adiposo visceral es el único que se encuentra directamente conectado con el hígado a través de la vena porta, lo que representa una amenaza para este órgano, cuya integridad y funcionalidad están comprometidas en el síndrome metabólico (Arner y cols., 2002).
- Existe un desequilibrio importante en la producción de adipocitocinas en el tejido adiposo visceral, caracterizada por un incremento de la secreción de citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1, IL-6, PCR) en detrimento de la de otras antiinflamatorias como la adiponectina, cuya producción se ve disminuida (Hotamisligil y cols., 1993). Esta situación puede contribuir a la producción de resistencia a la insulina, trombos, y otras enfermedades cardiovasculares (Matsuzawa, 2006).

1.2.2. RESISTENCIA A LA INSULINA

1.2.2.1 PAPEL FISIOLÓGICO DE LA INSULINA

La insulina es una hormona sintetizada en las células β de los islotes pancreáticos que se libera al torrente sanguíneo en respuesta al aumento de la concentración de glucosa. Su función es proporcionar a las células el combustible necesario para sus funciones, favoreciendo la captación del azúcar por parte de los tejidos e inhibiendo su producción hepática. Esta hormona es el principal agente regulador de la glucemia. Además, posee otras muchas acciones como estimular el crecimiento y la diferenciación celular, promover el almacenamiento de energía en forma de grasa en tejido adiposo, hígado y músculo

esquelético mediante la estimulación de la lipogénesis, favoreciendo la entrada de AGL para su utilización en la síntesis de triglicéridos (Bonadonna y *cols.*, 1990). También estimula la síntesis de glucógeno y proteínas e inhibe los procesos de lipólisis y glucogenólisis así como la degradación de proteínas (Saltiel y *cols.*, 2001) (Figura 1).

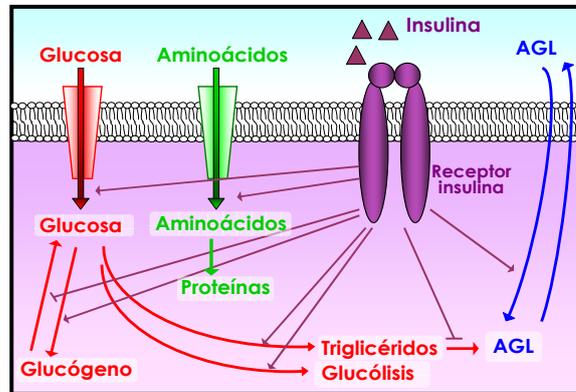


Figura 1. Efectos metabólicos de la insulina.
AGL: ácidos grasos libres.

La insulina aumenta la captación de glucosa por los tejidos mediante la estimulación de la traslocación del transportador de glucosa GLUT-4 desde el citoplasma hacia la superficie celular. Esta hormona interacciona con su receptor en la membrana celular dando lugar a la fosforilación de un resto de tirosina del sustrato del receptor de la insulina (IRS). Esta fosforilación induce a su vez la estimulación de la fosfatidil-inositol-3-kinasa (PI3K), con la consiguiente fosforilación y activación de Akt y la traslocación de los transportadores de glucosa GLUT-4 a la membrana celular para captar la glucosa del medio (Figura 2).

Más del 75% de la captación de glucosa dependiente de insulina se produce en el músculo esquelético, mientras que en el tejido adiposo se da en una proporción mucho menor (Slip y Paquet, 1990). Esta molécula, además, estimula la formación de glucógeno en el músculo. En el tejido adiposo, favorece la captación de glucosa tanto para su utilización como fuente de energía como para ser transformada en lípidos. A nivel hepático, esta

hormona estimula la utilización y el almacenamiento de la glucosa en forma de glucógeno o de lípidos, mientras inhibe su producción y liberación.

Por otra parte, distintos estudios han puesto de manifiesto el efecto antiinflamatorio de esta molécula (Dandona *y cols.*, 2001; Dandona *y cols.*, 2002). En ellos se demuestra que además de la función esencial que tiene la insulina en el control del metabolismo glucídico, esta hormona es capaz de suprimir la acción de varios factores de transcripción proinflamatorios como NF- κ B y el activador de la proteína 1 (AP-1), aumenta la expresión de κ B, y disminuye la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y la expresión del componente de la NADPH-oxidasa, p47^{phox}. En resumen, la insulina está dotada de propiedades antiinflamatorias y antioxidantes.

1.2.2.2. RESISTENCIA A LA INSULINA

Dada la importancia de las acciones de la insulina, esta hormona es una pieza fundamental en el control del metabolismo. Una respuesta menor de lo esperada a una dosis dada de insulina se conoce como resistencia a la insulina. El origen de esta alteración no está totalmente definido y distintos factores, tanto genéticos como ambientales, contribuyen a su aparición, destacando entre ellos la obesidad y el estilo de vida sedentario. En los últimos años se ha propuesto que unos elevados niveles de AGL podrían ser el punto de coincidencia entre obesidad y resistencia a la insulina (Wilding, 2007).

La relación entre el aumento de los AGL y la resistencia a la insulina fue planteada hace años por Randle *y cols.* (Randle *y cols.*, 1969) y a lo largo del tiempo numerosos estudios la han corroborado. La administración sistémica aguda de AGL reduce la captación de glucosa por el músculo esquelético de individuos sanos de forma dosis-dependiente (Boden *y cols.*, 1994; Roden *y cols.*, 1996). Otras investigaciones ponen de manifiesto que incrementos en la concentración de AGL, tanto agudos como crónicos, inducen resistencia a la insulina y, en parte, son responsables del aumento de la secreción de dicha hormona como mecanismo

compensatorio tanto en individuos delgados, como en obesos diabéticos y no diabéticos (Santomauro y cols., 1999; Boden y cols., 2003). Esta relación se confirma al observar que acciones que reducen la concentración plasmática de AGL, mejoran la utilización de la glucosa (Reaven y cols., 1988). Otros estudios mostraban como tras una liposucción, sólo los pacientes a los que se les extirpó tejido adiposo visceral y no subcutáneo, experimentaron una reducción en la resistencia a la insulina (Klein y cols., 2004). Los niveles de AGL parecen ser bastante parecidos entre individuos con similar IMC y son mayores en aquellos que presentan sobrepeso u obesidad (Nielsen y cols., 2004). La masa adiposa se ha relacionado con los niveles de AGL, más concretamente algunos estudios señalan al depósito visceral como el principal implicado en la liberación de AGL al plasma, ya que sus adipocitos son más lipolíticamente activos que los subcutáneos y más sensibles a las enzimas movilizadoras de grasa (Richelsen y cols., 1991; Raz y cols., 2005), y dada la mayor resistencia de este depósito de tejido adiposo a la acción de la insulina no se beneficia de la acción antilipolítica de la hormona (Bolindre y cols., 1983; Kurioka y cols., 2002).

El mecanismo por el que los AGL producen resistencia a la insulina consiste principalmente en una alteración en la vía de señalización intracelular de la hormona. La reducción en la fosforilación del IRS es el defecto más temprano y más pronunciado en la cascada de señalización de la insulina (Herman y cols., 2006). El mecanismo más importante que origina este defecto es la fosforilación de un resto de serina en lugar de un resto de tirosina (Paz y cols., 1997) en IRS. Existe un gran número de kinasas capaces de provocar esta fosforilación anómala, incluyendo isoformas de la protein-kinasa C (PKC), I κ B kinasa β (IKK- β) y c-Jun N-terminal kinasa (JNK). Todas ellas se encuentran elevadas en estados de obesidad y resistencia a la insulina y el bloqueo de la transcripción de sus genes previene estas alteraciones (Steinberg y cols., 2007). Estudios en humanos han revelado que elevadas concentraciones de AGL producen el depósito de lípidos y derivados lipídicos como DAG y ceramidas en el interior de las células musculares, y estos lípidos activan a la PKC (Bronfman y cols., 1988), contribuyendo así a la alteración de las vías de señalización activadas por la insulina. También se ha comprobado que los AGL pueden dañar esta vía mediante la

inhibición de la fosforilación de Akt (Belfort y *cols.*, 2005). Los AGL causan resistencia a la insulina asociada a un incremento en la PKC, causado por el depósito intracelular de DAG tanto en hígado como en músculo de rata (Boden y *cols.*, 2005).

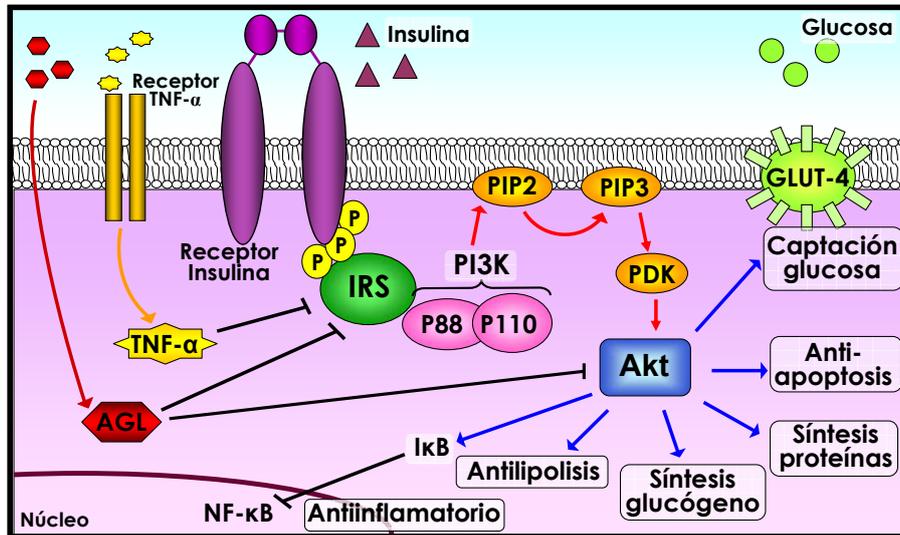


Figura 2. Señalización del receptor de la insulina. Acción de los AGL y del TNF- α sobre las vías de señalización activadas por la insulina. AGL, ácidos grasos libres; GLUT-4, transportador de glucosa.; I κ B, inhibidor del factor de transcripción NF- κ B; IRS, sustrato del receptor de insulina; NF- κ B, factor nuclear κ B; PDK, protein quinasa dependiente de fosfoinosítido; PI3K, fosfoinositol 3-quinasa; PIP2, fosfatidilinositol bifosfato; PIP3, fosfatidilinositol trifosfato; TNF- α , factor de necrosis tumoral- α .

1.2.3. COMPONENTE INFLAMATORIO DEL SÍNDROME METABÓLICO

En los últimos años se ha propuesto la existencia de una relación directa entre inflamación y síndrome metabólico, al constatar los elevados niveles de marcadores inflamatorios y citocinas proinflamatorias detectados en los pacientes afectados de este síndrome (Hotamisligil y *cols.*, 1995).

En este sentido, una revisión reciente establece una hipótesis para explicar la patogénesis del síndrome metabólico, según la cual, un estado proinflamatorio induciría la

resistencia a la insulina y conduciría a las manifestaciones clínicas y bioquímicas de este síndrome. Esta resistencia a la insulina promovería a su vez el estado inflamatorio, ya que en dicho estado se anulan los efectos antiinflamatorios de la insulina, dando lugar a un círculo vicioso que agrava cada vez más esta situación (Dandona *y cols.*, 2005). Por otra parte, muchas de las enzimas implicadas en la fosforilación anómala del IRS-1, son activadas por citoquinas inflamatorias, y a su vez esas enzimas favorecen la transcripción de mediadores y enzimas críticos en la señalización de la inflamación como IL-6, iNOS y TNF- α .

También existe una relación clara entre obesidad e inflamación. Teniendo en cuenta que el tejido adiposo es capaz de producir moléculas proinflamatorias (Hotamisligil *y cols.*, 1993), y que lo hace de forma exacerbada en situación de obesidad (Kern *y cols.*, 2001; Dandona *y cols.*, 1998), en la última década varios autores se plantearon la posibilidad de que la obesidad fuera una enfermedad inflamatoria crónica. Se lograron recoger numerosas pruebas clínicas, epidemiológicas y experimentales que asocian definitivamente la obesidad con un estado de inflamación crónica subclínica (Hotamisligil *y cols.*, 2006).

Estudios recientes han puesto de manifiesto que la ingesta de determinados macronutrientes origina la aparición de estrés oxidativo y da lugar a una respuesta inflamatoria. Las dietas ricas en azúcares y grasas saturadas en consumo crónico, son el patrón dietético que desencadena una mayor respuesta inflamatoria (Aljada *y cols.*, 2004b). Se ha demostrado que la administración de 75g de glucosa aumenta en un 140% los niveles basales de generación de anión superóxido en leucocitos, e induce la expresión de p47^{phox} (una de las subunidades de la enzima NADPH oxidasa, responsable de la producción de radical superóxido) (Dhindsa *y cols.*, 2004; Aljada *y cols.*, 2004a). La misma cantidad de glucosa también afecta a marcadores inflamatorios, induciendo el acoplamiento de NF- κ B, aumentando la expresión de p65 e inhibiendo la expresión de I κ B (Dhindsa *y cols.*, 2004; Aljada *y cols.*, 2004a; Aljada *y cols.*, 2004b).

La infusión aguda de una emulsión rica en lípidos que provoque un aumento en la concentración plasmática de ácidos grasos libres puede provocar esta reacción oxidativa e inflamatoria (Mohanty *y cols.*, 2002; Tripathy *y cols.*, 2003; Itani *y cols.*, 2005).

Consecuentemente, una reducción en la ingesta calórica y una corrección de las proporciones de macronutrientes hacia aquellos menos “reactivos” lleva a una disminución en los marcadores señalados (Dandona *y cols.*, 2001).

Considerando que la obesidad se puede entender como el resultado de un estilo de vida en el que destaca el consumo crónico de alimentos ricos en grasa y azúcares, acompañado de una escasa actividad física, estos estudios explican que la obesidad en sí misma sea capaz de dar lugar a un estado proinflamatorio.

1.2.3.1. IMPLICACIÓN DE LAS ADIPOCITOQUINAS

Sin duda, el mejor argumento para mantener la hipótesis del carácter inflamatorio del síndrome metabólico es el desequilibrio en la producción de hormonas y citocinas inflamatorias y antiinflamatorias por el tejido adiposo cuando existe obesidad (Hotamisligil *y cols.*, 1993). Las distintas moléculas secretadas por el tejido adiposo juegan un importante papel en la homeostasis energética y en la regulación de los mecanismos que conducen a la resistencia a la insulina.

1.2.3.1.1. TNF- α

La relación que existe entre las citoquinas proinflamatorias y la acción de la insulina en obesidad y diabetes tipo 2 fue reconocida por primera vez al observar la elevada producción de TNF- α en el tejido adiposo de individuos obesos (Hotamisligil *y cols.*, 1993). El TNF- α es una proteína de 17 kDa secretada como trímero de 51 kDa que toma su nombre de su identificación inicial como factor proapoptótico en células tumorales. La evidencia directa de la participación de esta citoquina en la resistencia a la insulina se obtuvo al observar que la infusión aguda de TNF- α inhibía la disponibilidad de glucosa estimulada por la insulina tanto en roedores obesos (Hotamisligil *y cols.*, 1994; 1996; Hofmann *y cols.*, 1994) como en humanos sanos (Plomgaard *y cols.*, 2005). La inhibición de la señalización del TNF- α o su neutralización mediante el uso de receptores solubles restauró la sensibilidad a la insulina en ratas obesas

Zucker (Hotamisligil *y cols.*, 1994b), pero no fue efectiva en humanos tratados durante 6 semanas (Ofei *y cols.*, 1996).

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

Los AGL circulantes se encuentran en elevadas concentraciones en el síndrome metabólico. En un estudio se puso de manifiesto que la infusión aguda de una emulsión rica en grasas capaz de elevar la concentración plasmática de AGL provocaba un considerable aumento de la concentración de TNF- α circulante (Itani *y cols.*, 2005). Varios estudios sugieren que los AGL activan las vías proinflamatorias en los macrófagos bien de forma directa, vía receptor toll-like 4 (TLR-4), bien de forma indirecta mediante reacciones de lipotoxicidad que son consecuencia de la acumulación ectópica de derivados lipídicos (Lee *y cols.*, 2003).

El TNF- α es capaz a su vez de activar rutas lipolíticas en el tejido adiposo (Zhang *y cols.*, 2002), provocando una liberación masiva de AGL al torrente circulatorio. Este hecho contribuye a generar resistencia a la insulina así como a la retroalimentación de la producción de esta citoquina, que también puede desencadenar resistencia a la insulina de forma directa, por su capacidad para fosforilar un resto de serina del IRS mediante la activación de JNK e I κ B/NF κ B (Arkan *y cols.*, 2005; Cai *y cols.*, 2005), inhibiendo la cascada de señalización de la insulina. Además, el TNF- α causa alteraciones metabólicas en tejidos afectados por la resistencia a la insulina como hígado y músculo esquelético. Aunque el mecanismo exacto aún no se conoce completamente, dichas alteraciones parecen estar relacionadas con un

descenso de la tasa de oxidación de AGL, fenómeno descrito y asociado a la presencia de obesidad, que podría originarse como consecuencia de la inhibición que el TNF- α causa en la protein-kinasa activada por 5'-AMP (AMPK) (Steinberg y cols.,2007). El TNF- α reduce la actividad de esta enzima al incrementar la expresión de la fosfatasa encargada de desfosforilar e inactivar a la AMPK, la proteína-fosfatasa 2C (PP2C) (se ha observado que la inhibición de esta fosfatasa evita los efectos del TNF- α sobre la AMPK) (Steinberg y cols., 2007). Como consecuencia de la inhibición de la AMPK, se activa la acetil-CoA carboxilasa 2 (ACC2), que actúa inhibiendo la oxidación de AGL (Hardie y cols., 2003).

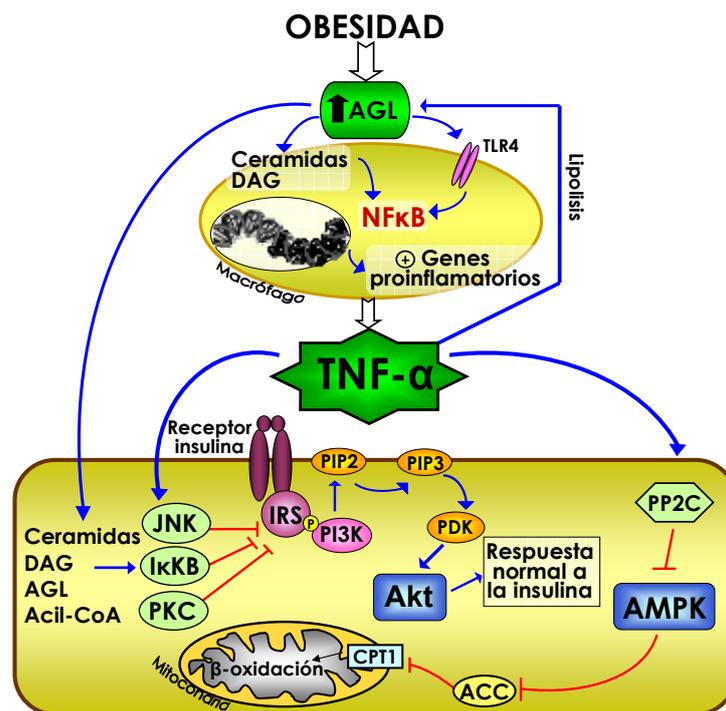


Figura 3. Mecanismos implicados en los efectos metabólicos del TNF- α . ACC, acetil Co-A carboxilasa; AMPK, protein kinasa activada por AMP; CPT1: carnitina palmitoil-transferasa; DAG: diacilglicerol; I κ B: inhibidor de la kinasa del NF- κ B; IRS, sustrato del receptor de insulina; PDK, protein kinasa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

1.2.3.1.2. ADIPONECTINA

De los factores producidos por el tejido adiposo implicados en el control de la homeostasis energética, la adiponectina es el único que es exclusivamente sintetizado y secretado por dicho tejido (Scherer *y cols.*, 1995; Hu *y cols.*, 1996; Maeda *y cols.*, 1996). La secreción de esta molécula se produce en grandes cantidades, representando aproximadamente un 0,01% del total de las proteínas plasmáticas y su concentración en sangre se encuentra en el rango de los $\mu\text{g/ml}$ (Whitehead *y cols.*, 2005). Al contrario de lo que sucede con otras moléculas secretadas por el adipocito, los niveles de adiponectina disminuyen al aumentar la masa de tejido adiposo, es decir, cuando existe obesidad (Arita *y cols.*, 1999) y su concentración está igualmente en una relación inversa con la resistencia a la insulina (Hotta *y cols.*, 2000).

La adiponectina es una hormona de 30 kDa. Se puede presentar bajo diferentes formas, como la fracción globular de la proteína, monómeros, homotrímeros, hexámeros que constituyen la forma completa de la molécula. Su secreción puede estar influenciada por distintos factores tales como edad, sexo, fertilidad, ritmos circadianos, ayuno-alimentación etc. Muchos de ellos pueden perder esta influencia en situación de obesidad y recuperarla con la pérdida de peso (Calvani *y cols.*, 2004). Se ha observado que en estado de obesidad existe una correlación negativa entre secreción de adiponectina e IMC, y ésta es mayor en el tejido adiposo visceral, que en el subcutáneo (Matsuzawa, 2006). También puede verse afectada la producción de esta molécula por la secreción de otras adipocitocinas como el TNF- α , con el que parece tener una relación recíproca de inhibición (Maeda *y cols.*, 2002; Cawthorn *y cols.*, 2008).

La adiponectina ejerce sus acciones en el organismo mediante la interacción con sus receptores específicos. Se han identificado dos receptores para esta molécula: adipoR1 y adipoR2, con una amplia distribución en el organismo. Cabe destacar la presencia del adipoR1 en numerosos tejidos, como músculo esquelético, hueso, páncreas, etc. Este receptor presenta una mayor afinidad por la fracción globular de la adiponectina. El adipoR2 se expresa fundamentalmente en el hígado, y manifiesta una mayor afinidad por la forma de

estructura completa (Kadowaki y cols., 2005). Los efectos fisiológicos que se obtienen de la unión de esta adipocitoquina a sus receptores son, por un lado, favorecer la sensibilidad a la insulina, mediante el aumento de la captación de glucosa y de la oxidación de AGL, y mediante la reducción de la gluconeogénesis, y por otro lado, ejercer un efecto antiinflamatorio que mantiene un equilibrio con otras citoquinas segregadas por el tejido adiposo (Figura 4).

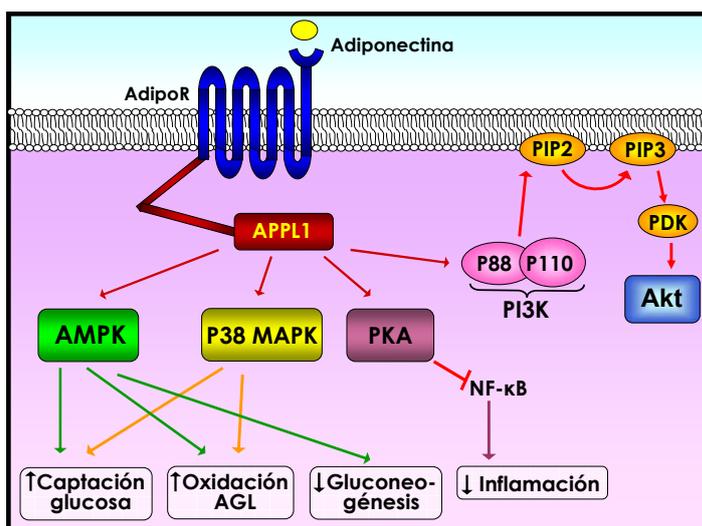


Figura 4. Efectos de la adiponectina mediados por sus receptores. APPL1, proteína adaptadora que contiene un dominio de homología pleckstrin, un dominio de unión a fosfotirosina (PTB) y un motivo zipper de leucina; MAPK, proteína quinasa activada por mitógeno; NF-κB, factor nuclear κB; PDK, proteína quinasa dependiente de fosfoinosítido; PI3K, fosfatidil inositol 3-quinasa; PIP2, fosfatidil-inositol bifosfato; PIP3, fosfatidil-inositol trifosfato; PKA, proteína quinasa A o proteína quinasa dependiente de AMPc.

Actualmente existen numerosas evidencias que sugieren que son necesarios ciertos niveles de adiponectina para mantener la homeostasis energética y prevenir enfermedades metabólicas. Se ha demostrado que bajos niveles de adiponectina se asocian de forma independiente con el síndrome metabólico, siendo dicha asociación incluso más fuerte que la que presentan otros marcadores inflamatorios (Matsushita y cols., 2006).

También se ha observado que la administración exógena de adiponectina a individuos obesos aumenta la sensibilidad a la insulina, efecto asociado a una disminución de los niveles plasmáticos de AGL y triglicéridos (Hotta *y cols.*, 2001; Fruebis *y cols.*, 2001). Según Yamauchi T *y cols.*, esta disminución del nivel de AGL es consecuencia de la activación de la AMPK en músculo esquelético por la adiponectina globular y en el hígado por la molécula completa (Yamauchi *y cols.* 2002). Este grupo de investigación realizó distintos estudios con el fin de identificar las vías por las que la adiponectina ejerce sus efectos beneficiosos en estos desórdenes metabólicos, llegando a la conclusión de que esta adipocitoquina es capaz de activar la fosforilación de la AMPK, inhibiendo con ello la actividad de la ACC2 y por lo tanto aumentando la oxidación de AGL, con el consiguiente descenso de los niveles de estos en plasma. También demostraron que siguiendo la misma ruta, la adiponectina aumenta la captación de glucosa, ya que es capaz de reducir la fosforilación de los restos de serina del IRS-1 provocada por los elevados niveles de mediadores inflamatorios mediante la activación de la kinasa encargada de fosforilar/activar a la AMPK, LKB1 (Changhua *y cols.*, 2007). Como consecuencia de esta activación se producen además el incremento de la producción de lactato y la reducción de la expresión de moléculas implicadas en la gluconeogénesis en el hígado (Combs *y cols.*, 2001). Todos estos efectos desaparecieron al bloquear la vía de la AMPK mediante adenovirus que expresaban un gen nulo para la subunidad α de la AMPK, demostrando que esta vía es necesaria para la obtención estos efectos.

Además de los acciones metabólicas mediadas por la AMPK, la adiponectina posee un potente efecto antiinflamatorio y antiaterogénico (Yamauchi *y cols.*, 2003; Okamoto *y cols.*, 2002) que la convierten en uno de los mejores aliados del organismo para combatir los desequilibrios metabólicos propios de este síndrome.

1.2.3.1.3. LEPTINA

Otra de las adipocitokinas que interviene de forma destacada en la regulación de la homeostasis energética es la leptina. Su descubrimiento en 1994 (Zhang *y cols.*, 1994), abrió las puertas a toda una serie de investigaciones acerca de los factores derivados del tejido

adiposo y su papel en el mantenimiento de la homeostasis energética. La leptina es un péptido de 16 kDa producto del gen *ob*. Aunque es producida y secretada principalmente por el tejido adiposo, puede proceder de otros tejidos como la placenta, la mucosa gástrica y el epitelio mamario (Masuzaki *y cols.*, 1997). Los niveles plasmáticos de esta molécula suelen ser bajos -del orden de ng/ml- (Simon *y cols.*, 2002) y guardan una relación directa con la masa de tejido adiposo y el IMC. En individuos delgados sanos, la mayor parte de la leptina que circula en el plasma lo hace unida a proteínas, siendo ésta la forma más propicia para ser captada por los tejidos y desempeñar su función. Además, de esta forma se retrasa su aclaramiento renal.

Inicialmente se creía que las acciones de la leptina eran exclusivamente centrales, pero el descubrimiento de la presencia de sus receptores, OB-R, en prácticamente todos los tejidos del organismo ha determinado que se le atribuyan numerosas funciones fisiológicas (Frühbeck *y cols.*, 2002). Existen distintas isoformas de este receptor (a, b, c, d, e y f), pero la forma larga del receptor, OB-Rb parece ser la única que inicialmente se considera funcional (Lee *y cols.*, 1996). La ausencia o el mal funcionamiento de este receptor es lo que provoca el fenotipo de obesidad que presentan algunos modelos animales como los ratones *db/db* o las ratas *fa/fa* (Zucker) respectivamente (Chua *y cols.*, 1996).

En los últimos años, el estudio de las rutas de señalización derivadas de la unión de la leptina a su receptor ha llevado a una mayor comprensión de los mecanismos bioquímicos y moleculares de sus acciones en el organismo. El receptor OB-R, se ha incluido en la superfamilia de receptores de citocinas de clase I, por el elevado grado de homología que presenta con sus miembros. Las principales vías de señalización intracelular implicadas en su funcionamiento incluyen la activación de JAK (Janus kinasas) y STAT (Transductores de señales y activadores de transcripción) (Sahu *y cols.*, 2004; Hegyi *y cols.*, 2004; Sweeney *y cols.*, 2002; Ahima *y cols.*, 2004). Sólo el receptor OB-Rb en su forma larga posee los motivos requeridos para la activación de la señalización JAK/STAT (Bjørnbæck *y cols.*, 1997; Myers *y cols.*, 2004).

La vía de JAK/STAT comprende cuatro tirosin-kinasa no asociadas al receptor (JAK) y siete factores de transcripción (STAT) que están regulados por fosforilación en residuos

específicos de serina y tirosina. La vía es típicamente activada por interferones, interleukinas y otras citocinas cuyos receptores carecen de actividad kinasa. La secuencia de activación por leptina se da de la siguiente manera: la leptina se une a su receptor, dando lugar a un cambio de conformación que permite interaccionar a los JAKs. Esto permite su activación y con ella su capacidad para fosforilar otros JAKs y otros restos de tirosina de la región citoplasmática del receptor, lo que a su vez permite la asociación de STATs, que pasan a ser sustrato de los JAKs, y, una vez fosforilados, se disocian del receptor para migrar al núcleo y promover la transcripción de genes. (Bates y Myers 2003). Esta secuencia y sus efectos son modulados por un sistema de *feed-back* negativo mediado por los supresores de señalización de citocinas (SOCS) (Bjørnbæk y cols., 2000).

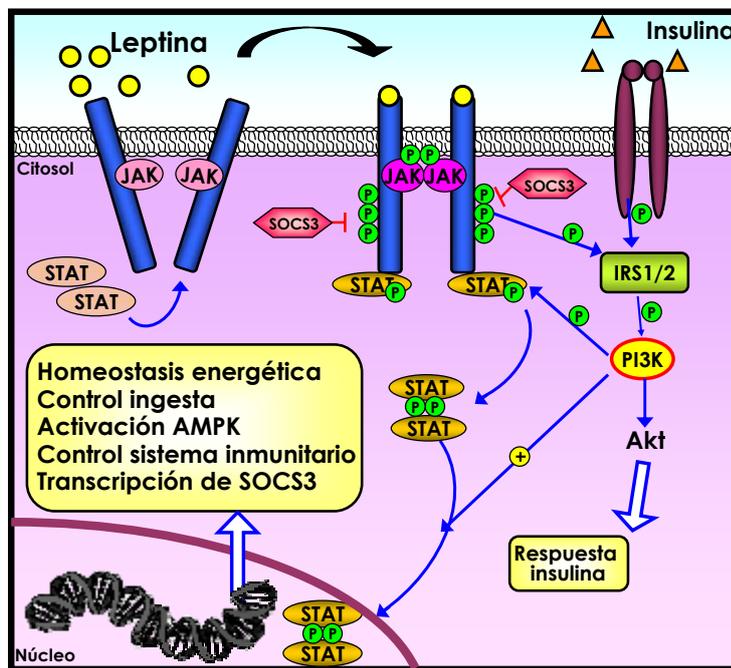


Figura 5. Señalización intracelular de la leptina y su interacción con la insulina. IRS, sustrato del receptor de la insulina; JAK, janus kinasas; P, fosforilado; PI3K, fosfatidil inositol 3-quinasa; SOCS, supresores de señalización de citoquinas; STAT: transductor de señales y activador de transcripción.

Los principales efectos que se le pueden atribuir a la leptina son los del control del balance energético del organismo, la modulación del sistema inmunitario y el control de la reproducción y el desarrollo sexual. Entre ellos, el que nos ocupa en este caso es el mantenimiento de la homeostasis energética. En este sentido, la leptina, al ser secretada por el tejido adiposo en cantidades proporcionales a la masa del mismo, actúa como un indicador del estado de la reserva energética del organismo completo. En consecuencia, en caso de reserva abundante de energía (elevado IMC), los niveles de leptina se encuentran aumentados (Isaganaitis y cols., 2005). Este control se lleva a cabo tanto a nivel periférico como central. En el primer caso, la regulación se realiza mediante la activación de diferentes rutas, destacando la activación de la enzima 5'-AMPK. Se ha observado que la leptina es capaz de activar de forma directa e independiente de AMP, en parte mediante estimulación simpática, la subunidad $\alpha 2$ de la AMPK en tejidos periféricos, lo que conlleva un aumento del gasto energético mediante la activación de la oxidación de glucosa y de AGL (Minokoshi y cols., 2004; Ceddia y cols., 2005; Kamohara y cols., 1997; Muoio y cols., 1997). En la regulación central de la homeostasis energética la leptina actúa transmitiendo información acerca de la reserva energética desde el resto del organismo hasta el hipotálamo, ejerciendo la modulación del apetito (Jéquier y cols., 1999; Niswender y cols., 2001). En una situación de acumulación de tejido adiposo, se produce un aumento de la concentración de leptina, aportando al hipotálamo el mensaje de abundancia que se traduce en una reducción del apetito y un aumento de la actividad catalítica en los tejidos efectores. Por el contrario, en el caso de que se produzca una reducción del nivel de leptina motivada por un ayuno de 12 horas o más, o por una pérdida de masa grasa, la señal interpretada por el hipotálamo es de escasez, lo que conduce a un aumento del apetito y a la disminución del gasto energético (Niswender y cols., 2001; Isaganaitis y cols., 2005).

Estos efectos de la leptina se encuentran íntimamente ligados a la acción de la insulina. Ambas hormonas son sintetizadas y secretadas en situaciones de abundancia energética, sus receptores se encuentran en las mismas neuronas del hipotálamo y ambas producen efectos anorexígenos cuando se administran en el fluido cerebro-espinal, con la

diferencia de que los niveles de insulina reflejan cambios agudos en la ingesta energética mientras los de leptina evidencian cambios a medio-largo plazo (Carvalho y cols., 2005). Igualmente sus vías de señalización intracelular están conectadas ya que la activación del receptor OB-R por la leptina se traduce en la fosforilación de un resto de tirosina del IRS, contribuyendo a la activación de Akt (Niswender, y cols. 2004).

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

- A nivel central se produce una reducción del transporte de las hormonas a través de la barrera hemato-encefálica y una disminución de la señalización intracelular. Lo primero se justifica porque los transportadores de la barrera son saturables y en situación de obesidad, dados los elevados niveles de leptina e insulina, no son capaces de introducir cantidades suficientes para llevar al hipotálamo la información real de la situación energética y obtener un efecto (Morrison y cols., 2008). La reducción de la señalización intracelular se debe a que las dos hormonas comparten la enzima fosfatidil-inositol-3-kinasa (PI3K) en sus cascadas intracelulares, estableciéndose un sinergismo entre ellas que se ve truncado en el caso del síndrome metabólico, ya que la fosforilación en un resto de serina en IRS impide la activación de PI3K (Niswender y cols., 2001) (Figura 5).

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

1.3 IMPLICACIONES ENERGÉTICAS DE LA 5'-AMPK

La AMPK es una proteína sensible al estrés metabólico, responsable de coordinar el metabolismo celular y la transcripción de genes para conseguir un equilibrio entre almacenamiento y gasto de energía en función del aporte de nutrientes y las demandas energéticas (Hardie y cols., 1997). Se trata de una proteína heterotrimérica, formada por tres subunidades, α , β , y γ . El principal estímulo activador de la AMPK es la depleción energética manifestada por un aumento en la relación AMP/ATP, aunque también puede ser activada por el estrés celular o la hipoxia (Hardie y cols., 2003). La activación de la AMPK depende fundamentalmente de la fosforilación en Thr¹⁷² en el dominio catalítico de la subunidad α , mediante la kinasa LKB1 (Sakamoto y cols., 2005). Además, la AMPK puede ser activada alostéricamente en la subunidad γ por AMP e inhibida por ATP (Davies y cols., 1995). Los principales efectos de su activación dan lugar a:

- La supresión de las rutas de utilización de ATP (síntesis de glucógeno, ácidos grasos, colesterol y proteínas).
- El aumento de los procesos de síntesis de ATP (transporte de glucosa al interior de la célula, glucólisis, oxidación de ácidos grasos en la mitocondria, etc).

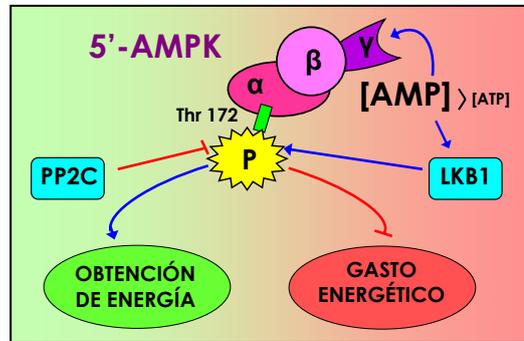


Figura 6. Activación de la enzima 5'-AMPK. LKB1, serin/treonin protein kinasa. PP2C, proteína fosfatasa 2C;

Uno de los principales efectos derivados de la activación de la AMPK es el aumento de la tasas de oxidación de ácidos grasos. La AMPK activada fosforila a la ACC, inhibiéndola, lo que conduce a una reducción en el nivel de malonil-CoA y con ello un aumento del flujo de ácidos grasos hacia el interior de la mitocondria, vía carnitina-palmitoil-transferasa1 (CPT1). En este aspecto, la AMPK juega un importante papel, coordinando cambios en el metabolismo lipídico las rutas anabólicas a catabólicas en casos de escasez energética (Hardie y cols., 2003). La AMPK interviene en el control de muchos otros procesos metabólicos (Figura 7). Desempeña un papel clave en la regulación de la síntesis de lípidos mediante la inhibición de otras enzimas implicadas como son la sintasa de ácidos grasos (FAS), la glicerolfosfatoaciltransferasa (GPAT) y la hidroximetilglutaril-CoA reductasa (HMG-CoA). También inhibe la síntesis de proteínas, por ser este un proceso de elevado coste energético. Su acción sobre el metabolismo glucídico viene dado por la inhibición de la síntesis de glucógeno y el aumento de la captación de glucosa, para favorecer su oxidación en la glucólisis (Hardie y cols., 2003).

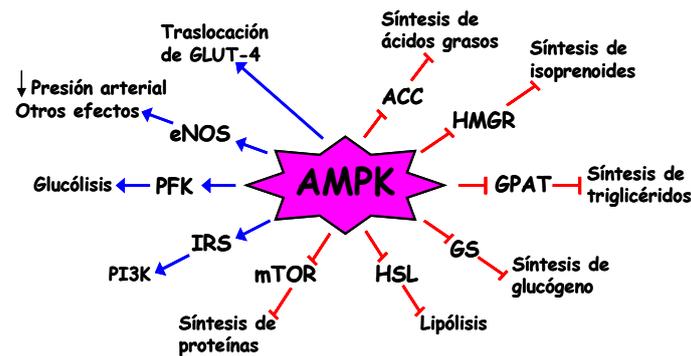


Figura 7. Funciones de la enzima 5'-AMPK. ACC: acetyl CoA carboxilasa; eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial; GLUT-4, transportador de glucosa; GPAT: glicerolfosfatoaciltransferasa; GS: glucogeno sintasa; HMGR: hidroximetilglutaril-CoA reductasa; HSL: lipasa sensible a hormonas; IRS: sustrato del receptor de insulina; mTOR: *mammalian target of rapamycin*; PFK: fosfofructokinasa.

Dada la naturaleza de los efectos de la AMPK, fue necesario conocer qué relación existe entre estos efectos y los de la insulina para averiguar qué papel desempeña cada una en el síndrome metabólico. Las rutas de señalización de la insulina se activan en abundancia de nutrientes, mientras que la de la AMPK se activa en escasez de los mismos. La insulina y la glucosa inhiben la actividad de la AMPK en todos los tejidos estudiados, ya que son señales de abundancia energética (Kola y cols., 2006). La inhibición de la AMPK por la insulina se produce por la fosforilación en Ser^{485, 491} de la subunidad α por Akt, lo que da lugar a una menor fosforilación en Thr¹⁷² (Horman y cols., 2006).

No obstante, insulina y AMPK pueden actuar en el mismo sentido, como en procesos que regulan niveles plasmáticos de glucosa (Mhairi y cols., 2006), o en el control de la lipólisis:

- En el músculo esquelético, la activación de ambas rutas estimula la captación de glucosa mediante el aumento de la translocación de GLUT-4 a la superficie de la membrana celular. Posteriormente la glucosa es destinada a fines distintos: la captada por acción de la insulina se emplea para la síntesis de glucógeno (efecto anabólico), mientras que la

captada por acción de la AMPK es oxidada para obtener energía (efecto catabólico) (Kramer y *cols.*, 2006; Treebak y *cols.*, 2006).

- A nivel hepático la activación de estas dos vías reduce la expresión de enzimas gluconeogénicas (Lochhead y *cols.*, 2000). La insulina, como hormona liberada en respuesta a una elevada concentración de glucosa en sangre, reprime la síntesis hepática de glucosa. En el caso de la AMPK, esta represión de la síntesis hepática de glucosa puede tratarse de una de sus acciones antianabólicas, y parece ser una de las principales causas del efecto hipoglucemiante de la adiponectina e incluso de fármacos como la metformina (Shaw y *cols.*, 2005).
- Insulina y AMPK ejercen su cooperación también en los adipocitos, donde ambas suprimen la activación de la lipasa sensible a hormonas (HSL) y, en consecuencia, la lipólisis. La HSL se activa por fosforilación por protein-quinasas AMPc dependientes (PKA). Las acciones de insulina y AMPK transcurren por vías de señalización diferentes. La insulina da lugar a la fosforilación y activación de la fosfodiesterasa 3B vía Akt, lo que disminuye la cantidad de AMPc (Wijkander y *cols.*, 1989). La AMPK fosforila directamente la HSL en Ser⁵⁶⁵, antagonizando así su activación por las PKA (Garton y *cols.*, 1989). Esta fosforilación impide su translocación a la gota lipídica del adipocito, previniendo con ello su acción lipolítica (Daval y *cols.*, 2005). En el caso de la insulina, se puede decir que ésta es una de sus acciones anticatabólicas. Sin embargo la actuación de la AMPK tiene una motivación más compleja. Si los AGL liberados como consecuencia de la lipólisis no son eliminados de la célula con rapidez, se reciclan dando lugar a nuevos triglicéridos, consumiendo ATP (Brooks y *cols.*, 1983). La inhibición de la lipólisis por AMPK, se ha propuesto como un mecanismo para limitar ese reciclaje, asegurando que la tasa de lipólisis no supere la tasa de eliminación o metabolización de AGL y así no consumir energía en su transformación en triglicéridos (Hardie y *cols.*, 1997).

Los efectos paralelos de insulina y AMPK en la captación de glucosa en el músculo y la producción hepática de glucosa, constituyeron la base para proponer que los activadores de

la AMPK podrían utilizarse en tratamiento de la diabetes de tipo 2 y el síndrome metabólico (Winder *y cols.*, 1999).

En otros tejidos como el adiposo, se ha observado que el incremento en la captación de glucosa puede ser independiente de la cascada de señalización de la insulina y podría estar estimulado por otras moléculas relacionadas con la actividad de AMPK como la adiponectina (Wu *y cols.*, 2003). De hecho, uno de los aspectos más interesantes de la investigación acerca de esta enzima, es que se ha demostrado que su actividad en diversos tejidos está regulada por factores hormonales como leptina (Minokoshi *y cols.*, 2002; Steinberg *y cols.*, 2004) y adiponectina (Yamauchi *y cols.*, 2002; Tomas *y cols.*, 2002), que la estimulan, y por por citoquinas como IL-6 (Carey *y cols.*, 2006) y TNF- α (Steinberg *y cols.*, 2007) que la inhiben. Destaca esta regulación de la AMPK en el tejido adiposo, que secreta de forma mayoritaria, o incluso exclusiva, estas moléculas.

Por otra parte, la activación de la AMPK conduce al aumento de la expresión de adiponectina en este tejido (Lihn *y cols.*, 2004; Sell *y cols.*, 2006), aunque no se conoce exactamente el mecanismo implicado. En los estudios que han conducido a esta observación, se puso de manifiesto igualmente cómo la activación de esta proteína reducía la producción de TNF- α e IL-6, lo que se explica por el papel de la adiponectina como inhibidor de la producción de TNF- α .

2. COMPUESTOS POLIFENÓLICOS

Los compuestos polifenólicos constituyen uno de los grupos más numerosos y ampliamente distribuidos del reino vegetal, con una lista de más de 8000 estructuras que sigue en continuo crecimiento. Existen numerosas clasificaciones, pero normalmente se agrupan según el número de anillos fenólicos que contienen y en función de cómo se unen entre sí. Se distinguen dos grandes grupos de moléculas, polifenoles flavonoides y no flavonoides, siendo el primero el más numeroso (figura 8). Los polifenoles también se pueden clasificar en función del número de átomos de carbono de la cadena alifática que se encuentra sustituyendo el núcleo bencénico. Sus estructuras van desde moléculas muy simples, como los ácidos fenólicos, hasta otras altamente polimerizadas, como los taninos. Suelen encontrarse en la naturaleza unidos a un resto de azúcar, que principalmente es la glucosa.

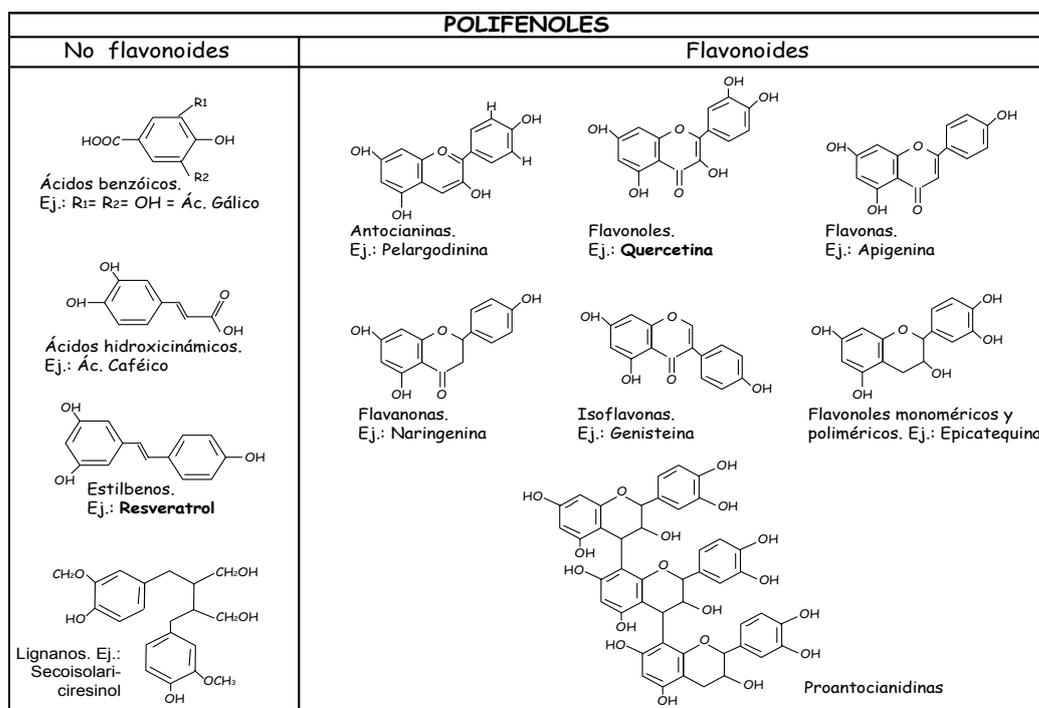


Figura 8. Clasificación de polifenoles.

Desde hace décadas, los polifenoles presentes en las plantas han interesado a los científicos. Estos compuestos son esenciales tanto en la fisiología como en la morfología de los vegetales. La función de los polifenoles en los vegetales es variada: pueden actuar como antioxidantes, pueden inhibir o activar el crecimiento de las plantas, inhibir la degradación de la auxina (hormona vegetal), también captan el 90% de las radiaciones UV impidiendo los efectos nocivos de las radiaciones en los tejidos internos, resistencia a plagas o a condiciones ambientales adversas. Son componentes de esencias y pigmentos de las flores que confieren aromas y coloraciones atractivos de insectos con lo que se favorece el proceso de floración, en las plantas polinizadas por insectos, del mismo modo los fenoles también confieren aromas y colores a los frutos que los hacen apetecibles para los herbívoros. A nivel de microorganismos, las plantas se defienden del ataque de patógenos sintetizando fitoalexinas, que son tóxicos para los microorganismos atacantes. También los fenoles protegen a las plantas generando sabores (principalmente amargos) o texturas (los taninos) que resultan desagradables para los herbívoros, por lo que este tipo de animales se nutren de otras plantas. En general la acción principal de estos compuestos es la de establecer relaciones químicas de las plantas con su entorno. Se encuentran prácticamente en todas las plantas y por tanto se encuentran integrados en la dieta humana (Cheynier *y cols.*, 2005).

Una vez incorporados a la dieta humana, los polifenoles pueden tener variados efectos. Como antioxidantes, se les ha atribuido una gran cantidad de propiedades beneficiosas para la salud, ya que pueden proteger estructuras celulares del ataque de especies reactivas del oxígeno y así limitar el riesgo de padecer enfermedades asociadas al estrés oxidativo. Existen numerosos estudios que atribuyen a los polifenoles de la dieta un importante papel en la prevención de enfermedades cardiovasculares, cáncer, osteoporosis, diabetes mellitus y enfermedades neurodegenerativas (Scalbert *y cols.*, 2005). Sin embargo, en los últimos años se han publicado nuevos estudios que sugieren una gran variedad de mecanismos de acción diferentes a la acción antioxidante, a través de los cuales los polifenoles podrían ejercer parte de sus acciones beneficiosas sobre los sistemas biológicos. Entre estos otros mecanismos destacan su capacidad para modular la actividad de enzimas

tales como la telomerasa (Naasani y cols., 2003), la ciclooxigenasa (Hussain y cols., 2005; O'Leary y cols., 2004) y la lipooxigenasa (Sadik y cols., 2003; Schewe y cols., 2001), o su capacidad para interactuar con señales de transducción y receptores celulares (Wiseman y cols., 2001; Birt y cols., 2001; Kris Eterno, PM. y cols., 2002). También se han descrito sus efectos en el tratamiento de la infección por VIH (Artico y cols., 1998), y se han puesto de manifiesto sus efectos antiinflamatorios (Biesalski y cols., 2007; Rahman y cols., 2006), antiaterogénicos, antidiabéticos (Manach y cols., 2005), y antiobesidad (Hsu y cols., 2008).

2.1. FLAVONOIDES

Los flavonoides constituyen un extenso grupo de metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el Reino Vegetal. Son compuestos polifenólicos de bajo peso molecular que se encuentran, prácticamente, en todas las partes de la planta: fruto, semilla, corteza, etc. Son los pigmentos responsables de las coloraciones amarilla, naranja y roja de esas partes de las plantas. El término flavonoide se refiere a un grupo de compuestos químicos que comparten un esqueleto común de tres anillos. Esta estructura básica permite multitud de sustituciones y variaciones que determinan las distintas clases de flavonoides. Esta estructura básica se compone de dos anillos bencénicos (A y B) unidos por un pirano (C) (Figura 9). Se han descrito más de 4000 flavonoides distintos y este número continúa creciendo cada día (Cody, 1988).

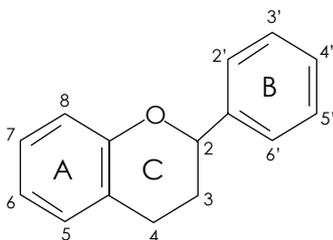


Figura 9. Estructura básica de los flavonoides

Se han realizado diferentes estudios para cuantificar el contenido en flavonoides de distintas plantas (Bilyk y Sapers, 1985; Hertog y cols., 1992; Rice-Evans y Packer, 1998). La ingesta diaria de flavonoides (fundamentalmente contenidos en cebollas, manzanas, uvas, cítricos,

vino, té, bayas y algunas especias) en la dieta humana es altamente variable en función de los hábitos alimenticios. La ingesta media estimada oscila entre 23 mg/día (Hertog y cols., 1993a) y más de 500 mg/día (Kühnau, 1976; Manach y cols., 1996). Las principales fuentes dietéticas de flavonoides son frutas y verduras (las cebollas, las manzanas, etc) y bebidas como el vino tinto y el té (Hertog y cols., 1993b). El consumo de flavonoides en la dieta supera al de otros antioxidantes naturales como la vitamina E (7-10 mg/día) o el β -caroteno (2-3 mg/día) (Hertog y cols., 1993b).

Como polifenoles que son, se ha descrito un amplio rango de acciones biológicas de los flavonoides, entre las que destacan acciones antibacterianas, antivirales, antiinflamatorias, antialérgicas, antihepatotóxicas, antiulcerosas, analgésicas, hipoglicémicas, estrogénicas, antidiarreicas, antiinflamatorias y anticancerígenas (Formica y Regelson, 1995; Rice-Evans y Packer, 1998, Middleton y cols., 2000). Además, diversos estudios epidemiológicos, que han incluido más de 100.000 pacientes (Hertog y cols., 1993b; 1995; 1996; 1997; Knekt y cols., 1996; Rimm y cols., 1996; Yochum y cols., 1999; Hirvonen y cols., 2000), han demostrado una correlación inversa entre la ingesta de flavonoides en la dieta y la mortalidad a largo plazo por cardiopatía isquémica y la incidencia de accidentes cerebrovasculares. Por otro lado, se ha sugerido que los polifenoles presentes en el vino, de los cuales los flavonoides son componentes importantes, podrían ser responsables de la *paradoja francesa*, es decir, de la baja tasa de mortalidad por cardiopatía isquémica observada en Francia y en otros países mediterráneos, a pesar de que los pacientes están expuestos a una dieta rica en grasa saturada (St. Leger y cols., 1979; Truelsen y cols., 1998).

Los flavonoides son compuestos típicamente polifenólicos y actúan como potentes agentes quelantes de metales y secuestradores de radicales libres (Thorel y cols., 1986; Kandaswami y Middleton, 1994). Se cree que su actividad antioxidante reside, principalmente, en su habilidad para donar átomos de hidrógeno y así, "barrer" los radicales libres generados durante la peroxidación lipídica.

2.1.1. QUERCETINA

Entre los flavonoles de la dieta, el flavonol quercetina es el más abundante, constituyendo aproximadamente el 60 % de la ingesta total de flavonoides (Hertog *y cols.*, 1993a). Este flavonoide presenta en su estructura sustituciones hidroxílicas en las posiciones 5, 7, 3' y 4' (Figura 10).

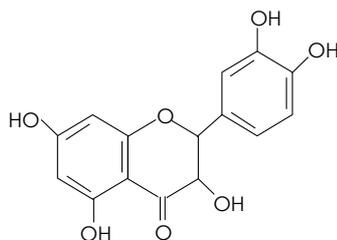


Figura 10. Estructura química de la quercetina

Los numerosos estudios acerca del potencial terapéutico de la quercetina han llevado a un aumento del interés por la biodisponibilidad del flavonol administrado por vía oral, llegando a la conclusión de que la forma más biodisponible es el aglicón (quercetina libre de la unión a azúcares) en dosis elevadas (Bischoff *y cols.*, 2008).

2.2.1.1. EFECTOS DE LA QUERCETINA

La quercetina ha sido descrita por ejercer numerosos efectos, tanto *in vivo* como *in vitro*, sobre los sistemas biológicos. Entre estos efectos, destacan los siguientes:

- Capacidad antioxidante. Dentro de la familia de los flavonoides, la quercetina es el que posee mayor poder antioxidante contra especies reactivas del oxígeno, incluido el anión superóxido (Boots *y cols.*, 2008). La quercetina reduce la oxidación de LDL mediante la inhibición de la enzima mieloperoxidasa en neutrófilos (Loke *y cols.*, 2008). También interfiere con la actividad de la enzima iNOS reduciendo la producción de peroxinitrito (Shutenko *y cols.*, 1999). La inhibición del sistema xantina-

deshidrogenasa/xantina-oxidasa es otro importante mecanismo por el que la quercetina disminuye el daño oxidativo tras una isquemia u otras condiciones patológicas (Bindoli y cols., 1985). Además, la quercetina posee acción antihipertensiva y mejora la función endotelial (Romero y cols., 2008; Duarte y cols., 1993a, 1993b, 2001a). La protección antioxidante y vascular previene accidentes cerebrovasculares (Knekt y cols., 2000).

- Actividad antiinflamatoria. Desde hace varios años se presenta la quercetina como posible principio activo antiinflamatorio, ya que ha mostrado ser inhibidor de la liberación de histamina y de otros mediadores inflamatorios en respuesta a lipopolisacárido (LPS) en macrófagos aislados (Manjeet and Ghosh, 1999) y mastocitos (Theoharides y cols., 2001). Dada la importancia de la infiltración de macrófagos en la aparición de inflamación en los tejidos, también se ha estudiado y puesto de manifiesto el efecto antiinflamatorio de la quercetina en órganos como el hígado (Simoes Dias y cols., 2005), el tejido adiposo (Rivera y cols., 2008), el cerebro (Singh y cols., 2008), el intestino (Comalada y cols., 2005; Camuesco y cols., 2004), etc. Los mecanismos implicados no están totalmente definidos, pero existen numerosos estudios que proponen una reducción en la producción de citokinas proinflamatorias mediante una atenuación de la expresión de NF- κ B, STAT1 y p38 MAPK (Hämäläinen y cols., 2007; Min y cols., 2007), inhibición de la isoforma inducible de la NOS (iNOS), COX2 y LOX, bloqueando la ruta del ácido araquidónico y Proteína C reactiva y aumentando la expresión de adiponectina (Biesalski y cols., 2007; García-Mediavilla y cols., 2007; Rivera y cols., 2008).
- Actividad antimicrobiana. El uso de flavonoides contra la infección por bacterias, hongos o protozoos tiene dos objetivos: matar al microorganismo invasor, y contrarrestar los efectos negativos del desarrollo microbiano y de sus posibles toxinas (Harborne y cols., 1976; McClure, 1975; Lopes y cols., 1998). El mecanismo por el que se ejerce este efecto no estaba claro, partiendo de la base de que las dianas de los flavonoides eran enzimas de las que las bacterias, como seres procariontes, carecían.

Sin embargo, las bacterias poseen enzimas metaloenzimas como las fosfatasas. Por lo tanto, el efecto bactericida de los flavonoides puede ser una alteración metabólica (Ohnishi y Bannai, 1993; Conti y cols., 1998). Hace varios años también se demostró que la quercetina inhibe la enzima transcriptasa inversa del VIH (Ono y cols., 1990; Spedding y cols., 1989), pero dado que existen otras moléculas más eficaces contra este virus, la quercetina se ha empleado para tratar infecciones causadas por otros como *Influenza virus* (Neznanov y cols., 2008) y *Poliovirus* (Davis y cols., 2008).

- Actividad antiagregante plaquetaria. El mecanismo por el que la quercetina ejerce sus efectos antiagregantes es bien conocido. La quercetina inhibe la activación de la fosfolipasa C, seguido de una inhibición de protein-kinasa C y de la formación de tromboxano A₂, lo cual lleva a una inhibición de la fosforilación de p47 y la movilización del calcio intracelular, resultando finalmente en una inhibición de la agregación plaquetaria (Sheu y cols., 2004).
- Actividad antitumoral. Tras ser ampliamente estudiados los principales efectos de la quercetina como son el efecto antiinflamatorio, antioxidante, etc., surgió la idea de que la este flavonol también poseía actividad antitumoral. Más tarde esta idea cobró sentido cuando diversos estudios epidemiológicos mostraban que las poblaciones en cuya dieta abundaban los alimentos ricos en flavonoides como son las frutas y verduras, presentaban una menor incidencia de ciertos tipos de cáncer. Finalmente se realizaron estudios *in vitro* (Van der Word y cols., 2005) e *in vivo* (Schlachterman y cols., 2008) que confirmaron estas hipótesis. El mecanismo propuesto por el que la quercetina ejerce su efecto antitumoral se basa en la inhibición de las DNA topoisomerasas I y II, induciendo un daño en el DNA y apoptosis (Yamashita y cols., 2000). Aunque en realidad existen muchos mecanismos por los que la quercetina, como otros flavonoides puede ejercer su acción antitumoral y esta es una materia densa y compleja (Havsteen, 2002).

- Efectos metabólicos de la quercetina. Los efectos que la quercetina, como otros polifenoles, tiene sobre el metabolismo glucídico y lipídico son complejos y han sido objeto de numerosos estudios en los últimos años. La quercetina ejerce una acción beneficiosa sobre la homeostasis lipídica en hígado y tejido adiposo (Peluso y cols., 2005), que además puede verse reflejada en una mejora sustancial del perfil lipídico en el plasma de animales obesos (Juźwiak y cols., 2005; Kamada y cols., 2005; Zang y cols., 2006). Además se ha observado una mejora en la sensibilidad a la insulina tras el tratamiento con altas dosis de quercetina (50 mg/kg/día) en humanos sanos, ratones ddy y ratas con diabetes inducida por estreptozotocina (Kato y cols., 2008). Los mecanismos propuestos para explicar estos efectos se centran en el poder antiinflamatorio y en parte también, antioxidante del flavonol, ya que la obesidad y el síndrome metabólico se entienden como enfermedades inflamatorias crónicas (Hotamisligil y cols., 2006). Este efecto antiinflamatorio, según se ha visto tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*, resulta en una menor liberación de ácidos grasos libres al plasma, que a su vez reduce la respuesta inflamatoria, la resistencia a la insulina etc. (Boden y cols., 2005).

2.2. ESTILBENOS: RESVERATROL

Existen distintos alimentos y bebidas de origen vegetal que contienen varios tipos de compuestos fenólicos no-flavonoides. Entre estos compuestos, el resveratrol ha sido identificado como el más activo de los estilbenos (fitoalexinas), y fue detectado en las uvas por primera vez en 1976 por Langcake y Pryce. El interés por este compuesto despertó cuando estudios epidemiológicos revelaron una relación inversa entre el consumo de frutas y bebidas ricas en resveratrol, como las uvas y el vino, y la aparición de enfermedades cardiovasculares, concretamente, cuando se observó el fenómeno conocido como la *paradoja francesa*. Con el paso de los años se han realizado numerosos estudios sobre las cualidades de esta molécula para mejorar la salud humana, y se han demostrado sus efectos en enfermedades

como el cáncer, la diabetes mellitus, la obesidad, (Frémont, 2000), enfermedades cardiovasculares, efectos atribuidos al control de la agregación plaquetaria, la vasodilatación por aumento de la producción y liberación de NO, regulación del metabolismo lipídico, efectos antioxidantes, sensibilización a la acción de la insulina, o efectos antiinflamatorios (Alarcón de la Lastra y cols., 2007). Otros estudios recientes atribuyen también al resveratrol el poder de aumentar la esperanza de vida en algunas levaduras y moscas, con lo que tendría un efecto antiedad que podría ser importante en ciertas enfermedades humanas relacionadas con el envejecimiento (Alarcón de la Lastra y cols., 2005; Holme y cols., 2007).

El resveratrol existe en las formas isoméricas cis- y trans- (Figura 11), pero sólo la isoforma trans- ha sido aislada en la uva. Es el isómero más abundante en la naturaleza, ya que es el más estable. Su concentración en esta fruta oscila entre 50 y 400 µg/g de fruto fresco y suele encontrarse en forma de glucósido. Se sintetiza principalmente en la piel de las uvas en respuesta a agresiones del entorno, como son la radiación ultravioleta o infecciones por hongos. La razón por la que el vino presenta una cantidad significativa de resveratrol, es por el tiempo que pasan en contacto la pulpa y la piel durante el proceso de elaboración de la bebida (Cucciolla y cols., 2007).

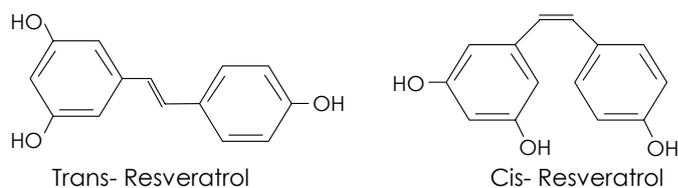


Figura 11. Estructuras de los isómeros trans- y cis- del resveratrol.

Con respecto a su metabolismo y biodisponibilidad, existen varios estudios en distintas especies de roedores y en humanos que muestran una buena absorción y distribución del resveratrol en diferentes tejidos, con un metabolismo fundamentalmente hepático de conjugación para dar glucurónidos y sulfatos. En plasma se alcanza un pico de concentración a los 30 minutos de la administración oral (Soleas y cols., 2001; Yu y cols., 2002; Goldberg y cols., 2003; Meng y cols., 2004). Por último, es importante añadir que la administración conjunta de varios polifenoles, como ocurre cuando estos se consumen a partir de sus fuentes naturales

de la dieta, como en el vino, se produce una inhibición en el metabolismo del resveratrol, pues se establece una competencia entre los distintos polifenoles por las enzimas encargadas de dicha metabolización (De Santi y cols., 2000), con lo que se ve aumentada la biodisponibilidad de este compuesto.

2.2.1. EFECTOS BIOLÓGICOS DEL RESVERATROL.

Los efectos beneficiosos que se atribuyen al resveratrol son los siguientes:

- Actividad antioxidante. El reconocimiento del resveratrol como agente antioxidante llegó con Zini y colaboradores en 1999 (Zini y cols., 1999), quien sugirió tres mecanismos por los que se ejercería esta acción (Alarcón de la Lastra y cols., 2007):
 - Competición con el coenzima Q mitocondrial.
 - Inactivando radicales activos del oxígeno formados en la mitocondria.
 - Inhibiendo la peroxidación lipídica.

Además, se ha demostrado que el resveratrol es capaz de mantener la concentración intracelular de los antioxidantes endógenos localizados en varios tejidos, como es el caso del glutatión (Losa y cols., 2003).

- Efectos antiinflamatorios. La acción antiinflamatoria del resveratrol se ha propuesto como mecanismo de acción responsable de varios efectos beneficiosos que se le atribuyen, como la acción antitumoral, acciones sobre el sistema nervioso, el hígado o el sistema cardiovascular. Esta regulación de la respuesta inflamatoria se lleva a cabo mediante la inhibición de la síntesis y liberación de mediadores pro-inflamatorios como el TNF- α , modificación de la síntesis de eicosanoides (Kimura y cols., 1985; Rotondo y cols., 1998; Pace-Asciak y cols., 1995), inhibición de enzimas como iNOS, LOX y COX, o inhibiendo factores de transcripción pro-inflamatorios como el NF- κ B y AP-1 (Alarcón de la Lastra y cols., 2005). Además, el resveratrol estimula la producción la adipocitokina antiinflamatoria adiponectina, que también contribuye a los efectos metabólicos beneficiosos del polifenol (Banks y cols., 2008) (Figura 12).

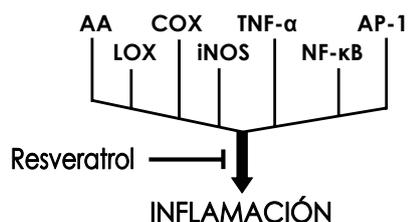


Figura 12. Mecanismos por los que el resveratrol ejerce su efecto antiinflamatorio.

- Cardioprotección. La capacidad del resveratrol para proteger el sistema cardiovascular fue apreciada tras la observación de diferentes estudios epidemiológicos (*Paradoja francesa*). La primera evidencia científica de este poder cardioprotector llegó con los estudios que mostraban que el resveratrol protegía corazones aislados del daño por isquemia-reperfusión (Renaud y cols., 1992; Ray y cols., 1999). Los mecanismos responsables de esta protección son su papel como antioxidante intracelular, agente antiinflamatorio y capacidad para inducir la expresión de eNOS (Bhat y cols., 2001). La protección ejercida por el resveratrol se debe a que este polifenol, por los mecanismo postulados, produce los siguientes efectos (Das y cols., 2006; Pace-Asciak y cols., 1995; Chan y cols., 2008):
 - Inhibe las moléculas de adhesión ICAM y VCAM.
 - Es antihipertensivo.
 - Inhibe la peroxidación lipídica.
 - Inhibe la endotelina.
 - Reduce el daño provocado por la isquemia-reperfusión.
 - Disminuye las arritmias ventriculares.
 - Induce vasorelajación.
 - Reduce la agregación plaquetaria.
 - Reduce la hipertrofia cardiaca mediante la activación de la AMPK.

- Actividad antitumoral. El resveratrol ha sido descrito por sus efectos tanto quimio-preventivos como antitumorales. Para ejercer dichos efectos, el resveratrol, una vez absorbido, puede actuar mediante diferentes mecanismos, como pueden ser la inhibición de la activación metabólica de compuestos carcinógenos, la estimulación de la detoxificación de esos compuestos y la prevención de su interacción con el ADN. Lo hace mediante la inhibición de las enzimas COX-1 y COX-2 y del complejo citocromo P450 e induciendo la enzima quinona-reductasa. Con la inhibición de las prostaglandinas y de la generación NO, previene la estimulación que estos ejercen sobre el desarrollo del tumor. La causa y el desarrollo del cáncer también incluye la generación de especies reactivas del oxígeno, y el resveratrol, como potente antioxidante, se opone a este proceso. Los numerosos estudios *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* han demostrado que además de lo mencionado, el resveratrol posee actividad quioterapéutica. Esta molécula suprime el crecimiento de distintas líneas celulares tumorales, en parte mediante la inhibición de las enzimas DNA-polimerasa y ribonucleótido-reductasa y en parte induciendo la apoptosis (Gusman y cols., 2001).
- Efectos metabólicos y antiedad del resveratrol. De los efectos del resveratrol, los que afectan al control metabólico y a la homeostasis energética han recibido una gran atención por parte de la comunidad científica en los últimos años. El resveratrol ha demostrado ser capaz de reducir los efectos negativos de la obesidad inducida en ratones por una dieta rica en grasas y energía, reduciendo además la resistencia a la insulina y la diabetes tipo 2, mediante el aumento y optimización del metabolismo oxidativo y gasto energético en distintos tejidos, como músculo esquelético (Park y cols., 2007), hígado (Zang y cols., 2006) y tejido adiposo (Milne y cols., 2007). Además este polifenol aumenta la sensibilidad a la insulina y reduce el desajuste lipídico propios de esta patología, ya que modula el metabolismo glucídico y lipídico a nivel hepático (Baur y cols., 2006). El mecanismo propuesto para realizar tales acciones se basa en la activación de la vía de la enzima 5'-AMPK y de SIRT-1, uno de los siete homólogos de

Sirt2 que se encuentran en los mamíferos (Lagouge y cols., 2006; Baur y cols., 2006). SIRT-1 es una deacetilasa dependiente de NAD⁺, cuya función es modular las rutas metabólicas derivadas de la restricción calórica que están relacionadas con los efectos beneficiosos que ésta tiene para la salud, especialmente en lo referente a la homeostasis energética y sensibilidad a la insulina (Milne y cols., 2007). En concordancia con estos mecanismos, se encuentra el hecho de que una activación de AMPK y SIRT-1, aumenta *in vivo* los niveles plasmáticos de adiponectina, adipocitoquina antiinflamatoria y con capacidad para aumentar la sensibilidad a la insulina (Banks y cols., 2008). Otros mecanismos implicados son la estimulación de la expresión y actividad de la enzima eNOS (Leighton y cols., 2006) y los efectos antioxidante y antiinflamatorio del resveratrol.

Objetivos

En las últimas décadas la prevalencia del síndrome metabólico se ha incrementado de forma drástica en todo el mundo, no sólo en las poblaciones de adultos y ancianos (Meigs y cols., 2003; Ford y cols., 2004), sino también en jóvenes y niños, experimentando un crecimiento paralelo a la presencia de obesidad y diabetes de tipo 2 (Cook y cols., 2003; Weiss y cols., 2004) e incrementando el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares. Esto hace de este síndrome un importante problema de salud pública a nivel mundial que demanda una urgente intervención terapéutica. En cuanto a las dimensiones del problema en España, también son preocupantes. La prevalencia de la obesidad en nuestro país es mayor que en países del norte de Europa como Dinamarca, Suecia, los Países Bajos o Francia, pero menor que en Estados Unidos, Canadá o Reino Unido. Japón presenta las tasas de prevalencia de obesidad más bajas entre los países desarrollados. En el estudio SEEDO 2000, destaca que la prevalencia de la obesidad en España fue del 14,5% (intervalo de confianza [IC] del 95%, 13,93-15,07%), significativamente más elevada en el colectivo femenino (15,75%; IC del 95%, 14,89-16,61%) que en el masculino (13,39%; IC del 95%, 11,84-14,94%). La prevalencia de obesidad aumentó significativamente con la edad en varones y en mujeres, observándose las proporciones más elevadas de personas obesas en el grupo de mayores de 55 años, el 21,58% en varones (IC del 95%, 18,68-24,48%) y el 33,9% en mujeres (IC del 95%, 32,73-35,07%). Además, este problema es manifiesto en las poblaciones más jóvenes. Según datos del Instituto Nacional de Estadística (INE), el 8,9 por ciento de los españoles de entre 2 a 17 años presenta obesidad y el 18,7 por ciento tiene sobrepeso. Las consecuencias sanitarias de la prevalencia de dicha alteración metabólica en nuestro país no se han hecho esperar, y se ponen de manifiesto, por ejemplo, en la disminución en la esperanza de vida de la población femenina, que presenta una mayor mortalidad por enfermedad cardiovascular asociada a estos trastornos.

En la actualidad no existen en el mercado muchos fármacos que permitan el tratamiento de este síndrome. Aunque se habían depositado grandes esperanzas en el rimonobant, la Agencia Europea del Medicamento ha recomendado recientemente la

“suspensión temporal” de su comercialización, ya que el tratamiento tiene algunos efectos secundarios graves, sobre todo de carácter psiquiátrico. El rimonabant se ha utilizado como adyuvante de la dieta y el ejercicio para el tratamiento de pacientes obesos (IMC > 30 kg/m²), o pacientes con sobrepeso (IMC > 27 kg/m²) con factores de riesgo asociados, tales como diabetes tipo 2 o dislipidemia. Se trata de un antagonista selectivo del receptor canabinoide-1 (CB1) que inhibe los efectos farmacológicos de los agonistas canabinoides tanto *in vitro* como *in vivo*. El sistema endocannabinoide es un sistema fisiológico presente en el cerebro y en los tejidos periféricos (incluyendo los adipocitos) que afecta el balance energético, el metabolismo de la glucosa y los lípidos, y el peso corporal; y en las neuronas del sistema mesolímbico modula la ingesta de alimentos altamente apetecibles ricos en azúcar o grasas.

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

En consecuencia, el objetivo general de este trabajo ha sido analizar los efectos de la administración oral crónica de dos polifenoles que han despertado gran interés en la comunidad científica, el flavonol quercetina y el estilbeno resveratrol, en el modelo experimental de síndrome metabólico de ratas Zucker obesas. Hemos estudiado la acción de estas moléculas sobre las principales alteraciones metabólicas que caracterizan a dicho modelo, determinando los siguientes parámetros:

- Variables morfológicas:
 - o Incremento de peso corporal.
 - o Ingesta diaria de alimento.
 - o Peso de órganos afectados.
- Marcadores plasmáticos:
 - o Lípidos plasmáticos: triglicéridos, colesterol total y ácidos grasos libres.
 - o Glucosa, insulina y leptina.
- Marcadores en tejidos insulino-resistentes.
 - o Tejido adiposo visceral:
 - Secreción de factor de necrosis tumoral α (TNF- α), y adiponectina
 - Fosforilación de Protein kinasa activada por AMP (AMPK) y acetil CoA carboxilasa (ACC)
 - Expresión proteica de las isoformas inducible y endotelial de la óxido nítrico sintasa (iNOS y eNOS respectivamente).
 - o Hígado:
 - Acumulación de lípidos hepáticos.
 - Fosforilación de AMPK y ACC
- Presión arterial
- Actividad antioxidante: Concentración de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Material y métodos

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las Normas Institucionales para el trato ético de los animales.

Las experiencias se han realizado con ratas Zucker macho obesas (fa/fa) de 450-490 g de peso y delgadas (fa/+) de 390-400g de peso de 13 semanas de edad, proporcionadas por los Laboratorios Charles River (Barcelona, España). Para facilitar su adaptación, los animales se mantuvieron en el estabulario del laboratorio dos semanas antes de iniciar los experimentos, a una temperatura de 22 ± 2 °C y con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas. Las ratas se alojaron en cubetas de makrolon dispuestas en racks de acero inoxidable con lecho de viruta, en grupos de 5 ratas por jaula, fueron alimentadas con una dieta estándar (Panlab A04) y recibieron agua corriente *ad libitum*.

1.1. TRATAMIENTO CON QUERCETINA

Las ratas, tanto obesas como delgadas, se dividieron respectivamente en tres grupos. Uno de ellos, recibió diariamente una dosis de quercetina de 2 mg/kg interpuesta en una solución de metilcelulosa al 1%, administrada mediante sonda gastroesofágica en un volumen fijo de 1ml. Otro grupo recibió una dosis de quercetina de 10 mg/kg/día de quercetina interpuesta en el mismo vehículo. A los animales del tercer grupo (control), se les administró el mismo volumen de vehículo (metilcelulosa al 1%). El tratamiento se llevó a cabo durante 10 semanas. Los grupos control se designan como LC, para las ratas delgadas, y OC, en el caso de las obesas. Los grupos de ratas delgadas y obesas que recibieron las distintas dosis de quercetina se denominan respectivamente LQ2 y LQ10 (ratas delgadas) y OQ2 y OQ10 (ratas obesas). Con el fin de evitar los efectos agudos de la administración de la quercetina, 48 horas antes del sacrificio de los animales se suspendió el tratamiento. Durante el período experimental los animales tuvieron libre acceso a la comida y al agua, midiendo diariamente su ingesta.

1.2. TRATAMIENTO CON RESVERATROL

Las ratas, obesas y delgadas, se dividieron en dos grupos. Uno de ellos recibió 10 mg/kg/día de resveratrol, disuelto en agua, administrado mediante sonda gastroesofágica en un volumen fijo de 1 ml, durante 8 semanas. El grupo control recibió el mismo volumen de vehículo. Los grupos control de ratas delgadas y obesas se designan como LC y OC. Los grupos de ratas, delgadas y obesas, tratadas con resveratrol reciben los nombres LR y OR respectivamente. Con el fin de evitar los efectos agudos del resveratrol, 48 horas antes del sacrificio de los animales se suspendió la administración del mismo. Durante este tratamiento los animales también tuvieron acceso libre a la comida y el agua, procediendo diariamente a la determinación de su ingesta.

2. MÉTODOS EXPERIMENTALES

2.1. DETERMINACIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA

La presión arterial sistólica (PAS) se determinó semanalmente en la cola de la rata mediante pletismografía. El sistema utilizado consta de un manguito de presión, acoplado a una unidad de insuflado semiautomática y a la unidad transductora del pletismógrafo, a la que se conecta un sensor neumático. La unidad transductora está conectada, a su vez, a la unidad de registro visual del pletismógrafo (LE 5000, Letica S.A., Barcelona). Antes de realizar la medida, la rata es introducida en una estufa a 37 °C, durante 15-20 minutos, para favorecer la dilatación de los vasos de la cola.

Se realizan entre 8 y 10 medidas de presión de cada rata, calculando la media aritmética de los siete últimos valores obtenidos con una diferencia menor de 5 mmHg. Las medidas de presión se llevaron a cabo por la mañana, 18-20 horas después de la administración del plifenol o de vehículo.

2.2. SACRIFICIO DE LOS ANIMALES Y RECOGIDA DE MUESTRAS

En el momento del sacrificio, las ratas fueron anestesiadas con una dosis de 2,5 ml/kg intraperitoneal de equitensina. Se realizó una incisión en el abdomen hasta visualizar la aorta descendente de la que se extrajo de sangre utilizando una jeringa previamente heparinizada. Posteriormente, se obtuvo el plasma mediante centrifugación de esta sangre a 4000 r.p.m. durante 10 minutos, que fue alicuotado y congelado a -80 °C hasta su análisis.

A continuación, se procedió, rápidamente, a la extracción de corazón, riñón derecho, aorta, tejido adiposo visceral y epididimal e hígado. Los órganos fueron lavados con solución Krebs fría, cuya composición es: NaCl 118 mM, KCl 4,75 mM, CaCl₂ 2 mM, MgSO₄·7H₂O 1,2 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, NaCO₃H 25mM, Glucosa 11 mM. Después fueron secados y pesados para el estudio de sus cambios morfológicos, mediante el análisis de la relación del peso del órgano y peso corporal del animal, calculado dividiendo el peso del órgano entre el peso corporal del animal en el momento de la muerte. Finalmente, los órganos fueron divididos en varios fragmentos destinados a distintas determinaciones bioquímicas, congelados en nitrógeno líquido y mantenidos a -80 °C hasta su análisis.

2.3. VALORACIÓN DEL ESTADO OXIDATIVO

2.3.1. DETERMINACIÓN DE MALONILDIALDEHIDO (MDA) EN HÍGADO

El grado de peroxidación lipídica que sufren los tejidos por la acción de los radicales libres puede ser determinado según el método descrito por Zingarelli en 1999 (Zingarelli y cols., 1999).

Reactivos:

1. Solución de KCl 1,15 % (p/v).
2. Solución de laurilsulfato sódico (SDS) al 8,1 % (p/v).
3. Solución de ácido acético glacial al 20 % (v/v) pH = 3,5.
4. Solución de ácido-2-tiobarbitúrico (4,6-dihidroxi-pirimidina-2-tiol) (TBA) al 0,8 % en ácido acético glacial 20 %.
5. Solución madre de 1,1,3,3-tetrametoxipropano 1 mM en KCl 1,15 %. A partir de ésta se obtuvieron soluciones de distintas concentraciones para construir la curva patrón.

Técnica:

El tejido se homogeneizó, en frío, en KCl 1,15 % en proporción 1:5 (p/v), con un homogenizador Heidolph. Tras centrifugar las muestras a 2500 r.p.m. durante 5 minutos, se utilizó el sobrenadante para la determinación de MDA. A continuación se procedió a preparar la mezcla de reacción en tubos de vidrio con tapón de rosca. En cada tubo se añadieron 750 μ l de ácido acético glacial 20 %, 750 μ l de TBA, 350 μ l de agua destilada, 100 μ l de la solución de SDS y 50 μ l del sobrenadante de la muestra o de la solución patrón. Cada tubo fue agitado, cerrado con su tapón e incubado durante 1 hora en un baño a 95 °C. La reacción se detuvo colocando los tubos en un baño de agua-hielo y posteriormente el contenido de estos tubos se traspasó a tubos eppendorf que se centrifugaron a 3000 g durante 10 minutos. Finalmente, el sobrenadante obtenido, se midió espectrofotométricamente a 532 nm en un lector de placas Microplate reader (Benchmarck). El cálculo de MDA contenido en las muestras, se realizó por interpolación en la curva patrón. Los resultados se expresaron como μ M MDA/100 mg tejido.

2.3.2. DETERMINACIÓN DE MDA PLASMÁTICO

Reactivos:

1. Reactivo cromogénico: solución de 1-metil-2-fenilindol 1,03 mM en acetonitrilo.
2. Solución de ácido clorhídrico al 37 % (v/v).
3. Solución madre de 1,1,3,3- tetrametoxipropano 42,5 μ M.

Técnica:

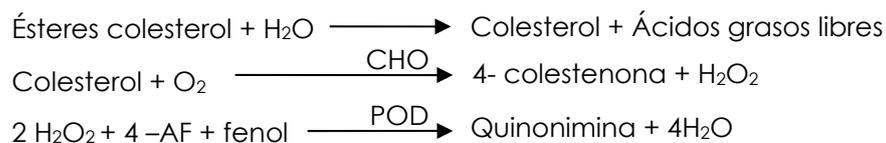
El método seguido fue el descrito por Esterbauer y Cheeseman en 1990 (Esterbauer y cols. 1990). Se mezclaron en tubos eppendorf 150 μ l del plasma con 350 μ l del reactivo cromogénico y 113 μ l del HCl y se agitó. La mezcla se incubó durante 40 minutos a 45 °C. Posteriormente se centrifugaron los tubos de reacción a 13000 g durante 5 minutos. La absorbancia del sobrenadante midió en 586 nm en un lector de placas Microplate Reader de Benchmark. El cálculo del contenido en MDA se realizó por interpolación en la curva patrón, expresando los resultados como concentración (μ M) de MDA en plasma.

2.4. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS PLASMÁTICOS

2.4.1. LÍPIDOS PLASMÁTICOS

Se determinaron las concentraciones de triglicéridos y colesterol total mediante kits de Spinreact (Spinreact, S.A., España). Los ácidos grasos libres se midieron con un kit NEFA C test de Wako (Wako Chemicals, Richmond, VA).

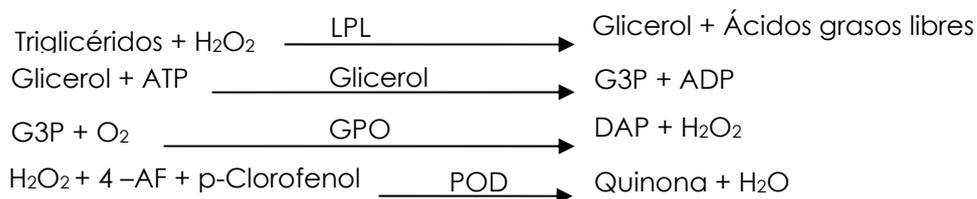
2.4.1.1. Colesterol. El colesterol presente en la muestra origina un compuesto coloreado según la siguiente reacción:



Donde:

- LPL: Lipoproteinlipasa
- GPO: Glicerolfosfato deshidrogenasa
- GK: Glicerol kinasa
- G3P: Glicerol-3-fosfato
- DAP: Dihidroxiacetona fosfato
- H₂O₂: Peróxido de hidrógeno
- 4-AF: 4-Aminofenazona
- POD: Peroxidasa

2.4.1.2. Triglicéridos. La concentración de triglicéridos presentes en la muestra es directamente proporcional a la intensidad de la coloración roja que aparece según las siguientes reacciones:

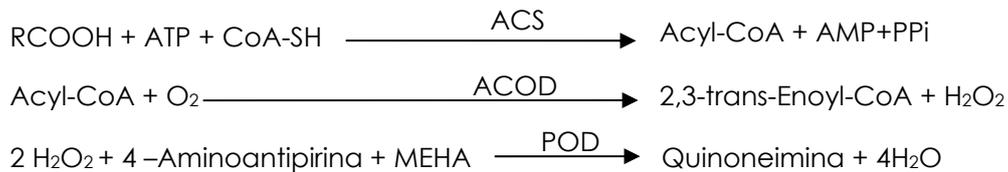


Donde:

- H₂O₂: Peróxido de hidrógeno
- CHOD: colesterol oxidasa
- 4-AF: 4- Aminofenazona
- POD: Peroxidasa

- CHE: Colesterol esterasa
- POD: Peroxidasa

2.4.1.3. Ácidos grasos libres. La determinación se llevó a cabo siguiendo el método ACS-ACOD, en el que la concentración de ácidos grasos libres es directamente proporcional a la intensidad de color rojo según la siguiente reacción:



Donde:

- RCOOH: Ácido graso
- CoA-SH: Coenzima-A
- PPi: Pirofosfato
- ACS: Acyl-CoA-Sintetasa
- ACOD: Acyl-CoA-Oxido
- POD: Peroxidasa
- MEHA: 3-Metil-N-Etil- N-(β-hidroxietil)anilina

2.4.2. PARÁMETROS PLASMÁTICOS RELACIONADOS CON LA RESISTENCIA A LA INSULINA.

Las variables implicadas en la resistencia a la insulina determinadas en nuestros estudios han sido la glucosa plasmática, medida por una técnica colorimétrica, y la insulina, medida por enzimoimmunoensayo. Para valorar el grado de resistencia a la insulina, se aplicó el modelo matemático HOMA_{IR}.

2.4.2.1. Glucosa. La glucosa oxidasa cataliza la oxidación de la glucosa a ácido glucónico y H₂O₂. Éste se detecta mediante un aceptor cromógeno de oxígeno (fenol-ampirona). La concentración de glucosa es proporcional a la intensidad de color formado según la siguiente reacción:



Donde:

- GOD: Glucosa oxidasa
- H₂O₂: Peróxido de hidrógeno
- POD: Peroxidasa

2.4.2.2. Insulina. La concentración de insulina fue cuantificada con un kit enzoinmunoensayo para rata (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) basado en la competición entre la insulina no marcada de la muestra y una cantidad fija de insulina marcada, por una cantidad limitada de anticuerpo específico (Figura 13). Así la intensidad de color producida es inversamente proporcional a la cantidad de insulina (no marcada) de la muestra.

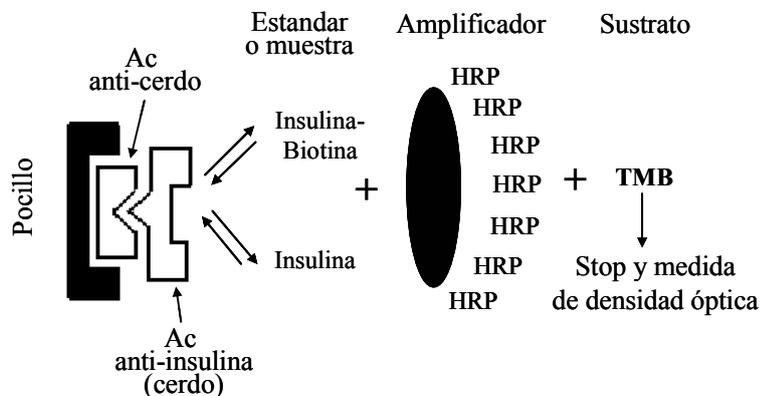


Figura 13. Principio del ensayo de determinación de insulina en plasma por ELISA.

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

$$\text{HOMA}_{\text{IR}} = (\text{insulina} \times \text{glucosa}) / 22,5$$

Donde la insulina se expresa en $\mu\text{U/ml}$ y la glucosa en mM. De acuerdo con este método, un elevado índice de HOMA_{IR} significa una baja sensibilidad a la insulina.

2.4.3. OTROS PARÁMETROS PLASMÁTICOS

Para conocer el estado inflamatorio de los animales y cómo se ve afectado por la quercetina, se determinaron la adipocitokina antiinflamatoria adiponectina, la citokina proinflamatoria TNF- α y el nivel de nitratos y nitritos (NO_x) indicativo de una elevada actividad iNOS.

2.4.3.1. Adiponectina. Se midió la concentración de adiponectina con un kit de ELISA para ratón/rata (B-Bridge International, Inc., CA, USA) basado en la reacción esquematizada en la Figura 14.

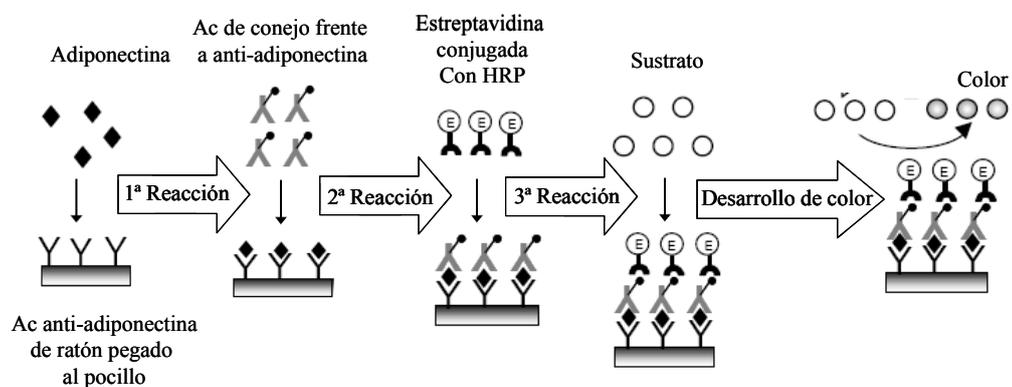


Figura 14. Principio del ensayo de determinación de adiponectina en plasma.

2.4.3.2. Nitratos más nitritos (NO_x). La determinación de nitritos plasmáticos, como marcadores de producción de NO (óxido nítrico) se realizó utilizando el método de Granger (Granger y cols., 1996). Este método requiere que los nitratos presentes en la muestra sean previamente reducidos a nitritos, utilizando la enzima nitrato reductasa, para su posterior determinación espectrofotométrica mediante la reacción de Griess.

Reactivos:

1. Solución enzimática de nitrato reductasa. La nitrato reductasa se obtiene a partir de un liofilizado procedente de *Aspergillus*, que se disuelve en agua destilada hasta obtener una concentración de 10 U/ml. De esta solución se obtienen alícuotas que se congelan a -80 °C hasta su utilización.
2. HEPES: ácido (N-[2-hidroxietil] piperazina-N'-[2-etanol sulfónico] 0,5 M, pH = 7,4.
3. Solución de flavín adenín dinucleótido (FAD) 0,05 mM.
4. Solución de β-NADPH 1 mM.
5. Solución enzimática de lactato deshidrogenasa (LDH) de músculo bovino 150 U/ml.
6. Solución de ácido pirúvico 0,1 M.
7. Reactivo de Griess: compuesto por partes iguales de una solución de N-1-naftil-etilen-diamina 0,1 % (p/v) en agua destilada y una solución de sulfonilamida 1 % (p/v) en ácido ortofosfórico 5 % (v/v).
8. Solución patrón de NaNO₂ 100 μM en agua destilada.

Técnica:

Para realizar el ensayo se mezclan: 10 μl de muestra, 5 μl de nitrato reductasa, 5 μl de HEPES, 5 μl de FAD, 5 μl de NADPH y 20 μl de agua destilada. Se incuba este cóctel de reacción a 37 °C durante 30 minutos. Posteriormente se adicionan 5 μl de LDH y 5 μl de ácido pirúvico, con el objeto de regenerar el NADPH que ha consumido la nitrato reductasa, incubando nuevamente, durante 10 minutos, a 37 °C. Finalmente se añaden 100 μl de reactivo de Griess y se incuba 10 minutos a temperatura ambiente, realizando la determinación

espectrofotométrica a 543 nm en el Microplate Reader de Benchmark. La concentración de NOx en plasma se obtiene por interpolación de los valores en la recta patrón. Los resultados se expresan como concentración (μM) de NOx en plasma.

2.5. PARÁMETROS TISULARES

2.5.1. EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE LÍPIDOS HEPÁTICOS

Para la cuantificación de triglicéridos y colesterol en el tejido hepático se realizó una extracción de los lípidos en el tejido según el método Blight and Dyer (Blight y cols., 1959) y una determinación posterior mediante el uso de kits de Spinreact (Spinreact, S.A., España), como se describe en la determinación de lípidos plasmáticos (Sección 2.4.1).

Reactivos:

- Cloroformo
- Metanol
- Isopropanol

Descripción de la técnica:

Se seleccionó una muestra de hígado de cada rata por triplicado de igual peso (aproximadamente 100 mg) y se incluyeron en una mezcla de cloroformo/metanol de proporción 1:2 para posteriormente ser homogenizados en sonicador de células. A continuación, se añade al homogenado la misma cantidad de cloroformo que hemos añadido al principio más una parte igual de agua, se mezcla bien en un vortex y se lleva a centrifugar 5 minutos a 3000 r.p.m. a 4° C. Se extrae la fase clorofórmica (inferior) y se guarda. A la fase acuosa restante se le añade de nuevo cloroformo en relación al peso de la muestra de tejido de la siguiente forma:

1250 mg tejido	—————→	1880 µl cloroformo
Peso de mi muestra de tejido	—————→	Volumen de cloroformo a añadir

Volver a mezclar bien en el vortex y centrifugar de nuevo 5 minutos a 3000 r.p.m. a 4 °C y seguidamente recoger la nueva fase clorofórmica que se mezclará con la primera. Una vez obtenida toda la fase lipídica, pasamos a la eliminación del cloroformo mediante evaporación a 55°C en corriente de nitrógeno. A continuación se disuelve el extracto en una cantidad de isopropanol según el peso de la muestra de hígado de la siguiente forma:

1250 mg tejido	—————→	2000 µl isopropanol
Peso de mi muestra de tejido	—————→	Volumen de isopropanol a añadir

En esta suspensión se medirá la concentración de colesterol y triglicéridos.

2.5.2. DETERMINACIÓN DE TNF- α EN TEJIDO ADIPOSO

Una alícuota de tejido adiposo visceral de cada rata fue homogenizada en tampón PBS, cuya composición es 137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 4,3 mM de Na₂HPO₄, 1,4 mM de KH₂PO₄, con un homogenizador Hiodolph en proporción 1:1 (p/v), más tarde se incubaron las muestras a 37°C durante 20 minutos y después se centrifugaron a 15000 r.p.m. durante 15 minutos recogiendo el sobrenadante como muestra que se analizó mediante un kit de ELISA para TNF- α de rata (Diaclone, Inc., France) basado en la siguiente reacción (Figura 15).

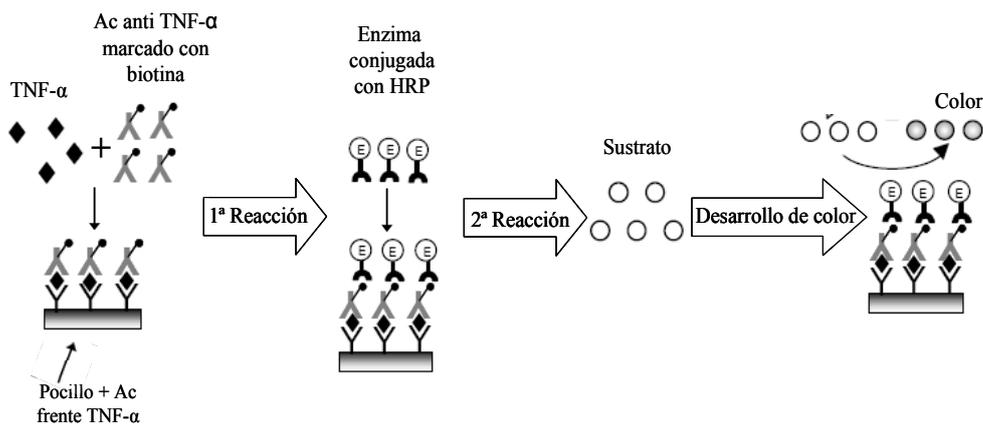


Figura 15. Principio del ensayo de determinación de TNF- α en tejido adiposo.

2.5.3. DETERMINACIÓN DE ADIPONECTINA EN TEJIDO ADIPOSO

Una alícuota de tejido adiposo visceral de cada rata fue homogeneizada en tampón PBS de composición 137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 4,3 mM de Na_2HPO_4 y 1,4 mM de KH_2PO_4 , con un homogenizador Hiodolph en proporción 1:1 (p/v). Posteriormente los homogenados obtenidos se centrifugaron a 15000 r.p.m. durante 15 minutos recogiendo el sobrenadante. En éste, tras realizar la dilución adecuada -para obesas 1:4000 y para delgadas 1:5000- se determinó la concentración de adiponectina mediante un kit de ELISA específico para adiponectina de rata (B-Bridge International, Inc., CA, USA), de acuerdo con lo descrito en el apartado 2.4.3.1.

2.5.4. DETERMINACIÓN DE NITRATOS MÁS NITRITOS (NO_x) EN TEJIDO ADIPOSO

Para realizar el análisis de NO_x en tejido adiposo visceral, se tomó una alícuota del tejido de cada rata y fue homogeneizada en tampón PBS cuya composición es 137 mM/L de NaCl, 2,7 mM de KCl, 4,3 mM de Na_2HPO_4 , 1,4 mM de KH_2PO_4 con un homogenizador Hiodolph en proporción 1:1 (p/v), posteriormente se centrifugaron a 15000 r.p.m. durante 15 minutos

recogiéndose el sobrenadante como muestra que se analizó mediante la técnica expuesta en el punto 2.4.3.2.

2.5.5. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN PROÉICA DE eNOS e iNOS EN TEJIDOS MEDIANTE WESTERN BLOT

Preparación de las muestras:

La determinación se realizó en anillos aórticos y en tejido adiposo visceral. Los anillos aórticos de 3-4 mm de longitud se homogeneizaron en tampón de homogeneización, en una proporción 1:10 (p/v) y con un homogeneizador Heidolph, en frío. Los lisados de tejido adiposo visceral se obtuvieron por homogenización del tejido en otro tampón de homogenización específico en proporción 1:1 (p/v) en las mismas condiciones. Los homogenados se centrifugaron a 15000 g durante 30 minutos a 4 °C y se tomó el sobrenadante.

Reactivos:

1. Tampón de homogenización de los anillos aórticos:

- 10 mM Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanosulfónico (HEPES) pH 7,4
- 0,32 M Sucrosa
- 100 µM Etilendiamino-tetraacetato sódico (EDTA)
- 1 mM Ditiotreitól (DTT)
- 0,5 mM Fluoruro de fenil-metil-sulfonilo (PMSF)
- 10 µg/ml Leupeptina

2. Tampón de homogenización del tejido adiposo (Tampón RIPA modificado):

- 50 mM Tris-HCl pH =7,4
- 1 % Triton X-100
- 0,2 % Deoxicolato sódico

- 0,2 % Dodecilsulfato sódico (SDS)
- 1 mM EDTA
- 1 mM PMSF
- 5 µg/ml Aprotinina
- 5 µg/ml Leupeptina

3. Tampón de carga:

- 50 mM Tris pH =6,8
- 10 % Glicerol
- 1 % SDS
- 5 % 2-Mercaptoetanol
- 5 mM EDTA
- 0,007 % Azul de bromofenol

4. Tampón de lavado (TBS-T):

- 10 mM Tris pH = 7,5
- 100 mM NaCl
- 0,1 % Polioxietilensorbitan-monolaurato (Tween-20)

5. Tampón de bloqueo: Solución de leche desnatada en polvo al 5 % en TBS-T. En ésta se disolvieron los siguientes anticuerpos (1:2500):

- Anticuerpo monoclonal de ratón anti-eNOS (BD Transduction laboratorios)
- Anticuerpo policlonal de conejo anti-iNOS (BD Transduction Laboratories)

Descripción de la técnica:

Cantidades equivalentes de proteína (50 µg) de cada muestra, suspendidas en tampón de carga y desnaturizadas mediante ebullición durante 5 minutos, fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 8 %. Posteriormente las proteínas fueron

transferidas a una membrana de nitrocelulosa a voltaje constante de 35 mV durante toda la noche a 4 °C. A continuación las membranas se incubaron en tampón de bloqueo durante 2 horas a temperatura ambiente y después se incubaron con el anticuerpo primario anti-eNOS y anti-iNOS (1:2500) por un periodo de 2 horas a temperatura ambiente. Seguidamente se lavaron con tampón TBS-T 5 veces cambiando dicha solución cada 10 minutos, antes de incubarse durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario (1:2000). Tras 5 lavados de 10 minutos con TBS-T las membranas se incubaron con una solución ECL (PerkinElmer Life Sciences, Boston) durante 2 minutos y se expusieron a una película autoradiográfica para detectar la quimioluminiscencia.

2.5.6. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN Y FOSFORILACIÓN DE AMPK EN TEJIDOS MEDIANTE WESTERN BLOT

Preparación de las muestras:

La determinación se realizó en hígado y en tejido adiposo visceral. El hígado se homogeneizó en tampón específico, en una proporción 1:20 (p/v) y con un homogeneizador Heidolph, en frío. Y los lisados de tejido adiposo visceral se obtuvieron por homogenización del tejido en otro tampón específico en proporción 1:1 (p/v) en las mismas condiciones.

Los homogenados se centrifugaron a 15000 g durante 30 minutos a 4 °C y se tomó el sobrenadante, donde se determinó la concentración de proteínas mediante la técnica del ácido bicinconínico.

Reactivos

1. Tampón de homogenización de hígado

- 20 mM Tris-HCl, pH = 8.0
- 1% Igepal
- 1 mM EDTA
- 1 mM EGTA

- 1 mM Ortovanadato de sodio
- 1 mM DTT
- 1 mM PMSF
- 2 µg/ml Aprotinina
- 2 µg/ml Leupeptina

2. Tampón de homogenización de tejido adiposo visceral (RIPA modificado) descrito en el apartado 2.5.

3. Tampón de lavado (TBS-T):

- 0,2 M Tris pH = 7,6
- 1,37 M NaCl
- 0,1 % Polioxietilensorbitan-monolaurato (Tween-20)

4. Tampón de bloqueo: Solución de leche desnatada en polvo al 5 % en TBS-T. En ésta se disolvieron los siguientes anticuerpos (1:1000):

- Anticuerpo policlonal de conejo anti-AMPK- α (Cell Signaling Technology, Inc)
- Anticuerpo policlonal de conejo anti-fosfo-AMPK- α (Cell Signaling Technology, Inc))

Descripción de la técnica:

Cantidades equivalentes de proteína (30 µg) de cada muestra suspendidas en tampón de carga (descrito en el apartado anterior) y desnaturizadas mediante ebullición durante 5 minutos, fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10 %. Posteriormente las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa a voltaje constante de 90 mV durante 2 horas a 4 °C. A continuación las membranas se incubaron en tampón de bloqueo durante 2 horas a temperatura ambiente y después se incubaron con el anticuerpo primario anti-AMPK- α y anti-fosfo-AMPK- α (1:1000) durante toda la noche a 4° C. Seguidamente se lavaron con tampón TBS-T 3 veces cambiando dicha solución cada 10 minutos, antes de incubarse durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo

secundario (1:2000). Tras 5 lavados de 10 minutos con TBS-T las membranas se incubaron con una solución ECL (PerkinElmer Life Sciences, Boston) durante 2 minutos y se expusieron a una película autoradiográfica para detectar la quimioluminiscencia.

2.5.7. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN Y FOSFORILACIÓN DE ACC EN TEJIDOS MEDIANTE WESTERN BLOT

Siguiendo el mismo procedimiento de preparación de muestras de hígado y tejido adiposo y la misma técnica de western blot que para la AMPK, se procedió a la determinación de la expresión y fosforilación de la ACC con los siguientes anticuerpos en dilución 1:1000 en tampón de bloqueo:

- Anticuerpo policlonal de conejo anti-ACC (Cell Signaling Technology, Inc)
- Anticuerpo policlonal de conejo anti-fosfo-ACC (Cell Signaling Technology, Inc).

2.5.8. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

La determinación de las proteínas en tejidos se realizó mediante la técnica "del ácido bicinonínico". Cuando la sal disódica de este ácido reacciona con las proteínas de un tejido, forma un complejo con iones Cu^{+2} de color púrpura intenso cuya absorbancia puede medirse espectrofotométricamente a 562 nm.

Reactivos:

- A) Solución de ácido bicinonínico en medio alcalino (pH = 11,25):
 - Ácido bicinonínico 25 μM
 - $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,16 M
 - Tartrato sódico 5,7 μM
 - NaOH 0,1 M
 - NaHCO_3 0,1 M

- B) Sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0,16 M

Curva patrón: se preparan soluciones de concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina (fracción V) a partir de una solución madre de 1 mg/ml mediante diluciones seriadas de 1/2 en agua destilada o en solución salina.

Descripción de la técnica:

Se procede mezclando los reactivos A+B en proporción 50:1 (v/v) respectivamente. En una placa de ELISA se cargan 5 μl de cada muestra o curva patrón, a los que se añaden 200 μl de la mezcla A+B y se incuba la placa a 37°C durante 30 minutos hasta que desarrolle el color púrpura. Posteriormente se procede a su determinación espectrofotométrica a 543 nm en el lector de placas Microplate Reader de Benchmark. La cantidad de proteína se obtiene por interpolación de los valores de las muestras en la curva patrón.

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los resultados se expresan como media aritmética \pm error estándar de la media (SEM) de un determinado número (n) de animales. El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante el cálculo de la varianza utilizando un ANOVA de dos vías, seguido del test de Bonferroni, donde $P < 0,05$ se consideró diferencia significativa estadísticamente. Para llevar a cabo este análisis se empleó el programa estadístico Graph-Pad Prism versión 4.00 para windows (Graph-Pad Software, San Diego, CA).

Resultados

1. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON QUERCETINA EN RATAS ZUCKER OBESAS

Las ratas Zucker (fa/fa) son homocigóticas para un receptor de leptina no funcional, y se caracterizan por desarrollar obesidad, hiperlipidemia e hiperinsulinemia, mientras que las heterocigóticas (fa/+) se mantienen delgadas y presentan perfiles lipídico e insulínico normales. La resistencia a la insulina aparece en los animales jóvenes (5-7 semanas de edad) instaurándose el síndrome metabólico hacia las 10-12 semanas, razón por la que constituyen un modelo animal adecuado para el estudio de este síndrome.

En este modelo se puede apreciar una marcada hiperinsulinemia, elevados niveles plasmáticos de AGL, triglicéridos y colesterol, además de la resistencia a la leptina derivada del defecto en el receptor OB-R y manifestada como una marcada hiperleptinemia. También aparecen depósitos grasos en tejidos no destinados a ello como hígado, páncreas y músculo esquelético. También son características la hiperfagia y la obesidad. (Chen y cols. 2005). Para valorar los efectos que ejerce el tratamiento crónico con quercetina en este modelo se han valorado los siguientes parámetros:

1.1. VARIABLES MORFOLÓGICAS

1.1.1. PESO CORPORAL E INGESTA DE COMIDA

La obesidad es uno de los principales factores que determinan el síndrome metabólico y en este modelo, los animales homocigóticos (fa/fa) la desarrollan ya desde edades tempranas, estando completamente instaurada hacia la décima semana y aumentando a lo largo de la vida, pudiendo llegar a alcanzar los 700g. Las ratas obesas presentaban un peso mayor que las delgadas desde el inicio del experimento ($P < 0,05$). La administración crónica

de las dos dosis de quercetina no produjo cambios significativos en el peso final de los animales pero sí logró que los animales tratados con la dosis mayor ganaran menos peso que los no tratados (Figura 16).

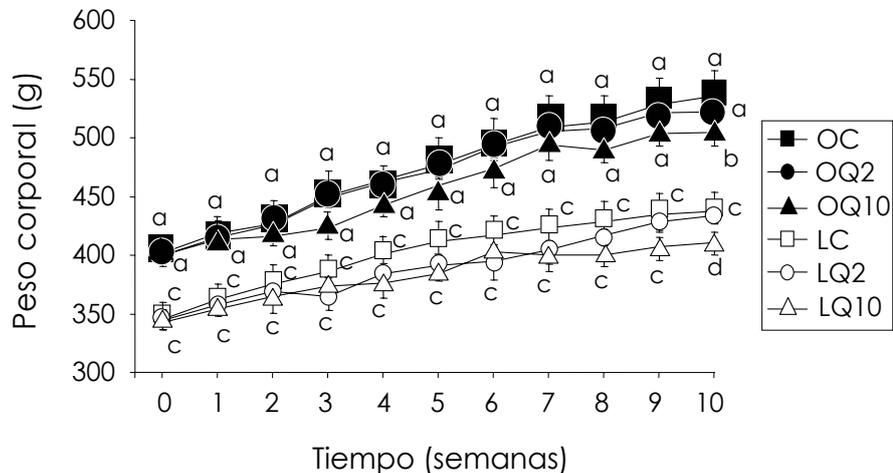


Figura 16. Evolución del peso corporal de los animales obesos y delgados que recibieron quercetina vehículo o quercetina a las dosis de 2 ó 10 mg/kg/día durante 10 semanas. Grupos experimentales: LC, ratas delgadas que recibieron vehículo; LQ2, ratas delgadas que recibieron 2 mg/kg/día de quercetina; LQ10, ratas delgadas que recibieron 10 mg/kg/día de quercetina; OC, ratas obesas que recibieron vehículo; OQ2, ratas obesas que recibieron 2 mg/kg/día de quercetina; OQ10, ratas obesas que recibieron 10 mg/kg/día de quercetina. Los valores están expresados como media aritmética \pm EEM ($n = 7-8$). Los valores para un mismo tiempo con distinta letra, presentan diferencia significativa ($P < 0,05$).

La hiperfagia característica en este modelo pudo apreciarse en el valor medio de la ingesta diaria de comida que fue superior en las ratas obesas, comparada con la ingesta de las delgadas. Sin embargo entre los grupos tratados y controles no se observaron diferencias (Tabla 4).

Tabla 4. Ingesta media de comida y peso corporal de las ratas que recibieron vehículo o quercetina a las dosis de 2 ó 10 mg/kg/día durante 10 semanas.

<i>Grupos experimentales</i>	<i>LC</i>	<i>LQ2</i>	<i>LQ10</i>	<i>OC</i>	<i>OQ2</i>	<i>OQ10</i>
Ingesta media (g/rata/día)	19,9 ± 0,2 ^b	20,4 ± 0,5 ^b	19,7 ± 0,3 ^b	22,6 ± 1,1 ^a	22,5 ± 0,9 ^b	22,3 ± 1,1 ^a
Peso corporal inicial (g)	345,2 ± 5,7 ^b	344,0 ± 10,8 ^b	342,2 ± 4,9 ^b	401,7 ± 11,6 ^a	400,0 ± 3,7 ^a	400,0 ± 7,2 ^a
Peso corporal final (g)	437,0 ± 8,4 ^c	433,7 ± 9,9 ^c	411,0 ± 6,2 ^d	535,1 ± 15,5 ^a	522,3 ± 10,2 ^a	504,8 ± 11,5 ^b

Grupos experimentales: LC, ratas delgadas que recibieron vehículo; LQ2, ratas delgadas que recibieron 2 mg/kg/día de quercetina; LQ10, ratas delgadas que recibieron 10 mg/kg/día de quercetina; OC, ratas obesas que recibieron vehículo; OQ2, ratas obesas que recibieron 2 mg/kg/día de quercetina; OQ10, ratas obesas que recibieron 10 mg/kg/día de quercetina. Los valores están expresados como media ± EEM (n = 7-8). Entre los valores que presentan letras distintas existe diferencia significativa (P < 0,05).

1.1.2. PESO RELATIVO DE ÓRGANOS

Las ratas Zucker obesas presentaron un incremento en el peso del hígado de aproximadamente un 40% en relación con las ratas delgadas (P < 0,00001). En este modelo de síndrome metabólico los animales manifiestan un acúmulo de grasa en tejidos no adiposos, como es el caso del hígado, por lo que era de esperar encontrar hepatomegalia y esteatosis hepática. Este mayor peso hepático no se vio afectado por el tratamiento con quercetina. Los pesos del riñón y del corazón, así como sus pesos relativos no presentaban diferencias entre obesas y delgadas ni entre controles y tratadas (Tabla 5).

Tabla 5. Peso de los órganos y peso relativo de los mismos con respecto al peso corporal de las ratas que recibieron vehículo o quercetina a las dosis de 2 ó 10 mg/kg/día durante 10 semanas.

Grupos	LC	LQ2	LQ10	OC	OQ2	OQ10
PH (g)	11.77± 0.38 ^b	11,07±0,64 ^b	10.91± 0.36 ^b	20.71± 0.97 ^a	19,21±0,74 ^a	20.25 ±0.90 ^a
PRH(g)	2.56± 0.043 ^b	2,58± 0,17 ^b	2.46± 0.052 ^b	3.74± 0.09 ^a	3,75± 0,11 ^a	3.73± 0.11 ^a
PC(g)	1,15± 0,03 ^a	1,14± 0,05 ^a	1,10± 0,02 ^a	1,17± 0,04 ^a	1,13± 0,02 ^a	1,15± 0,03 ^a
PRC(g)	2,50± 0,02 ^a	2,65± 0,10 ^a	2,49± 0,03 ^a	2,15± 0,03 ^a	2,22± 0,03 ^a	2,13± 0,03 ^a
PR(g)	1,12± 0,02 ^a	1,15± 0,02 ^a	1,15± 0,02 ^a	1,15± 0,04 ^a	1,06± 0,04 ^a	1,14± 0,05 ^a
PRR(g)	2,63± 0,03 ^a	2,69± 0,08 ^a	2,69± 0,04 ^a	2,10± 0,04 ^a	2,07± 0,05 ^a	2,08± 0,03 ^a

Grupos experimentales: LC, ratas delgadas que recibieron vehículo; LQ2, ratas delgadas que recibieron 2 mg/kg/día de quercetina; LQ10, ratas delgadas que recibieron 10 mg/kg/día de quercetina; OC, ratas obesas que recibieron vehículo; OQ2, ratas obesas que recibieron 2 mg/kg/día de quercetina; OQ10, ratas obesas que recibieron 10 mg/kg/día de quercetina. Los valores están expresados como media ± EEM (n = 7-8). Entre los valores que presentan letras distintas, existe diferencia significativa (P < 0,05). PH: peso del hígado; PRH: peso relativo del hígado; PC: peso del corazón, PRC: Peso relativo del corazón; PR: peso del riñón; PRC: Peso relativo del riñón.

1.2. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EN PLASMA

1.2.1. LÍPIDOS PLASMÁTICOS

La dislipidemia se valoró mediante la determinación de la concentración de colesterol total, triglicéridos y AGL en plasma en ayunas.

1.2.1.1. Colesterol. Como se esperaba, se apreció una concentración plasmática de colesterol mayor en las ratas obesas que en las delgadas (P < 0,05). El tratamiento con las dos dosis de quercetina redujo estos niveles en un 17 % (Figura 17A).

1.2.1.2. Triglicéridos. Los elevados niveles de triglicéridos plasmáticos que presentaban las ratas obesas con respecto a las delgadas ($P < 0,05$) se vieron reducidos en un 30 % en el grupo OQ2 y en un 33,2 % en el grupo OQ10 (Figura 17B).

1.2.1.3. Ácidos grasos libres. Se observó una concentración plasmática de AGL 1,5 veces mayor en las ratas obesas que en las delgadas ($P < 0,05$). El tratamiento con las dos dosis de quercetina redujo estos niveles en un 25 % (Figura 17C).

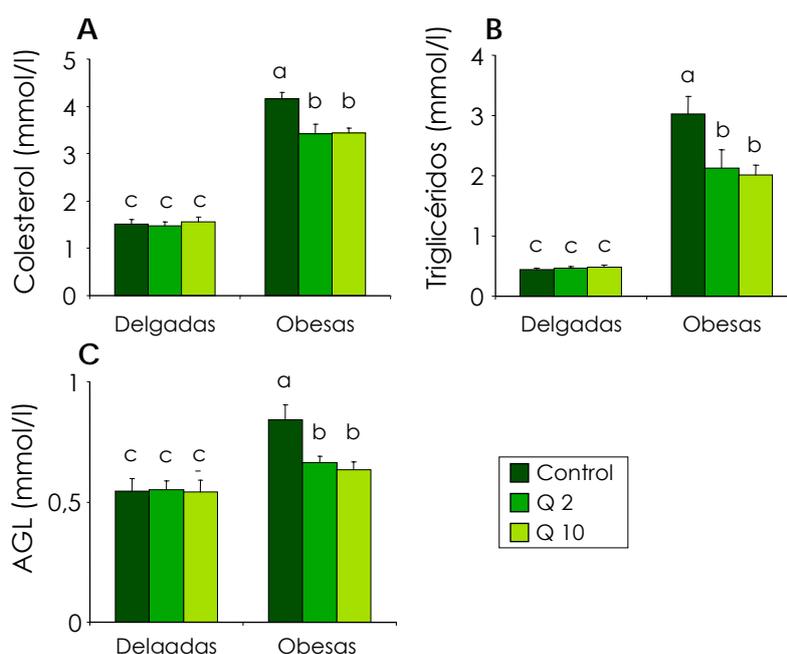


Figura 17. Concentración plasmática de colesterol (A), triglicéridos (B) y ácidos grasos libres (AGL) (C) en ratas delgadas y obesas que recibieron vehículo (Control) o quercetina a las dosis de 2 (Q2) ó 10 mg/kg/día (Q10) durante 10 semanas. Los valores están expresados como media \pm EEM ($n = 7-8$). Entre los valores que presentan letras distintas existe diferencia significativa ($P < 0,05$).

1.2.2. RESISTENCIA A LA INSULINA

1.2.2.1. Glucosa. No se observaron diferencias en la concentración de glucosa en ninguno de los grupos, tanto entre controles y tratados como entre obesas y delgadas (Figura 18A).

1.2.2.2. Insulina. Como corresponde a este modelo, se halló una concentración plasmática de insulina 17 veces superior en las ratas obesas con respecto a las delgadas ($P < 0,05$) (Figura 18B). El tratamiento con ambas dosis de quercetina (2 y 10 mg/kg/día) lograron reducir ese incremento en un 74,2% y un 76,2% respectivamente ($P < 0,05$) (Figura 18B).

1.2.2.3. HOMA_{IR}. Las ratas obesas presentaron valores mayores de HOMA_{IR} en relación con las ratas delgadas ($P < 0,01$) (Figura 18C). La administración de las dos dosis de quercetina corrigió estos valores en un 74,7% para la dosis de 2 mg/kg/día y un 79,0% para la dosis de 10 mg/kg/día ($P < 0,05$ vs OC) (Figura 18C).

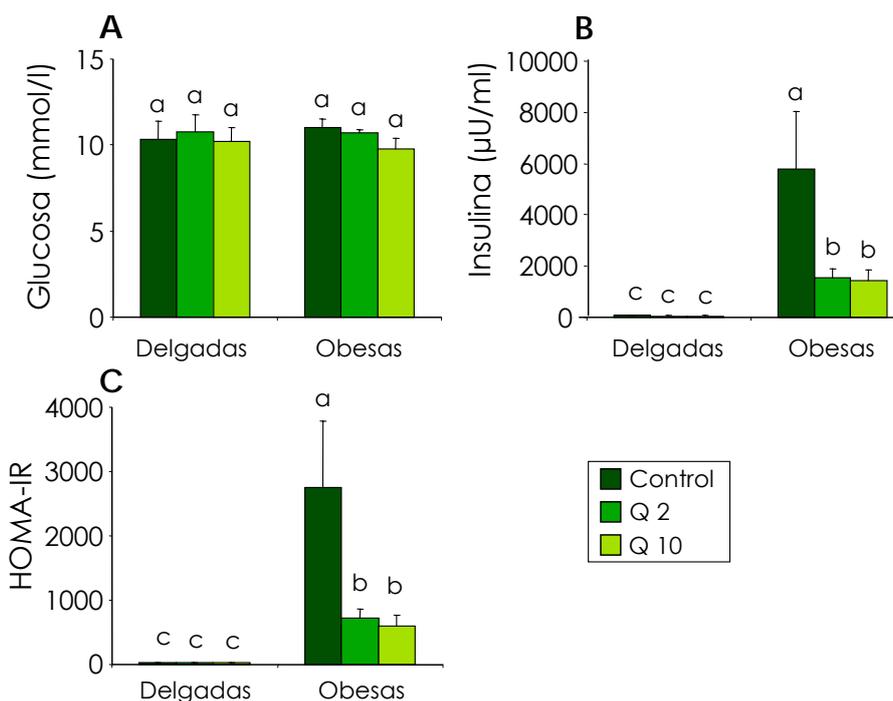


Figura 18. Concentración plasmática de glucosa (A) e insulina (B) y valoración de la resistencia a la insulina como HOMA_{IR} (C) en ratas delgadas y obesas que recibieron vehículo (Control) o quercetina a las dosis de 2 (Q2) ó 10 mg/kg/día (Q10) durante 10 semanas. Los valores están expresados como media \pm EEM (n = 7-8). Entre los valores que presentan letras distintas existe diferencia significativa (P < 0,05).

1.2.3. RESISTENCIA A LA LEPTINA

El grado de resistencia a la leptina se determinó mediante el estudio de la concentración plasmática de leptina mediante kit de ELISA, ya que en este modelo, el animal produce una cantidad muy elevada de leptina para compensar la falta de eficacia de su receptor, provocando hiperleptinemia. Una disminución significativa de estos niveles, se interpretará como una mejora en la sensibilidad a la proteína y por tanto una reducción de la resistencia (DaSilva y cols., 1998; Croase y cols., 1998; Frühbeck y cols., 2006).

Las ratas obesas control presentaron una leptinemia 6 veces superior a la de las delgadas ($P < 0,0001$). Ninguna de las dos dosis de quercetina logró modificar la hiperleptinemia (Figura 19).

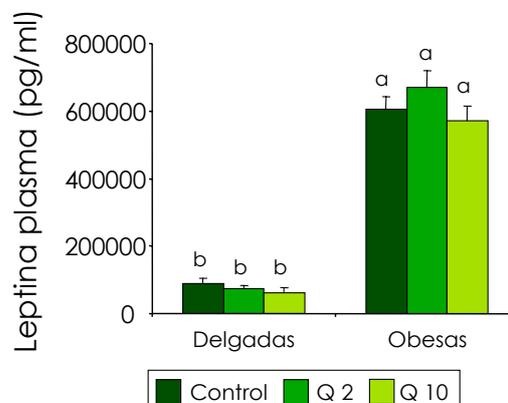


Figura 19. Concentración de leptina en plasma de ratas delgadas y obesas que recibieron vehículo (Control) o quercetina a las dosis de 2 (Q2) ó 10 mg/kg/día (Q10) durante 10 semanas. Los valores están expresados como media \pm EEM ($n = 7-8$). Entre los valores que presentan letras distintas existe diferencia significativa ($P < 0,05$).

1.2.4. CONCENTRACIÓN DE NITRATOS MÁS NITRITOS (NOx)

La concentración plasmática de NOx puede interpretarse como indicador del equilibrio entre las isoformas endotelial e inducible de la NOS, de modo que un nivel elevado de NOx puede indicar exceso de actividad de la isoforma inducible (Yugar-Toledo y cols., 2004; Kapur y cols., 1999; Bedard y cols., 1997), contribuyendo a la inflamación del síndrome metabólico. Además este desequilibrio podría afectar la función endotelial ayudando también al desarrollo de una moderada hipertensión.

En las ratas OC se observaron niveles de NOx 5 veces superiores a los de las ratas LC ($P < 0,001$). En las ratas OQ10 estos niveles se redujeron a la mitad ($P < 0,001$ vs OC). La dosis

menor de quercetina no produjo ningún cambio significativo en los niveles de NOx de las ratas obesas (Figura 20).

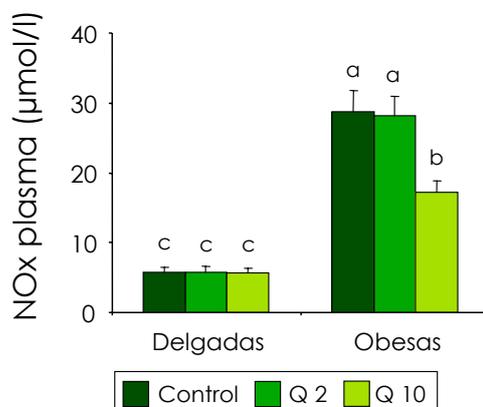


Figura 20. Niveles plasmáticos de NOx en ratas delgadas y obesas que recibieron vehículo (Control) o quercetina a las dosis de 2 (Q2) ó 10 mg/kg/día (Q10) durante 10 semanas. Los valores están expresados como media \pm EEM (n = 7-8). Entre los valores que presentan letras distintas existe diferencia significativa ($P < 0,05$).

1.2.5. ADIPONECTINA

Los niveles plasmáticos de adiponectina fueron 1,8 veces más bajos en las ratas OC que en las LC ($P < 0,0001$). El tratamiento con 10 mg/kg/día de quercetina aumentó estos niveles hasta un 37,7 % ($P < 0,001$ vs OC), pero la dosis de 2 mg/kg/día no produjo ningún cambio significativo. No se observaron diferencias entre los grupos de ratas delgadas (Figura 21).

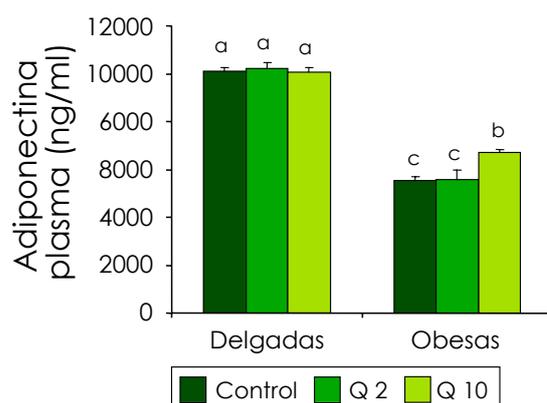


Figura 21. Niveles plasmáticos de adiponectina en ratas delgadas y obesas que recibieron vehículo (Control) o quercetina a las dosis de 2 (Q2) ó 10 mg/kg/día (Q10) durante 10 semanas. Los valores están expresados como media \pm EEM (n = 7-8). Entre los valores que presentan letras distintas existe diferencia significativa ($P < 0,05$).

1.3. EFECTOS DE LA QUERCETINA EN TEJIDOS INSULINO-RESISTENTES.

Para conocer más profundamente el efecto de la quercetina sobre la resistencia a la insulina, nos centramos en el estudio de dos tejidos fundamentalmente: el tejido adiposo visceral y el hígado.

1.3.1. TEJIDO ADIPOSO VISCERAL

Como se destaca en la introducción, destaca la inflamación crónica del tejido adiposo como una de las principales causas de este desorden metabólico. Por esto, nos hemos centrado en el estudio de distintas variables que pueden caracterizar estos fenómenos. Para conocer el papel hormonal y antiinflamatorio del efecto de la quercetina, hemos evaluado además de los niveles plasmáticos de NOx (descrito en el apartado 1.2.4. de esta

sección) y adiponectina (secretada exclusivamente por el tejido adiposo y descrita anteriormente en el apartado 1.2.5), la producción de la citoquina proinflamatoria TNF- α y la expresión proteica de las formas constitutiva e inducible de la enzima NOS, ya que un desequilibrio entre estas dos isoformas es indicativo de inflamación y estrés oxidativo (Persichini y cols., 2006).

1.3.1.1. PRODUCCIÓN DE TNF- α EN TEJIDO ADIPOSITO VISCERAL

Los niveles de TNF- α en las ratas obesas fueron 1,5 veces superiores a los de las ratas delgadas ($P < 0,0001$). La administración de la dosis mayor de quercetina (10 mg/kg/día) a ratas obesas redujo estos niveles hasta valores similares a los de los animales delgados. En las ratas OQ2 no se observaron diferencias con respecto a las OC en este parámetro (Figura 22).

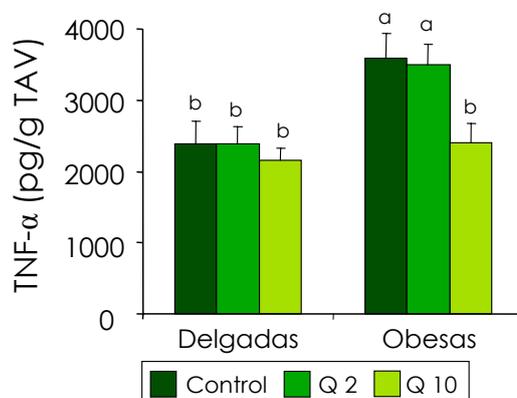


Figura 22. Niveles de TNF- α en tejido adiposo de ratas delgadas y obesas que recibieron vehículo (Control) o quercetina a las dosis de 2 (Q2) ó 10 mg/kg/día (Q10) durante 10 semanas. Los valores están expresados como media \pm EEM ($n = 7-8$). Entre los valores que presentan letras distintas existe diferencia significativa ($P < 0,05$).

1.3.1.2. EXPRESIÓN DE eNOS E iNOS EN TEJIDO ADIPOSO VISCERAL

Debido a que los efectos antiinflamatorios deducidos del aumento en la concentración de adiponectina en plasma y del descenso de la producción de TNF- α en tejido adiposo, sólo aparecen tras la administración de la dosis mayor de quercetina (10 mg/kg/día), fue en este grupo en el que se midió la expresión de eNOS y de iNOS. Al igual que en estudios realizados por otros autores (Persichini y cols., 2006), la expresión eNOS estaba disminuida y la de iNOS aumentada en las ratas obesas control. La administración de 10 mg/kg/día de quercetina logró equilibrar significativamente la expresión de ambas proteínas (Figura 23).

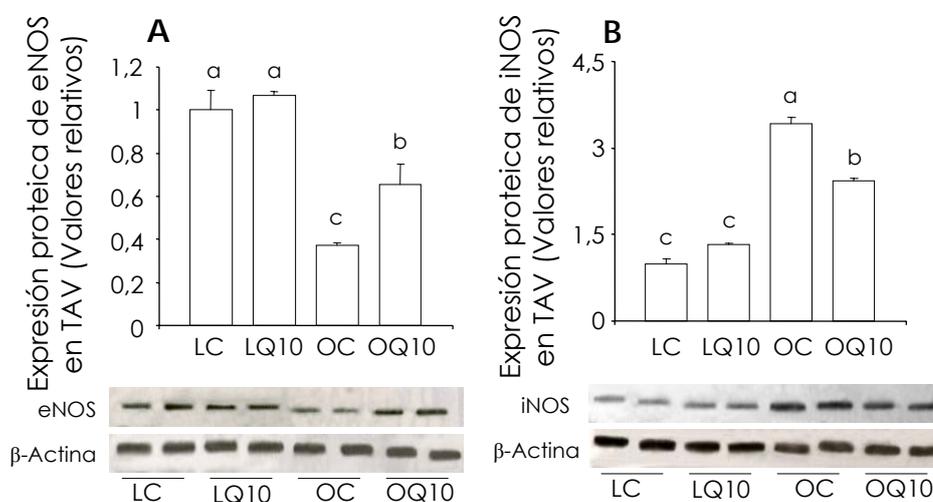


Figura 23. Expresión proteica de eNOS (A) e iNOS (B) en tejido adiposo visceral (TAV) de ratas delgadas y obesas que recibieron vehículo o 10 mg/kg/día de quercetina durante 10 semanas. Grupos experimentales: LC, ratas delgadas que recibieron vehículo; LQ10, ratas delgadas que recibieron 10 mg/kg/día de quercetina; OC, ratas obesas que recibieron vehículo; OQ10, ratas obesas que recibieron 10 mg/kg/día de quercetina. Los valores relativos están expresados como media \pm EEM (n = 5) y proceden del análisis densitométrico en relación a la β -actina, asignando el valor 1.0 al grupo LC. Entre los valores que presentan letras distintas existe diferencia significativa ($P < 0,05$).

1.3.2. HÍGADO

El hígado es uno de los principales órganos implicados en el metabolismo glucídico y lipídico, y por tanto es una de las dianas fundamentales en el tratamiento de la resistencia a la insulina.

1.3.2.1. ACUMULACIÓN HEPÁTICA DE LÍPIDOS

En el modelo Zucker de síndrome metabólico existe depósito ectópico de lípidos en el hígado, y se planteó como posible, el hecho de que el contenido lipídico se viera modificado por el tratamiento con quercetina. Para averiguarlo, se procedió a la extracción de estos lípidos mediante la técnica de Blight and Dyer (Blight y Dyer, 1959) para su posterior cuantificación.

1.3.2.1.1. Colesterol total. El contenido hepático de colesterol en las ratas obesas control fue 2,6 veces mayor que el de las delgadas ($P < 0,00001$) (Figura 25A). Tras la administración de la dosis de 10 mg/kg/día de quercetina, este se vio reducido en un 45%, sin afectar en este caso a los animales delgados (Figura 25A).

1.3.2.1.2. Triglicéridos. Las ratas obesas control mostraron una cantidad de triglicéridos hepáticos 2,3 veces mayor que la que mostraron las delgadas ($P < 0,00001$) (Figura 25B). El tratamiento con la dosis de 10 mg/kg/día de quercetina redujo este contenido en un 50% ($P < 0,00001$) en los animales obesos y un 20% en los delgados ($P < 0,001$) (Figura 25B).

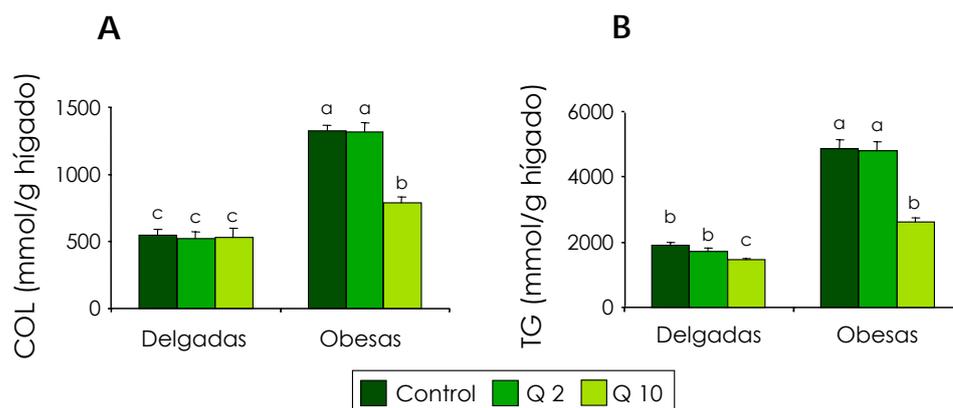


Figura 25. Contenido de colesterol total (COL) (A) y triglicéridos (TG) (B) en ratas delgadas y obesas que recibieron vehículo (Control) o quercetina a las dosis de 2 (Q2) ó 10 mg/kg/día (Q10) durante 10 semanas. Los valores están expresados como media \pm EEM (n = 7-8). Entre los valores que presentan letras distintas existe diferencia significativa (P < 0,05).

1.3.2.2. EXPRESIÓN DE AMPK TOTAL Y FOSFORILADA

Al ser la AMPK una de las enzimas implicadas en la homeostasis energética y en concreto en la regulación del metabolismo lipídico, y dada su alteración en trastornos metabólicos (Mhairi y cols., 2007), hemos querido analizar los efectos de la quercetina sobre esta enzima y la vía de inhibición que produce sobre la ACC. Para ello hemos valorado la activación de la AMPK mediante la determinación de la relación entre la expresión de la proteína fosforilada en Thr¹⁷² (activada) y la expresión de AMPK- α total, medidas por western blot.

Se pudo apreciar que mientras la expresión constitutiva de la enzima permaneció constante, su activación por fosforilación fue significativamente menor en ratas obesas control (OC) en relación a las ratas delgadas (LC) (P < 0,05) y que el tratamiento con la dosis mayor de quercetina (10mg/kg/día) restauró en un 41% la activación de esta vía. La dosis menor de

quercetina no produjo cambios significativos y tampoco se vio efecto sobre los controles delgados (Figura 26).

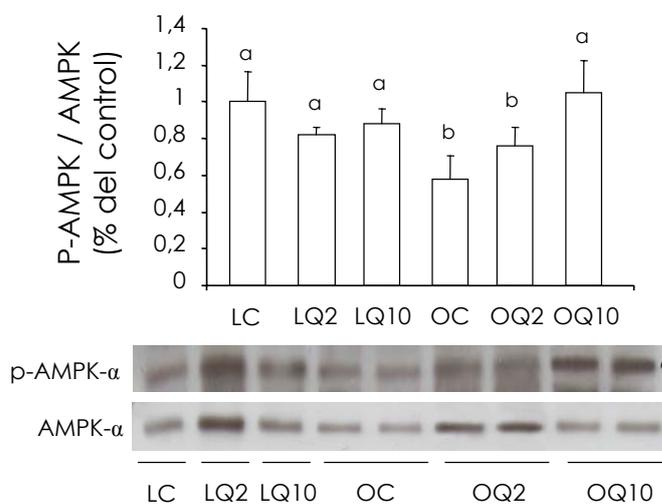


Figura 26. Expresión hepática de la proteína AMPK- α y de la fracción fosforilada de la misma (p-AMPK- α) en ratas delgadas y obesas que recibieron vehículo, quercetina 2 mg/kg/día o quercetina 10 mg/kg/día durante 10 semanas. Grupos experimentales: LC, ratas delgadas que recibieron vehículo; LQ2, ratas delgadas que recibieron 2 mg/kg/día de quercetina; LQ10, ratas delgadas que recibieron 10 mg/kg/día de quercetina; OC, ratas obesas que recibieron vehículo; OQ2, ratas obesas que recibieron 2 mg/kg/día de quercetina; OQ10, ratas obesas que recibieron 10 mg/kg/día de quercetina. Los valores relativos están expresados como media \pm EEM ($n = 5$) y reflejan la relación densitométrica entre la fracción fosforilada de AMPK- α y el total de la proteína, asignando el valor 1.0 al grupo LC. Entre los valores que presentan letras distintas existe diferencia significativa ($P < 0,05$).

1.3.2.3. EXPRESIÓN DE ACC TOTAL Y FOSFORILADA

Tras valorar la activación de la AMPK en el hígado, se analizó la inhibición de la enzima acetil-CoA carboxilasa (ACC), determinando por western blot su forma constitutiva y su forma fosforilada. Mientras la expresión constitutiva de la enzima permaneció constante, las ratas obesas control presentaron menor fosforilación relativa que las ratas delgadas ($P < 0,05$). En las ratas OQ10 la fosforilación relativa de ACC aumentó un 41% en relación con el grupo OC ($P < 0,05$), sin que se observaran diferencias entre los grupos OQ2 y OQ10 (Figura 27).

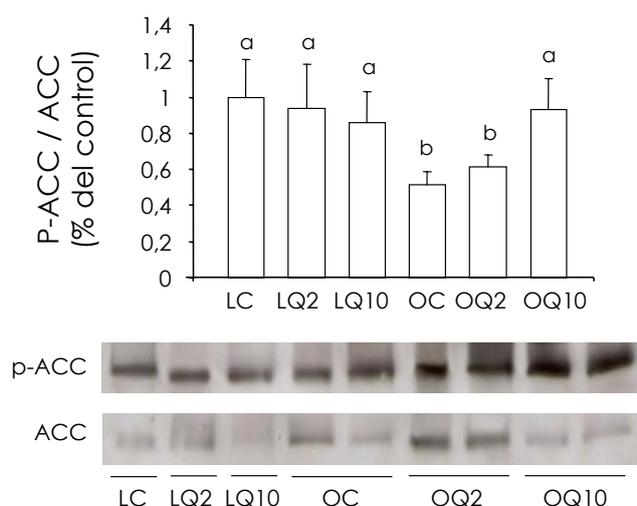


Figura 27. Expresión hepática de la proteína ACC y de la fracción fosforilada de la misma (p-ACC) en ratas delgadas y obesas que recibieron vehículo, quercetina 2 mg/kg/día o quercetina 10 mg/kg/día durante 10 semanas. Grupos experimentales: LC, ratas delgadas que recibieron vehículo; LQ2, ratas delgadas que recibieron 2 mg/kg/día de quercetina; LQ10, ratas delgadas que recibieron 10 mg/kg/día de quercetina; OC, ratas obesas que recibieron vehículo; OQ2, ratas obesas que recibieron 2 mg/kg/día de quercetina; OQ10, ratas obesas que recibieron 10 mg/kg/día de quercetina. Los valores relativos están expresados como \pm EEM ($n = 5$) y reflejan la relación densitométrica entre la fracción fosforilada de ACC y el total de la proteína, asignando el valor 1.0 al grupo LC. Entre los valores que presentan letras distintas existe diferencia significativa ($P < 0,05$).

1.4. EFECTOS DE LA QUERCETINA SOBRE LA PRESIÓN ARTERIAL

Según las definiciones del síndrome metabólico dadas por diversos grupos de expertos como Organización Mundial de la Salud (OMS) (WHO 1999), el *European Group for the Study of Insulin Resistance* (EGIR) (Balkau B y cols. 1999) y el *National Cholesterol Education Program-Third Adult Treatment Panel* (NCEP ATP III, 2001), entre las alteraciones que lo caracterizan se encuentra la hipertensión, debido a que la funcionalidad de la enzima eNOS se encuentra comprometida, resultado una producción inadecuada de NO y una disfunción endotelial. Además, este fallo enzimático se ha relacionado, entre otros factores, con desequilibrios en la defensa antioxidante (Chatterjee y cols., 2008).

Según estudios previos de este grupo (Duarte y cols., 2001; Galisteo y cols., 2004), la quercetina posee acción antihipertensiva y antioxidante, por lo tanto estos dos aspectos del síndrome metabólico también fueron estudiados.

1.4.1. PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA

Al inicio del experimento se hizo una medida basal de la PAS que oscilaba entre 124 mmHg para las ratas delgadas y 141 mmHg para las obesas, por tanto existía una moderada pero significativa hipertensión en las ratas obesas ($P < 0,0001$). Estos valores fueron aumentando lentamente a lo largo del experimento en el grupo OC mientras que en los tratados con quercetina (OQ2 y OQ10) disminuyeron. En el caso de la dosis de 2 mg/kg/día (OQ2), el descenso fue significativo ($P < 0,01$) a partir de la quinta semana de tratamiento, mientras que en grupo de la dosis mayor (OQ10) la diferencia apareció a la tercera semana (Figura 28).

Al final del tratamiento, los valores de presión arterial para los grupos OQ2 y OQ10 fueron de 14 y 17 mmHg menos respectivamente, en comparación con el grupo control OC ($P < 0,001$), mientras que no se observó ningún efecto en las ratas delgadas.

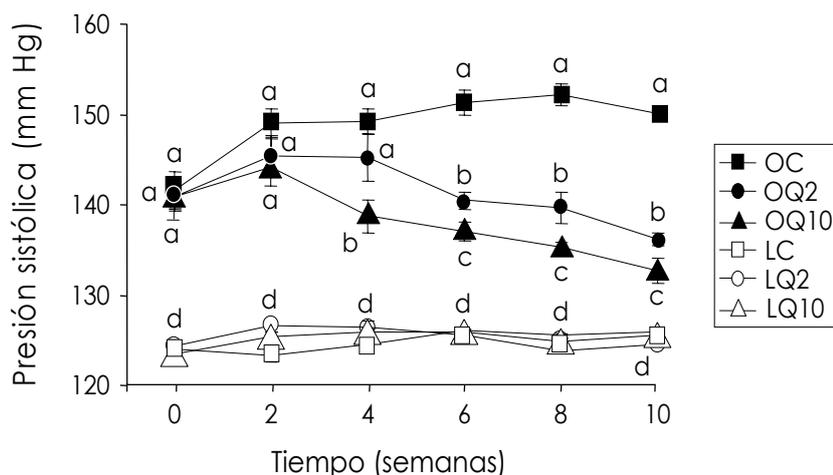


Figura 28. Evolución de la PAS medida por pletismografía en la cola de los animales delgados y obesos que recibieron vehículo o quercetina a las dosis de 2 ó 10mg/kg/día durante 10 semanas. Grupos experimentales: LC, ratas delgadas que recibieron vehículo; LQ2, ratas delgadas que recibieron 2 mg/kg/día de quercetina; LQ10, ratas delgadas que recibieron 10 mg/kg/día de quercetina; OC, ratas obesas que recibieron vehículo; OQ2, ratas obesas que recibieron 2 mg/kg/día de quercetina; OQ10, ratas obesas que recibieron 10 mg/kg/día de quercetina. Los valores están expresados como media \pm EEM ($n = 7-8$). Los valores de un mismo tiempo con distinta letra, presentan diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$).

1.4.2. EXPRESIÓN DE eNOS EN AORTA

Para evaluar la implicación de la enzima eNOS en el efecto antihipertensivo de la quercetina, se analizó mediante técnica de western blot la expresión proteica de la enzima en la aorta.

La expresión proteica de eNOS en los anillos aórticos de las ratas obesas control (OC) se encontraba reducida comparado con la de las ratas delgadas ($P < 0,001$) (Figura 30). El tratamiento con 10 mg/kg/día de quercetina aumentó la expresión de la enzima hasta ser similar a la de las ratas delgadas ($P < 0,001$ vs OC) (Figura 29).

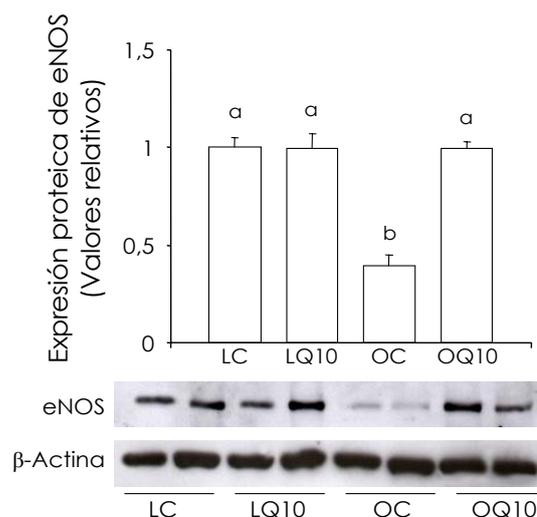


Figura 29. Expresión proteica de eNOS en aorta de en ratas delgadas y obesas que recibieron vehículo o quercetina a la dosis de 10 mg/kg/día durante 10 semanas. Grupos experimentales: LC, ratas delgadas que recibieron vehículo; LQ10, ratas delgadas que recibieron 10 mg/kg/día de quercetina; OC, ratas obesas que recibieron vehículo; OQ10, ratas obesas que recibieron 10 mg/kg/día de quercetina. Los valores relativos están expresados como media \pm EEM ($n = 5$) y proceden del análisis densitométrico en relación a la β -actina, asignando el valor 1.0 al grupo LC. Entre los valores que presentan letras distintas existe diferencia significativa ($P < 0,05$).

1.5. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Para realizar una valoración del estado oxidativo de los animales se procedió a la medida del nivel hepático de TBARS (especies reactivas al ácido tiobarbitúrico) expresado como MDA.

1.5.1. CONCENTRACIÓN DE MDA EN HÍGADO Y PLASMA

Las ratas obesas presentaron una peroxidación lipídica expresada como concentración de MDA tres veces mayor que las ratas delgadas ($P < 0,05$). El tratamiento con ambas dosis de quercetina redujeron estos valores en un 40% en plasma y en un 25% en hígado ($P < 0,05$) (Figura 30).

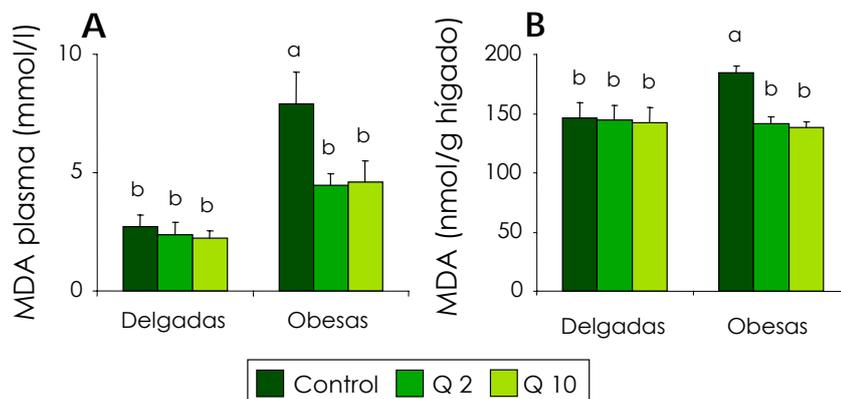


Figura 30. Concentración de malondialdehído (MDA) en plasma (A) e hígado (B) en ratas delgadas y obesas que recibieron vehículo (Control) o quercetina a las dosis de 2 (Q2) ó 10 mg/kg/día (Q10) durante 10 semanas. Los valores están expresados como media \pm EEM ($n = 7-8$). Entre los valores que presentan letras distintas existe diferencia significativa ($P < 0,05$).

2. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON RESVERATROL EN RATAS ZUCKER OBESAS

2.1. VARIABLES MORFOLÓGICAS

2.1.1. PESO CORPORAL E INGESTA DE COMIDA

Las ratas obesas presentaban un peso mayor que las delgadas desde el inicio del experimento ($P < 0,05$). La administración crónica de resveratrol no produjo cambios significativos en el peso final de los animales pero sí consiguió que los animales tratados ganaran menos peso que los no tratados (Figura 31, tabla 6).

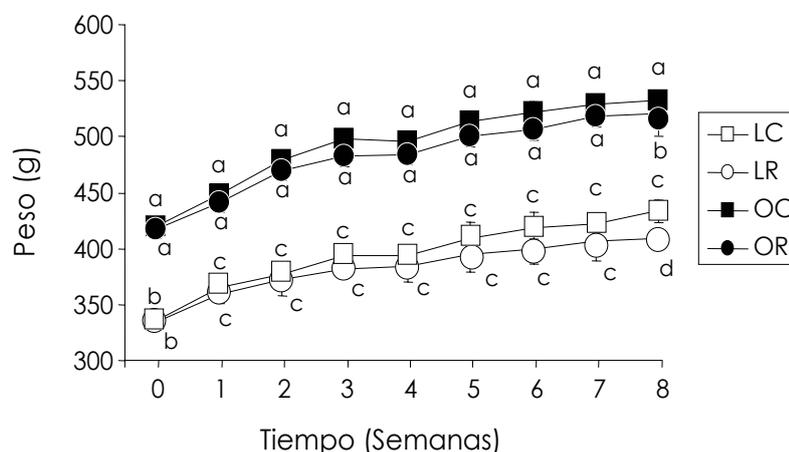


Figura 31. Efecto de la administración de resveratrol sobre la evolución del peso corporal de las ratas obesas y delgadas que recibieron vehículo o resveratrol (10 mg/kg/día) durante 8 semanas. Grupos experimentales: LC, ratas delgadas que recibieron vehículo; LR, ratas delgadas que recibieron resveratrol; OC, ratas obesas que recibieron vehículo; OR, ratas obesas que recibieron resveratrol. Los valores están expresados como media aritmética \pm EEM ($n = 7-8$). Entre los valores para un mismo tiempo que presentan letras distintas, existe diferencia significativa ($P < 0,05$).

Como corresponde al modelo, al igual que en el experimento con la quercetina, la media de la ingesta diaria de comida fue marcadamente superior en las ratas obesas comparadas con la ingesta de las delgadas ($P < 0,05$), alimentadas con la misma dieta. Sin embargo entre los grupos tratados y controles no se observaron diferencias (Tabla 6).

Tabla 6. Ingesta media de comida y peso corporal de las ratas que recibieron vehículo o resveratrol (10 mg/kg/día) durante 8 semanas.

<i>Grupos experimentales</i>	<i>LC</i>	<i>LR</i>	<i>OC</i>	<i>OR</i>
Ingesta media (g/rata/día)	20,7 ± 0,1 ^b	20,4 ± 0,2 ^b	22,6 ± 0,6 ^a	22,5 ± 0,5 ^a
Peso corporal inicial (g)	340,3 ± 7,0 ^b	339,4 ± 5,6 ^b	418,9 ± 6,0 ^a	416,9 ± 8,0 ^a
Peso corporal final (g)	438,0 ± 9,7 ^b	419,7 ± 8,4 ^b	535,4 ± 7,5 ^a	520,0 ± 11,0 ^a

Grupos experimentales: LC, ratas delgadas que recibieron vehículo; LR, ratas delgadas que recibieron resveratrol; OC, ratas obesas que recibieron vehículo; OR, ratas obesas que recibieron resveratrol. Los valores están expresados como media ± EEM (n = 7-8). Entre los valores que presentan letras distintas existe diferencia significativa ($P < 0,05$).

2.1.2. PESO RELATIVO DE ÓRGANOS

En las ratas obesas se apreció un incremento en el peso del hígado ($P < 0,0001$) con respecto a las delgadas, pero estos parámetros no se vieron afectados por el tratamiento con resveratrol. Los pesos del riñón, corazón y grasa visceral así como sus pesos relativos no presentaban diferencias entre obesas y delgadas ni entre controles y tratadas, sin embargo, el peso de grasa epididimal, representativo del acumulo de grasa corporal, sí se vio reducido en un 21% y su peso relativo en un 18% ($P < 0,05$) tras el tratamiento con resveratrol (Tabla 7).

Tabla 7. Peso relativo de órganos de las ratas que recibieron vehículo o resveratrol (10 mg/kg/día) durante 8 semanas.

<i>Grupos</i>	<i>LC</i>	<i>LR</i>	<i>OC</i>	<i>OR</i>
PH (g)	14,27± 0,42 ^b	13,02± 0,65 ^b	24,69± 1,23 ^a	24,13± 1,10 ^a
PRH(g)	3,29± 0,15 ^b	3,19± 0,10 ^b	4,68± 0,25 ^a	4,68± 0,16 ^a
PC(g)	1,12± 0,01 ^a	1,03± 0,03 ^a	1,14± 0,02 ^a	1,12± 0,02 ^a
PRC(g)	2,65± 0,05 ^a	2,62± 0,11 ^a	2,16± 0,04 ^b	2,17± 0,03 ^b
PR(g)	1,01± 0,03 ^a	0,94± 0,03 ^a	1,00± 0,05 ^a	0,96± 0,02 ^a
PRR(g)	2,34± 0,06 ^a	2,32± 0,05 ^a	1,93± 0,10 ^b	1,84± 0,02 ^b
PEPI(g)	3,38± 0,20 ^c	3,49± 0,48 ^c	8,61± 0,57 ^a	6,81± 0,36 ^b
PREPI(g)	7,83± 0,57 ^c	8,49± 0,74 ^c	16,26± 0,93 ^a	13,23± 0,63 ^b
PVIS(g)	3,79± 0,29 ^b	3,72± 0,72 ^b	12,45± 0,43 ^a	12,56± 0,33 ^a
PRVIS(g)	8,80± 0,65 ^b	9,00± 1,11 ^b	23,61± 0,97 ^a	24,44± 0,66 ^a

Grupos experimentales: LC, ratas delgadas que recibieron vehículo; LR, ratas delgadas que recibieron 10 mg/kg/día de resveratrol; OC, ratas obesas que recibieron vehículo; OR, ratas obesas que recibieron 10 mg/kg/día de resveratrol. Los valores están expresados como media ± EEM (n = 7-8). Entre los valores que presentan letras distintas existe diferencia significativa (P< 0,05). P: peso del órgano; PR: peso relativo del órgano con respecto al peso corporal. H: hígado, C: corazón, R: riñón, EPI: tejido adiposo visceral y VIS: tejido adiposo visceral.

2.2. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EN PLASMA

2.2.1. LÍPIDOS PLASMÁTICOS

2.2.1.1. LÍPIDOS PLASMÁTICOS BASALES

2.2.1.1.1. Colesterol. Se observó una concentración plasmática de colesterol significativamente mayor en las ratas obesas respecto a las delgadas ($P < 0,0001$), representado por un 45% de incremento en ratas OC (Figura 32A).

2.2.1.1.2. Triglicéridos. Las ratas obesas presentaron un nivel de triglicéridos en plasma un 89,5% superior al de sus controles delgados antes de comenzar el tratamiento ($P < 0,001$) (Figura 32B).

2.2.1.1.3. Ácidos grasos libres. En nivel de AGL en plasma de los animales obesos fue un 26,6% superior al de los controles delgados ($P < 0,01$) (Figura 32C).

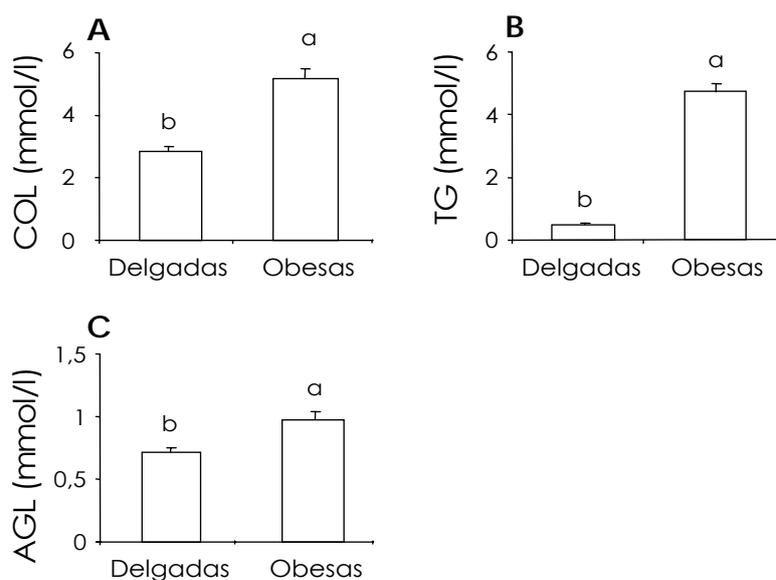


Figura 32. Concentraciones plasmáticas de colesterol (COL) (A), triglicéridos (TG) (B) y ácidos grasos libres (AGL) (C) en ratas delgadas y obesas antes de iniciar el tratamiento. Los valores están expresados como media \pm EEM (n = 7-8). Existe diferencia significativa ($P < 0,05$) entre los valores que presentan letras distintas.

2.2.1.2. LÍPIDOS PLASMÁTICOS A LAS 4 SEMANAS

2.2.1.2.1. Colesterol. La elevada concentración de colesterol total que presentaron las ratas OC con respecto a las LC ($P < 0,0001$), se redujo en un 28% a las cuatro semanas de tratamiento en las ratas OR ($P < 0,01$ vs OC) (Figura 33A).

2.2.1.2.2. Triglicéridos. Tras cuatro semanas de administración oral de resveratrol se produjo una reducción de un 20 % en los niveles plasmáticos de triglicéridos de las ratas OR con respecto a los observados en las ratas OC ($P < 0,05$), que a su vez mostraban valores 8 veces superiores a los de las ratas LC ($P < 0,00001$) (Figura 33B).

2.2.1.2.3. Ácidos grasos libres. En la cuarta semana de tratamiento con resveratrol, en los animales OR se apreció una disminución del 33,4% en los niveles de AGL ($P < 0,05$ vs OC) (Figura 33C).

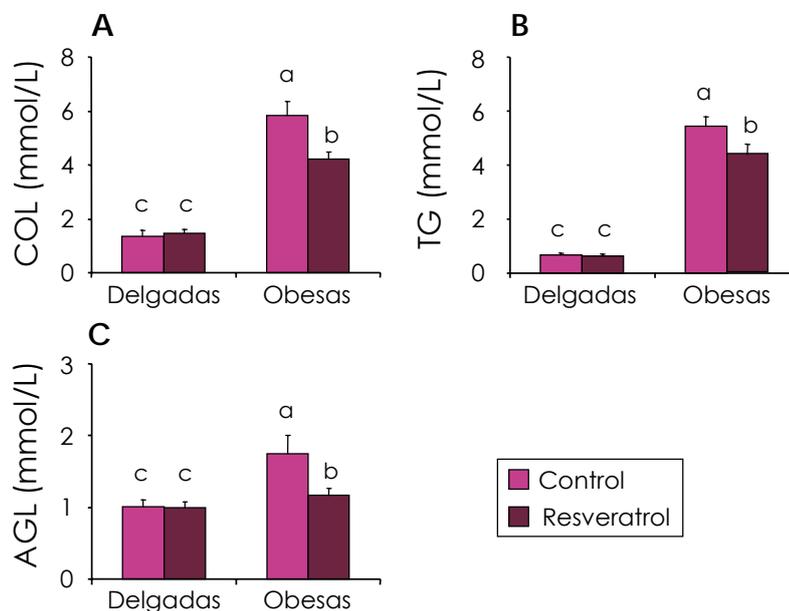


Figura 33. Concentraciones plasmáticas de colesterol (COL) (A), triglicéridos (TG) (B) y ácidos grasos libres (AGL) (C) en ratas obesas y delgadas que recibieron vehículo (Control) o Resveratrol (10 mg/kg/día) durante 4 semanas. Los valores están expresados como media \pm EEM ($n = 7-8$). Existe diferencia significativa ($P < 0,05$) entre los valores que presentan letras distintas.

2.2.1.3. LÍPIDOS PLASMÁTICOS A LAS 8 SEMANAS

2.2.1.3.1. Colesterol. Los elevados niveles de colesterol que presentaban las ratas obesas con respecto a las delgadas ($P < 0,0001$) fueron reducidos en un 29,7% en los animales OR ($P < 0,0001$ vs OC) (Figura 34A).

2.2.1.3.2. Triglicéridos. La concentración de triglicéridos que fue superior en las ratas OC ($P < 0,0001$ vs LC), disminuyó un 31,6% en las ratas obesas que recibieron resveratrol durante 8 semanas ($P < 0,01$ vs OC) (Figura 34B).

2.2.1.3.3. Ácidos grasos libres. El nivel de AGL en las ratas OC fue 1,5 veces superior al de sus controles delgados ($P < 0,05$). La administración del resveratrol produjo una disminución del 26,2% en las ratas obesas ($P < 0,05$ vs OC) sin afectar a los animales delgados (Figura 34C).

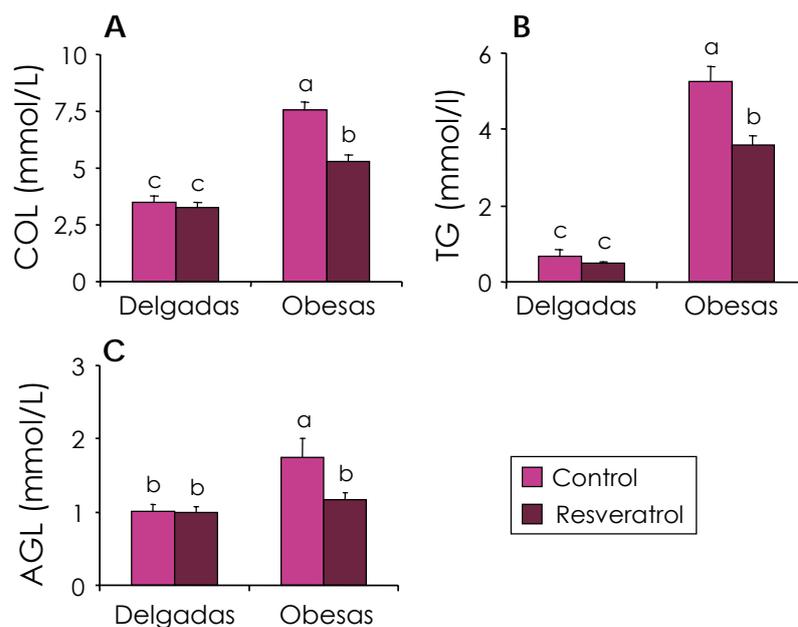


Figura 34. Concentraciones plasmáticas de colesterol (COL) (A), triglicéridos (TG) (B) y ácidos grasos libres (AGL) (C) en ratas obesas y delgadas que recibieron vehículo (Control) o Resveratrol (10 mg/kg/día) durante 8 semanas. Los valores están expresados como media \pm EEM ($n = 7-8$). Existe diferencia significativa ($P < 0,05$) entre los valores que presentan letras distintas.

2.2.2. RESISTENCIA A LA INSULINA.

2.2.2.1. RESISTENCIA A LA INSULINA BASAL

2.2.2.1.1. Glucosa. En el modelo Zucker no siempre se da la presencia de hiperglucemia en los animales de edades jóvenes, de hecho, en anteriores experimentos no se ha manifestado. Sin embargo, en este caso, se apreció una glucemia 1,2 veces superior en las ratas obesas con respecto a las delgadas ($P < 0,001$) (Figura 35A).

2.2.2.1.2. Insulina. Como corresponde al modelo, los animales obesos ya presentaban hiperinsulinemia a las 15 semanas de edad, con unos niveles plasmáticos 3,2 veces superiores a los de los animales delgados ($P < 0,01$) (Figura 35B).

2.2.2.1.3. HOMA_{IR}. El resultado de aplicar el modelo matemático del índice HOMA_{IR} para valorar la resistencia a la insulina revela que los animales obesos ya manifiestan dicha resistencia claramente a las 15 semanas de edad antes de iniciar el tratamiento, con valores 10 veces superiores a los de los delgados ($P < 0,05$) (Figura 35C).

2.2.2.2. RESISTENCIA A LA INSULINA A LAS 4 SEMANAS

2.2.2.2.1. Glucosa. La diferencia en la glucemia entre obesas y delgadas que se manifestó en animales no tratados creció ligeramente durante las 4 primeras semanas de tratamiento ($P < 0,0001$). Sin embargo, las ratas del grupo OR de obesas tratadas no sólo no siguió ese comportamiento, sino que su glucemia descendió un 20% con respecto a las del grupo OC, situándose en valores similares a los de los controles delgados, que no se vieron afectados por el tratamiento (Figura 35A).

2.2.2.2.2. Insulina. Durante las 4 primeras semanas de tratamiento, las ratas OC experimentaron un aumento en su nivel de insulina de un 52%. Por el contrario, las ratas que recibieron el tratamiento con resveratrol (OR) mantuvieron estable su concentración de

insulina, abriéndose entre ambos grupos una diferencia de un 42% ($P < 0,01$). Los animales delgados no experimentaron cambios (Figura 35B).

2.2.2.2.3. HOMA_{IR}. Como era de esperar, el índice de resistencia a la insulina aumentó en el grupo OC durante la primera mitad del tratamiento, manteniéndose estable en el grupo OR, estableciendo una diferencia de un 47% con respecto a OC ($P < 0,01$). No hubo diferencia entre los animales delgados durante el tratamiento (Figura 35C).

2.2.2.3. RESISTENCIA A LA INSULINA A LAS 8 SEMANAS

2.2.2.3.1. Glucosa. Al final del tratamiento, la glucemia de todos los grupos experimentó un incremento que se produjo manteniendo las diferencias establecidas a las 4 semanas: el grupo OR aumentó su glucemia siguiendo el mismo patrón que los animales delgados, mientras el grupo OC lo hizo manteniendo valores 1,3 veces por encima, con una diferencia del 16% ($P < 0,05$ vs LC). Los animales delgados no se vieron afectados por el tratamiento (Figura 35A).

2.2.2.3.2. Insulina. El grupo OC se sitúa con valores 17 veces superiores a los de los animales delgados ($P < 0,0001$), que no experimentaron cambios a lo largo del período experimental (Figura 35B). Las ratas obesas que recibieron resveratrol, disminuyeron su concentración plasmática de insulina con respecto al valor tomado a las 4 semanas, estableciendo una diferencia final con el grupo OC de un 60,5% ($P < 0,0001$) (Figura 35B).

2.2.2.3.3. HOMA_{IR}. Al final del tratamiento, la resistencia a la insulina que manifestaban las ratas OC fue 22,5 veces superior a la de las LC ($P < 0,0001$) y casi 3 veces superior a la de las ratas obesas que recibieron tratamiento con resveratrol, con una diferencia del 66% ($P < 0,0001$ vs OC). El tratamiento con resveratrol no produjo cambios en los animales delgados (Figura 35C).

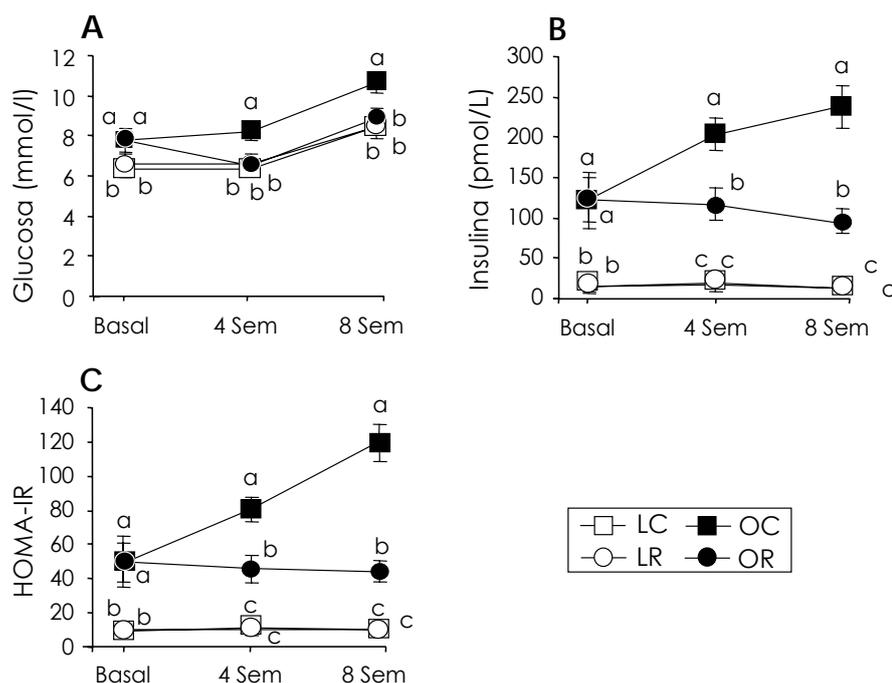


Figura 35. Evolución de los niveles plasmáticos de glucosa (A) e insulina (B) y del índice de resistencia a la insulina, HOMA_{IR}, (C) en ratas delgadas y obesas antes (basal), a las 4 y a las 8 semanas de tratamiento con vehículo o con resveratrol (10 mg/kg/día). Grupos experimentales: LC, ratas delgadas que recibieron vehículo; LR, ratas delgadas que recibieron resveratrol; OC, ratas obesas que recibieron vehículo; OR, ratas obesas que recibieron resveratrol. Los valores están expresados como media \pm EEM (n = 7-8). Existe diferencia significativa ($P < 0,05$) entre los valores que presentan letras distintas para un mismo momento del período experimental.

2.2.3. RESISTENCIA A LA LEPTINA

El grado de resistencia a la leptina se determinó mediante el estudio de la concentración plasmática de leptina, ya que en este modelo, el animal produce una cantidad muy elevada de leptina para compensar la falta de eficacia de su receptor,

provocando hiperleptinemia. Una disminución significativa de estos niveles, se interpretará como una mejora en la sensibilidad a la proteína y por tanto una reducción de la resistencia (DaSilva y cols., 1998; Croase y cols., 1998; Frühbeck y cols., 2006).

2.2.3.1. RESISTENCIA A LA LEPTINA BASAL

Antes de iniciarse el tratamiento, los animales obesos mostraban una marcada hiperleptinemia, con valores de leptina circulante 18 veces superiores a los de los animales delgados ($P < 0,05$) (Figura 36).

2.2.3.2. RESISTENCIA A LA LEPTINA A LAS 4 SEMANAS

La leptina plasmática de los animales obesos control aumentó un 25,8% durante las 4 primeras semanas del experimento, mientras en los animales del grupo OR el incremento de este parámetro fue de un 16%, diferencia que no fue significativa frente al grupo OC ($P > 0,1$). En los grupos de ratas delgadas la leptinemia se mantuvo constante (Figura 36).

2.2.3.3. RESISTENCIA A LA LEPTINA A LAS 8 SEMANAS

Al final del tratamiento, la leptinemia de los animales OC era 26 veces superior a la de los animales LC. Con respecto a la situación basal, los animales OC experimentaron un incremento de su concentración de leptina de un 45%, mientras que los animales obesos tratados con resveratrol, sólo aumentaron este parámetro en un 26% desde el inicio del tratamiento, alcanzando una diferencia significativa con respecto a OC ($P < 0,01$). No se observaron diferencias entre los grupos de ratas delgadas (Figura 36).

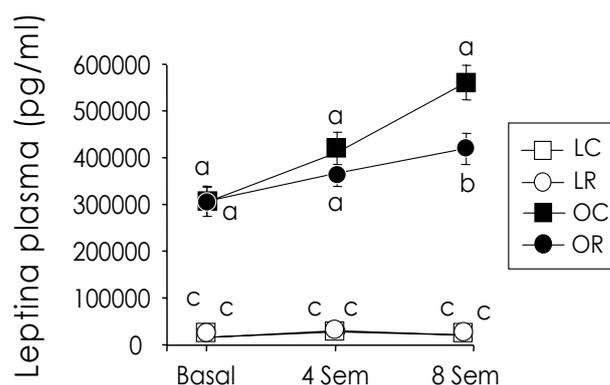


Figura 36. Evolución de los niveles de leptina plasmática en ratas delgadas y obesas que recibieron vehículo o resveratrol (10 mg/kg/día) en distintos momentos del período experimental: antes del inicio del tratamiento, a las 4 y a las 8 semanas del mismo. Grupos experimentales: LC, ratas delgadas que recibieron vehículo; LR, ratas delgadas que recibieron 10 mg/kg/día de resveratrol; OC, ratas obesas que recibieron vehículo; OR, ratas obesas que recibieron 10 mg/kg/día de resveratrol. Los valores están expresados como media \pm EEM (n = 7-8). Existe diferencia significativa ($P < 0,05$) entre los valores que presentan letras distintas para un mismo tiempo.

2.2.4. ADIPONECTINA EN PLASMA.

En las ratas obesas se observó un nivel plasmático de adiponectina, en relación con el peso de tejido adiposo del animal, 2,4 veces menor al de las delgadas ($P < 0,05$). El tratamiento con resveratrol produjo un aumento del mismo de un 39% ($P < 0,001$ vs OC) sin afectar a los animales delgados (Figura 37).

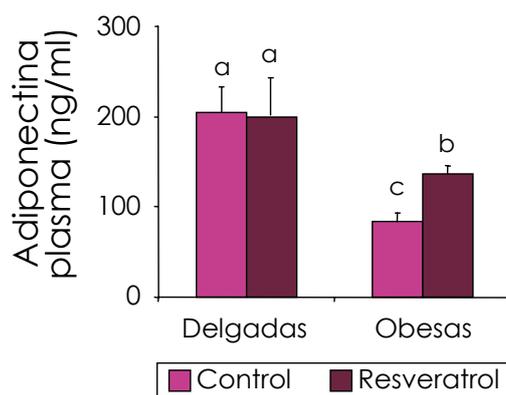


Figura 37. Concentración de adiponectina en plasma de ratas obesas y delgadas que recibieron vehículo (Control) o 10 mg/kg/día de resveratrol (Resveratrol). Los valores están expresados como media \pm EEM ($n = 7-8$). Existe diferencia significativa ($P < 0,05$) entre los valores que presentan letras distintas.

2.3. EFECTOS DEL RESVERATROL EN TEJIDOS INSULINO-RESISTENTES

Al igual que hicimos con la quercetina, para conocer más profundamente el efecto del resveratrol sobre la resistencia a la insulina, nos centramos fundamentalmente en el estudio de dos tejidos: el tejido adiposo visceral y el hígado.

2.3.1. TEJIDO ADIPOSO VISCERAL

El tejido adiposo visceral juega un papel fundamental en el síndrome metabólico, por lo que en este caso, también nos hemos centrado en su estudio para caracterizar el efecto del resveratrol en la resistencia a la insulina.

2.3.1.1. ADIPONECTINA

Basándonos en los óptimos resultados obtenidos en la adiponectina plasmática con la quercetina, en este caso dimos un paso más y se realizó una medida directa en el tejido adiposo visceral para conocer no sólo la secreción sino también la producción en el tejido. Como cabía esperar, en el tejido de los animales OC se halló también una menor concentración de adiponectina con respecto a los LC ($P < 0,0001$). En el grupo OR estos niveles aumentaron en un 32 % ($P < 0,05$ vs OC). Tampoco se observaron diferencias entre los grupos de ratas delgadas (Figura 38).

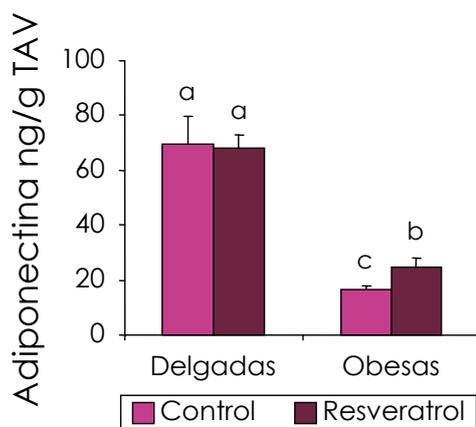


Figura 38. Niveles de adiponectina en tejido adiposo visceral de ratas obesas y delgadas que recibieron vehículo (Control) o Resveratrol 10 mg/kg/día durante 8 semanas. Valores expresados como media \pm EEM ($n = 7-8$). Existe diferencia significativa ($P < 0,05$) entre los valores que presentan letras distintas.

2.3.1.2. FACTOR DE NECROSIS TUMORAL- α (TNF- α)

Revelando el estado proinflamatorio en que se encuentra este tejido en el síndrome metabólico, la producción de TNF- α en las ratas obesas control se encontró 3 veces superior a la de las ratas delgadas. El tratamiento con resveratrol resultó en una disminución de esta

producción de TNF- α en las ratas obesas de un 30% ($P < 0,01$ vs OC), sin afectar a los niveles observados en las ratas delgadas (Figura 39).

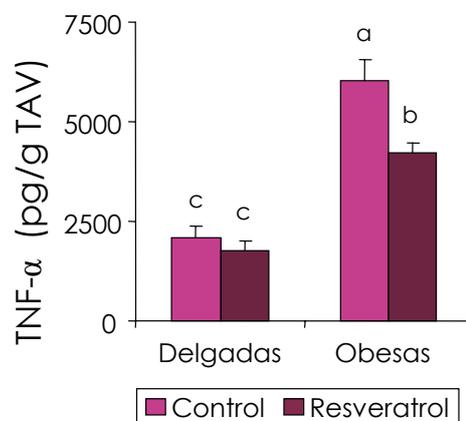


Figura 39. Producción de TNF- α en tejido adiposo visceral (TAV) en ratas obesas y delgadas que recibieron vehículo (Control) o resveratrol 10 mg/kg/día (Resveratrol) durante 8 semanas. Los valores están expresados como media \pm EEM ($n = 7-8$). Existe diferencia significativa ($P < 0,05$) entre los valores que presentan letras distintas.

2.3.1.3. EXPRESIÓN eNOS EN TEJIDO ADIPOSO VISCERAL

En condiciones normales, las pequeñas cantidades de NO producidas por la isoforma constitutiva de la NOS (eNOS), juegan un importante papel en el control de la homeostasis metabólica (Wenjuan y cols., 2005; Duplain y cols., 2001), y sabemos que en ratas Zucker, la expresión de esta enzima se encuentra disminuida debido a la acción del TNF- α (Valerio y cols., 2006), así que se valoró este aspecto mediante la determinación de la expresión de eNOS en tejido adiposo visceral por técnica de Western Blot.

Se apreció una reducción a la mitad en la expresión de eNOS en el tejido adiposo visceral de las ratas OC con respecto a las LC ($P < 0,001$). En el tejido adiposo visceral de las ratas obesas tratadas con resveratrol se incrementó la expresión de eNOS, alcanzando valores similares a los de los animales delgados ($P < 0,05$ vs OC) (Figura 40).

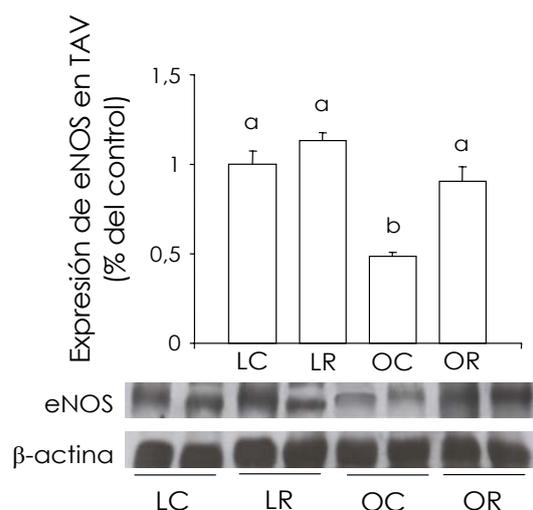


Figura 40. Expresión proteica de eNOS en tejido adiposo visceral (TAV) de ratas delgadas y obesas que recibieron vehículo o resveratrol (10 mg/kg/día) durante 8 semanas. Grupos experimentales: LC, ratas delgadas que recibieron vehículo; LR, ratas delgadas que recibieron resveratrol; OC, ratas obesas que recibieron vehículo; OR, ratas obesas que recibieron de resveratrol. Los valores relativos están expresados como media \pm EEM ($n = 5$) y proceden del análisis densitométrico en relación a la β -actina, asignando el valor 1.0 al grupo LC. Existe diferencia significativa ($P < 0,05$) entre los valores que presentan letras distintas.

2.3.1.4. NITRATOS MÁS NITRITOS (NO_x)

En este experimento se midió la concentración de NO_x en tejido adiposo. Las ratas obesas presentaron una concentración de NO_x 1,7 veces superior a la de las delgadas ($P < 0,01$) y el tratamiento con resveratrol la redujo en un 38% ($P < 0,01$ vs OC) (Figura 41), hasta niveles similares a los de los controles delgados.

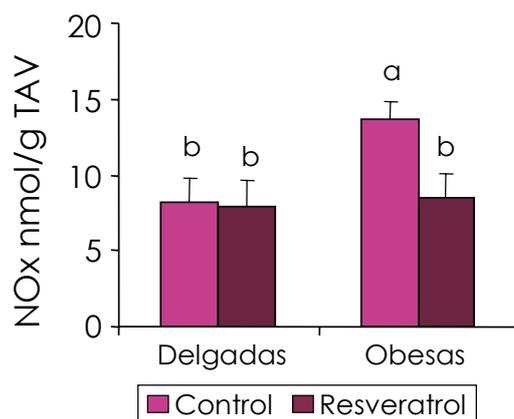


Figura 41. Concentración de NOx en tejido adiposo de ratas delgadas y obesas que recibieron vehículo (Control) o resveratrol (10 mg/kg/día) durante 8 semanas. Los valores están expresados como media \pm EEM (n = 7-8). Existe diferencia significativa ($P < 0,05$) entre los valores que presentan letras distintas.

2.3.1.5. EXPRESIÓN DE AMPK TOTAL Y FOSFORILADA

Para valorar la activación de la vía dependiente de AMPK en tejido adiposo visceral se realizaron análisis por western blot tanto de la expresión total de la subunidad α de la enzima como de la fracción fosforilada en Thr¹⁷² (activada) de la misma. Se pudo apreciar que mientras la expresión total de la enzima permaneció constante, su activación por fosforilación fue significativamente menor en el grupo OC con respecto al grupo LC ($P < 0,001$). El tratamiento de las ratas obesas con resveratrol restauró en un 35% la expresión de la forma fosforilada, mostrando la activación de esta vía ($P < 0,01$ vs OC). No se observaron diferencias entre los grupos de ratas delgadas (Figura 42).

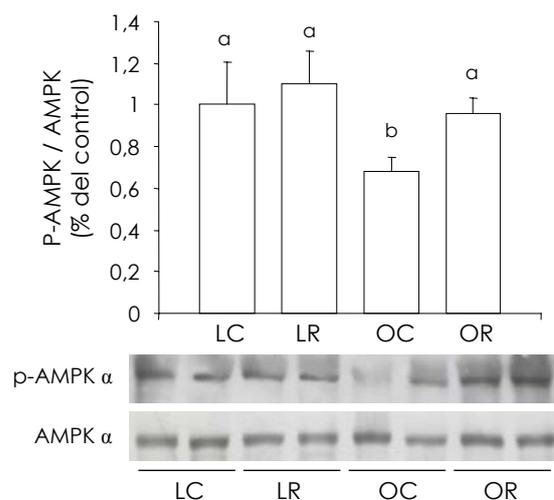


Figura 42. Fosforilación relativa a la expresión de AMPK en hígado de ratas delgadas y obesas que recibieron vehículo o resveratrol (10 mg/kg/día). Grupos experimentales: LC, ratas delgadas que recibieron vehículo; LR, ratas delgadas que recibieron resveratrol; OC, ratas obesas que recibieron vehículo; OR, ratas obesas que recibieron resveratrol. Los valores relativos están expresados como media \pm EEM ($n = 5$) y reflejan la relación densitométrica entre la fracción fosforilada de AMPK y el total de la proteína, asignando el valor 1.0 al grupo LC. Existe diferencia significativa ($P < 0,05$) entre los valores que presentan letras distintas.

2.3.1.6 EXPRESIÓN DE ACC TOTAL Y FOSFORILADA

Para confirmar los efectos del resveratrol sobre la vía de la AMPK en el tejido adiposo visceral y su implicación en la regulación del metabolismo lipídico, el siguiente paso fue analizar la expresión de la ACC en sus formas total y fosforilada mediante western blot, para determinar el grado de inhibición (fosforilación) de este sustrato de la AMPK. Como se esperaba, mientras la expresión de la ACC total permaneció constante, las ratas obesas control presentaron menor grado de fosforilación que las ratas delgadas ($P < 0,05$), mientras

las ratas OR mostraron un aumento de la misma de un 28,8% en relación con las ratas OC ($P < 0,05$) (Figura 43).

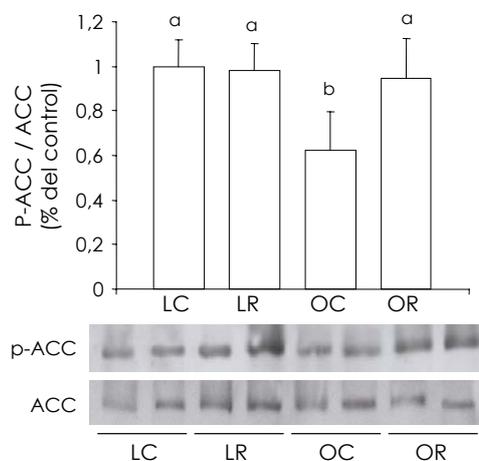


Figura 43. Fosforilación relativa a la expresión de ACC en tejido adiposo visceral de ratas delgadas y obesas que recibieron vehículo o resveratrol (10 mg/kg/día). Grupos experimentales: LC, ratas delgadas que recibieron vehículo; LR, ratas delgadas que recibieron resveratrol; OC, ratas obesas que recibieron vehículo; OR, ratas obesas que recibieron resveratrol. Los valores relativos están expresados como media \pm EEM ($n = 5$) y reflejan la relación densitométrica entre la fracción fosforilada de AMPK y el total de la proteína, asignando el valor 1.0 al grupo LC. Existe diferencia significativa ($P < 0,05$) entre los valores que presentan letras distintas.

2.3.2. HÍGADO.

Como es característico del modelo, el hígado es uno de los principales órganos implicados en la resistencia a la insulina, y por ello profundizamos en su estudio. Igual que en el tratamiento con quercetina, se han analizado los niveles lipídicos hepáticos y se ha valorado la implicación en los efectos de la AMPK, mediante la determinación de la expresión de la proteína total y la proteína fosforilada por western blot, y analizando por densitometría la

fosforilación relativa de dicha enzima. Se procedió de igual manera con su siguiente sustrato, la ACC.

2.3.2.1. ACUMULACIÓN HEPÁTICA DE LÍPIDOS

2.3.2.1.1. Colesterol total. El contenido hepático de colesterol en las ratas obesas control fue 2 veces mayor que el de las delgadas ($P < 0,00001$). La administración de resveratrol durante 8 semanas produjo una reducción de este parámetro en las ratas obesas de un 41% con respecto a las ratas OC ($P < 0,00001$), sin afectar a los animales delgados (Figura 44A).

2.3.2.1.2. Triglicéridos. Las ratas obesas control mostraron un nivel de triglicéridos hepáticos 2,5 veces mayor que el observado en las delgadas ($P < 0,00001$). El tratamiento con resveratrol redujo este parámetro en un 39,4% en los animales obesos ($P < 0,00001$ vs OC) y en un 18% en los delgados ($P < 0,001$ vs LC) (Figura 44B).

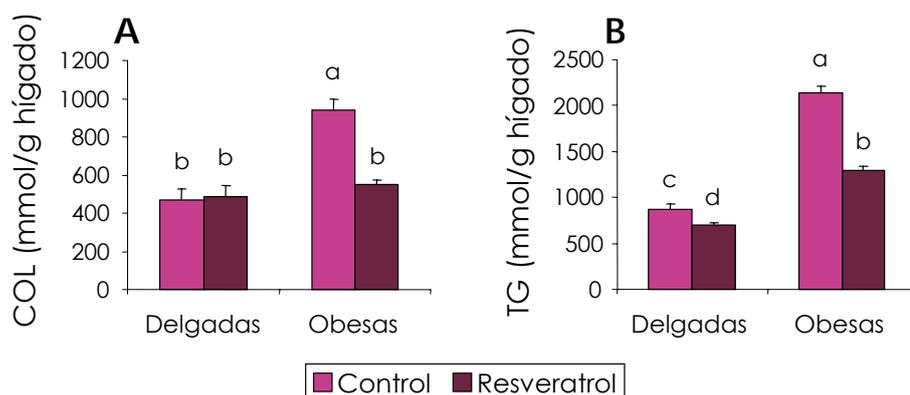


Figura 44. Contenido en colesterol total (COL) (A) y triglicéridos (TG) (B) en el hígado de ratas obesas y delgadas que recibieron vehículo (Control) o resveratrol (10 mg/kg/día) durante 8 semanas. Los valores están expresados como media \pm EEM ($n = 7-8$). Existe diferencia significativa ($P < 0,05$) entre los valores que presentan letras distintas.

2.3.2.2. EXPRESIÓN DE AMPK TOTAL Y FOSFORILADA

Para valorar la activación de la vía dependiente de AMPK se realizaron análisis por western blot tanto de la expresión total de la subunidad α de la enzima como de la fracción fosforilada en Thr¹⁷² (activada) de la misma.

Se pudo apreciar que mientras la expresión total de la enzima permaneció constante, su activación por fosforilación fue significativamente menor en el grupo OC con respecto al grupo LC ($P < 0,001$). El tratamiento de las ratas obesas con resveratrol restauró en un 37% la expresión de la forma fosforilada, mostrando la activación de esta vía ($P < 0,01$ vs OC). No se observaron diferencias entre los grupos de ratas delgadas (Figura 45).

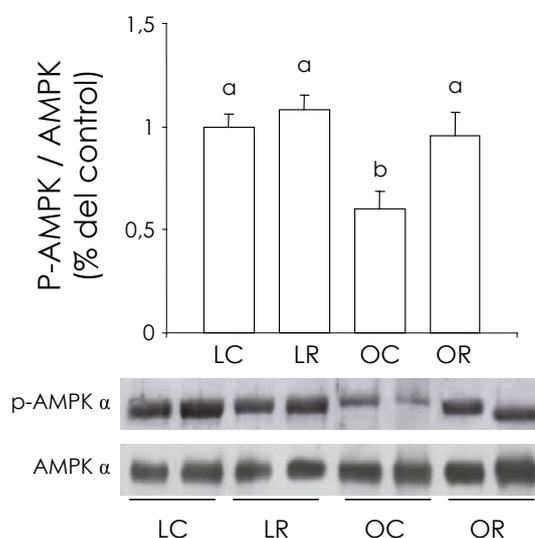


Figura 45. Fosforilación relativa a la expresión de AMPK en hígado de ratas delgadas y obesas que recibieron vehículo o resveratrol (10 mg/kg/día). Grupos experimentales: LC, ratas delgadas que recibieron vehículo; LR, ratas delgadas que recibieron resveratrol; OC, ratas obesas que recibieron vehículo; OR, ratas obesas que recibieron resveratrol. Los valores relativos están expresados como media \pm EEM ($n = 5$) y reflejan la relación densitométrica entre la fracción fosforilada de AMPK y el total de la proteína, asignando el valor 1.0 al grupo LC. Existe diferencia significativa ($P < 0,05$) entre los valores que presentan letras distintas.

2.3.2.3. EXPRESIÓN DE ACC TOTAL Y FOSFORILADA

Para confirmar los efectos del resveratrol sobre la vía de la AMPK en el hígado y su implicación en la regulación del metabolismo lipídico, el siguiente paso fue analizar la expresión de la ACC en sus formas total y fosforilada mediante western blot, para determinar el grado de inhibición (fosforilación) de este sustrato de la AMPK.

Como se esperaba, mientras la expresión de la ACC total permaneció constante, las ratas obesas control presentaron menor grado de fosforilación que las ratas delgadas ($P < 0,05$), mientras las ratas OR mostraron un aumento de la misma de un 34% en relación con las ratas OC ($P < 0,05$) (Figura 46).

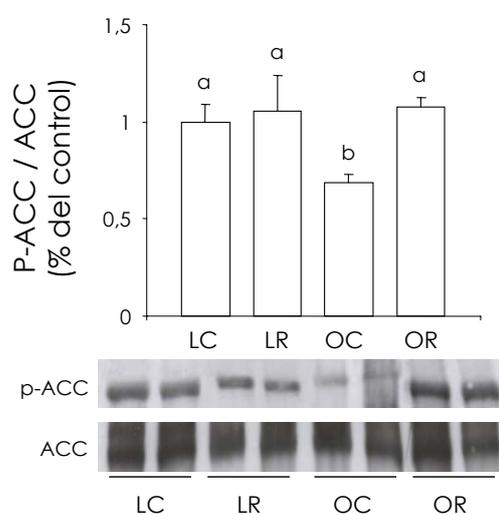


Figura 46. Fosforilación relativa a la expresión de ACC en hígado de ratas delgadas y obesas que recibieron vehículo o resveratrol (10 mg/kg/día). Grupos experimentales: LC, ratas delgadas que recibieron vehículo; LR, ratas delgadas que recibieron resveratrol; OC, ratas obesas que recibieron vehículo; OR, ratas obesas que recibieron resveratrol. Los valores relativos están expresados como media \pm EEM ($n = 5$) y reflejan la relación densitométrica entre la fracción fosforilada de AMPK y el total de la proteína, asignando el valor 1.0 al grupo LC. Existe diferencia significativa ($P < 0,05$) entre los valores que presentan letras distintas.

2.4. EFECTOS DEL RESVERATROL SOBRE LA PRESIÓN ARTERIAL

La hipertensión moderada es una de las alteraciones que forman parte del síndrome metabólico. Existen estudios que atribuyen al resveratrol una acción antihipertensiva directa (Liu y cols., 2005; Bradamante y cols., 2004), o relacionada con su acción antioxidante (Martínez y cols., 2000). Analizamos los efectos del tratamiento sobre la PAS.

2.4.1. PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA

Al inicio del experimento se realizó una medida basal de la PAS, encontrando unos valores de 124 ± 3 mmHg para las ratas delgadas y de 141 ± 2 mmHg para las obesas. Esta primera medida confirmaba la existencia de una moderada pero significativa hipertensión en las ratas obesas con respecto a las delgadas ($P < 0,0001$). Estos valores se incrementaron ligeramente a lo largo del experimento en el grupo OC mientras que en las ratas obesas tratados con resveratrol disminuyeron. El descenso fue significativo ($P < 0,01$ vs OC) a partir de la primera semana de tratamiento. Desde la cuarta semana y hasta el final del mismo, la reducción en los valores de presión arterial para el grupo OR, fue aproximadamente de 21 mmHg con respecto al grupo control OC ($P < 0,001$). No se observó ningún efecto del resveratrol sobre la presión arterial de las ratas delgadas (Figura 47).

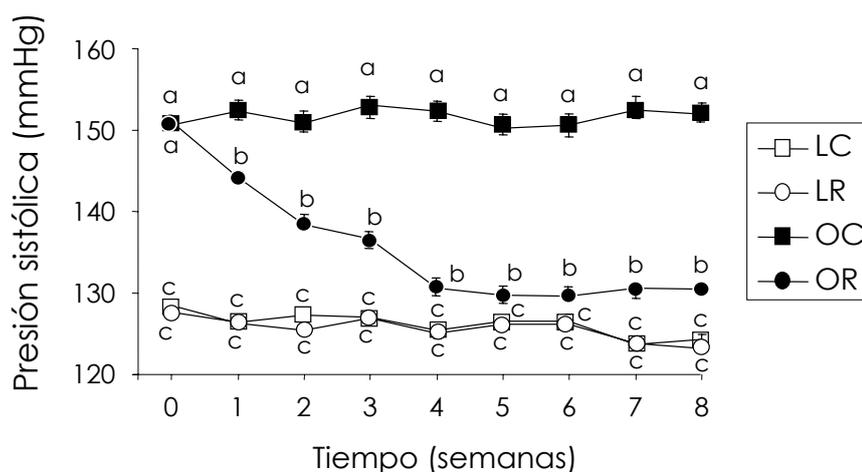


Figura 47. Evolución de la presión arterial sistólica (PAS) medida por pletismografía en la cola de los animales delgados y obesos que recibieron vehículo o resveratrol (10mg/kg/día) durante 8 semanas. Grupos experimentales: LC, ratas delgadas que recibieron vehículo; LR, ratas delgadas que recibieron resveratrol; OC, ratas obesas que recibieron vehículo; OR, ratas obesas que recibieron resveratrol. Los valores están expresados como media \pm EEM ($n = 7-8$). Para los valores de un mismo tiempo que presentan letras distintas, existe diferencia significativa ($P < 0,05$).

2.4.2. EXPRESIÓN DE eNOS EN AORTA

Para evaluar la implicación de la enzima eNOS en el efecto antihipertensivo del resveratrol, se analizó mediante la técnica de western blot la expresión proteica de dicha enzima en muestras de aorta procedentes de los distintos grupos experimentales.

Las ratas del grupo OC presentaron una expresión aórtica de eNOS 3 veces inferior a la de las del grupo LC ($P < 0,001$). En las aortas de las ratas OR dicha expresión experimentó un incremento del 65% con respecto a la hallada en OC ($P < 0,01$) (Figura 48).

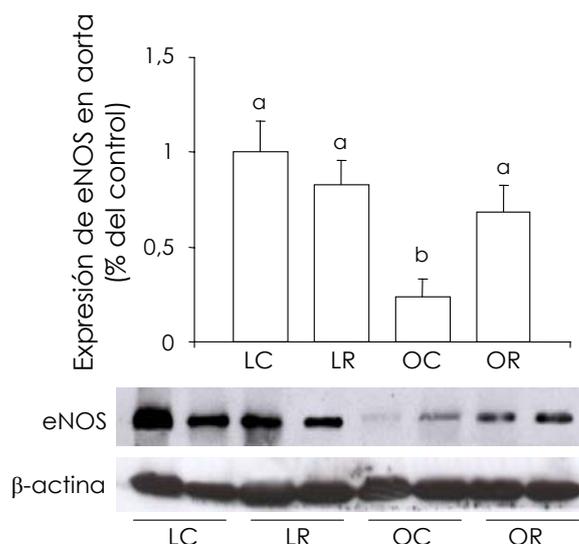


Figura 48. Expresión proteica de eNOS en aorta de ratas delgadas y obesas que recibieron vehículo o resveratrol (10 mg/kg/día). Grupos experimentales: LC, ratas delgadas que recibieron vehículo; LR, ratas delgadas que recibieron resveratrol; OC, ratas obesas que recibieron vehículo; OR, ratas obesas que recibieron resveratrol. Los valores relativos están expresados como media \pm EEM ($n = 5$) y proceden del análisis densitométrico en relación a la β -actina, asignando el valor 1.0 al grupo LC. Existe diferencia significativa ($P < 0,05$) entre los valores que presentan letras distintas.

2.5. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Para realizar una valoración del estado oxidativo de los animales se llevó a cabo la medida del nivel hepático de MDA.

2.5.1. CONCENTRACIÓN DE MDA EN HÍGADO

Las ratas obesas presentaron una concentración hepática de MDA 1,5 veces superior a la de las ratas delgadas ($P < 0,05$). El tratamiento con resveratrol redujo estos valores en un 25% en hígado ($P < 0,05$ vs OC) (Figura 49).

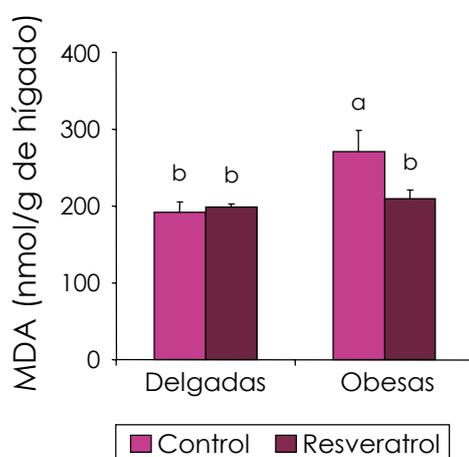


Figura 49. Concentración de MDA en hígado de ratas delgadas y obesas que recibieron vehículo (Control) o Resveratrol (10 mg/kg/día) durante 8 semanas. Los valores están expresados como media \pm EEM ($n = 7-8$). Existe diferencia significativa ($P < 0,05$) entre los valores que presentan letras distintas.

Discusión

1. RATA ZUCKER OBESA: MODELO EXPERIMENTAL DE SÍNDROME METABÓLICO.

Como modelo experimental de síndrome metabólico utilizamos la rata Zucker obesa (fa/fa). Hemos llevado a cabo nuestros experimentos con ratas macho Zucker (fa/fa) de 15 semanas de edad, que ya manifestaban la mayor parte de las alteraciones funcionales características de este síndrome con respecto a las ratas control delgadas (fa/+) de la misma edad: obesidad, hiperlipidemia, resistencia a la insulina e hipertensión moderada. La mayoría de estas alteraciones se vieron incrementadas al transcurrir las 8-10 semanas del período de experimentación.

1.1. VARIABLES MORFOLÓGICAS

Al iniciar nuestros experimentos, los animales obesos presentaban un peso corporal un 23% superior al de las ratas control delgadas. Al final del período experimental, esta diferencia fue de un 26%. La rata Zucker obesa (*Zucker Fatty Rat*) surge como resultado del cruce de ratas Merck Stock M y Sherman, y se caracteriza por presentar un fenotipo obeso, ya que sufre la mutación recesiva "fatty" (fa) (Zucker y Zucker, 1968). Esta mutación afecta al receptor Ob-R para la leptina y consiste en la sustitución de un resto de glutamina en posición 268 por otro de prolina (Gln²⁶⁸ →Pro). Como consecuencia de esta mutación se produce una disfunción del receptor Ob-R para la leptina, que se traduce tanto en una disminución en el número de receptores expresados en la superficie celular como en la alteración en la cascada de señalización intracelular mediada a través de dicho receptor, lo que conduce en última instancia a una marcada resistencia a la acción de la leptina. Esta mutación no implica una ausencia total del efecto de la leptina (Crouse y cols., 1998; Da Silva, y cols., 1998). Los animales homocigotos para el alelo fa (fa/fa) son manifiestamente obesos a las 5 semanas de vida; a las 14 semanas, su composición corporal contiene de más de un 40% de lípidos. Por el

contrario, las ratas con genotipos homocigoto dominante (+/+) y heterocigoto (fa/+) no presentan obesidad, pudiendo ser considerados como controles sanos (Arias-Díaz y cols., 2007). Como consecuencia de procesos de hipertrofia e hiperplasia, el crecimiento del tejido adiposo en la rata Zucker fa/fa es anormal desde su primera semana de vida, fenómeno indicativo de la alteración de mecanismos relacionados con el mantenimiento de la homeostasis energética desde el nacimiento y que posteriormente se ven agravados por el comportamiento hiperfágico (Argilés y cols., 1989).

En nuestros estudios, la ingesta dietética de los animales obesos fue superior a la de los controles delgados. Este hecho es atribuible a la hiperfagia característica del modelo de rata Zucker fa/fa, y que es más notoria en las primeras semanas de vida, estabilizándose aproximadamente hacia la semana 10. En ese momento cobran mayor importancia otros mecanismos en el desarrollo de la obesidad (Vasselli y cols., 1985). Nuestras experiencias encajan con este fenómeno, ya que los animales empleados fueron de 15 semanas de edad y la diferencia en la ingesta, aunque significativa, representa sólo un 11% con respecto a las ratas fa/+, manteniéndose estable durante las 10 semanas de tratamiento. Este aumento de la ingesta tiene su origen en el deterioro de la acción de la leptina y, por lo tanto, uno de sus principales efectos, el control de la ingesta, se encuentra comprometido (Niswender y cols., 2001).

1.2. ALTERACIONES BIOQUÍMICOS EN PLASMA

Observamos que en ratas Zucker obesas la concentración plasmática de leptina era unas 20 veces superior a la de las delgadas, como era de esperar dada la mutación del receptor OB-R. Como consecuencia, se produce un excesivo almacenamiento de energía en forma de grasa. La leptina es una hormona producida por el tejido adiposo en proporción directa a la cantidad del mismo, de manera que un individuo obeso originará elevados niveles de leptina (Frühbeck y cols., 2006).

En situación de abundancia energética, la leptina, a través de sus receptores centrales y periféricos, envía mensajes para reducir la ingesta de alimento y aumentar el gasto energético mediante la activación de la AMPK y rutas de termogénesis y disipación de energía. En el marco de unos receptores afuncionales, estas señales no llegan a su destino y no se ponen en marcha tales mecanismos. El organismo interpreta una situación de déficit energético y dirige sus esfuerzos a la captación y acumulación de energía en forma de tejido adiposo.

Al inicio de nuestros experimentos, las ratas obesas presentaban niveles plasmáticos elevados de triglicéridos, colesterol y AGL con respecto a las ratas delgadas, y los valores de dichos parámetros en las ratas fa/fa aumentaron entre un 10 y un 30% durante el período experimental. La rata Zucker obesa es hiperlipidémica debido a un desequilibrio entre la síntesis y la oxidación de lípidos (Chanussot y cols., 1983). El agravamiento de la hiperlipidemia con la edad es el resultado de una ingesta elevada de nutrientes de forma crónica en el marco de la resistencia a la leptina y a la insulina. Para favorecer la captación de glucosa, la insulina induce en las células de tejidos insulino-resistentes la expresión de enzimas lipogénicas mediante la activación del factor de transcripción lipogénico SREBP-1c, dotando a la célula de la maquinaria necesaria para la síntesis *de novo* de lípidos. Estas enzimas lipogénicas se encuentran sobre-expresadas en casos de resistencia a la insulina, con lo que la lipogénesis aumenta de forma considerable. Los nuevos lípidos, más los aportados por la dieta, circulan en grandes cantidades por el torrente sanguíneo. Además, al existir resistencia a la leptina, el papel protector que ésta ejerce sobre el proceso queda anulado. Esto conlleva el aumento del acúmulo de lípidos en tejidos no adiposos, contribuyendo a las alteraciones metabólicas del síndrome (Kakuma y cols., 2000).

También comprobamos que las ratas Zucker obesas mostraban unos niveles plasmáticos de insulina 8 veces mayores que los de los controles sanos a las 15 semanas de edad, niveles que fueron aumentando con el tiempo alcanzando al final del experimento, valores que duplicaban a los del inicio. Estos datos confirman la existencia de resistencia a la acción de la insulina en las ratas fa/fa a las 15 semanas de edad, alteración metabólica que

se va agravando con el tiempo, al finalizar nuestros experimentos, los valores de insulina plasmática en ayunas de las ratas obesas multiplicaban por 18 los observados en las ratas delgadas. Los principales tejidos implicados en el control del metabolismo glucídico y lipídico son el hígado, el músculo esquelético y el tejido adiposo. Todos ellos están fuertemente influenciados por las acciones metabólicas de la leptina, que protege de la acumulación nociva de lípidos. En la situación de resistencia a esta proteína que viven estas ratas, sus rutas de actuación se encuentran afectadas, produciéndose una acumulación intracelular de intermediarios lipídicos provocando la resistencia a la insulina (Unger y cols., 2003; Ceddia y cols., 2005; Perseghin y cols., 2003). Cuando la rata es joven, existe mayor resistencia a la acción de la insulina en músculo e hígado comparado con el tejido adiposo, que sigue siendo sensible, y continúa captando glucosa para sintetizar nuevos lípidos favoreciendo la acumulación de masa grasa. A medida que avanza la edad, la resistencia a la insulina es generalizada (Debant y cols., 1987). Una vez instaurada, esta resistencia se caracteriza por una hipersecreción pancreática de insulina, acompañada de un menor aclaramiento hepático de la hormona, que da lugar a la hiperinsulinemia.

La concentración plasmática de glucosa en ayunas de las ratas Zucker fa/fa fue similar o ligeramente superior a la que presentaron las ratas fa/+, dependiendo de los estudios realizados. Este modelo no ha sido utilizado muy extensamente para diabetes tipo 2, precisamente porque, a diferencia de los ratones *db/db* y *ob/ob*, su hiperglucemia es discreta, existiendo variaciones entre colonias. No obstante, presenta algunas complicaciones similares a la enfermedad en humanos, como hiperinsulinemia secundaria a resistencia periférica a la insulina, especialmente marcada en músculo e hígado (Argilés y cols., 1989).

1.3. ALTERACIONES EN TEJIDOS INSULINO-RESISTENTES

En la última década, el tejido adiposo ha dejado de considerarse exclusivamente un almacén de energía, para ser tenido en cuenta como un órgano endocrino capaz de regular

la homeostasis energética y la sensibilidad a la insulina mediante la secreción de numerosas moléculas llamadas adipocitoquinas (Kershaw y cols., 2004). En el modelo de rata Zucker fa/fa hemos podido comprobar la existencia de un desequilibrio en la secreción de dos importantes citoquinas implicadas en la función metabólica del tejido adiposo con respecto a las ratas fa/+. La secreción de TNF- α , una citoquina inflamatoria, se encuentra aumentada mientras la de adiponectina, principal adipocitoquina antiinflamatoria aparece disminuida. Este desequilibrio ha sido descrito anteriormente tanto en humanos como en distintos modelos experimentales (Whitehead y cols., 2005) y corrobora el planteamiento del síndrome metabólico como una enfermedad inflamatoria crónica (Hotamisligil y cols., 1995; Dandona y cols., 2005).

Otro parámetro que encontramos notablemente alterado en el tejido adiposo de las ratas Zucker obesas fue la expresión de la proteína eNOS, que se encontraba disminuida en aproximadamente un 40% con respecto a la de las ratas delgadas. Esta enzima juega un importante papel en el control de la homeostasis metabólica. Existen estudios en los que ratones carentes de eNOS desarrollaban síndrome metabólico (Duplain y cols., 2001). Además se ha visto que la expresión de eNOS está regulada negativamente por el TNF- α , y cuando éste aumenta, se reduce la expresión de la enzima (Valerio y cols., 2006).

El hígado es otro tejido con una gran implicación en las manifestaciones del síndrome metabólico, lo que motivó que también nos centráramos en su estudio. El hígado es uno de los principales órganos responsables del control del metabolismo glucídico y lipídico. Las ratas obesas Zucker de nuestros estudios presentaron un contenido hepático de triglicéridos y colesterol que duplicaba el de las ratas delgadas. Además, el peso hepático los animales obesos fue un 40% superior al de los delgados, indicando hepatomegalia, como ha sido descrito por otros autores (Bach y cols., 1981). La esteatosis hepática está relacionada en este modelo con la resistencia a la leptina originada por la mutación del receptor Ob-R. De hecho, en modelos experimentales de obesidad inducida por una dieta rica en grasa en roedores sanos, el aumento del tejido adiposo que se produce, conduce a un aumento en la producción de leptina (Zhang y cols., 2002) y de su concentración en plasma. La leptina

ejerce su efecto protector y el depósito extra-adiposo de lípidos es mínimo. Por el contrario, en animales resistentes a la leptina, este depósito de lípidos es mucho mayor incluso cuando se les alimenta con una dieta baja en grasa (Lee y cols., 2001). Se indica así que la leptina determina el destino del exceso de grasa aportado por la dieta.

1.4. ALTERACIONES EN LA PRESIÓN ARTERIAL

Las ratas obesas empleadas en nuestros estudios revelaron valores de presión sistólica mayores que los de las ratas delgadas, con una diferencia de aproximadamente 20 mmHg. En este modelo, entre los 4 o 5 meses de edad, puede aparecer una hipertensión moderada, basada en una disfunción endotelial producida por varios posibles factores. También existen camadas en las que esta característica no aparece (Kurtz y cols., 1989). Los factores que pueden influir en su aparición son:

- Daño del epitelio por especies reactivas del oxígeno inducidas por los AGL circulantes y el estrés oxidativo (Chinen y cols., 2007).
- Desaparición del efecto vasodilatador que ejerce la leptina al unirse a sus receptores endoteliales (Winters y cols., 2000).
- Efecto negativo del exceso de insulina en plasma sobre la vasodilatación por aumento de los receptores para la endotelina-1 (Wu y cols., 1999).
- Aumento de la expresión de la isoforma inducible de la NOS (iNOS) en detrimento de la isoforma constitutiva endotelial (eNOS), dañando la producción de NO vasodilatador a nivel endotelial y favoreciendo el estado inflamatorio sistémico y las alteraciones metabólicas y vasculares (Kapur y cols., 2000).

2. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON QUERCETINA EN RATAS ZUCKER OBESAS

Para conocer los efectos de la quercetina en ratas Zucker obesas, hemos seleccionado dos dosis, una de 2 mg/kg/día, similar a la cantidad aportada por una dieta muy rica en este flavonoide y otra más elevada de 10 mg/kg/día comparable a la cantidad aportada por un suplemento de quercetina. Las dos dosis se han administrado diariamente por vía oral durante 10 semanas. Transcurrido el tiempo del tratamiento, observamos que con ambas dosis hemos obtenido una mejora significativa en los principales aspectos de este síndrome, ya que en los animales tratados se da una menor ganancia de peso corporal, una reducción de la concentración plasmática de lípidos e insulina y una disminución de los valores de presión arterial. Con la dosis de 10 mg/kg/día de quercetina se observa además un aumento en la secreción de adiponectina y una reducción en la de TNF- α en el tejido adiposo, así como un restablecimiento del equilibrio en la expresión de eNOS/iNOS en dicho tejido. A nivel hepático, la administración crónica de esta dosis elevada de quercetina dio lugar a una menor acumulación de lípidos así como a la activación de la vía de AMPK.

2.1. EFECTOS DE LA QUERCETINA SOBRE VARIABLES MORFOLÓGICAS

La administración crónica de ambas dosis de quercetina produjo en la última semana de tratamiento una ligera pero significativa reducción en la ganancia de peso en los animales obesos con respecto a los no tratados. Este efecto no responde a una disminución de la ingesta, ya que ésta fue similar en los distintos grupos de ratas obesas y se mantuvo constante durante todo el período, lo que descarta posibles efectos centrales de la quercetina sobre la saciedad. La persistencia de una ingesta constante indica también que a la edad a la que comenzó el experimento, la hiperfagia está ya estabilizada y son otros mecanismos los que

actúan en el desarrollo de la obesidad. Posiblemente, el efecto de la quercetina sobre estos mecanismos sea la causa de esta menor ganancia de peso. En este sentido, destaca el efecto antiinflamatorio de la quercetina a nivel adiposo que se traduce en un aumento de la secreción de adiponectina por este tejido. Existen estudios en humanos que relacionan el aumento de la adiponectina con ligeras pérdidas de peso (Esposito y cols., 2003). Puede que en tratamientos más prolongados en el tiempo sí se pueda apreciar una diferencia significativa en el peso final.

2.2. EFECTOS DE LA QUERCETINA SOBRE ALTERACIONES BIOQUÍMICAS EN PLASMA.

Uno de los efectos más importantes que tuvo el tratamiento con ambas dosis de quercetina sobre los animales obesos, fue el descenso en la concentración plasmática de insulina, sugiriendo una mejora en la respuesta a la insulina. La quercetina y sus efectos metabólicos han sido estudiados ampliamente y existen trabajos que demuestran la capacidad de este flavonol para mejorar la sensibilidad a la insulina y el metabolismo glucídico (Kato y cols., 2008). Los mecanismos propuestos para estas acciones, son fundamentalmente su actividad antioxidante, al igual que ocurre con otros compuestos similares como el epigalo-catecol-galato del té verde o el γ -tocoferol (Venables y cols., 2008; Singh y cols., 2008; Rösen y cols., 2001), y a su actividad antiinflamatoria, demostrada tanto *in vitro* como *in vivo* en diferentes modelos experimentales de enfermedades inflamatorias, relacionándola con la inhibición de la vía de NF- κ B (Comalada y cols., 2006; Camuesco y cols., 2004). En nuestro trabajo, el mecanismo que parece ser predominante es el antioxidante, ya que la dosis menor de quercetina administrada no manifestó efecto antiinflamatorio y sin embargo disminuyó los niveles plasmáticos de insulina.

La administración oral crónica de 2 y 10 mg/kg/día de quercetina redujo significativamente las elevadas concentraciones circulantes de los distintos lípidos analizados. La quercetina y su glucósido han demostrado también actividad hipolipemiante en otros

modelos experimentales. En conejos alimentados con una dieta rica en colesterol, la quercetina redujo la hiperlipidemia y el estado oxidativo de los vasos sanguíneos (Kamada y cols., 2005). Otro estudio con quercetina y otros polifenoles como el resveratrol en hamsters hipercolesterolémicos dio resultados similares (Auger y cols., 2005). Al igual que la mayoría de los efectos beneficiosos de los polifenoles, los efectos hipolipemiantes se han atribuido a su actividad antioxidante, puesto que inhiben la oxidación de las LDL. Pese a ello, actualmente se plantea también la implicación de otros mecanismos, como pueden ser modificaciones en la absorción hepática de colesterol, cambios en el ensamblaje y la secreción de triglicéridos o mediante efectos antiinflamatorios (Zern y cols., 2005). Nuestros resultados apuntan a que el descenso en los niveles de lípidos en plasma es secundario a la mejora en la resistencia a la insulina producida por el efecto antioxidante de la quercetina, y no al efecto antiinflamatorio, ya que como en el caso anterior, la dosis menor administrada mostró actividad hipolipemiente sin ejercer efecto antiinflamatorio. Naturalmente, no se descarta que la reducción de la hiperlipidemia puede estar además reforzada por el efecto antioxidante directo de la quercetina sobre las LDL u otros mecanismos. En este sentido, los flavonoides también han sido descritos como moduladores de la homeostasis lipídica en tejido adiposo e hígado mediante la inhibición de fosfodiesterasas (Peluso y cols., 2006).

Finalmente, las ratas obesas no presentaron una glucemia mayor que la de las delgadas y además no se vio afectada por el tratamiento con ninguna dosis. Como citábamos anteriormente, la hiperglucemia en estos animales no es un rasgo característico y depende de la camada.

2.3. EFECTOS DE LA QUERCETINA EN TEJIDOS INSULINO-RESISTENTES

Con el fin de conocer más profundamente las acciones de la quercetina en este modelo experimental de síndrome metabólico, estudiamos sus efectos en dos de los principales tejidos afectados por la resistencia a la insulina, el tejido adiposo y el hígado.

Dada la importante contribución del desequilibrio que existe en el tejido adiposo de las ratas Zucker obesas al desarrollo del síndrome metabólico, analizamos los efectos de la administración crónica de ambas dosis de quercetina sobre la secreción de la citoquina inflamatoria TNF- α y la antiinflamatoria adiponectina por el tejido graso. La dosis mayor de quercetina disminuyó la secreción de TNF- α y aumentó la de adiponectina, lo que demuestra que se redujo el estado inflamatorio general de los animales

Por otro lado, el estado inflamatorio está también evidenciado por los elevados niveles de NOx en plasma (Yugar-Toledo y *cols.*, 2004; Coscum y *cols.*, 2005), que reflejan una producción aumentada de NO por la iNOS. En estos desórdenes metabólicos existe una sobreexpresión de esta isoforma inducible de la NOS en tejido adiposo y músculo esquelético (Kapur y *cols.*, 1999; Bedard y *cols.*, 1997) en perjuicio de la isoforma constitutiva, eNOS, quien en condiciones normales produce pequeñas cantidades de NO responsable de controlar la vasodilatación a nivel endotelial y de mantener la homeostasis metabólica. Un estudio en ratones carentes de eNOS, relaciona el desarrollo de síndrome metabólico con la ausencia de esta enzima (Duplain y *cols.*, 2001). En este sentido, el TNF- α producido en el tejido adiposo reduce la expresión de eNOS y aumenta la de iNOS en este tejido (Valerio y *cols.*, 2006). La elevada actividad iNOS produce grandes cantidades de NO que contribuyen a la resistencia a la insulina y a las complicaciones cardiovasculares asociadas a este síndrome. Finalmente, se puede llegar a plantear que los tratamientos que limiten este desequilibrio eNOS/iNOS, mejorarán las alteraciones propias del síndrome metabólico (Perreault y *cols.*, 2001). En este trabajo hemos observado que los animales obesos mostraron niveles plasmáticos de NOx muy superiores a los normales, y que sólo la dosis de quercetina de 10 mg/kg/día fue capaz de

reducirlos. Basándonos en este resultado, analizamos la expresión de iNOS y eNOS en tejido adiposo y observamos que efectivamente existía un desequilibrio favorable a iNOS en las ratas obesas con respecto a las delgadas. La dosis alta de quercetina redujo la expresión de iNOS mientras incrementó la de eNOS, restableciendo significativamente el equilibrio y mejorando tanto el estado inflamatorio como las alteraciones metabólicas derivadas. Posiblemente este efecto se deba a la acción inhibitoria de la quercetina sobre la producción de TNF- α , que es la principal citoquina causante del aumento de la iNOS y disminución de la eNOS en tejido adiposo (Kapur y cols., 1999; Valerio y cols., 2006). Los resultados concuerdan con los efectos antiinflamatorios descritos para la quercetina (Comalada y cols., 2006; Camuesco y cols., 2004). Además, un estudio reciente indica que la administración de este flavonol reduce los niveles plasmáticos de NO en ratas diabéticas tratadas con estreptozotocina (Coscum y cols., 2005).

La resistencia a la insulina característica del modelo provoca el depósito de lípidos en otros tejidos distintos del adiposo. En la rata Zucker fa/fa se produce un acúmulo de grasa de forma destacada en el hígado, originando esteatosis hepática. Además estas ratas obesas presentan hepatomegalia (Anderson y cols., 2008; Scheen y cols., 2002). El tratamiento con la dosis mayor de quercetina redujo el contenido hepático de colesterol y triglicéridos, mientras que la dosis menor no produjo ningún efecto. Se ha descrito que la activación de la AMPK, da lugar a través de la fosforilación e inhibición de la ACC, a una mayor oxidación de los lípidos, reduciendo su acumulación en tejidos insulino-resistentes como el hígado (Unger y cols. 2003). Para confirmar que el mecanismo por el que la quercetina a altas dosis reduce la esteatosis hepática es la activación de AMPK, analizamos esta vía en el hígado. Observamos que la dosis de 10 mg/kg/día de quercetina aumentó significativamente la fosforilación/activación de AMPK y la fosforilación/inhibición de ACC a nivel hepático en las ratas Zucker obesas. Esta es la primera vez que se describe esta activación hepática de la AMPK por una dosis elevada de quercetina en este modelo. Distintos estudios muestran que moléculas capaces de activar esta vía, como AICAR (Yu y cols., 2004) y berberina (Kim y cols., 2009) previenen la acumulación de lípidos fuera del tejido adiposo, la diabetes y mejora otras complicaciones

del síndrome metabólico como la hipertensión en animales con defectos en el receptor de la leptina como la rata Zucker *fa/fa* (Buhl y *cols.*, 2002). Se ha propuesto en estudios recientes que diferentes polifenoles presentan una acción activadora de AMPK (Zang y *cols.*, 2006). Sin embargo el hecho de que la quercetina no modifique la actividad de esta enzima en el tejido adiposo (datos no mostrados) nos lleva a pensar que la activación que se produce en el hígado sea indirecta al efecto antiinflamatorio. La reducción de la producción de TNF- α y el aumento de la secreción de adiponectina por el tejido adiposo originados por la administración crónica de la dosis mayor de quercetina, pueden ser los responsables de la activación de la AMPK en el hígado (Yamauchi, T. y *cols.* 2002). El efecto antioxidante de la quercetina y la mejora de la respuesta a la insulina que produce, también podrían contribuir al efecto, pero por sí solos no son suficientes para activar AMPK, por esto la administración de la dosis de 2 mg/kg/día de quercetina no logra activar esta vía ni reducir significativamente la esteatosis hepática. Por otro lado, esta rebaja en el contenido lipídico del hígado que se obtiene con la dosis de 10 mg/kg/día no resulta en un peso menor del órgano. La capacidad regenerativa del hígado, con una sustitución de la masa grasa por nuevos hepatocitos, podría explicar este fenómeno.

2.4. EFECTOS DE LA QUERCETINA SOBRE LA PRESIÓN ARTERIAL.

El tratamiento con ambas dosis de quercetina redujo significativamente los valores de presión arterial de las ratas Zucker obesas. La dosis mayor hizo patente su efecto a la tercera semana de tratamiento y logró una reducción máxima de 17 mmHg. Los efectos de la dosis de 2 mg/kg/día sobre la presión arterial se empezaron a observar tras 5 semanas de tratamiento, alcanzando una reducción máxima en este parámetro de 14 mmHg. La quercetina ha sido descrita como un eficaz agente antihipertensivo a la dosis de 10 mg/kg/día en distintos modelos experimentales de hipertensión arterial (Duarte y *cols.*, 2002; Galisteo y *cols.*, 2004; Sanchez y *cols.*, 2006). En este trabajo hemos comprobado que a

menores dosis (2mg/kg/día) la quercetina es eficaz para reducir la presión arterial en un modelo de hipertensión moderada. Este efecto antihipertensivo ha sido relacionado con los beneficios que ejerce la quercetina sobre el endotelio vascular, que aun no han sido explicados completamente pero que se atribuyen entre otros mecanismos a su actividad antioxidante (Duarte y cols., 2002). Esto ratifica que la dosis menor actúa por mecanismos antioxidantes para ejercer sus otros efectos en este modelo.

La eNOS del endotelio vascular no sólo es una de las enzimas clave en el control de la presión arterial sino que también un daño en su expresión y actividad puede conducir a la aparición de síndrome metabólico (Duplain y cols., 2001; Cook y cols. 2003). Para evaluar la implicación de la eNOS en el efecto antihipertensivo de la quercetina, valoramos la expresión de esta enzima en anillos aórticos de las ratas tratadas con la dosis más eficaz. Observamos que las ratas obesas tenían muy reducida su expresión aórtica y que el tratamiento con quercetina la restableció casi por completo, indicando que además de la actividad antioxidante, la quercetina protege la función endotelial normalizando la expresión de eNOS en los vasos.

En resumen, nuestros estudios sobre los efectos de la quercetina en el modelo de síndrome metabólico de rata Zucker obesa, podemos afirmar que las dosis empleadas son capaces de reducir de forma similar manifestaciones propias de las ratas Zucker obesas como la ganancia de peso, la hiperlipidemia, la resistencia a la insulina y la presión arterial. La dosis mayor además logró ejercer un apreciable efecto antiinflamatorio y una reducción de la esteatosis hepática. Analizando los resultados obtenidos podemos proponer dos posibles mecanismos implicados en estos efectos de la quercetina:

- La actividad antioxidante que presenta la quercetina puede ser responsable directa de la mejora en la respuesta a la insulina, la reducción de la hiperlipidemia y disminución de la presión arterial. Esto indica que la actividad antioxidante es el primer efecto que ejerce el flavonol.

- A dosis altas la quercetina está dotada de una actividad antiinflamatoria que se manifiesta en el tejido adiposo con el aumento de la secreción de adiponectina en detrimento de la de TNF- α que conlleva el restablecimiento del equilibrio eNOS/iNOS. El aumento de la secreción de adiponectina podría justificar la reducción de la esteatosis hepática a través de la activación de la vía de la AMPK en el hígado. Este mecanismo refuerza los efectos mediados por la actividad antioxidante.

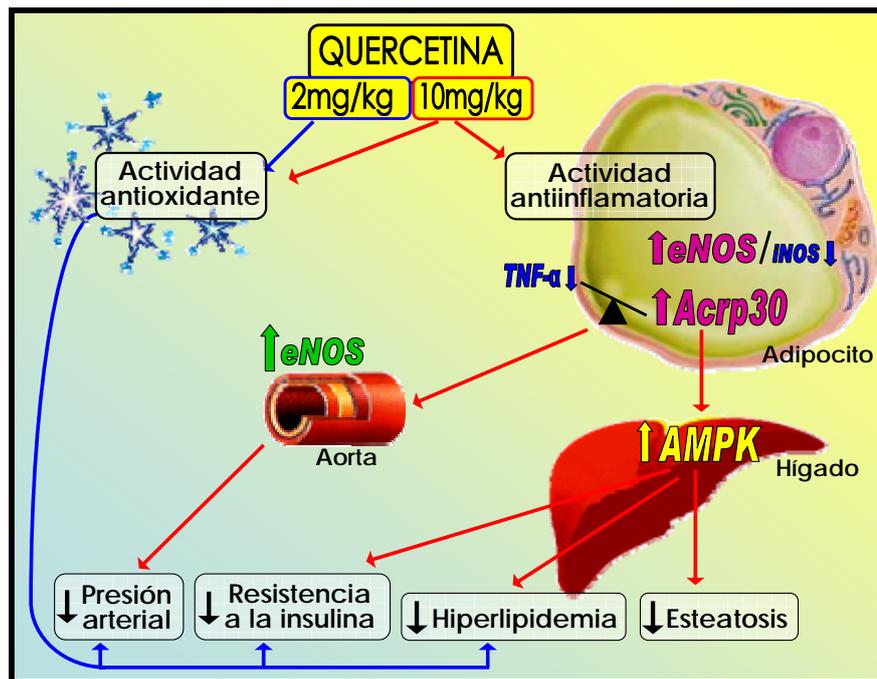


Figura 50. Hipótesis de los mecanismos por los que la quercetina ejerce sus efectos en el síndrome metabólico. Acrp30, adiponectina; AMPK, protein kinasa activada por AMP; eNOS, óxido nítrico sintasa endotelial; iNOS, óxido nítrico sintasa inducible; TNF- α , factor de necrosis tumoral- α .

3. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON RESVERATROL EN RATAS ZUCKER OBESAS

Con objeto de analizar los efectos del resveratrol sobre las alteraciones metabólicas de ratas Zucker obesas, administramos una dosis diaria de este polifenol de 10 mg/kg/día a las ratas obesas (fa/fa) y delgadas (fa/+) durante 8 semanas. Existen numerosos estudios *in vivo* que utilizan un amplio rango de dosis de resveratrol que va desde 100 ng a 3g/kg peso, dependiendo del animal de experimentación utilizado y los objetivos de los estudios (Baur y Sinclair, 2006; Crowell y cols., 2004). En nuestro trabajo seleccionamos una dosis de 10 mg/kg/día porque se encuadra entre las utilizadas en modelos similares (Baur y cols., 2006) y en última instancia para establecer una comparación entre los efectos de este polifenol y los del flavonol quercetina. La duración de este estudio se redujo en 2 semanas con respecto a los de quercetina porque a las 8 semanas de tratamiento ya observamos importantes efectos del resveratrol sobre la presión arterial y sobre parámetros plasmáticos, y dado el elevado coste de esta molécula decidimos concluir el estudio en ese punto.

La administración de resveratrol redujo los valores de presión arterial de las ratas Zucker obesas desde la primera semana de tratamiento y continuó este comportamiento durante todo el período experimental. A la luz de este efecto, decidimos analizar parámetros plasmáticos transcurridas 4 semanas desde el inicio del experimento. Observamos una mejora significativa en la mayor parte de los marcadores determinados. Se redujeron las concentraciones de lípidos circulantes, glucosa e insulina de las ratas Zucker obesas tratadas con resveratrol con respecto a las no tratadas. Estos efectos continuaron e incluso se hicieron más patentes a las 8 semanas de tratamiento, momento en el que también detectamos un descenso significativo de la concentración plasmática de leptina en las ratas Zucker obesas tratadas con resveratrol. A partir de este momento se sacrificaron los animales y se analizaron los efectos de la administración crónica con este polifenol en los tejidos. En el tejido adiposo se produce un aumento en la secreción de adiponectina y una reducción en la de TNF- α , así

como un aumento de la expresión de eNOS. A nivel hepático se produce una menor acumulación de lípidos acompañada de la activación de la vía de AMPK. En el momento del sacrificio también observamos una menor ganancia de peso corporal.

3.1. EFECTOS DEL RESVERATROL SOBRE VARIABLES MORFOLÓGICAS.

Aunque no hubo diferencias significativas en el valor del peso corporal al finalizar el tratamiento, en los animales obesos tratados con resveratrol la ganancia de peso fue significativamente menor que en los no tratados. La ingesta dietética fue similar en ambos grupos, lo que nos sugiere la ausencia de efectos del resveratrol sobre la saciedad a nivel del SNC. Estudios recientes han puesto de manifiesto que el resveratrol es capaz de proteger a roedores de las complicaciones derivadas de la obesidad inducida por la ingesta de una dieta hipercalórica, incluso que ratones alimentados con este tipo de dieta más resveratrol eran ligeramente más delgados que los que no tomaron este polifenol (Raz y *cols.*, 2005; Baur y *cols.*, 2006). Estos resultados sugieren que tratamientos prolongados con resveratrol podrían producir reducciones en el peso corporal a largo plazo. En nuestros experimentos se observa una secuencia temporal de mejoría en distintos marcadores plasmáticos que podría redundar en una disminución del peso corporal de los animales obesos tratados con resveratrol: la resistencia a la insulina disminuye a las 4 semanas de tratamiento y la hiperleptinemia lo hace a las 8 semanas. Estas mejoras que produce el tratamiento crónico oral con resveratrol en la respuesta a la insulina y a la leptina podrían dar lugar, con el tiempo, a una disminución del peso corporal de los animales obesos, que se empieza a manifestar con una mejora en la respuesta a la insulina, ya que estudios demuestran que concentraciones altas de insulina en sangre conllevan un aumento del peso corporal (Russell-Jones y *cols.*, 2006).

3.2. EFECTOS DEL RESVERATROL SOBRE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EN PLASMA

Tras 4 semanas de tratamiento, las ratas Zucker fa/fa que recibieron resveratrol ya presentaban mejoría en la resistencia a la insulina expresada por el índice HOMA_{IR}. Este efecto fue incrementándose con el tiempo, de modo que al final del período experimental, el HOMA_{IR} en las ratas obesas tratadas con resveratrol era un 30% menor con respecto al valor que presentaban a las 4 semanas. La capacidad del resveratrol para reducir la resistencia a la insulina ha sido demostrada en varios estudios, que atribuyen dicho efecto a la activación que este polifenol ejerce sobre la AMPK (Baur y *cols.*, 2006; Sun y *cols.*, 2007; Breen y *cols.*, 2008). Una reactivación de esta vía conduce a una mejor respuesta a la insulina, debido al efecto directo sobre la acción de la insulina (Yamauchi y *cols.*, 2002; Mhairi y *cols.*, 2007), y a la reducción del depósito de lípidos fuera del tejido adiposo (Viollet y *cols.*, 2006). Existe también un componente inflamatorio en el origen de la resistencia a la insulina que se pone de manifiesto con el aumento de la secreción de TNF- α y la disminución en la de adiponectina, perdiéndose gran parte del efecto sensibilizador a la insulina de esta última adipocitoquina (Dandona y *cols.*, 2005; Perseghin y *cols.*, 2003). El tratamiento con 10 mg/kg/día de resveratrol durante 8 semanas aumentó la producción de adiponectina y redujo la de TNF- α por el tejido adiposo visceral, contribuyendo a la mejora en la sensibilidad a la insulina. Este resultado es corroborado por los obtenidos en otros estudios, en los que se describe que el resveratrol ejerce un efecto antiinflamatorio, restableciendo el equilibrio entre la secreción de estas dos moléculas mediante la activación de SIRT-1 (Ahn y *cols.*, 2007) y la inhibición de NF- κ B y AP-1 (Alarcón de la Lastra y *cols.* 2005).

La mejora de la resistencia a la insulina estuvo acompañada por un descenso en los niveles plasmáticos de las tres fracciones lipídicas estudiadas: triglicéridos, colesterol total y AGL. Existen varios trabajos que muestran el resveratrol como un eficaz agente hipolipemiante. Ahn y *cols.* demostraron que el resveratrol inhibe la expresión de genes relacionados con la lipogénesis, como *Fdft1*, implicado en la síntesis de colesterol y *Fasn*, en la síntesis de ácidos

grasos libres (Ahn y *cols.*, 2008). Otro estudio atribuye este efecto hipolipemiante a la activación de la AMPK que produce el resveratrol (Zang y *cols.*, 2006). La activación de la AMPK favorece la oxidación de los lípidos en la mitocondria y reduce su síntesis. Además, la AMPK dificulta la excesiva movilización de ácidos grasos desde el tejido adiposo (Daval y *cosl.*, 2005). Por otro lado, el efecto antiinflamatorio del resveratrol también contribuye al efecto hipolipemiante, ya que una reducción de la concentración de TNF- α reduce el estado inflamatorio del tejido adiposo y con ello la lipólisis y liberación de AGL al torrente circulatorio (Cawthorn y *cols.* 2008). El poder antioxidante del resveratrol también ejerce un papel muy importante en estos efectos. Se ha demostrado que el resveratrol reduce la oxidación de LDL (Frankel y *cols.*, 1993) y que es capaz de revertir los efectos negativos de un exceso de AGL en el plasma mediante la activación de FoxO1 (Subauste y *cols.*, 2007).

Al inicio de nuestro experimento, las ratas Zucker obesas presentaron una glucemia significativamente mayor a la que presentaron las delgadas. Tras las 4 semanas de tratamiento con resveratrol, estos niveles de glucosa descendieron y continuaron con valores similares a los de los animales sanos. Este efecto se puede atribuir a la reducción de la resistencia a la insulina que produce el polifenol.

La hiperleptinemia que presentan las ratas Zucker fa/fa se vio significativamente reducida tras 8 semanas de tratamiento con resveratrol. Este efecto es indicativo de una disminución en la resistencia a la leptina que podría ser una consecuencia directa de la reducción de hiperinsulinemia que se observa a las 4 semanas de tratamiento: Dada la interacción entre ambas hormonas, la recuperación de la acción de la insulina, repercute favorablemente en la acción de la leptina (Fruehwald-Schultes y *cols.*, 2002; Carvalheira y *cols.*, 2005).

3.3. EFECTOS DEL RESVERATROL EN TEJIDOS INSULINO-RESISTENTES

La administración oral crónica de resveratrol, además de una mejora en el perfil lipídico y una reducción de la acumulación ectópica de lípidos en las ratas Zucker obesas, produjo una disminución significativa del contenido graso abdominal. Este hecho sugiere que ha tenido lugar una degradación de tejido adiposo. Uno de los principales mecanismos por los que este efecto puede aparecer es como consecuencia de la activación de AMPK a nivel de la grasa visceral. La activación por fosforilación de la AMPK conduce a la fosforilación/inhibición de la ACC, aumentando la oxidación de ácidos grasos en la mitocondria y reduciendo su síntesis (Hardie y cols., 2003). El tratamiento con resveratrol activó significativamente esta vía enzimática en el tejido adiposo de las ratas Zucker obesas. Esto permite explicar esa reducción en la masa adiposa abdominal además de la menor concentración de AGL en plasma. Un descenso en la activación de la AMPK origina una excesiva movilización de AGL provocando el aumento de la concentración de estos lípidos y propiciando su acumulación junto con triglicéridos en músculo e hígado (Yu y cols., 2004). Además, los AGL estimulan la síntesis hepática de triglicéridos (Julius y cols., 2003). A la vista de estos fenómenos, un producto capaz de activar la vía de la AMPK, como el resveratrol, contribuiría a una mejora en el metabolismo lipídico.

El tratamiento crónico con resveratrol redujo la producción de TNF- α y aumentó la de adiponectina por el tejido adiposo visceral de ratas Zucker obesas. Estudios anteriores en modelos *in vitro* (Ahn y cols., 2007) corroboran nuestros resultados, por lo que podemos hablar de un efecto antiinflamatorio directo del resveratrol en el tejido adiposo. Por otro lado, en condiciones normales, la reducida concentración de NO producida por la eNOS ejerce un papel en el control de la homeostasis metabólica (Duplain y cols., 2001). En las ratas Zucker la expresión de eNOS en el tejido adiposo se encuentra disminuida por la acción del TNF- α , (Valerio y cols., 2006). En consecuencia, los tratamientos capaces de restaurar la expresión de eNOS, deben mejorar las alteraciones del síndrome metabólico (Perreault y cols., 2001). Nuestros resultados muestran que el resveratrol no sólo reduce la producción de TNF- α , sino

que este efecto se acompaña del aumento de la expresión proteica de eNOS en el tejido adiposo.

La adiponectina es uno de los factores capaces de activar la AMPK (Yamauchi y *cols.*, 2002; Tomas y *cols.*, 2002; Huypens y *cols.*, 2005). El aumento en su secreción por el tratamiento con resveratrol, se suma al efecto activador que este polifenol puede tener sobre esta vía de forma directa, ya que hay estudios recientes que ponen de manifiesto la acción activadora de distintos polifenoles sobre la AMPK. Zang y *cols.* comprobaron cómo diferentes polifenoles, unos naturales como resveratrol y apigenina y otro sintético (S17834), fueron capaces de activar AMPK y obtener resultados similares en ratones deficientes en el receptor LDL y en la línea celular HepG2 (Zang y *cols.*, 2006).

En la rata Zucker el acúmulo de grasa se produce de forma destacada en el hígado, originando esteatosis hepática y hepatomegalia (Anderson y *cols.*, 2008; Scheen y *cols.*, 2002). En nuestras experiencias, el tratamiento con resveratrol redujo el contenido hepático de colesterol y triglicéridos. Estos resultados fueron acompañados por la activación de la vía AMPK en el hígado de las ratas Zucker *fa/fa*, con la consiguiente fosforilación/inhibición de ACC. La activación hepática de la AMPK por el resveratrol en este modelo justifica el descenso que el tratamiento con este polifenol produce en la concentración plasmática de AGL, así como en la reducción de la producción, liberación y acumulación hepática de triglicéridos y colesterol. Este efecto también contribuye a mejorar la resistencia a la insulina (Viollet y *cols.*, 2006; Mhairi y *cols.*, 2007).

3.4. EFECTOS DEL RESVERATROL SOBRE LA PRESIÓN ARTERIAL

La administración crónica oral de 10 mg/kg/día de resveratrol a ratas obesas Zucker ha puesto de manifiesto una importante reducción de la hipertensión arterial en este modelo. Nuestros resultados muestran que este polifenol fue capaz de reducir desde la primera semana la presión arterial, alcanzando, a las 4 semanas, un descenso máximo de 21 mmHg que se mantuvo hasta el final del tratamiento. El resveratrol ha sido descrito como un eficaz

agente antihipertensivo en modelos de hipertensión como en ratas con hipertensión inducida por nefrectomía parcial (Liu, Z. y cols. 2005) y en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) (Mizutani y cols., 2000), pudiendo estar relacionado con sus beneficios sobre la función endotelial. Los mecanismos implicados en este efecto pueden ser tanto la actividad antioxidante como el aumento en la expresión de eNOS (Li-Man Hung y cols. 1999; Wallerath, T. y cols. 2002; Leifert, WR. Y cols. 2008). Nuestros resultados concuerdan con este planteamiento, ya que el tratamiento con resveratrol redujo los niveles de MDA hepático e incrementó de forma contundente la reducida expresión de eNOS en anillos aórticos de ratas Zucker obesas. A esta acción podría igualmente contribuir la reducción de los AGL en plasma, puesto que en modelos de síndrome metabólico, se ha descrito que los AGL no sólo están involucrados en la resistencia a la insulina, sino también en la reducción de la actividad de eNOS en aorta (Du, X. y cols. 2006; Steinberg, HO. Y cols. 1997).

Podemos concluir que la administración oral crónica de 10 mg/kg/día de resveratrol, reduce eficazmente las alteraciones típicas del síndrome metabólico en el modelo experimental de ratas Zucker obesas. Además podemos añadir que la reducción de la hiperlipidemia y de la resistencia a la insulina son patentes a las 4 semanas de tratamiento y se incrementan a lo largo de todo el período experimental. Al final del mismo, se suman la reducción de la hiperleptinemia, la inflamación y la esteatosis hepática, con una menor ganancia de peso corporal y una reducción en el contenido adiposo visceral. Todo ello acompañado de una reducción de la presión arterial desde el inicio del tratamiento.

Analizando todos estos resultados de forma conjunta, podemos proponer tres mecanismos fundamentales por los que podría actuar este polifenol en el modelo de síndrome metabólico de rata Zucker obesa:

- La actividad antioxidante que presenta el resveratrol puede contribuir de forma importante a la mejora en la respuesta a la insulina, la reducción de la hiperlipidemia y disminución de la presión arterial.

- El resveratrol ejerce un efecto antiinflamatorio que se manifiesta en la inhibición de la secreción de TNF- α y aumento de la de adiponectina por el tejido adiposo visceral. Este efecto antiinflamatorio produce una recuperación en la expresión eNOS y una reducción de los niveles de NOx.
- Por último, el principal mecanismo del resveratrol es la activación de la vía de la AMPK, tanto a nivel hepático como a nivel del tejido adiposo visceral, dirigiendo la actividad metabólica hacia el consumo de energía. Con ello contribuye a la reducción de la hiperlipidemia, de la esteatosis hepática y de la resistencia a la insulina. Este efecto, a su vez, reforzaría los debidos a las acciones antioxidante y antiinflamatoria de este polifenol.

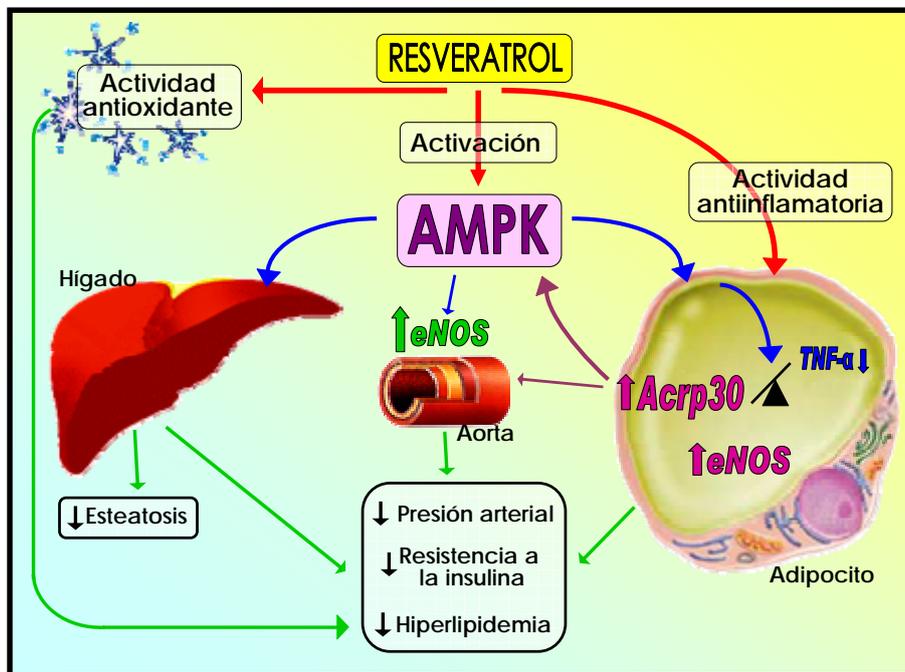


Figura 51. Hipótesis de los mecanismos por los que el resveratrol ejerce sus efectos en el síndrome metabólico. Acrp30, adiponectina; AMPK, protein kinasa activada por AMP; eNOS, óxido nítrico sintasa endotelial; iNOS, óxido nítrico sintasa inducible; TNF- α , factor de necrosis tumoral- α .

Conclusiones

1. La administración oral del flavonoide quercetina a las dosis de 2 y 10 mg/kg/día durante 10 semanas a ratas Zucker obesas con síndrome metabólico, disminuye el incremento de peso, las concentraciones plasmáticas de triglicéridos, colesterol total, AGL, insulina así como la presión arterial. A la dosis más elevada, además se manifiesta un efecto antiinflamatorio en el tejido adiposo, acompañado de una disminución de los lípidos hepáticos, efecto asociado a la activación de la AMPK, con la consecuente inhibición por fosforilación de la ACC en dicho tejido.
2. La administración oral diaria de 10 mg/kg/día del estilbeno a ratas Zucker obesas durante 8 semanas reduce la hipertensión desde la primera semana de tratamiento y produce una disminución patente de la dislipemia y la resistencia a la insulina ya a las 4 semanas de administración. Estos efectos se ven incrementados y se acompañan del descenso de la hiperleptinemia al final del tratamiento en este modelo experimental de síndrome metabólico. Los efectos del resveratrol se asocian además a una reducción del estado inflamatorio en el tejido adiposo y de la activación de la AMPK en tejidos diana característicos de este síndrome metabólico como el hígado y el tejido adiposo.
3. Los resultados obtenidos en nuestros estudios corroboran los efectos beneficiosos de ambos polifenoles en las alteraciones metabólicas y los convierten en herramientas potenciales como constituyentes fundamentales en la preparación de alimentos funcionales orientados al tratamiento de patologías relacionadas con el síndrome metabólico.

Bibliografía

- Abel ED, Peroni O, Kim JK, Kim YB, Boss O, Hadro E, *et al.* Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature* 2001; 409:729-733.
- Ahima RS, Osei SY. Leptin signalling. *Physiol behav* 2004; 81:223-241.
- Ahmed RL, Schmitz KH, Anderson KE, Rosamond WD, Folsom AR. The metabolic syndrome and risk of incident colorectal cancer. *Cancer* 2006; 107:28-36.
- Ahn J, Lee H, Kim S, Ha T. Resveratrol inhibits TNF- α -induced changes of adipokines in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 364:972-977.
- Ahn J, Cho I, Kim S, Kwon D, Ha T. Dietary resveratrol alters lipid metabolism-related gene expresión of mice on an atherogenic diet. *J Hepatol* 2008; 49:1019-1028.
- Alarcón de la Lastra C, Villegas I. Resveratrol as an anti-inflammatory and anti-aging agent: Mechanisms and clinical implications. *Mol Nut. Food Re* 2005; 49:405-430.
- Alarcón de la Lastra C, Villegas I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochem Soc Transact* 2007; 35(5):1156-1160.
- Alberti KGMM, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome-a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabetic Med* 2006; 23:469-80.
- Aljada A, Ghanim H, Mohanty P, Tufail S, Bandyopadhyay A, Dandona P. Glucose intake induces an increase in AP-1 and Erg-1 binding activities and tissue factor and matrix metalloproteinase concentrations. *Am J Clin Nutr* 2004; 80: 51-57.
- Aljada A, Mohanty P, Ghanim H, Abdo T, Tripathy D, Chaudhuri A, Dandona P. Increase in intranuclear nuclear factor kappaB and decrease in inhibitor kappaB in mononuclear cells after a mixed meal: evidence for a proinflammatory effect. *Am J Clin Nutr* 2004; 79:682-690.

Anderson ME. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol* 1985; 113:548-555.

Anderson N, Borlak J. Molecular mechanisms and therapeutic targets in steatosis and steatohepatitis. *Pharmacol Rev* 2008; 60(3): 311-357.

Anderson PJ, Critchley JA, Chan JC, Cockram CS, Lee ZS, Thomas GN, *et al.* Factor analysis of the metabolic syndrome: obesity vs insulin resistance as the central abnormality. *Int J Obes* 2001; 25:1782-1788.

Andersson U, Filipsson K, Abbott CR, Woods A, Smith K, Bloom SR, *et al.* AMP-activated Protein Kinase Plays a Role in the Control of Food Intake. *J Biol Chem* 2004; 279(13): 12005-12008.

Argilés JM. The obese Zucker rat: a choice for fat metabolism. *Prog Lipid Res* 1989; 28: 53-66.

Arias-Díaz J, Balibrea J. Modelos animales de intolerancia a la glucosa y diabetes tipo 2. *Nutr Hosp* 2007; 22(2):160-68.

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

Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li ZW, Long JM, Wynsaw-Boris A, Poli G, Olefsky J, Karim M. Ikk-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med* 2005; 11:91-198.

Arner P. Insulin resistance in type 2 diabetes: role of fatty acids. *Diabetes Metab Res Rev* 2002; 18:S5-S9.

Artico M, Di Santo R, Costi R, Novellino E, Greco G, Massa S, *et al.* Geometrically and conformationally restrained cinnamoyl compounds as inhibitors of HIV-1 integrase: synthesis, biological evaluation, and molecular modeling. *J. Med. Chem.* 1998; 41:3948-3960.

Asensi M, Medina I, Ortega A, Carretero J, Bano MC, Obrador E, Estrela JM. Inhibition of cancer growth by resveratrol is related to its low bioavailability. *Free Radical Biol Med* 2002; 33:387-398.

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

Bach A, Schirardin H, Bauer M, Schaeffer A, Weryha A. Age-related changes in biological parameters in Zucker rats. *Lipids* 1981; 16:41-848.

Balkau B, Charles MA. Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *Diabetic Med* 1999; 16:442-443.

Banerji MA, Lebowitz J, Chaiken RL, Gordon D, Kral JG, Lebovitz HE. Relationship of visceral adipose tissue and glucosa disposal is independent of sex in black NIDDM subjects. *Am J Physiol* 1997; 273:E425-E432.

Banks AS, Kon N, Knight C, Matsumoto M, Gutiérrez-Juárez R, Rossetti L et al. SirT1 Gain of Function Increases Energy Efficiency and Prevents Diabetes in Mice. *Cell Metabolism* 2008; 8:333-341.

Barry WS, Bray GA. Plasma triglycerides in genetically obese rats. *Metabolism* 1969; 18 (10):833-839.

Bates SH, Myers MG Jr. The role of leptin receptor signaling in feeding and neuroendocrine function. *Trends Endocrinol Metab* 2003; 14(10):447-452.

Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5:493-506.

Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A., et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 2006; 444:337-342.

Bedard S, Marcotte B, Marette A. Cytokines modulate glucose transport in skeletal muscle by inducing the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biochem J* 1997; 325:487-493.

Belfort R, Mandarino L, Kashyap S, Wirfel K, Pratipanawat T, Berria R *et al.* Dose-response effect of elevated plasma free fatty acid on insulin signaling. *Diabetes* 2005; 54:1640-1648.

Bhat KP, Kosmeder JW, II and Pezzuto JM. Biological effects of resveratrol. *Antiox Redox Signal* 2001; 3:1041-1064.

Bieger J, Cermak R, Blank R, de Boer VC, Hollman PC, Kamphues J, Wolfram S. Tissue distribution of quercetin in pigs after long-term dietary supplementation. *J Nutr* 2008; 138(8):1417-1420.

Biesalski HK. Polyphenols and inflammation: basic interactions. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007; 10:724-728.

Bilik A, Sapers GM. Distribution of quercetin and kaempferol in lettuce, kale, chive, leek, horseradish, red radish and red cabbage tissues. *J. Agric. Food Chem* 1985; 33:226-228.

Bindoli A, Valente M, Cavallini L. Inhibitory action of quercetin on xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase activity. *Pharmacol Res Commun* 1985; 17:831-839.

Birt DF, Hendrich S, Wang W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol Ther.* 2001; 90:157-177.

Bischoff SC. Quercetin: potentials in the prevention and therapy of disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2008; 11:733-740.

Bjørnbæk C, Uotani S, da Silva B, Flier JS. Divergent signalling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. *J Biol Chem* 1997; 272:32686-32695.

Bjørnbæck C, Lavery HJ, Bates SH, Olson RK, Davis SM, Flier JS, Myers Jr MG. SOCS3 mediates feedback inhibition of the leptin receptor via Tyr985. *J Biol Chem* 2000; 275: 40649-40657.

Bjørnbæck C, Kahn BB. Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Rec Prog Horm Res* 2004; 59:305-331.

Blight EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Med Sci* 1959; 37:911-917.

Boden G, Chen X, Ruiz J, White JV, Rossetti L. Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. *J Clin Invest* 1994; 93:2438-2446.

Boden G. Effects of free fatty acids (FFA) on glucose metabolism: significance for insulin resistance and type 2 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2003; 111:121-124.

Boden G, She P, Mozzoli M, Cheung P, Gumireddy K, Reddy P *et al.* Free Fatty Acids Produce Insulin Resistance and Activate the Proinflammatory Nuclear Factor- κ B Pathway in Rat Liver. *Diabetes* 2005; 54:3458-3465.

Bolinder J, Kager L, Ostman J, Arner P. Differences at the receptor and post-receptor levels between human omental and subcutaneous adipose tissue in the action of insulin on lipolysis. *Diabetes* 1983; 32:117-123.

Bonadonna RC, Groop LC, Zych K, Shank M, DeFronzo RA. Dose-dependent effect of insulin on plasma free fatty acid turnover and oxidation in humans. *Am J Physiol* 1990; 259:E736-E750.

Boots AW, Haenen GR, Bast A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *Eur J Pharmacol* 2008; 585: 325-337.

Bradamante S, Barenghi L, Villa A. Cardiovascular protective effects of resveratrol. *Cardiovasc Drug Rev* 2004; 22:169-188.

Breen DM, Sanli T, Giacca A, Tsiani E. Stimulation of muscle cell glucose uptake by resveratrol through sirtuins and AMPK. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2008; 374:117-122.

Bronfman M, Morales MN, Orellana A. Diacylglycerol activation of protein kinase C is modulated by long-chain acyl-CoA. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 152:987-992.

Brooks BJ, Arch JR, Newsholme EA. Effect of some hormones on the rate of the triacylglycerol/fatty-acid substrate cycle in adipose tissue of the mouse in vivo. *Biosci Rep* 1983; 3:263-267.

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

Buhl ES, Jessen N, Pold R, Ledet T, Flyvbjerg A, Pedersen SB *et al.* Long-term AICAR administration reduces metabolic disturbances and lowers blood pressure in rats displaying features of the insulin resistance syndrome. *Diabetes* 2002; 51(7):2199-2206.

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

Calvani M, Scarfone A, Granato L, Mora EV, Nanni G, Castagneto M *et al.* Restoration of adiponectin pulsatility in severely obese subjects after weight loss. *Diabetes* 2004; 53(4):939-947.

Camuesco D, Comalada M, Rodríguez-Cabezas ME, Nieto A, Lorente MD, Concha A *et al.* The intestinal anti-inflammatory effect of quercitrin is associated with an inhibition in iNOS expression. *Br J Pharmacol* 2004; 143(7):908-918.

- Carey AL, Steinberg GR, Macaulay SL, Thomas WG, Holmes AG, Ramm G *et al.* Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMP-activated protein kinase. *Diabetes* 2006; 55(10):2688-2697.
- Carvalho JBC, Torsoni MA, Ueno M, Amaral ME, Araujo EP, Velloso LA *et al.* Cross-Talk between the Insulin and Leptin Signaling Systems in Rat Hypothalamus. *Obesity Research* 2005; 13:48-57.
- Cawthorn WP, Sethi JK. TNF- α and adipocyte biology. *FEBS Letters* 2008; 582:117-131.
- Ceddia RB. Direct metabolic regulation in skeletal muscle and fat tissue by leptin: implication for glucose and fatty acid homeostasis. *Int J Obes (Lond)* 2005; 29(10):1175-1183.
- Chanussot F, Ulmer M, Ratanasavanh R, Max JP, Debry G. Influence of diet composition on obesity, hyperlipemia and liver steatosis in Zucker fa/fa rats pair-fed with Zucker Fa/+ rats. *Int J Obes* 1984; 8(3):259-70.
- Chatterjee A, Catravas JD. Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation. *Vascul Pharmacol* 2008; 49:134-140.
- Chen D, Wang MW. Development and application of rodent models for type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 2005; 7:307-317.
- Cheynier, V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am J Clin Nutr* 2005; 81:223S-229S.
- Chinen I, Shimabukuro M, Yamakawa K, Higa N, Matsuzaki T, Noguchi K, *et al.* Vascular Lipotoxicity: Endothelial Dysfunction via Fatty-Acid-Induced Reactive Oxygen Species Overproduction in Obese Zucker Diabetic Fatty Rats. *Endocrinology* 2007; 148(1):160-165.

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

Codi V. Crystal and molecular structures of flavonoids. *Prog Clin Biol Res* 1988; 280:29-44.

Comalada M, Camuesco D, Sierra S, Ballester I, Xaus J, Gálvez J, *et al.* In vivo quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF-kappaB pathway. *Eur J Immunol* 2005; 35(2):584-592.

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

Conti C, Mastromarino P, Sgro R, Desideri N. Anti-picornavirus activity of synthetic flavone-3-yl esters. *Antiviral Chem Chemother* 1998; 9:511-515.

Cook S, Hugli O, Egli M, Vollenweider P, Burcelin R, Nicod P, *et al.* Clustering of cardiovascular risk factors mimicking the human metabolic syndrome X in eNOS null mice. *Swiss Med Wkly* 2003; 133(25-26):360-363.

Cook S, Weitzman M, Auinger P, Nguyen M, Dietz WH. Prevalence of a metabolic syndrome phenotype in adolescents: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988–1994. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2003; 157:821-827.

Corton JM, Gillespie JG, Hawley SA, Hardie DG. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside: a specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *Eur J Biochem* 1995; 229:558–565.

Coskum O, Kanter M, Korkmaz A, Oter S. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and cell damage in rat pancreas. *Pharmacol Res* 2005; 51:117–123.

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

Crowell JA, Korytko PJ, Morrissey RL, Booth TD, Levine BS. Resveratrol-associated renal toxicity. *Toxicol Sci* 2004; 82:614-619.

Cucciolla V, Borriello A, Oliva A, Galletti P, Zappia V, Della Ragione F. Resveratrol: from basic science to the clinic. *Cell Cycle* 2007; 6:20, 2495-2510.

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

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

Dandona P, Weinstock R, Thusu K, Abdel-Rahman E, Aljada A, Wadden T. Tumor necrosis factor-alpha in sera of obese patients: fall with weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:2907-2910.

Dandona P, Mohanty P, Ghanim H, Aljada A, Browne R, Hamouda Prabhala, *et al.* The suppressive effect on dietary restriction and weight loss in the obese on the generation of reactive oxygen species by leukocytes, lipid peroxidation and protein carbonylation. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:355-362.

Dandona P. *et al.* Insulin inhibits intranuclear nuclear factor kappaB and stimulates IκB in mononuclear cells in obese subjects: evidence for an anti-inflammatory effect?. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:3257-3265.

Dandona P, Aljada A, Mohanty P. The anti-inflammatory and potential anti-atherogenic effect of insulin: a new paradigm. *Diabetologia* 2002; 45:924-930.

Dandona P, Aljada A, Chaudhuri A, Mohanty P, Garg R. Metabolic syndrome: A comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation. *Circulation* 2005; 111:1448-1454.

Das DK, Maulik N. Resveratrol in cardioprotection: a therapeutic promise of alternative medicine. *Molecular Intervention* 2006; 6 (1):36-47.

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

Davies SP, Helps NR, Cohen PT, Hardie DG. 5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C alpha and native bovine protein phosphatase-2AC. *FEBS Lett* 1995; 377(3):421-425.

Davis JM, Murphy EA, McClellan JL, Carmichael MD, Gangemi JD. Quercetin reduces susceptibility to influenza infection following stressful exercise. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008; 295:R505-R509.

Dhindsa S, Tripathy D, Mohanty P, Ghanim H, Syed T, Aljada A, Dandona P. Differential effects of glucose and alcohol on reactive oxygen species generation and intranuclear factor-KappaB in mononuclear cells. *Metabolism* 2004; 53:330-334.

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

De Santi C, Pietrabissa A, Spisni R, Mosca F, Pacifici GM. Sulfation of resveratrol, a natural compound present in wine, and its inhibition by natural flavonoids. *Xenobiotica* 2000; 30:857-866.

Debant A, Guerre-Millo M, Le Marchand-Brustel Y, Freychet P, Lavau M, Van Obberghen E. Insulin receptor kinasa is hyperresponsive in adipocytes of young obese Zucker rats. *Am J Physiol* 1987; 252:E273-E278.

Du X, Edelstein D, Obici S, Higham N, Zou MH, Brownlee M. Insulin resistance reduces arterial prostacyclin synthase and eNOS activities by increasing endothelial fatty acid oxidation. *J Clin Invest* 2006; 116:1071–1080.

Duarte J, Pérez-Vizcaíno F, Utrilla P, Jiménez J, Tamargo J, Zarzuelo A. Vasodilatatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure-activity relationships. *Gen Pharmacol*. 1993a; 24(4):857-862.

Duarte J, Pérez-Vizcaíno F, Zarzuelo A, Jiménez J, Tamargo J. Vasodilator effects of quercetin in isolated rat vascular smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol* 1993b; 239(1-3):1-7.

Duarte J, Pérez-Vizcaíno F, Zarzuelo A, Jiménez J, Tamargo J. Inhibitory effects of quercetin and staurosporine on phasic contractions in rat vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 1994; 262(1-2):149-156.

Duarte J, Pérez-Palencia R, Vargas F, Ocete MA, Pérez-Vizcaíno F, Zarzuelo A, et al. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 2001a; 133:117-124.

Duarte J, Galisteo M, Ocete MA, Pérez-Vizcaíno F, Zarzuelo A, Tamargo J. Effects of chronic quercetin treatment on hepatic oxidative status of spontaneously hypertensive rats. *Mol Cell Biochem* 2001b; 221:155-160.

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

Duplain H, Burcelin R, Sartori C, Cook S, Egli M, Lepori M, *et al.* Insulin resistance, hyperlipidemia, and hypertension in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 2001;104:342-345.

Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* 2005; 365:1415-1428.

Esposito K, Nappo F, Giugliano F, Di Palo C, Ciotola M, Barbieri M, *et al.* Meal modulation of circulating interleukin 18 and adiponectin concentrations in healthy subjects and in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr* 2003;78:1135–1140.

Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 1990;186:407-421.

Executive summary of the third report of the National cholesterol education Program (NCEP) Expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001; 285:2486-2497.

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

Ford ES, Giles WH, Mokdad AH. Increasing prevalence of the metabolic syndrome among U.S. Adults. *Diabetes Care* 2004; 27:2444-9.

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

Frankel EN, Waterhouse AL, Kinsella JE. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet* 1993; 341:1103-1104.

Frémont L. Biological effects of resveratrol. *Life Sci* 2000; 66(8):663-673.

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

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

Frühbeck G. Peripheral actions of leptin and its involvement in disease. *Nutr Rev* 2002; 60:S47-S55.

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

Fryer LGD, Foudelle F, Barnes K, Baldwin SA, Woods A, Carlind D. Characterization of the role of the AMP-activated protein kinase in the stimulation of glucose transport in skeletal muscle cells. *Biochem J* 2002; 363:167-174.

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

Galisteo M, Sánchez M, Vera R, González M, Anguera A, Duarte J, Zarzuelo A. A diet supplemented with husks of *Plantago ovata* reduces the development of endothelial dysfunction, hypertension, and obesity by affecting adiponectin and TNF- α in obese Zucker rats. *J Nutr* 2005;135:2399-2404.

García-Mediavilla V, Crespo I, Collado P, Esteller A, Sánchez-Campos SJ, Muñón M, *et al.* The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells. *Eur J Pharmacol* 2007; 557:221-229.

Garton AJ, Campbell DG, Carling D, Hardie DG, Colbran RJ, Yeaman SJ. Phosphorylation of bovine hormone-sensitive lipase by the AMP-activated protein kinase. A possible antilipolytic mechanism. *Eur J Biochem* 1989; 179:249–254.

Gavrilova O, Marcus-Samuels B, Graham D, Kim JK, Shulman GI, Castle AL, *et al.* Surgical implantation of adipose tissue reverses diabetes in lipodystrophic mice. *J Clin Invest* 2000;105:271-278.

Grundy SM, Brewer HB Jr, Cleeman JI, Smith SC Jr, Lenfant C. American Heart Association; National Heart, Lung, and Blood Institute. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation* 2004;109:433-438.

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

Goldberg DM, Yan J, Soleas GJ. Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. *Clin Biochem* 2003; 36:79-87.

Granger DL, Taintor RR, Boockvar KS, Hibbs JB. Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction. *Methods Enzymol.* 1996; 268:142-151.

Gusman J, Malonne H, Atassi G. A reappraisal of the potential chemopreventive and chemotherapeutic properties of resveratrol. *Carcinogenesis* 2001; 22:1111-1117.

Hämäläinen RN, Nieminen N, Vuorela P, Heinonen M, Moilanen, E. Antiinflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF- κ B activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF- κ B activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Mediators of Inflammation* Volume 2007, Article ID 45673, 10 pages.

Harborne JB, Inghaus JL, King I, Payne M. The isopentenyl isoflavone luteone as a proinfectious antifungal agent in the genus lupines. *Phytochemistry* 1976;15:1485.

Harborne JB. *Methods in plant biochemistry, I: plant phenolics*. London: Academic Press 1989. pp

Hardie DG, Carling D. The AMP-activated protein kinase-fuel gauge of the mammalian? *Cell Eur J Biochem* 1997; 246(2):259-273.

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

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

Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoides. *Pharmacol Ther.* 2002; 96:67-202.

Hegyi K, Fülöp K, Kovács K, Tóth S, Falus A. Leptin-induced signal transduction pathways. *Cell Biol Int* 2004; 28:159-169.

Herman MA, Hahn BB. Glucose transport and sensing maintenance of glucose homeostasis and metabolic harmony. *J. Clin Invest* 2006; 116:1767-1775.

Hertog MGL, Hollman PCH, Katan MB. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J Agric Food Chem* 1992; 40:2379-2383.

Hertog MGL, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D. (1993a). Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutr Cancer* 1993a; 20:21-29.

Hertog MGL, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 1993b; 342:1007-1011.

Hertog, M.G.L., Kromhout, D., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Fidanza, F., *et al.* Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med* 1995; 155:381-386.

Hertog, M.G.L. (1996). Epidemiological evidence on potential health properties of flavonoids. *Proc Nutr Soc* 1996; 55:385-397.

Hertog, M.G.L., Feskens, E.J.M., Kromhout, D. (1997). Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk. *Lancet* 1997; 349:699.

Hirvonen, T., Virtamo, J., Korhonen, P., Albanes, D., Pietinen, P. Intake of flavonoids, carotenoids, vitamins C and E, and risk of stroke in male smokers. *Stroke* 2000; 31(10): 2301-2306.

Holme AL, Pervaiz SJ. Resveratrol in cell fate decisions. *Bioenerg Biomembr.* 2007;39: 59-63.

Horman S, Vertommen D, Heath R, Neumann D, Mouton V, Woods A, *et al.* Insulin antagonizes ischemia-induced Thr172 phosphorylation of AMP-activated protein kinase alpha-subunits in heart via hierarchical phosphorylation of Ser485/491. *J Biol Chem* 2006; 281:5335-5340.

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

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

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

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

Hotamisligil GS. The role of TNFalpha and TNF receptors in obesity and insulin resistance. *J Intern Med* 1999; 245(6):621-625.

Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 2006; 444:860-867.

Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, et al. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20(6):1595-1599.

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

Houseknecht, K. L., Mantzoros, C. S., Kuliawat, R., Hadro, E., Flier, J. S. and Kahn, B. B. Evidence for leptin binding proteins in serum of rodents and humans: modulation with obesity. *Diabetes*. 1996; 45:1638-1643

Hsu CL and Yen GC. Phenolic compounds: Evidence for inhibitory effects against obesity and their underlying molecular signaling mechanisms. *Mol Nutr Food Res* 2008; 52:53-61.

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

Huang, W., Dedousis, N., Bhatt, B.A., O'Doherty, R.M. Impaired Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase by Leptin Is a Novel Mechanism of Hepatic Leptin Resistance in Diet-induced Obesity. *J Biol Chem* 2004; 279:21695-21700.

Hung, L.-M., Chen, J.-K., Huang, S.-S., Lee, R.-S., Su, M.-J. Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. *Cardiovasc Res* 2000; 47:549-555.

Hussain T, Gupta S, Adhami VM, Mukhtar H. Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate selectively inhibits COX-2 without affecting COX-1 expression in human prostate carcinoma cells. *Int J Cancer* 2005; 113:660-669.

Huypens, P., Moens, K., Heimberg, H., Ling, Z., Pipeleers, D., Van de Casteele, M. Adiponectin-mediated stimulation of AMP-activated protein kinase (AMPK) in pancreatic beta cells. *Life Sci* 2005; 77: 2005:1273-1282.

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

Itani, S.I., Ruderman, N.D., Schmeider, F., Boden, G. Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C and ikappab-alpha. *Diabetes* 2002; 51:2005-2011.

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

Julius U. Influence of plasma free fatty acids on lipoprotein synthesis and diabetic dyslipidemia. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2003; 111:246-250.

Juźwiak S, Wójcicki J, Mokrzycki K, Marchlewicz M, Białecka M, Wenda-Rózewicka L, et al. Effect of quercetin on experimental hyperlipidemia and atherosclerosis in rabbits. *Pharmacol Rep* 2005; 57(5):604-609.

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

Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome *J Clin Invest* 2006; 116:1784-1792.

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

Kakuma T, Lee Y Higa, M Wang Z, Pan W., Shimomura I, Unger RH. Leptin, troglitazone and the expression of sterol regulatory element binding proteins in liver and pancreatic islets. *Proc Natl Acad Sci US A* 2000; 97:8536-8541.

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

Kamohara S, Burcelin R, Halaas JL, Friedman JM, Charron MJ Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature* 1997; 389:374-377.

Kandaswami C, Middleton E. Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids. *Adv Exp Med Biol* 1994; 366:351-376.

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

Kapur S, Marcotte B, Marette A. Mechanism of adipose tissue iNOS induction in endotoxemia. *Am J Physiol* 1999; 276:E635-E641.

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

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

Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan E, Aljada A, Wadden T. Tumor necrosis factor and interleukina-6 in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol* 2001; 280:E745-E751.

Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:2548-2556.

Kim WS, Lee YS, Cha SH, Jeong HW, Choe SS, Lee MR, Oh GT, Park HS, Lee KU, Lane MD, Kim JB. Berberine improves lipid dysregulation in obesity by controlling central and peripheral AMPK activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 296(4):E812-819.

Kimura Y, Okuda H, Arichi S, Effects of stilbene derivatives on arachidonate metabolism in leukocytes. *Biochim Biophys Acta* 1985; 837:209-212.

Klein S, Fontana L, Young VL, Coggan AR, Kilo C, Patterson BW *et al.* Absence of an effect of liposuction on insulin action and risk factors for coronary heart disease. *N Engl J Med* 2004; 350:2549-2557.

Klip A & Paquet MR. Glucose transport and glucose transporters in muscle and their metabolic regulation. *Diabetes Care* 1990; 13:228-243.

Knekt P, Järvinen R, Reunanen A, Maatela J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *Br Med J* 1996; 312:478-481.

Knekt P, Isotupa S, Rissanen H, Heliövaara M, Järvinen R, Häkkinen S, Aromaa A, Reunanen A. Quercetin intake and the incidence of cerebrovascular disease. *Eur J Clin Nutr* 2000; 54(5):415-417.

Kola B, Boscaro M, Rutter GA, Grossman AB and Korbonits M. Expanding role of AMPK in endocrinology. *TRENDS in Endocrinol Metab* 2006; 17 (5):205-215.

Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature* 2000; 404:635-643.

Kramer HF, Witczak CA, Fujii N, Jessen N, Taylor EB, Arnolds DE, Sakamoto K, Hirshman MF, Goodyear LJ. Distinct signals regulate AS160 phosphorylation in response to insulin, AICAR, and contraction in mouse skeletal muscle. *Diabetes* 2006; 55:2067-2076.

Kris-Etherton PM, Keen CL. Evidence that the antioxidant flavonoids in tea and cocoa are beneficial for cardiovascular health. *Curr Opin Lipidol* 2002; 13:41-1349.

Kühnau J. The flavonoids: a class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet* 1976; 24:117-120.

Kurioka S, Murakami Y, Nishiki M, Sohmiya M, Koshimura K, Kato Y. Relationship between visceral fat accumulation and antilipolytic action of insulin in patients with type 2 diabetes mellitus. *Endocr J* 2002; 49:459-464.

Kurtz TW, Morris RC, Pershadsingh HA. The fatty Zucker rat as a genetic model of obesity and hypertension. *Hypertension* 1989; 13:896-901.

Kylin E. Studien ueber das Hypertonie-Hyperglyka «mie-Hyperurika» miesyndrom. *Zentralblatt fuer Innere Medizin* 1923; 44:105-27.

Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, et al. Resveratrol Improves Mitochondrial Function and Protects against Metabolic Disease by Activating SIRT1 and PGC-1 α . *Cell* 2006; 127:1109-1122.

Langcake P and Pryce RJ. *Physiol. Plant Pathol* 1976; 9:77-86.

Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI, et al. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature (London)* 1996; 379:632-635.

Lee JY, Ye J, Gao Z, Youn HS, Lee WH, Zhao L, et al. Reciprocal modulation of toll-like receptor-4 signaling pathways involving myd88 and phosphatidylinositol-3-kinase/akt by saturated and polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem* 2003; 278: 37041-37051.

Lee Y, Wang MY, Kakuma T, Wang ZW, Babcock E, McCorkle K, Higa M, Zhou YT, Unger RH. Liporegulation in diet-induced obesity. The antisteatotic role of hyperleptinemia. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 5629-5635.

Leifert, W.R, Abeywardena, M.Y. Cardioprotective actions of grape polyphenols. *Nutrition Research* 2008; 28:729-737.

Leighton F, Miranda-Rottmann S and Urquiaga I. A central role of eNOS in the protective effect of wine against metabolic syndrome. *Cell Biochem Func.* 2006; 24:291-298.

Levine YC, Li GK, Michel T. Agonist-modulated regulation of AMP-activated protein kinase (AMPK) in endothelial cells. Evidence for an AMPK – Rac1 – Akt – endothelial nitric-oxide synthase pathway. *J Biol Chem.* 2007; 282:20351-20364.

Lihn AS, Jessen N, Pedersen SB, Lund S, Richelsen B. AICAR stimulates adiponectin and inhibits cytokines in adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 316(3): 853-858.

Li-Man Hung, Jan-Kan Chen, Shiang-Suo Huang, Ren-Shen Lee, Ming-Jai Su. Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from Grapes. *Cardiovascular Research* 2000; 47:549-555.

Liu Z, Song Y, Zhang X, Liu Z, Zhang W, Mao W, *et al.*. Effects of trans-resveratrol on hypertension-induced cardiac hypertrophy using the partially nephrectomized rat model. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2005; 32:1049-1054.

Lochhead PA, Salt IP, Walker KS, Hardie DG, Sutherland C. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide riboside mimics the effects of insulin on the expression of the 2 key gluconeogenic genes PEPCCK and glucose-6-phosphatase. *Diabetes.* 2000; 49:896-903.

Loke WM, Proudfoot JM, McKinley AJ, *et al.* Quercetin and its in vivo metabolites inhibit neutrophil-mediated low-density lipoprotein oxidation. *J Agric Food Chem* 2008; 56:3609-3615.

Lönnqvist F, Thome A, Nilzell K, Hoffstedt J and Arner P. A Pathogenic Role of Visceral Fat β_3 -Adrenoceptors in Obesity. *J Clin Invest* 1995; 95:1109-1116.

Long YC, Zierath JR. AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *The J Clin Invest* 2006;16(7):1776-1783.

Lopes NP, Chicaro P, Kato MJ, Albuquerque S & Yoshida M. Flavonoids and lignans from *Virola surinamensis* twigs and their in vitro activity against *Trypanosoma cruzi*. *Planta Med* 1998; 64:667-668.

Lorincz AM, Sukumar S. Molecular links between obesity and breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2006; 13:279-92.

Losa GA. Resveratrol modulates apoptosis and oxidation in human blood mononuclear cells. *Eur J Clin Invest* 2003; 33:818-823.

Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 221(2):286-289.

Maeda N, Shimomura I, Kishida K, Nishizawa H, Matsuda M, Nagaretani H, *et al.* Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med* 2002; 8(7):731-737.

Manach C, Regerat F, Texier O, Agullo G, Demigne C and Remesy C. Bioavailability, metabolism and physiological impact of 4-oxo-flavonoids. *Nutr Res* 1996; 16:517-544.

Manach C, Mazur A & Scalbert A. Polyphenols and prevention of cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 2005; 16:77-84.

Martínez J and Moreno JJ Effect of Resveratrol, a Natural Polyphenolic Compound, on Reactive Oxygen Species and Prostaglandin Production. *Biochem Pharmacol.* 2000; 59: 865-870.

Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, *et al.* Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med* 1997; 3:1029-1033.

Matthews D, Hosker J, Rudenski A, Naylor B, Treacher D, Turner R. Homeostasis model assessment: insulin resistance and B-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28:412-419.

Matsushita K, Ishikawa T, Sumita S, Kobayashi T, Ogawa H, Inoue N, *et al.* Comparison of circulating adiponectin and proinflammatory markers regarding their association with metabolic syndrome in Japanese men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26:871-876.

Matsuzawa Y. White adipose tissue and cardiovascular disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2005; 19(4):637-647.

Matsuzawa Y. The metabolic syndrome and adipocytokines. *FEBS Lett* 2006; 580:2917-2921.

McClure JW. Physiology and functions of flavonoids. In J. B. Harborne, T. J. Mabry, & H. Mabry (Eds.), *The Flavonoids*, Ch. 18 (pp. 970– 1055). New York: Academic Press.

Meigs JB, Wilson PW, Nathan DM, D'Agostino RB Sr, Williams K, Haffner SM. Prevalence and characteristics of the metabolic syndrome in the San Antonio Heart and Framingham Offspring Studies. *Diabetes* 2003; 52:2160-2167.

Meng X, Maliakal P, Lu H, Lee MJ, Yang CS. Urinary and plasma levels of resveratrol and quercetin in humans, mice, and rats after ingestion of pure compounds and grape juice. *J Agric Food Chem* 2004; 52:935-942.

Mhairi C. Towler and D. Grahame Hardie. AMP-Activated Protein Kinase in Metabolic Control and Insulin Signaling. *Circ Res* 2007; 100:328-341.

Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implication for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol Rev* 2000; 52 (4):673-751.

Milionis, H.J., Florentin, M. & Giannopoulos, S. Metabolic syndrome and Alzheimer's disease: a link to a vascular hypothesis? *CNS Spectr* 2008;13:606-613.

Milne JC, Lambert PD, Schenk S, Carney DP, Smith JJ, Gagne DJ, *et al.* Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature* 2007; 450:712-716.

Min Y-D, Choi C-H, Bark H, Son H-Y, Park H-H, Lee S, *et al.* Quercetin inhibits expression of inflammatory cytokines through attenuation of NF- κ B and p38 MAPK in HMC-1 human mast cell line. *Inflamm Res* 2007; 56:210-215.

Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Müller C, Carling D, Kahn BB. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* 2002; 17;415(6869):339-43.

Mohanty P, Ghanim H, Hamouda W, Aljada A, Garg R, Dandona P. Both lipid and protein intakes stimulate increased generation of reactive oxygen species by polymorphonuclear leukocytes and mononuclear cells. *Am J Clin Nutr* 2002; 75:767-772.

Morrison CD Leptin resistance and the response to positive energy balance. *Physiology and behaviour* 2008; 94:660-663.

Muoio DM, Dohm GL, Fiedorek FT Jr, Tapscott EB, Coleman RA Leptin directly alters lipid partitioning in skeletal muscle. *Diabetes* 1997; 46:1360-1363.

Myers Jr, MG. Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology. *Rec Prog Horm Res* 2004; 59:287-304.

Naasani I, Oh-Hashi F, Oh-Hara T, Feng WY, Johnston J, Chan K, Tsuruo T. Blocking telomerase by dietary polyphenol is a major mechanism for limiting the growth of human cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res* 2003; 63:824-830.

Neznanov N, Kondratova A, Chumakov KM, et al. Quercetinase pirin makes poliovirus replication resistant to flavonoid quercetin. *DNA Cell Biol* 2008; 27:191-198.

Nielsen S, Guo Z, Johnson CM, Hensrud DD, Jensen MD. Splanchnic lipolysis in human obesity. *J Clin Invest* 2004; 113:1582-1588.

Niswender KD, Morton GJ, Stearns WH, Rhodes CJ, Myers MG, Schwartz MW Intracellular signaling: Key enzyme in leptin-induced anorexia. *Nature* 2001; 413:794-795.

Niswender KD, Baskin DG and Schwartz MW Insulin and its evolving partnership with leptin in the hypothalamic control of energy homeostasis. *Trends Endocrinol Metab* 2004;15(8):362-369.

Ofei F, Hurel S, Newkirk J, Sopwith M, Taylor R Effects of engineered anti-TNF- α antibody(cdp571) on insulin sensivity and glycemic control in patients with niddm. *Diabetes* 1996; 45:881-885.

Okamoto Y, Kihara S, Ouchi N, Nishida M, Arita Y, Kumada M, Ohashi K, Sakai N, Shimomura I, Kobayashi H, Terasaka N, Inaba T, Funahashi T, Matsuzawa Y. Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2002; 26;106(22):2767-2770.

O'Leary KA, de Pascual-Tereasa S, Needs PW, Bao YP, O'Brien NM, Williamson G. Effect of flavonoids and vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription. *Mutat Res* 2004; 551:245-54.

Ohnishi E & Bannai H. Quercetin potentiates TNF-induced antiviral activity. *Antiviral Res* 1993; 22: 327-331.

Olas B, Wachowicz B. Resveratrol, a phenolic antioxidant with effects on blood platelet functions. *Platelets* 2005; 16(5):251-260.

Ono K, Nakane H, Fukushima M, et al. Differential inhibitory effects of various flavonoids on the activities of reverse transcriptase and cellular DNA and RNA polymerases. *Eur J Biochem* 1990; 190:469-476.

Orallo F, Alvarez E, Camiña M, Leiro JM, Gómez E, Fernández P. The possible implication of trans-resveratrol in the cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption. *Mol Pharmacol* 2002; 61:294-302.

Pace-Asciak CR, Hahn S, Diamandis EP, Soleas G, Goldberg DM. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease. *Clin Chim Acta* 1995; 235:207-219.

Palasciano G, Moschetta A, Palmieri VO, Grattagliano I, Iacobellis G, Portincasa P. Non-alcoholic fatty liver disease in the metabolic síndrome. *Curr Pharm Des* 2007; 13(21):2193-2198.

Park CE, Kim MJ, Lee JH, Min BI, Bae H, Choe W, Kim SS. and Ha J. Resveratrol stimulates glucose transport in C2C12 myotubes by activating AMP-activated protein kinase. *Exp Mo Med* 2007; 39(2):222-229.

Paz K, Hemi R, LeRoith D, Karasik A, Elhanany E, Kanety H, Zick Y. A molecular basis for insulin resistance: Elevated serine/threonine phosphorylation of irs-1 and irs-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 1997; 272:29911-28818.

Peluso MR. Flavonoids attenuate cardiovascular disease, inhibit phosphodiesterase, and modulate lipid homeostasis in adipose tissue and liver. *Exp Biol Med (Maywood)* 2006; 231(8):1287-99.

Perreault M, Marette A. Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. *Nat Med* 2001; 7:1138-1143.

Perseghin G, Petersen K and Shulman GI. Cellular mechanism of insulin resistance: potential links with inflammation. *Int J Obes* 2003; 27:S6-S11.

Persichini T, Cantoni O, Suzuki H, Colasanti M Cross-Talk Between Constitutive and Inducible NO Synthase: An Update. *Antioxid redox signal* 2006; 8(6-6):949-953.

Plomgaard P, Bouzakri K, Krogh-Madsen R, Mittendorfer B, Zicrath JR, Pedersen BK. Tumor necrosis factor-alpha induces skeletal muscle insulin resistance in healthy human subjects via inhibition of akt substrate 160 phosphorylation. *Diabetes* 2005; 54:2939-2945.

Profenno LA, Porsteinsson AP and Faraone SV Meta-Analysis of Alzheimer's Disease Risk with Obesity, Diabetes, and Related Disorders. *Biol Psychiatry* 2009;7[Epub ahead of print].

Rahman I, Biswas SK, Kirkham PA Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochem pharmacol* 2006;72:1439-1452.

Randle P, Garland C, Hales C, Newsholme E The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1963. 1;785-789.

Ray PS, Maulik G, Cordis GA, Bertelli AA, Bertelli A and Das DK The red wine antioxidant resveratrol protects isolated rat hearts from ischemia reperfusion injury. *Free Rad. Biol Med* 1999; 27:160-169.

Raz I, Eldor R, Cernea S, Shafrir E. Diabetes: insulin resistance and derangements in lipid metabolism. Cure through intervention in fat transport and storage. *Diabetes Metab Res Rev.* 2005; 21:3-14.

Reaven GM, Chang H, Hoffman BB. Additive hypoglycemic effects of drugs that modify free-fatty acid metabolism by different mechanisms in rats with streptozocin-induced diabetes. *Diabetes* 1988; 37:28-32.

Reaven GM. Banting Lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988; 37:1595-607.

Reaven GM. The insulin resistance syndrome: definition and dietary approaches to treatment. *Annual Review of Nutrition* 2005; 25:391-406.

Renaud S and de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 1992; 339:1523-1526.

Rice-Evans CA, Packer L, (eds). Flavonoids in health and disease. *Marcel Dekker, Inc., New York* 1998.

Richelsen B, Pedersen SB, Moller-Pedersen T, Bak JF. Regional differences in triglyceride breakdown in human adipose tissue: effects of catecholamines, insulin, and prostaglandin E2. *Metabolism* 1991; 40:990-996.

Rimm ER, Katan MB, Ascherio A, Stampfer M and Willet W. Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals. *Ann Intern Med* 1996; 125:384-389.

Roden M, Price TB, Perseghin G, Petersen KF, Rothman DL, Cline GW, et al. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest* 1996; 97:2859-2865.

Rocchini AP Childhood obesity and a diabetes epidemic. *N Eng. J Med* 2002; 346:854-855.

Romero M, Jiménez R, Sánchez M, et al. Quercetin inhibits vascular superoxide production induced by endothelin-1: role of NADPH oxidase, uncoupled eNOS and PKC. *Atherosclerosis* 2008 [Epub ahead of print].

Rösen P, Nawroth PP, King G, Möller W, Tritschler HJ, Packer L. The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. *Diabetes Metab Res Rev* 2001; 17: 189-212.

Rotondo S, Rajtar G, Manarini S, Celardo A, Rotillo D, de Gaetano G. *et al.*, Effect of trans-resveratrol, a natural polyphenolic compound, on human polymorphonuclear leukocyte function. *Br J Pharmacol* 1998; 123:1691-1699.

Russell-Jones D and Rehman K. Insulin-associated weight gain in diabetes – causes, effects and coping strategies. *Diab Obes Metab.* 2007; 9:799-812.

Sadik CD, Sies H, Schewe T. Inhibition of 15-lipoxygenases by flavonoids: structure-activity relations and mode of action. *Biochem Pharmacol.* 2003; 65:773-781.

Sahu A. Leptin signalling in the hypothalamus: emphasis on energy homeostasis and leptin resistance. *Front Neuroendocrinol* 2004; 24:225-253.

Sakamoto K, McCarthy A, Smith D, Green KA, Grahame Hardie D, Ashworth A, Alessi DR. Deficiency of LKB1 in skeletal muscle prevents AMPK activation and glucose uptake during contraction. *EMBO J* 2005. 18; 24 (10):1810-20.

Saltiel, A.R., Kahn, C.R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 2001; 414:799-806.

Sanchez M, Galisteo M, Vera R *et al.* Quercetin downregulates NADPH oxidase, increases eNOS activity and prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2006; 24:75–84.

Santomauro AT, Boden G, Silva ME, Rocha DM, Santos RF, Ursich MJ *et al.* Overnight lowering of free fatty acids with Acipimox improves insulin resistance and glucose tolerance in obese diabetic and non-diabetic subjects. *Diabetes* 1999; 48:1836-1841.

Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2005; 45:287-306.

Scheen AJ, Luyckx FH Obesity and liver disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2002; 16:703-716.

Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 1995 Nov 10; 270(45):26746-26749.

Schewe T, Sadik C, Klotz LO, Yoshimoto T, Kuhn H, Sies H. Polyphenols of cocoa: inhibition of mammalian 15-lipoxygenase. *Biol Chem* 2001; 382:1687-96.

Schlachterman A, Valle F, Wall KM, Azios NG, Castillo L, Morell L, et al. Combined resveratrol, quercetin, and catechin treatment reduces breast tumor growth in a nude mouse model. *Transl Oncol* 2008; 1:19-27.

Sell H, Dietze-Schroeder D, Eckardt K, Eckel J. Cytokine secretion by human adipocytes is differentially regulated by adiponectin, AICAR, and troglitazone. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 343(3):700-706.

Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D, Koo SH, Bardeesy N, Depinho RA, Montminy M, Cantley LC. The kinase LKB1 mediates glucosa homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science* 2005; 310:1642-1646.

Sheu JR, Hsiao G, Chou PH, et al. Mechanisms involved in the antiplatelet activity of rutin, a glycoside of the flavonol quercetin, in human platelets. *J Agric Food Chem* 2004; 52:4414-4418.

Shutenko Z, Henry Y, Pinard E, et al. Influence of the antioxidant quercetin in vivo on the level of nitric oxide determined by electron paramagnetic resonance in rat brain during global ischemia and reperfusion. *Biochem Pharmacol* 1999; 57:199-208.

Simoes Dias A, Porawski M, Alonso M, Marroni N, Collado PS and Gonzalez-Gallego J Quercetin Decreases Oxidative Stress, NF- κ B Activation, and iNOS Overexpression in Liver of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *J Nutrition* 2005; 135:2299-230.

Simón E y Del Barrio AS. Leptina y obesidad. *ANALES Sis San Navarra*. 2002; 25 (suppl 1): 53-64.
Singh I, Carey AL, Watson N, Febbraio MA, Hawly JA. Oxidative stress-induced insulin resistance in skeletal muscle cells is ameliorated by gamma-tocopherol treatment. *Eur J Nutr* 2008;47:387-392.

Singh M, Arseneault M, Sanderson M, Anderson T, Murthy V and Ramassamy C. Challenges for Research on Polyphenols from Foods in Alzheimer's Disease: Bioavailability, Metabolism, and Cellular and Molecular Mechanisms. *J Agric Food Chem* 2008; 56:4855-4873.

Soleas GJ, Angelini M, Grass L, Diamandis EP, Goldberg DM. Absorption of trans-resveratrol in rats. *Methods Enzymol* 2001;335:145-154.

Spedding G, Ratty A, Middleton E Jr. Inhibition of reverse transcriptases by flavonoids. *Antiviral Res* 1989;12:99-110.

St. Leger AS, Cochrane AL, Moore F. Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of wine. *Lancet*. 1979; 1:1017-1020.

Steinberg HO, Tarshoby M, Monestel R, Hook G, Cronin J, Johnson A, et al. Elevated circulating free fatty acid levels impair endothelium-dependent vasodilation. *J Clin Invest* 1997; 100:1230-1239.

Steinberg GR, Smith AC, Wormald S, Malenfant P, Collier C, Dyck DJ. Endurance training partially reverses dietary-induced leptin resistance in rodent skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004 Jan;286(1): E57-E63.

Steinberg GR. Inflammation in obesity is the common link between defects in fatty acid metabolism and insulin resistance. *Cell Cycle* 2007; 6:8:888-894.

Subauste AR and Burant CF. Role of FoxO1 in FFA-induced oxidative stress in adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 293:E159-E164.

Sullivan JE, Brocklehurst KJ, Marley AE, Carey F, Carling D, Beri RK. Inhibition of lipolysis and lipogenesis in isolated rat adipocytes with AICAR, a cell-permeable activator of AMP-activated protein kinase. *FEBS Lett* 1994; 353:33-36.

Sun C, Zhang F, Ge X, Yan T, Chen X, Shi X and Zhai Q. SIRT1 Improves Insulin Sensitivity under Insulin-Resistant Conditions by Repressing PTP1B. *Cell Metabolism* 2007; 6:307-319.

Sweeney G. Leptin signalling. *Cell signalling* 2002; 14:655-663.

Terao J. Dietary flavonoids as antioxidants in vivo: conjugated metabolites of (-)-epicatechin and quercetin participate in antioxidative defense in blood plasma. *J Med Invest.* 1999; 46(3-4):159-168.

Theoharides TC, Alexandrakis M, Kempuraj D, Lytinas M. Antiinflammatory actions of flavonoids and structural requirements for new design. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2001; 14:119-27.

Thorel JM, Bercoff E, Massari P, Droy JM, Chassagne P, Proust B, et al.. Toxicity of 1,2 dichloropropane. A case with portal hypertension. *J Toxicol Clin Exp* 1986; 6 (4):247-252.

Tomas E, Tsao TS, Saha AK, Murrey HE, Zhang Cc C, Itani SI, Lodish HF, Ruderman NB. Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;10; 99(25)16309-163.

Trebbak JT, Glund S, Deshmukh A, Klein DK, Long YC, Jensen TE, Jorgensen SB, Violette B, Andersson L, Neumann D, Wallimann T, Richter EA, Chibalin AV, Zierath JR, Wojtaszewski JF. AMPK-mediated AS160 phosphorylation in skeletal muscle is dependent on AMPK catalytic and regulatory subunits. *Diabetes* 2006; 55:2051-058.

Tripathy D, Mohanty P, Dhindsa S, Tufail S, Ghanim H, Aljada A, Dandona P. Elevation of free fatty acids induces inflammation and impairs vascular reactivity in healthy subjects. *Diabetes* 2003; 52:2882-2887.

Truelsen T, Morten G, Schnohr P, Boysen G . Intake of beer, wine and spirits and risk of stroke. *Stroke* 1998; 29:2647-2672.

Ukkola O, Bouchard C. Clustering of metabolic abnormalities in obese individuals: the role of genetic factors. *Ann Med* 2001; 33:79-90.

Unger RH Minireview: Weapons of Lean Body Mass Destruction: The Role of Ectopic Lipids in the Metabolic Síndrome. *Endocrinology* 2003; 144(12): 159-5165.

Unger RH Lipid overload and overflow: metabolic trauma and the metabolic syndrome. *Trends in Endocrinol Metabo* 2003; 14 No.9:398-403.

Valerio A, Cardile A, Cozzi V, Bracale R, Tedesco L, Pisconti A *et al.* TNF-alpha downregulates eNOS expresión and mitochondrial biogenesis in fat and muscle of obese rodents. *J Clin Invest* 2006; 116:2791-2798.

Van der Woude H, Ter Veld MG, Jacobs N, *et al.* The stimulation of cell proliferation by quercetin is mediated by the estrogen receptor. *Mol Nutr Food Res* 2005; 49:763-771.

Vasselli JR Patterns of hyperphagia in the Zucker obese rat: a role for fat cell size and number? *Brain Res Bull* 1985; 14:633-641.

Venables MC, Hulston CJ, Cox HR, Jeukendrup AE. Green tea extract ingestion, fat oxidation, and glucose tolerance in healthy humans. *Am J Clin Nutr* 2008; 87(3):778-84.

Viollet B, Foretz M, Guigas B, Horman S, Dentin R, Bertrand L, Hue L and Andreelli F. Activation of AMP-activated protein kinase in the liver: a new strategy for the management of metabolic hepatic disorders. *J Physiol* 2006; 574 (1):41-53.

Vitaglione P, Ottanelli B, Milani S, Morisco F, Caporaso N, Fogliano V. Dietary trans-resveratrol bioavailability and effect on CCl4-induced liver lipid peroxidation. *J Gastroenterol Hepatol*.2008; 1-5.

Wallerath T, Deckert G, Ternes T, Anderson H, Li H, Witte K, et al. Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 2002; 106:1652-1568.

Wang C, Mao X, Wang L, Liu M, Wetzel MD, Guan KL, Dong LQ, Liu F. Adiponectin sensitizes insulin signaling by reducing p70 S6 kinase-mediated serine phosphorylation of IRS-1. *J Biol Chem* 2007;282(11):7991-7996.

Weiss R, Dziura J, Burgert TS, Tamborlane WV, Taksali SE, Yeckel CW, et al. Obesity and the metabolic syndrome in children and adolescents. *N Engl J Med* 2004; 350: 362-74.

Weissberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaun M, Leibel RL, Ferrante Jr AW Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003; 112:1796-1808.

Wenjuan Shi Jobgen, Susan K. Fried, Wenjiang J. Fu, Cynthia J. Meininger, Guoyao Wu. Regulatory role for the arginine–nitric oxide pathway in metabolism of energy substrates. *J Nut Biochem* 2006; 17:571–588

Wijkander J, Landstrom TR, Manganiello V, Belfrage P, Degerman E. Insulin-induced phosphorylation and activation of phosphodiesterase 3B in rat adipocytes: possible role for protein kinase B but not mitogen-activated protein kinase or p70 S6 kinase. *Endocrinology* 1998; 139:219-227.

Winder WW, Hardie DG. The AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in Type 2 diabetes. *Am J Physiol* 1999; 277:E1-E10.

Winters B, Mo Z, Brooks-Asplund E, Kim S, Shoukas A, Li D, Nyhan D, and Berkowitz DE. Reduction of obesity, as induced by leptin, reverses endothelial dysfunction in obese (*Lepob*) mice. *J Appl Physiol* 2000; 89:2382-2390.

Wilding JPH. The importance of free fatty acids in the development of Type 2 diabetes. *Diabetes Medicine* 2007; 24:934-945.

Wiseman S, Mulder T, Rietveld A. Tea flavonoids: bioavailability *in vivo* and effects on cell signaling pathways *in vitro*. *Antioxid Redox Signa*. 2001; 3:1009-1021.

Whitehead JP, Richards AA, Hickman IJ, Macdonald GA and Prins JB. Adiponectin – a key adipokine in the metabolic síndrome. *Diab Obes Metab* 2006; 8:264-280.

World Health Organization. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Report of a WHO consultation. Geneva: World Health Organization 1999.

World Health Organization. The World Health Report 2002 *Reducing Risks, Promoting Healthy Life.*, Geneva, 2002.

Wu SQ, Hopfner RL, McNeill JR, Wilson TW, Gopalakrishnan V. Altered paracrine effect of endothelin in blood vessels of the hyperinsulinemic, insulin resistant obese Zucker rat. *Cardiovascular Res* 2000; 45:994-1000.

Wu X, Motoshima H, Mahadev K, Stalker TJ, Scalia R, Goldstein BJ. Involvement of AMP-activated protein kinase in glucose uptake stimulated by the globular domain of adiponectin in primary rat adipocytes. *Diabetes* 2003; 52(6):1355-1363.

Yamashita N, Kawanishi S. Distinct mechanisms of DNA damage in apoptosis induced by quercetin and luteolin. *Free Radic Res* 2000; 33:623-633.

Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, *et al*. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 2002; 8(11):1288-95.

YM Chan A, Dolinsky VW, Soltys CLM, Viollet B, Baksh S, Light PE and Dyck JRB. Resveratrol inhibits cardiac hypertrophy via AMP- activated protein kinase and Akt. *J Biol Chem* 2008.

Yamauchi T, Hara K, Kubota N, Terauchi Y, Tobe K, Froguel P, *et al.* Dual roles of adiponectin/Acrp30 in vivo as an anti-diabetic and anti-atherogenic adipokine. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2003 3(4):243-254. Review.

Yochum L, Kushi LH, Meyer K and Folsom AR. Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women. *Am. J Epidemiol.* 1999; 149:943-949.

Yu C, Shin Y G, Chow A, Li Y, *et al.*, Human, rat and mouse metabolism of resveratrol. *Pharm Res* 2002; 19:1907-1914.

Yu X, McCorkle S, Wang M, Lee Y, Li J, Saha AK, *et al.* Leptinomimetic effects of the AMP kinase activator AICAR in leptin-resistant rats: prevention of diabetes and ectopic lipid deposition. *Diabetologia* 2004; 47:2012-2021.

Yugar-Toledo JC, Tanus-Santos JE, Sabha M, Sousa MG, Cittadino M, Tácito LH, Moreno H Jr, Sabha M. Uncontrolled hypertension, uncompensated type II diabetes, and smoking have different patterns of vascular dysfunction. *Chest* 2004; 125:823-830.

Zang M, Xu S, Maitland-Toolan KA, Zuccollo A, Hou X, Jiang B, *et al.* Polyphenols Stimulate AMP-Activated Protein Kinase, Lower Lipids, and Inhibit Accelerated Atherosclerosis in Diabetic LDL Receptor-Deficient Mice. *Diabetes* 2006; 55:2180- 2191.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature (London)* 1994; 372:425-432.

Zhang HH, Halbleib M, Ahmad F, Manganiello VC, Greenberg AS. Tumor necrosis factor-alpha stimulates lipolysis in differentiated human adipocytes through activation of extracellular signal-related kinase and elevation of intracellular cAMP. *Diabetes* 2002; 51: 2929-2935.

Zhang Y, Guo KY, Diaz PA, Heo M, Leibel RL. Determinants of leptin gene expression in fat depots of lean mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002;282: R226-R234.

Zern TL, West KL, Fernandez ML. Grape polyphenols decrease plasma triglycerides and cholesterol accumulation in the aorta of ovariectomized guinea pigs. *J Nutr* 2003;133: 2268-2272.

Zern TL, Fernandez ML. Cardioprotective effects of dietary polyphenols. *J Nutr* 2005;135:229-2294.

Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 2001; 414:782-787.

Zingarelli B, Szabo C, Salzman AL. Blockade of poly (ADP-ribose) synthetase inhibits neutrophil recruitment, oxidant generation, and mucosal injury in murine colitis. *Gastroenterology* 1999; 116 (2):335-345.

Zini, R., Morin, C., Bertelli, A., Bertelli, A.A. and Tillement, J.P. Effects of resveratrol on the rat brain respiratory chain. *Drugs Exp Clin Res* 1999; 25:87-97.

Zucker L and Zucker TJ. *Hered.* 1968; 52:275-278.