

# UNIVERSIDAD DE GRANADA

PROGRAMA OFICIAL DE DOCTORADO EN NUTRICIÓN HUMANA

## **Estudio experimental del efecto de ingredientes alimentarios funcionales sobre la ingesta de alimento, peso corporal y utilización digestiva y metabólica de nutrientes. Posible utilización en dietas para sobrepeso y obesidad**

**Experimental study of the effect of functional food ingredients on food  
intake, body weight and digestive and metabolic utilization of nutrients.  
Possible application in diets for overweight and obesity**

Tesis doctoral con Mención Internacional presentada por:

**Jesús Manuel Alcalá-Bejarano Carrillo**

Bajo la dirección de los doctores:

**Emilio Martínez de Victoria Muñoz**

**María Dolores Yago Torregrosa**

**Mariano Mañas Almendros**



Instituto de Nutrición y  
Tecnología de los  
Alimentos "José Mataix  
Verdú"



Universidad de Granada  
Departamento de Fisiología  
Facultad de Farmacia





D. Emilio Martínez de Victoria Muñoz, Catedrático del Departamento de Fisiología de la Universidad de Granada.

Dña. María Dolores Yago Torregrosa, Profesora Titular del Departamento de Fisiología de la Universidad de Granada.

D. Mariano Mañas Almendros, Catedrático del Departamento de Fisiología de la Universidad de Granada.

Informan:

Que el trabajo titulado “Estudio experimental del efecto de ingredientes alimentarios funcionales sobre la ingesta de alimento, peso corporal y utilización digestiva y metabólica de nutrientes. Posible utilización en dietas para sobrepeso y obesidad” ha sido realizado por Jesús Manuel Alcalá-Bejarano Carrillo bajo su dirección y reúne todos los requisitos para ser defendido y optar al grado de Doctor.

Y para que conste donde proceda, se firma este informe en Granada a 29 de Octubre de 2014.

D. Emilio Martínez de Victoria Muñoz

Dra. M<sup>a</sup> Dolores Yago Torregrosa

D. Mariano Mañas Almendros



El doctorando Jesús Manuel Alcalá-Bejarano Carrillo y los directores de la tesis Emilio Martínez de Victoria Muñoz, María Dolores Yago Torregrosa y Mariano Mañas Almendros. Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada 29/10/2014

Director/es de la Tesis

Doctorando

Fdo.:

Fdo.:



Este estudio forma parte del proyecto PRONAOS, incluido en el programa CENIT (Consortios Estratégicos Nacionales de Investigación Técnica), en el cual colaboran la empresa Biosearch Life® y la Universidad de Granada.





Nunca te olvides de sonreír, porque el día en que no sonrías será un día perdido.



# ABREVIATURAS

*Ninguna condición es permanente; ninguna condición es fiable;  
nada es ser. (Sidartha Gautama)*



AA	Aminoácido ( <i>Amino acid</i> )
AgRP	Péptido relacionado con la proteína agoutí ( <i>Agouti-Related Peptide</i> )
AMY	Amilina ( <i>Amylin</i> )
AP	Área postrema ( <i>Area postrema</i> )
BAT	Tejido adiposo marrón ( <i>Brown adipose tissue</i> )
BBB	Barrera hematoencefálica ( <i>Blood-brain barrier</i> )
BMI	Índice de Masa Corporal ( <i>Body Mass Index</i> )
BW	Peso corporal ( <i>Body weight</i> )
CART	Transcrito regulado por cocaína y anfetamina ( <i>Cocaine and amphetamine regulated transcript</i> )
CCK	Colecistoquinina ( <i>Cholecystokinin</i> )
CNS	Sistema nervioso central ( <i>Central nervous system</i> )
DIO	Obesidad inducida por la dieta ( <i>Diet-induced obesity</i> )
ENS	Sistema nervioso entérico ( <i>Enteric nervous system</i> )
EEC	Células enteroendocrinas ( <i>Enteroendocrin cells</i> )
GIP	Péptido insulínico dependiente de glucosa ( <i>Glucose-dependent insulintropic peptide</i> )
GLP-1	Péptido similar al glucagón-1 ( <i>Glucagon-Like Peptide-1</i> )
GP	Péptidos Gastrointestinales ( <i>Gastrointestinal peptides</i> )

GRN	Grelina ( <i>Ghrelin</i> )
HFD	Dietas con alto porcentaje de grasa ( <i>High Fat Diet</i> )
HDC	Hidratos de carbono ( <i>Carbohydrates</i> )
HOSO	Aceite de girasol alto oleico ( <i>High oleic sunflower oil</i> )
INS	Insulina ( <i>Insulin</i> )
IOTF	Grupo internacional de trabajo sobre obesidad ( <i>International Obesity Task Force</i> )
i.p.	Intraperitoneal ( <i>Intraperitoneal</i> )
i.v.	Intravenoso ( <i>Intravenous</i> )
LEP	Leptina ( <i>Leptin</i> )
LPB	Núcleo lateral parabraquial ( <i>Lateral parabrachial nucleus</i> )
NPY	Neuropéptido Y ( <i>Neuropeptide Y</i> )
NTS	Núcleo del tracto solitario ( <i>Nucleus Tractus Solitarius</i> )
OGTT	Test de tolerancia oral a la glucosa ( <i>Oral glucose tolerance test</i> )
POMC	Péptido precursor de la Pro-opiomelanocortina ( <i>Pro-opiomelanocortin peptide precursor</i> )
PP	Polipéptido pancreático ( <i>Pancreatic polypeptide</i> )
PYY	Péptido tirosina tirosina ( <i>Peptide YY</i> )
T2DM	Diabetes mellitus tipo 2 ( <i>Type 2 diabetes mellitus</i> )
TG/s	Triglicérido/s ( <i>Triglyceride/s</i> )

TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa ( <i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i> )
WAT	Tejido adiposo blanco ( <i>White adipose tissue</i> )
WHO	Organización Mundial de la Salud ( <i>World Health Organization</i> )





# AGRADECIMIENTOS

*“Como un sueño, todo lo que disfruto se convertirá en recuerdo”  
(Sidartha Gautama)*



Debería haber otro índice para todas aquellas personas que con su ayuda, ánimo y cariño han contribuido con su granito de arena a esta tesis. Ese índice se guarda en el corazón y día a día se va haciendo más grande y completo, haciéndonos más grandes y mejores.

Se cierra una etapa y se inicia otra nueva en la que espero estar acompañado por esas personas y muchas más. Como suele decirse, es de bien nacido...., así que me gustaría dar gracias a las siguientes personas (falta gente que no son menos):

M. Carmen y Rafael, las personas que me lo han dado todo y me ha enseñado a esforzarme cada día más y mejor, mi ejemplo a seguir, os quiero.

Rosuchi, Taty, Cuña y Antoñico, sois parte de mí y os quiero como a nada.

A mi familia de Priego, Cataluña y Mallorca, aunque nos veamos de vez en cuando, son el mejor apoyo en los momentos importantes.

Mariano, Dolo y Emilio por confiar en mí, y por todo su esfuerzo y conocimientos para hacer posible esta tesis, me acordaré siempre del día en el que te mandé el correo Dolo!!.

Jesús y Gloria, por sus enseñanzas y sugerencias.

Me gustaría agradecer a la empresa Biosearch S. A, en especial a Mónica, Juristo, Luis y Manuel por su ayuda y la posibilidad de haber desarrollado este proyecto.

Canillo y Lupe, sabéis que soy el tito político del pequeño Elián y que me tenéis aquí para lo que haga falta. A mis biólogos y biólogas, Jarichuelis (y Juanlu), Clau, Elo, Arcas y Emlio, por esos días de excursiones, comedores, estudio, vogue y demás recuerdos. Además a los psicólogos, médicos y sector almeriense, Sasi y Guille, Lili y Diego, Maribélie, Curro, Víctor, Ana, Antonio, Andrés, Vero, Elena y Tomás, Ali y Chema, por esas jamonadas, cumpleaños y bodas..., por todos esos momentos que hemos pasado juntos y que pasaremos.

Cantero y Ali, valéis oro y lo sabéis. Jose, Marta, Mari, Gema, Pere, Edu y Laura, gracias por esos momentos, sabéis que aquí tenéis un amigo. Pape y Gema, en el futuro habrá más días de playa, lo sé. A Mari (Migue) y Pagul, por pasar la cabra "conmigo". A mis compis Sandra (y Cris), Laura y Adeline (Pablo y Corentin), por ese año tan bueno y los momentos que hemos pasado. Inesita, cuya sabiduría y bondad no tienen límites. Ameer y Cristina, *thanks for all!!* A Rafa, sin palabras. A Susana y *family*, por su ayuda y amistad, os llevo conmigo. A Dory, que sabe que vale millones y seguiré apostando por ello. Carlos y Jo, por ser los mejores guía en tierras frías. Mari Cruz y los *warnings!*

Estefanía, Josune y Miriam Alejandra, por ser tan apañadas. Dj bedca, por alegrarme el último tramo de la tesis. Vivi y Laura por ser unas máquinas en todos los aspectos. Óscar, por su valiosa amistad. Carola y Belén por ser mis maestras en el laboratorio. Gracias Alba por tu alegría y ayuda. Soto y Miguel, por ser personas como pocas hay. Shailis, solo un poco de relax!

Thanks to the people in CPH for the kind help and the moments that we spent together (Jens, Rune, Nicolai, Mónica, Suku, Bolette, Johanne, Nicolai, Radeck and Weronica, Nicoleta and Pedro).

Al grupo de Farmacia, Chari (Luismi)-Garry-Dani, *the perfect team*. Anilla y su furor. Elena, Lucía, Irene, Virginia, Pili, Carlos, Gerry, Cristina, y Encarna, por todos esos momentos dentro y fuera del laboratorio.

A mis compañeros y compañeras del CIBM (Puri, Carolina González, Dimas, Azahara, Fran, Ignacio, Julio, Sergio, Erika, Luis, María, Carolina Gómez, Samantha, Marina, Carmen, Angie...), por todos los momentos fuera y dentro del trabajo, vuestra ayuda, apoyo y cariño.

A María, Pilar, Ángel, Chiqui y MD por su ayuda en los momentos cruciales.

A mis compañeros y compañeras del Máster (Roberto, Ana y Viti, Aitor, Olga, Marta y Rodia, Eva, Adrián, Triana, Miriam y Edu...) porque aunque haya distancia, la amistad no se termina.

A los de "Darío" (Elena, Santos, Carolina, Laura, Marta, Huayqui, Carla...), porque vuestro vecino lo seré siempre.

Al personal del CIBM y de Farmacia (Rosa, Charo, Mercedes, Luismi, Toñi, Indalecio, Pablo, Ana vet. y Cristina...), por vuestra simpatía y ayuda en el día a día, que hace pasar los días más a gusto.

# ÍNDICE

*Un monje le preguntó a Yun Men: “¿Qué son las enseñanzas de toda una vida?”. Yun Men dijo: “Una declaración apropiada”. (Los anales del acantilado azul)*



<b>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b>	<b>31</b>
<b>ANTECEDENTES</b>	<b>35</b>
<b>2. OBESIDAD</b>	<b>37</b>
2.1. DEFINICIÓN, TIPOS, EPIDEMIOLOGÍA Y REPERCUSIONES SOBRE LA ECONOMÍA	37
2.1.1. Definición	37
2.1.2. Tipos de obesidad	39
2.1.3. Epidemiología	39
Obesidad adulta	39
Obesidad infantil	42
2.1.4. Repercusiones en la economía	45
2.2. ETIOLOGÍA	45
2.2.1. Factores genéticos	45
2.2.2. Factores fisiológicos y ambientales	47
Factores sensoriales	
Factores nerviosos	
Factores endocrinos	
Factores psicológicos	
Factores ambientales	
2.2.3. Actividad física	48
2.3. EL TEJIDO ADIPOSO Y EL ADIPOCITO	48
2.3.1. El tejido adiposo y el adipocito	48
2.3.2. Lipogénesis y lipólisis	50
2.4. TRASTORNOS ASOCIADOS Y CONSECUENCIAS MÉDICAS	51
2.4.1. Trastornos asociados	51
Diabetes	51
Enfermedades cardiovasculares	52
Problemas respiratorios	52
Síndrome metabólico	53
Otros trastornos	53
2.5. ESTRATEGIAS CONTRA LA OBESIDAD	53



2.5.1. Tratamiento farmacológico	53
Fármacos, péptidos gastrointestinales y análogos	53
2.5.2. Cirugía	54
2.5.3. Tratamiento dietético	55
Componentes alimentarios y alimentos funcionales	55
Grasa y saciedad	57
Sistemas de liberación de lípidos	58
2.5.4. Terapia del comportamiento	62
2.6. MODELOS PARA EL ESTUDIO DE LA OBESIDAD	63
2.6.1. Celulares	63
2.6.2. Animales	63
<b>3. REGULACIÓN DEL PESO CORPORAL. BALANCE DE ENERGÍA</b>	<b>66</b>
3.1. INTRODUCCIÓN	66
3.2. ENTRADA DE ENERGÍA (INGESTA DE ALIMENTOS) Y SU REGULACIÓN	67
3.2.1. Recepción y generación de señales	67
Señales sensoriales y cognitivas	67
Señales generadas en el sistema digestivo y páncreas	68
Amilina (AMY)	69
Colecistoquinina (CCK)	74
Péptido insulínico dependiente de glucosa (GIP)	80
Péptido análogo al glucagón-1 (GLP-1)	84
Grelina (GRN)	89
Insulina (INS)	94
Polipéptido pancreático (PP)	98
Péptido tirosina tirosina (PYY)	101
Señales generadas en el tejido adiposo	104
Leptina (LEP)	104
Señales directas debidas a nutrientes	109
Otras señales	111
Ritmos circadianos	113
Estrés	113
3.2.2. Integración de las señales en el CNS	113

3.2.3. Otros factores que influyen en la ingesta de alimentos	116
Recompensa	116
Memoria y aprendizaje	117
Variedad	117
3.3. SALIDA DE ENERGÍA. GASTO ENERGÉTICO Y SU REGULACIÓN	118
3.3.1. Regulación del gasto energético	119
3.4. INTEGRACIÓN DE LA REGULACIÓN DE LA INGESTA Y EL GASTO ENERGÉTICO	119
3.4.1. Fase sensorial y cognitiva	120
3.4.2. Fase post-ingestión	121
<b>4. UTILIZACIÓN NUTRITIVA DE PROTEÍNA Y GRASA</b>	<b>124</b>
4.1. CONCEPTOS	124
4.2. FACTORES QUE AFECTAN A LA UTILIZACIÓN NUTRITIVA	124
4.2.1. Dependientes de la dieta	124
Proteína	124
Cantidad y calidad proteica	
Interacción con otros nutrientes	
Estructura de la matriz del alimento	
Componentes antinutricionales	
Grasa	125
Interacción con otros nutrientes	
4.2.2. Dependientes del modelo experimental	126
Estado fisiológico (obesidad)	126
Proteína	126
Grasa	128
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>130</b>
<b>1. ESTUDIO EXPERIMENTAL EN ANIMALES</b>	<b>132</b>
1.1. ANIMALES	132
1.2. JAULAS	132
1.3. INGREDIENTES FUNCIONALES	133
1.4. DIETAS	133

1.4.1. PREPARACIÓN DE LA DIETA CONTROL, E1, E2 Y E3	135
Procedimiento	
1.5. ANÁLISIS DE LAS DIETAS	135
1.5.1. HUMEDAD	135
1.5.2. CENIZAS	135
1.5.3. PROTEÍNA, GRASA Y CARBOHIDRATOS TOTALES	135
1.6. DISEÑO EXPERIMENTAL	136
1.6.1. EXPERIMENTO I (CORTO PLAZO)	136
1.6.2. EXPERIMENTO II (LARGO PLAZO)	137
1.6.3. EXPERIMENTO III	
(LARGO PLAZO CON INDUCCIÓN PREVIA DE OBESIDAD)	138
1.7. CONTROL DE LA INGESTA Y DEL PESO	139
1.8. ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE PÉPTIDOS	
GASTROINTESTINALES Y HORMONAS	140
1.8.1. DISEÑO DEL ESTUDIO Y PROCEDIMIENTO DE RECOGIDA DE MUESTRAS	
DE SANGRE	140
1.8.2. PROCESADO DE MUESTRAS	141
1.8.3. MEDICIÓN DE CONCENTRACIONES	141
Determinación de AMY (activa), GRN (activa), GIP (total), GLP-1 (activo), LEP,	
INS, PP y PYY (total).	141
Fundamento	141
Equipo	143
Reactivos y material	143
Procedimiento	144
Determinación de CCK	145
Fundamento	145
Equipo	146
Reactivos y material	146
Procedimiento	147
1.9. ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE NITRÓGENO EN HECES Y ORINA, Y DE GRASA	
EN HECES	148
RECOGIDA DE LAS MUESTRAS	148

1.9.1. PROCESADO DE LAS MUESTRAS	148
Orina	148
Heces	148
1.9.2. ANÁLISIS DE MUESTRAS	148
Contenido en nitrógeno (heces y orina)	148
Contenido en grasa (heces)	148
1.9.3. ÍNDICES BIOLÓGICOS	149
1.10. CURVA DE GLUCEMIA (EXPERIMENTO III)	149
1.10.1. FUNDAMENTO	149
1.10.2. REACTIVOS Y MATERIAL	149
1.10.3. PROCEDIMIENTO	150
1.11. EUTANASIA Y OBTENCIÓN DE ÓRGANOS <i>POSTMORTEN</i>	150
1.11.1. EUTANASIA	150
1.11.2. OBTENCIÓN Y CONSERVACIÓN DE LOS ÓRGANOS	150
1.12. DETERMINACIÓN DE COLESTEROL Y TRIGLICÉRIDOS EN HÍGADO	151
1.12.1. FUNDAMENTO	151
1.12.2. REACTIVOS Y MATERIAL	151
1.12.3. PROCEDIMIENTO	152
Extracción	
Medición de triglicéridos	
Medición de colesterol	
Lectura y análisis de los resultados	
1.13. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DE SANGRE TOMADAS AL SACRIFICIO	153
1.13.1. HEMOGRAMA	153
1.13.2. ANÁLISIS BIOQUÍMICO DEL PLASMA	153
<b>2. ESTUDIO EXPERIMENTAL EN HUMANOS</b>	<b>154</b>
2.1. VOLUNTARIOS	154
2.2. PRODUCTOS	154
2.3. DISEÑO EXPERIMENTAL	154
2.4. ESTUDIO DE SACIEDAD	155
2.5. ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE PÉPTIDOS GASTROINTESTINALES	156

2.5.1. DISEÑO DEL ESTUDIO Y PROCEDIMIENTO	
DE RECOGIDA DE MUESTRAS DE SANGRE	156
2.5.2. PROCESADO DE MUESTRAS	156
2.5.3. MEDICIÓN DE CONCENTRACIONES	157
Determinación de GRN (activa), GIP, LEP, INS, PP y PYY (total).	
<b>3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y CÁLCULO DE LAS VARIABLES</b>	<b>158</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>160</b>
<b>1. COMPOSICIÓN DE LAS DIETAS Y DISEÑO EXPERIMENTAL</b>	<b>162</b>
<b>2. EXPERIMENTOS EN RATAS CON NORMOPESO</b>	<b>162</b>
2.1. CORTO PLAZO	162
2.1.1. Ingesta	162
2.1.2. Peso corporal y de órganos	165
Evolución ponderal	
Peso corporal y de órganos al sacrificio	
2.1.3. Concentración plasmática de hormonas gastrointestinales	168
2.1.2. Largo plazo	174
Ingesta	174
2.1.4. Peso corporal	177
Evolución ponderal	177
Peso corporal y de órganos al sacrificio	179
2.1.5. Concentración plasmática de hormonas gastrointestinales	182
<b>3. EXPERIMENTO EN RATAS OBESAS</b>	<b>189</b>
3.1. PERIODO DE INDUCCIÓN DE OBESIDAD POR LA DIETA	189
3.1.1. Ingesta	189
3.1.2. Evolución ponderal	190
3.2. PERIODO EXPERIMENTAL	191
3.2.1. Ingesta	191
3.2.2. Peso corporal y de órganos	194
Evolución ponderal	194
Peso corporal y de órganos al sacrificio	196

3.2.3. Curva de glucemia	200
3.2.4. Concentración plasmática de hormonas gastrointestinales	202
<b>4. PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS</b>	<b>207</b>
4.1. PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS	207
4.2. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS PLASMÁTICOS Y HEPÁTICOS	210
<b>5. EXPERIENCIA EN HUMANOS</b>	<b>212</b>
5.1. Dieta del periodo experimental	212
5.2. Concentración plasmática de hormonas gastrointestinales	214
5.3. Parámetros de saciedad y hambre	218
<b><i>DISCUSIÓN</i></b>	<b>219</b>
<b>1. ASPECTOS GENERALES</b>	<b>221</b>
<b>2. EXPERIMENTOS EN RATAS NORMOPESO</b>	<b>223</b>
2.1. CORTO PLAZO	223
2.1.1. Ingesta	223
2.1.2. Evolución ponderal	224
2.1.3. Peso corporal y de órganos al sacrificio	224
2.1.4. Parámetros e índices de utilización nutricional de proteína y grasa	224
2.1.5. Concentración plasmática de hormonas gastrointestinales	225
2.2. LARGO PLAZO	231
2.2.1. Ingesta	231
2.2.2. Evolución ponderal	232
2.2.3. Peso corporal y de órganos al sacrificio	232
2.2.4. Parámetros e índices de utilización nutricional de proteína y grasa	232
2.2.5. Parámetros hematológicos y bioquímicos	233
2.2.6. Concentración plasmática de hormonas gastrointestinales	234
<b>3. EXPERIMENTOS EN RATAS OBESAS</b>	<b>241</b>
3.1. Modelo de obesidad	241
3.2. Experimento con ratas obesas	241
3.2.1. Ingesta	241
3.2.2. Evolución ponderal	242

3.3. Parámetros e índices de utilización nutricional de proteína y grasa	242
3.4. Parámetros hematológicos y bioquímicos	243
3.5. Concentración plasmática de hormonas gastrointestinales	243
<b>4. COMPARACIÓN ENTRE RATAS NORMOPESO DE LA EXPERIMENTO A CORTO PLAZO Y A LARGO PLAZO</b>	<b>250</b>
<b>5. COMPARACIÓN ENTRE RATAS NORMOPESO Y OBESAS</b>	<b>256</b>
<b>6. ESTUDIO EN HUMANOS</b>	<b>260</b>
6.1. CONCENTRACIONES DE GP	260
6.2. SACIEDAD Y HAMBRE	263
<b><i>CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS</i></b>	<b>265</b>
<b><i>SUMMARY</i></b>	<b>271</b>
<b>1. INTRODUCTION</b>	<b>273</b>
<b>1. RATIONALE AND AIMS OF THE STUDY</b>	<b>275</b>
<b>2. METHODOLOGY</b>	<b>275</b>
2.1. STUDIES IN RATS	275
2.2. STUDIES IN HUMANS	277
<b>3. RESULTS AND DISCUSSION</b>	<b>277</b>
3.1. SHORT TERM RAT STUDY (Experiment I)	277
3.2. LONG TERM STUDY IN NORMAL WEIGHT RATS (Experiment II)	278
3.3. LONG TERM STUDY IN DIETARY OBESE RATS (Experiment III)	279
3.4. ACUTE STUDY IN HUMANS	281
<b>4. CONCLUSIONS</b>	<b>281</b>
<b><i>REFERENCIAS</i></b>	<b>283</b>
<b><i>ANEXO</i></b>	<b>343</b>

# JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

*“El conocimiento habla, la sabiduría escucha”  
(Jimi Hendrix)*





Ya decía el filósofo Feuerbach por el siglo XVII: “Somos lo que comemos”, que bien se podría traducir de una forma más científica como “Lo que comes influirá en tu organismo”.

Desde que existe vida como tal, ésta siempre ha necesitado adquirir materia y energía exógena para poder perpetuarse, adquisición que evolutivamente se ha ido haciendo más compleja hasta llegar a estar perfectamente regulada en el reino animal. En el ser humano, esta situación se vuelve aún más complicada ya que éste puede elegir el tipo, cantidad y calidad (dentro de unos límites económicos) de los alimentos que come, estando muy influenciado por el efecto placentero que ciertas comidas producen en el cerebro y que pueden llegar a convertirse en una adicción con los consecuentes problemas que ello supone. Poco a poco, este hecho de ser consciente y sentir placer por la comida, ha derivado de una alimentación para subsistir, a puro hedonismo, circunstancia que casualmente casa con el hecho de que los alimentos que nos reportan un mayor placer son más calóricos. Ello ha ido generando un ambiente obesogénico que se ha ido propagando primeramente en los países desarrollados y cuyo contagio a los países en vías de desarrollo está siendo inevitable. El problema ha ido adquiriendo tintes de epidemia, siendo reconocido por organismos como la Organización Mundial de la Salud/*World Health Organization* (OMS/WHO) o el Grupo Internacional de Trabajo sobre Obesidad/*International Obesity Task Force* (IOTF), que desde finales del siglo pasado a principios de éste ha llevado a plantear una serie de estrategias para impedir su propagación, entre las que se encuentran una mejora de la educación en materia de alimentación y actividad física, la creación de leyes que favorezcan los alimentos más saludables o el desarrollo de alimentos funcionales que complementen al resto de estrategias.

En la línea comentada anteriormente, se ha realizado esta Tesis Doctoral desarrollada dentro del Proyecto PRONAOS, el cual es una aportación a favor de la estrategia NAOS (Nutrición, Actividad física y Prevención de la Obesidad), auspiciada por los estados miembros de la Organización Mundial de la Salud y cuyo objetivo principal es la prevención de la obesidad. Se ha realizado en el Departamento de Fisiología y el Instituto de Nutrición de la Universidad de Granada en colaboración con la empresa Biosearch Life®. Dicho proyecto a su vez se enmarca en el Programa CENIT (Consortios

Estratégicos Nacionales de Investigación Técnica), el cual pretende incentivar la colaboración público-privada para el desarrollo de proyectos de investigación y constituye uno de los instrumentos del Programa Ingenio 2010, recogido en las estrategias de investigación y desarrollo del Gobierno Español en el campo científico-tecnológico.

El objetivo general planteado para esta Tesis Doctoral ha consistido en evaluar el efecto de tres ingredientes funcionales, facilitados por la empresa mencionada, utilizando en una primera fase la rata Wistar (tanto normopeso como obesas inducidas por la dieta) y en una segunda, humanos sanos con normopeso. Todo este trabajo queda englobado en un objetivo global (en conjunción con otros centros de España), que consiste en el desarrollo de alimentos funcionales que ayuden a prevenir la obesidad (Proyecto PRONAOS).

Para abordar este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- 1 Cambios en la ingesta de alimento.
- 2 Evolución ponderal.
- 3 Utilización digestiva y metabólica de la proteína y digestiva de grasa.
- 4 Determinación de las concentraciones plasmáticas, en ayuno y postprandiales, de los péptidos gastrointestinales amilina (AMY), grelina (GRN), colecistoquinina (CCK), péptido similar al glucagón 1 (GLP-1), péptido insulino-trópico dependiente de glucosa (GIP), polipéptido pancreático (PP) y péptido tirosina tirosina (PYY) y de las hormonas leptina (LEP) e insulina (INS), en el caso de las ratas, y GRN, LEP, INS, GIP, PP y PYY en humanos.
- 5 Evaluación de distintos parámetros de hambre y saciedad en humanos.

# ANTECEDENTES

*La confusión condiciona la actividad, la cual condiciona la conciencia, la cual condiciona la personalidad encarnada, la cual condiciona la experiencia sensorial, la cual condiciona el impacto, el cual condiciona el estado de ánimo, el cual condiciona el ansia, la cual condiciona el aferramiento, el cual condiciona el devenir, el cual condiciona el nacimiento, el cual condiciona el envejecimiento y la muerte.*

*(Sidartha Gautama)*



# 1. OBESIDAD

## 1.1. DEFINICIÓN, TIPOS, EPIDEMIOLOGÍA Y REPERCUSIONES SOBRE LA ECONOMÍA

### 1.1.1. Definición

Ya en los años 50, investigadores como Jean Vague [1] proponían que el exceso de grasa en el tronco (obesidad androide) podía acarrear mayores problemas metabólicos que la grasa acumulada en los miembros (obesidad ginoide) [1]. Esta observación ha sido confirmada en estudios tanto prospectivos como transversales siendo dicha acumulación de grasa visceral, un factor determinante en el síndrome metabólico e influyente en otros trastornos como la resistencia a la INS y otras enfermedades crónicas [2].

Posteriormente, en 1985, la *Metropolitan Life Insurance Company* desarrolló tablas de peso/altura para determinar el peso ideal e identificar la obesidad, llegando a la conclusión de que más de un 20% por encima del peso ideal constituía un riesgo. Este sistema tenía el defecto de que se basaba en un pequeño grupo de población, por ello el *National Institutes of Health* (NIH) propuso adoptar el índice de Quetelet o *Body Mass Index* (BMI) como medida de consenso, que consistía en el peso en kilos dividido por la estatura en metros elevada al cuadrado. Este índice es igualmente propuesto en los 90 por la *Organización Mundial de la Salud* (WHO) [3] como medida estándar, que a día de hoy sigue siéndolo, y que muestra una visión general del estado de la población. No obstante el BMI a nivel clínico, es un método de clasificación inexacto que subestima la gravedad de la situación y puede contribuir al fracaso del tratamiento. A día de hoy, el método más eficaz para conocer la adiposidad del individuo es la absorciometría dual de rayos X o *Dual-Energy X-Ray Absorptiometry* (DEXA) [4].

Los puntos de corte del BMI propuestos por la WHO se muestran en la Tabla 1 [5] y son los que se adoptan tanto en las guías clínicas como en los estudios de obesidad.

Table 1. The international classification of adult underweight, overweight and obesity according to BMI

<b>CLASSIFICATION</b>	<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>
<b>UNDERWEIGHT</b>	<18.5
Severe thinness	<16.00
Moderate thinness	16.00-16.99
Mild thinness	17.00-18.49
<b>NORMAL RANGE</b>	18.50-24.99
<b>OVERWEIGHT</b>	≥25.00
Pre-obese	25.00-29.99
<b>OBESE</b>	≥30.00
Obese class I	30.00-34.99
Obese class II	35.00-39.99
Obese class III	>40.00

Taken from the WHO [5].

### **1.1.2. Tipos de obesidad**

Dependiendo de la distribución de la grasa en el cuerpo se pueden diferenciar cuatro tipos de obesidad [6]:

- Tipo I: Exceso de grasa con distribución homogénea.
- Tipo II: Exceso de grasa abdominal-troncal (obesidad androide).
- Tipo III: Exceso de grasa abdominal-visceral.
- Tipo IV: Exceso de grasa glúteo-femoral (obesidad ginoide).

Por otra parte, dependiendo de la forma en que acumulen dicha grasa los adipocitos, se puede diferenciar entre [7]:

- Obesidad hiperplásica: Incremento del número de adipocitos.
- Obesidad hipertrófica: Crecimiento del tamaño de los adipocitos sin aumento del número.

### **1.1.3. Epidemiología**

La liberación en el comercio global, el aumento de los ingresos familiares y la urbanización ha hecho que se cree un ambiente obesogénico propicio para que se produzca un aumento en la ingesta calórica y una reducción en la actividad física, resultando en un balance positivo de energía que a largo plazo se convertirá en una acumulación de tejido graso [8].

### ***Obesidad adulta***

La carga global de enfermedades no hereditarias continúa creciendo año tras año, constituyendo unos de los mayores retos a los que se enfrentan los países desarrollados en el siglo XXI. Las enfermedades cardiovasculares, diabetes, cáncer y enfermedades crónicas respiratorias representaron 35 millones de muertes en 2005, lo que supone el 60% de todas las defunciones globales. Todo esto no pasó desapercibido en el mundo, proponiéndose en 2008 una estrategia para combatir esta lacra, la cual se basó en diferentes objetivos como realizar mapas epidemiológicos, reducir la exposición al tabaco, a las dietas insanas y reducir la inactividad física, así como la elaboración de estrategias concretas basadas en evidencias científicas [9].



De acuerdo con la WHO [10], el 10% y el 14% de hombres y mujeres (respectivamente) mayores de 20 años presentaban obesidad en 2008. De estos adultos, 2.8 millones mueren cada año, lo que hace de este el mayor problema de salud pública en numerosas partes del mundo. Por otro lado la *International Obesity Task Force* (IOTF), estimaba en el año 2010, la existencia de 1 billón de adultos con sobrepeso (BMI 25-29.9 kg/m<sup>2</sup>) de los que 475 millones eran obesos (BMI ≥30 kg/m<sup>2</sup>). En la Figura 1 se pueden observar según la IOTF, los datos más actuales de prevalencia de obesidad (que van del 2008 al 2012, dependiendo del país).

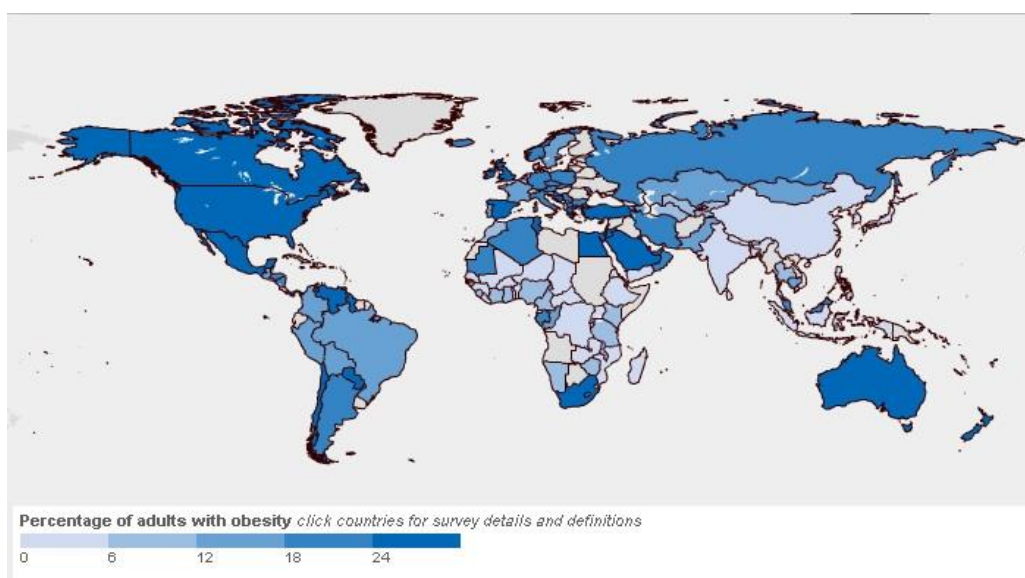


Figure 1. Prevalence of obesity, males and females, ages 20+. Taken from International Obesity Task Force (IOTF) (Data from 2008 to 2012. The period varies depending on the country).

Uno de los primeros estudios y hasta la fecha el más completo, que analiza la prevalencia de la obesidad y los trastornos asociados en Europa (incluyendo además algunos países como Australia, China y USA) es el WHO MONICA (*Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease*). En él se examinó la evolución temporal de los factores de riesgo de la enfermedad cardiovascular en 21 países con voluntarios

de entre 35 y 64 años de edad. Comenzó en 1980 y finalizó en 1995, observándose hechos como un mayor BMI en los países del este en comparación con los del oeste, tanto al inicio como al final del estudio, hecho cuyo origen no parece tener un patrón claro ya que, por ejemplo, en algunos países como España la ingesta energética es grande debido a la ingesta de grasa total y dulces, pero en otros como Finlandia es debido aparte de dulces, a otro tipo de alimentos [11].

Unos años después, en 1997, el *Institute of European Food Studies* (IEFS) realizó un estudio cuyo objetivo era conocer la situación de sobrepeso y obesidad en los 15 países pertenecientes a la Unión Europea, con un total de 1000 participantes de cada país. Este arrojó unos porcentajes elevados de obesidad en adultos, en torno al 12% en Reino Unido y 11% en España [12,13].

Otro estudio a destacar es el EPIC (*European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*), llevado a cabo por la *International Agency for Research on Cancer* (IARC) en una población de 50-65 años y con un periodo de recogida de datos de entre 1992 y 2000, y en el cual participaron 23 centros de 10 países. El objetivo principal giraba en torno al estudio de la etiología del cáncer en relación con el estilo de vida y los hábitos alimentarios, aunque su diseño lo ha hecho útil también para investigar factores genéticos, nutricionales y hormonales [14]. En la cohorte Diógenes se observó tras un periodo de seguimiento de 6 años, que la obesidad aumentó de un 13% a un 17% tanto en hombres como en mujeres [15].

A excepción de los estudios anteriormente comentados, los datos posteriores que se tienen de cada país se deben a informes internos y han sido recogidos y analizados por Berghöfer *et al.* [16] en una revisión sistemática realizada en 2008. En ella se llega a una conclusión parecida al estudio MONICA, con los países del área mediterránea, del este y centro con una mayor prevalencia de la obesidad que los del norte y oeste [16].

Hasta la fecha, la recogida de datos de mayor duración se ha llevado a cabo en Estados Unidos gracias al programa *National Health and Nutrition Examination Study* (NHANES), el cual comenzó en los años 60 realizándose de forma intermitente hasta 1999, cuando se estableció de forma continua cada año y cuyo objetivo consistió en

evaluar de forma continua y representativa a la población americana. Los resultados que se han obtenido desde los años 60 muestran que casi se ha triplicado la prevalencia de obesidad en adultos, pasando aproximadamente del 13% al 36% en 2009-2010, y existiendo diferencias evidentes dependiendo de la edad, sexo y estatus socioeconómico [17,18].

En nuestro país, los últimos datos publicados por la Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo (OECD), revelan que existe un porcentaje de sobrepeso del 45% entre los adultos y que 1 de cada 6 personas es obesa. La tendencia en los últimos años ha tendido a estabilizarse, hecho que no coincide con las previsiones pasadas que estimaban un aumento [19].

Queda añadir, según los últimos estudios, la existencia de un descenso en el riesgo de enfermedades cardiovasculares asociado a la obesidad, lo que aparentemente sólo es a efectos de mortalidad ya que la calidad de vida o los años vividos sin discapacidad no han disminuido, lo que en definitiva nos muestra los numerosos factores de confusión que influyen en el estudio de la obesidad y los factores asociados a ella [20].

### ***Obesidad infantil***

De acuerdo con estimaciones de la WHO, la obesidad infantil constituye un problema en muchos de los países tanto desarrollados como en vías de desarrollo, sobre todo en ambientes urbanos. Las cifras que se han estimado según esta organización revelan un aumento alarmante de la prevalencia de esta enfermedad desde un 4.2% en 1990 a un 6.7% en 2010, esperándose que alcance un 9.1% en 2020 si la tendencia no cambia [21].

En general el porcentaje de obesidad es mayor en adultos que en niños en la mayoría de los países, no obstante en países como Estados Unidos, Brasil o China esta situación ha ido cambiando en los últimos años [22]. Paralelamente la globalización está haciendo que muchos países adopten hábitos de comida rápida y bollería típicos de los sitios occidentales, siendo un factor clave en el empeoramiento de la situación. De hecho, ya existe una amplia evidencia de que los niños obesos lo serán también en la adolescencia [23] y en la edad adulta [24-27].

Sorprendentemente, el tema de la obesidad infantil apenas si ha empezado a cobrar importancia de forma reciente, habiendo pocos registros o bastante incompletos. Además no hay un consenso en la definición de obesidad infantil [28], existiendo clasificaciones como la propuesta por la WHO en la cual se tienen en cuenta el BMI y las desviaciones estándar o las que propone el *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) y la IOTF (Tabla 2), éstas últimas con puntos de corte similares [28], lo que complica la estandarización de los resultados a nivel mundial.

Table 2. Current definitions of childhood obesity by the WHO, CDC and IOTF.

ORGANIZATION	DEFINITION OF CHILDHOOD OBESITY
<b>WHO</b>	<p>Birth to age 5 [29]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Overweight: BMI &gt; 2 standard deviations above the WHO growth standard median.</li> <li>- Obese: BMI &gt; 3 standard deviations above the WHO growth standard median.</li> </ul> <p>Ages 5 to 19 [30]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Overweight: BMI &gt; 1 standard deviation above the WHO growth standard median.</li> </ul> <p>Obese: BMI &gt; 2 standard deviations above the WHO growth standard median.</p>
<b>CDC</b>	<p>In children from birth to age 2, the CDC uses a modified version of the WHO criteria [31].</p> <p>In children ages 2 to 19, BMI is assessed by age- and sex-specific percentiles [32]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Normal weight: 5<sup>th</sup> &lt; BMI &lt; 85<sup>th</sup> percentile</li> <li>- Overweight: 85<sup>th</sup> &lt; BMI &lt; 95<sup>th</sup> percentile</li> <li>- Obese: BMI &gt; 95<sup>th</sup> percentile</li> </ul>
<b>IOTF</b>	<p>Provides international BMI cut points by age and sex for overweight and obesity for children age 2 to 18 [33].</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- The cut points correspond to an adult BMI of 25 (overweight) or 30 (obesity).</li> </ul>

En España la situación queda reflejada en dos estudios que se han realizado sucesivamente:

- El primero es el estudio enKid realizado del año 1998 al 2000 sobre una muestra de 3500 individuos de entre 2 y 24 años, que reveló que un 26.3% de los jóvenes tienen sobrepeso y de estos un 13.9% son obesos, tomando como referencia el percentil 97 y 85 respectivamente [34] de las tablas de referencia de Hernández *et al.* de 1988 [35].
- Posteriormente se realizó el estudio ALADINO (Alimentación, actividad física, desarrollo infantil y obesidad), desarrollado por la Agencia de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) durante los años 2010-2011 sobre una muestra de 7600 niños de entre 6 y 10 años. Este reveló una prevalencia del 26.2% de niños con sobrepeso y un 18.3% con obesidad según los estándares de la WHO [36].

#### **1.1.4. Repercusiones en la economía**

Para una buena estimación de los costes que supone la obesidad hoy en día, hay que tener en cuenta los que derivan directamente de ésta y los que surgen de los trastornos asociados. Como una idea general podemos tomar datos de Estados Unidos del 2008 que estiman unos 147 billones de dólares por año [37] y que según el ritmo de crecimiento actual, prevén que dicho coste se incrementará en este país en torno a 48-66 billones por año de aquí a 2030 [38]. A nivel mundial, las estimaciones calculan que el gasto medio debido a la obesidad supone en torno a 0.7-2.8% del presupuesto dedicado a la sanidad de un país [39].

## **1.2. ETIOLOGÍA**

### **1.2.1. Factores genéticos**

El estudio de asociaciones genéticas con la obesidad es relativamente reciente, no siendo hasta 1996 cuando se comenzó el proyecto que trató de relacionar el genoma humano con la obesidad [40], describiéndose en el último informe alrededor de 200 tipos de obesidad asociados a un solo gen [41], las cuales son bastante graves y se manifiestan desde una edad muy temprana. Por otra parte existe una evidencia bastante contrastada de que la mayoría de los casos de obesidad tienen un

componente poligénico con diferencias entre individuos a la hora de ganar peso, lo cual supone una diferente predisposición a la obesidad de unos individuos respecto a otros. Dicha predisposición lleva estudiándose desde hace más de 6 años [42] gracias a los *Genome-Wide Association Studies* (GWAS), en los cuales se pretende asociar variantes genéticas con un trastorno o enfermedad. Han supuesto una herramienta que ha logrado relacionar un total de 32 variantes de forma significativa con el BMI y 18 con la distribución de la grasa corporal [43]. No obstante, a pesar de haberse demostrado dicha correlación, el efecto de estos genes sobre la predisposición a la obesidad es pequeño [44] y sólo puede explicar menos del 2% de la variación fenotípica atribuida a la variación genotípica [45].

En el último informe del mapa genético relacionado con la obesidad, se nombran como mínimo 127 genes con al menos una asociación positiva con alguna característica de dicho fenotipo obeso, de los cuales 22 se encuentran respaldados por diversas publicaciones [46].

Si observamos las funciones en las que están implicados dichos genes, emergen 5 grupos de genotipos susceptibles que muestran una tendencia [47]:

- Bajo metabolismo basal y termogénesis.
- Genotipo hiperfágico: Pobre regulación del apetito y la saciedad.
- Genotipo sedentario: Propenso a ser físicamente inactivo.
- Genotipo de baja oxidación lipídica: Tendencia a oxidar poco los ácidos grasos.
- Genotipo con una mayor capacidad de acumular grasa.

Por último, estudios en gemelos claramente denotan una predisposición genética a ganar peso, ya que las diferencias en la ganancia de peso entre parejas son mayores que dentro de las parejas [48], siendo estos últimos estudios los que demuestran de forma más fehaciente la predisposición genética a la obesidad.

## **1.2.2. Factores fisiológicos y ambientales**

### ***Factores sensoriales***

Recientemente ha adquirido una gran importancia el hecho de la percepción sensorial de los individuos hacia los alimentos, que puede relacionarse con diferencias en la apreciación de la palatabilidad entre ellos, la cual si es mayor, puede redundar en un aumento de la ingesta [49].

### ***Factores nerviosos***

Refiriéndonos al estrés nervioso, hay evidencias de que puede actuar a corto plazo disminuyendo la ingesta, no obstante parece que a largo plazo el efecto es contrario [50-52], hecho que se puede relacionar con la liberación de glucocorticoides e INS que pueden hacer que la ingestión de “alimentos placenteros” reduzcan el efecto del factor estresante [53].

### ***Factores endocrinos***

La obesidad se asocia en determinadas ocasiones a alteraciones endocrinas como el hipotiroidismo, síndrome de Cushing, deficiencia de la hormona de crecimiento (GH) y testosterona, síndrome de ovario poliquístico, insulinoma y lesiones hipotalámicas [54].

Por otra parte, como se verá más adelante, la regulación de la ingesta y del peso corporal (BW) está sometida a un complejo control endocrino y nervioso, el cual ha adquirido protagonismo en los últimos años y cuyo estudio de forma más detallada será clave para el entendimiento de la obesidad [55].

### ***Factores psicológicos***

Revisiones sistemáticas como la de Atlantis *et al.* [56] y Lupino *et al.* [57] indican la existencia de una ligera correlación entre la obesidad y los trastornos afectivos (depresiones y trastornos bipolares) sobre todo en mujeres más que hombres y en los americanos más que en los europeos [56,57].



### ***Factores ambientales***

La ingesta de alimento está motivada por la necesidad, pero influenciada por una miríada de factores, de los cuales, los que afectan de forma más pronunciada son: la variedad (hace que siga el interés por la comida), la ingesta en grupo, la ingesta de alcohol (la energía de éste es aditiva a la energía total ingerida) y las horas de visionado de la televisión [58]. Todos estos factores funcionan a corto plazo, influyendo en el resultado a largo plazo, que va estar fuertemente determinado por la capacidad del individuo de contenerse a ese estímulo, hecho que entre otros factores está fuertemente influenciado por la herencia [59].

Un elemento que ha adquirido importancia en los últimos años son los cambios en el tipo de microbiota intestinal, percibiéndose que las bacterias de tipo Bacteroides y Firmicutes son dominantes en humanos y roedores obesos, lo que hace que aumente la capacidad de adquirir energía de la dieta [60]. Sobre este tema se están realizando estudios con resultados prometedores, que pueden mostrar un fuerte impacto de la microbiota en el desarrollo de obesidad [61].

#### **1.2.3. Actividad física**

Como se ha comentado, el sedentarismo constituye a día de hoy uno de los principales factores, el cual está influenciado por diversos aspectos de la vida moderna como los medios de comunicación y de entretenimiento, ampliamente descrito en obras como la de Bouchard *et al.* [62].

Los expertos de la *American College of Sports Medicine (ACSM)*, recomiendan la realización de ejercicio regular que incluya actividades variadas, tanto cardiorrespiratorias como de resistencia y flexibilidad, de intensidad moderada con un tiempo de aproximadamente 30 minutos al día durante 5 días a la semana [63].

### **1.3. EL TEJIDO ADIPOSO Y EL ADIPOCITO**

#### **1.3.1. El tejido adiposo y el adipocito**

El tejido adiposo es de tipo conectivo y su función principal es la de almacenar energía, estando implicado además en regulación de la ingesta, respuesta inmunitaria, mantenimiento óseo o secreción de hormonas. Lo constituyen en su mayor parte

adipocitos rodeados por una matriz de colágeno y otras células anejas como leucocitos, macrófagos, preadipocitos o células estromales.

En mamíferos se distinguen el tejido adiposo blanco (WAT), especializado en el almacenamiento de lípidos, el marrón (BAT), cuya principal función es la regulación de la temperatura [64], y un tercero denominado beige que posee características intermedias a los dos anteriores [65].

En el caso de humanos, el marrón y el beige se presentan más abundantemente en el recién nacido que en el adulto, donde queda relegado a la zona supraclavicular, cervical, mediastino y la zona suprarrenal (localizados gracias a las técnicas de emisión computerizada de positrones) [66].

Hasta hace relativamente poco tiempo se pensaba que el tejido adiposo era meramente un tejido de almacenamiento de grasa, concepto que ha ido cambiando con el tiempo desde que se descubrió la LEP en 1994 y que ha ido posicionando a dicho tejido como todo un órgano endocrino. Cabe destacar su producción de moléculas como [67]:

- Adipoquinas: LEP, resistina, adiponectina, visfatina, apelina, omentina, vapina, adipsina o angiopoyetina.
- Citoquinas: Factor de necrosis tumoral (TNF) o las interleuquinas 1, 4, 6 y 10.
- Quimioquinas: Interleuquina 8 (IL-8), proteína inducible debido a interferón 10 (IP-10) o la proteína de atracción de monocitos 1 (MCP-1).

Los adipocitos, por otra parte, poseen características diferentes según sean de BAT o de WAT, con una maquinaria de biosíntesis lipídica desarrollada en el primer tipo y un desarrollo de los sistemas implicados en la respiración y generación de energía en el segundo. La diferenciación de estos es un proceso complejo en el que están involucrados diferentes factores de transcripción y correguladores operando de forma conjunta para establecer un patrón de expresión génica en el adipocito. Dicho proceso, pese a que se ha caracterizado bastante, no está del todo dilucidado [67].

El origen de estas células son las denominadas células madre mesenquimales, las cuales en primera instancia se diferencian hacia preadipocitos, para posteriormente entrar en un estadio de compromiso generando adipocitos de tipo blanco o marrón dependiendo de la exposición a factores como el receptor activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR), proteína de unión a los activadores CCAAT (C/EBP) y factor dependiente de la diferenciación y determinación del adipocito 1/ Proteína de unión a elementos de respuesta regulados por esteroides 1 (ADD-1/SREBP-1) [67].

### **1.3.2. Lipogénesis y lipólisis**

La lipogénesis consiste en la formación de triglicéridos (TGs) a partir de ácidos grasos libres (FFA) y glicerol, llevándose a cabo en el hígado y tejido adiposo. La provisión de FFA resulta de procesos como la lipólisis producida en el adipocito, de la grasa presente en el alimento que se almacena provisionalmente en los quilomicrones y de la síntesis *de novo* en el hígado a partir de sustratos como la glucosa. Este último proceso, es estimulado por dietas ricas en carbohidratos e inhibido por dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados que suprimen la expresión de las enzimas implicadas [68].

La lipólisis, por otra parte, es exclusiva del tejido adiposo y consiste en una rotura hidrolítica de los TGs, llevada a cabo por las enzimas adipo-triglicérido-lipasa (ATGL), lipasa sensible a hormonas (HSL) y monoacilglicerol lipasa (MGL) (Ver Figura 2), que actúan al fosforilarse la proteína perilipina y dejan libre acceso a las gotas de grasa [69].

Respecto a la regulación de la lipólisis, se ha visto una menor inducción de la HSL por catecolaminas en personas obesas [70], así como un fallo en la regulación de la lipólisis, que hace que se libere gran cantidad de FFA a la sangre, causando efectos adversos que se detallarán más adelante.

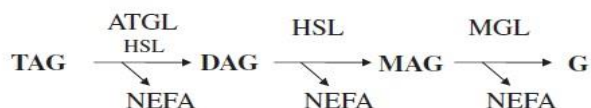


Figure 2. Schematic delineation of the coordinate breakdown of triacylglycerols. ATGL: adipose triacylglycerol lipase; DAG: diacylglycerol; G: glycerol; HSL: hormone-sensitive lipase; MAG: monoacylglycerol; MGL: monoacylglycerol lipase; NEFA: non-esterified fatty acid; TAG: triacylglycerol. Taken from Lass *et al.* [71].

## 1.4. TRASTORNOS ASOCIADOS Y CONSECUENCIAS MÉDICAS

### 1.4.1. Trastornos asociados

Es un hecho bastante contrastado, como reflejan revisiones como la de Iyer *et al.* [72], que la obesidad abdominal produce un estado de inflamación de tipo crónico, en el cual los adipocitos producen un amplio número de citoquinas proinflamatorias y aumenta el número de macrófagos activados que colonizan el tejido adiposo [73,74]. Además, se ha observado un incremento de la LEP y la resistina (no en todos los estudios), lo que conduce a un aumento de factores como el TNF $\alpha$  e IL6, que han sido relacionados de forma directa con la inflamación e indirecta con la aterosclerosis a través de la proteína C-reactiva. Por otro lado los valores bajos de adiponectina observados en los individuos obesos, hacen que no haya respuesta ante el aumento de LEP y resistina [67]. Todo ello deriva inicialmente en una resistencia a la INS local (a nivel del tejido adiposo) que puede generalizarse, inflamación hepática y aterogénesis. Todo este proceso inflamatorio hace que aumente la probabilidad de padecer enfermedades de tipo cardiovascular, diabetes tipo 2 y problemas respiratorios [75].

### ***Diabetes***

Aproximadamente el 90% de los individuos obesos sufren diabetes mellitus tipo 2 (T2DM) [76], debido principalmente a que la acumulación de grasa visceral redundante en una resistencia a la INS, hecho que cuando se acompaña con una disfunción en los islotes  $\beta$  pancreáticos deriva en una T2DM [77].

En la obesidad, aparte del ya comentado proceso inflamatorio, hay un aumento de la actividad de los glucocorticoides que promueven una gran actividad metabólica con la consecuente acumulación de grasa especialmente en la zona abdominal.

Paralelamente existe en esta zona una mayor sensibilidad a la acción lipolítica de la noradrenalina, lo que hace que se tiendan a liberar FFA al sistema portal [78], ejerciendo un efecto deletéreo en el hígado, reduciendo el aclaramiento hepático de INS (agravándose la hiperinsulinemia) y aumentando la gluconeogénesis y producción hepática de glucosa, con la consiguiente hiperglucemia. Este bucle hace que poco a poco vayan aumentando los niveles de INS y glucosa, lo que fuerza al páncreas a contrarrestar dicha hiperglucemia secretando más INS, hecho que a largo plazo hace que se vaya generando una resistencia a dicha hormona, primero local y poco a poco trasladándose a tejidos como el hueso o el músculo [79]. Recientemente se ha propuesto el exceso energético como factor principal implicado en la T2DM, con el concomitante aumento del ATP, como demuestra la mejora de los síntomas en situaciones que disminuyen dicho exceso, como la realización de más ejercicio, una restricción calórica o una pérdida de BW, abriendo esta teoría una senda inexplorada en el desarrollo de fármacos para tratar dicho trastorno [80].

### ***Enfermedades cardiovasculares***

El incremento del BW deriva en un aumento en el volumen sanguíneo, lo que redundará en una serie de adaptaciones cardíacas que finalmente hacen que se eleve el gasto cardíaco para compensar, hecho que puede no llegar a ser suficiente y que puede acabar en una disfunción sistólica y diastólica, lo que aumenta las posibilidades de un fallo cardíaco [81,82]. Además, paralelamente, todo el proceso inflamatorio y fallo hepático hace que se produzca una dislipemia con un aumento de los TGs circulantes, colesterol LDL y disminución del colesterol HDL, hechos que se relacionan directamente con problemas aterogénicos [83]. Hay que añadir que recientemente se ha descubierto la expresión de angiotensinógeno en el tejido adiposo, lo que relaciona la obesidad con la hipertensión de una forma más directa [84].

### ***Problemas respiratorios***

Un incremento en la masa grasa del pecho y el abdomen produce una disminución del volumen pulmonar y una alteración en el patrón de ventilación, que se acentúa cuando el individuo está tumbado. Durante el sueño puede ocurrir hipoventilación y apnea lo que resulta en una caída temporal del oxígeno arterial (hipoxemia) y

aumento del dióxido de carbono (hipercapnia). Todo esto, de persistir en el tiempo, puede terminar en un fallo cardíaco y/o respiratorio [85].

### ***Síndrome metabólico***

Se denomina también síndrome X, y se caracteriza por una serie de anormalidades metabólicas entre las que (aparte de una disminución de la tolerancia a la glucosa, alteración de glucemia en ayunas o diabetes) se incluyen (dependiendo de si se sigue la definición de la WHO (1999), EGIR (1999) o ATPIII (2001)) dislipemia, hipertensión, obesidad central, resistencia a la INS, hiperinsulinemia y microalbuminuria [86,87].

### ***Otros trastornos***

La obesidad también aumenta la probabilidad de padecer problemas gastrointestinales, musculares, genitourinarios y algunos tipos de cáncer [88].

## **1.5. ESTRATEGIAS CONTRA LA OBESIDAD**

La principal estrategia contra la obesidad consiste en una dieta saludable y ejercicio regular, aunque como bien se sabe, esto es complicado de llevar a cabo en el ambiente obesogénico presente en los países desarrollados, de forma que se deben plantear otras estrategias que pueden ser farmacológicas, quirúrgicas o alimentarias.

### **1.5.1. Tratamiento farmacológico**

#### ***Fármacos, péptidos gastrointestinales y análogos***

El desarrollo de los nuevos fármacos y análogos contra la obesidad se centra principalmente en obtener una disminución de la ingesta (bloqueando factores orexígenos o promoviendo los anorexígenos), un aumento del gasto energético o ambos a la vez.

En el caso de la administración de fármacos, sólo se recomienda cuando la dieta y el ejercicio no funcionan. Desde hace años se llevan desarrollando, pero la mayoría han sido retirados del mercado debido sobre todo a los efectos secundarios que causan, siendo a fecha de 2014 los usados a corto plazo la fentermina, dietilpropion, zonisamida, topiramato, y a largo plazo el orlistat. De los anteriores la fentermina y el

dietilpropión son análogos de las anfetaminas, y la zonisamida y el topiramato son fármacos antiepilépticos, así como el orlistat tiene un efecto periférico inhibiendo la lipasa pancreática. Pese a todo, lamentablemente todavía no se ha encontrado un medicamento con una eficacia contrastada que no posea efectos secundarios [89].

Por otro lado, los distintos péptidos gastrointestinales (GP) y sus análogos tienen un gran potencial para ser usados en terapias contra la obesidad y muchos de ellos (solos o en combinaciones) están siendo testados en ensayos clínicos, como la liraglutida (análogo del GLP-1), que está en fase III, o la pramlinitida (análogo de la AMY) y la obinipitida (análogo del PP y PYY), que está en fase II [90].

Ahora bien, refiriéndonos a los GP como tal, la GRN es la que mayor potencial tiene para ser utilizada como herramienta para el desarrollo de nuevas estrategias farmacológicas contra la obesidad, debido principalmente a sus efectos orexígenos. Actualmente, se están probando compuestos relacionados con este GP como son [91]:

- Antagonistas y agonistas inversos (disminución de la actividad) del receptor GHS-R1a.
- Neutralizadores de la GRN por vacunación y por unión de pequeños ARN artificiales denominados "spiegelmers".
- Antagonistas de los receptores del sabor amargo (T2R), los cuales parece ser que están implicados en el aumento de las concentraciones plasmáticas de GRN cuando son estimulados (hecho observado en ratones).
- Inhibidores de la grelina O-acetiltransferasa, siendo esta enzima necesaria para la activación de la GRN.

Otros compuestos que se plantean son aquellos que evitan la degradación de los GP, como por ejemplo, los inhibidores de la enzima DPP-4 que degrada a varios de ellos, e incluso bloqueantes de las señales adipocitarias entre otros [92].

### **1.5.2. Cirugía**

Hasta ahora la cirugía bariátrica es la forma más eficaz de perder peso corporal, aunque sólo se utiliza si el paciente supera los 40 kg/m<sup>2</sup> de BMI, ya que conlleva un riesgo alto de mortalidad. Existen diversas técnicas las cuales se pueden dividir en

restrictivas, malabsortivas o mixtas, siendo del último tipo la técnica más comúnmente realizada hoy en día, la Roux-en-Y proximal (llamada así por el cirujano César Roux, que fue el primero que la describió). Consiste en disminuir el tamaño del estómago hasta casi 1/3 de su tamaño original y seccionar el duodeno conectando un extremo a este “nuevo estómago”, de forma que el extremo que queda libre se une con una porción más distal, haciendo que se disminuya tanto la capacidad de almacenar alimento como su absorción.

Su eficacia a corto-medio plazo se debe sobre todo a cambios en las concentraciones plasmáticas de los GP, entre los cuales se ha visto que hay una disminución en la LEP e INS en ayunas y un incremento postprandial progresivo de enteroglucagón y GLP-1 en 6 meses [93] y del PYY hasta los 24 meses [94]. Además recientemente se ha descrito que los pacientes con este tipo de operación poseen un gasto energético mayor comparado con los sometidos a otras técnicas como la gastroplastia vertical en banda [95], motivo que puede explicar en parte la pérdida de BW.

### **1.5.3. Tratamiento dietético**

#### ***Componentes alimentarios y alimentos funcionales***

A finales de los 80 y principios de los 90 se empezaron a relacionar de forma directa los alimentos con distintas enfermedades, y ya en el siglo XXI se propuso la denominada nutrición optimizada, que consiste en maximizar las funciones fisiológicas y psicológicas a través de la alimentación [96].

Para concretar los conceptos sobre alimentos funcionales a nivel europeo el *International Life Science Institute (ILSI)*, dentro del proyecto denominado *Functional Food Science in Europe (FUFOSE)*, propuso que un alimento puede ser considerado como funcional cuando muestra un efecto beneficioso sobre una o más funciones diana del organismo, más allá de unos adecuados efectos nutricionales, de forma que mejora el estado de salud del individuo y de bienestar y/o reduce el riesgo de padecer una enfermedad [97].

Los objetivos de la nutrición funcional deben identificar las interacciones beneficiosas entre un alimento en concreto y una o más funciones del organismo y obtener



evidencias sobre los mecanismos implicados en la interacción. Estos objetivos deben de alcanzarse a través de experimentos tanto *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* con una metodología adecuada y en la que se integren los distintos campos de las ciencias de la vida (fisiología, psicología, farmacología y medicina) [97].

Si nos referimos a los alimentos en general, hay que comentar que normalmente el principal problema radica en el hecho de que una alta palatabilidad se relaciona con una alta densidad energética y poca capacidad de saciedad y a la inversa. Lo ideal serían alimentos con una alta palatabilidad y saciedad y una baja densidad energética [98], siendo éste el objetivo de la mayoría de las industrias alimentarias.

Los efectos que se buscan a la hora de desarrollar un producto eficaz contra la obesidad son (por separado o con efectos conjuntos):

- Incremento de la saciedad.
- Actuación sobre la fisiología adipocitaria (disminución de la lipogénesis o incremento de la lipólisis).
- Inhibición o disminución de la lipasa pancreática.
- Disminución de la absorción energética.
- Incremento del gasto energético.

El concepto de alimento funcional es amplio, de forma que puede ser [99]:

- Un alimento natural.
- “ “ “ con componentes añadidos.
- “ “ “ al que se le elimina/n algún/os componente/s.
- “ “ “ con algún componente al que se le modifica la biodisponibilidad.
- Cualquier combinación de las anteriores.

Diferentes alimentos y componentes de estos (en combinación o aislados) llevan investigándose desde hace tiempo y aunque hay muestras de efecto sobre distintos parámetros, no son del todo concluyentes y se requiere una investigación más

detallada. Todos estos se describen en los trabajos de Riccardi *et al.* y Martínez-Augustín *et al.* [100,101] (Tabla 3).

### ***Grasa y saciedad***

En condiciones normales, la mayor parte de la grasa de la dieta se digiere y absorbe antes de alcanzar el yeyuno, activándose en dicho tránsito mecanismos que promueven la saciedad como una disminución en el vaciado gástrico o un aumento de las concentraciones plasmáticas de la CCK (influye en el vaciado gástrico) y del PYY [102-107]. Las comidas abundantes y el estado sólido de la grasa incluida en el alimento pueden favorecer la llegada de fracciones sin absorber de este macronutriente a las partes más distales del intestino [108,109]. La presencia de este nutriente en estos segmentos distales activa mecanismos que desencadenan cambios funcionales como una disminución de la motilidad intestinal y/o una estimulación de la secreción de GLP-1 y PYY (estímulos que influyen en el freno ileal), y cuya consecuencia es una disminución de la ingesta de alimentos [110-113].

Además, los FFA también estimulan la secreción de AMY [114], GIP [115], GLP-1, [116], INS [117] y PYY [118] e inhiben la liberación de GRN (la de cadena larga principalmente) [119].

Por otro lado, también es importante la actividad de la lipasa pancreática sobre los triglicéridos de la dieta, ya que una inhibición de la actividad de esta enzima aumenta el vaciado gástrico y disminuye la secreción de CCK, lo que teóricamente disminuye la sensación de saciedad y también la absorción de los lípidos [120,121].

En general, parece ser que la inhibición de la ingesta debida a la grasa alimentaria está relacionada de forma directa con la superficie intestinal expuesta a ella, siendo en consecuencia esta inhibición mayor a medida que aumenta la superficie expuesta [122-124].

Como ya se ha comentado, la situación en condiciones reales es mucho más compleja ya que entran en juego factores relacionados con el componente de placer que provocan los alimentos a nivel central, lo que hace que se puedan rebasar los mecanismos homeostáticos que controlan la ingesta [125,126].

Por último, hay que comentar que pese a que tradicionalmente se ha considerado que la grasa tiene menor efecto saciante respecto al de HDC y proteína, a día de hoy esta afirmación es objeto de debate [127]. Además, muchos autores han relacionado la obesidad con la ingesta de grasa [128,129] y se ha postulado que este macronutriente produce una atenuación de los mecanismos que desencadenan saciedad (ya comentado) [130-132]. Hoy en día se está cuestionando si dicho nutriente juega un papel tan determinante en la obesidad o constituye un factor de distracción en el estudio de dicha enfermedad [133].

### ***Sistemas de liberación de lípidos***

La industria alimentaria es consciente, por distintos estudios de que la saciedad se puede modificar dependiendo del tramo intestinal donde se liberen los ácidos grasos [134-136], hecho que a su vez depende del grado de emulsión de la grasa. Actualmente existe un extenso campo para el desarrollo de este tipo de manipulaciones de la grasa dietética que puedan tener un efecto inhibitor de la ingesta de alimentos [102,103,137]. Se están estudiando diferentes modelos entre los que se incluyen: emulsiones convencionales, pequeños o grandes agregados emulsionados y esferas rellenas de microgel [138].

Para conseguir dicha modificación de la ingesta y como ya se esbozó en los antecedentes de forma general, en el caso de esta tesis, las emulsiones desarrolladas tienen como objetivo la modificación de la actividad de la lipasa pancreática y/o de la liberación de péptidos gastrointestinal y hormonas relacionadas.

Respecto al perfil de ácidos grasos de las emulsiones, se ha observado un aumento del poder saciante cuando predominan los ácidos grasos de cadena larga (más de 12 carbonos) [139] y con un alto nivel de insaturación [140].

La influencia del tamaño de las partículas de las emulsiones en parámetros relacionados con la ingesta (absorción de nutrientes, secreción de hormonas, etc...), se ha estudiado en diferentes trabajos:

- En el estudio de Armand *et al.* [141], se ensayaron dos emulsiones administradas intragástricamente, con tamaños de partícula de  $0.7 \pm 0.2 \mu\text{m}$  y

10±0.9 µm respectivamente. Se produjo un ligero retraso en la absorción de triglicéridos en el caso de la emulsión de diámetro más pequeño, relacionado, en este caso, con una disminución del vaciado gástrico, aunque la absorción de grasa no se modificó en ningún momento [141].

- Seimon *et al.* [142] administraron intraduodenalmente emulsiones con diferentes tamaños de gotículas (0.26, 30 y 170 µm), observándose un mayor efecto sobre la disminución del vaciado gástrico y el aumento de los niveles plasmáticos de CCK y PYY con la emulsión de 0.26 µm, aunque no se encontraron diferencias significativas en la saciedad para ninguna de las emulsiones [142].
- Por último, Maljaars *et al.* [143] compararon los efectos que sobre saciedad, hambre y secreción de CCK y PYY tenía la administración intraduodenal y/o intraileal de emulsiones con partículas pequeñas (0.88 µm) o grandes (15.5 µm). Se observó un aumento de la sensación de saciedad y una disminución de vaciado gástrico en la emulsión con menor tamaño de partícula. Por otro lado, la administración en íleon aumentó la secreción total de CCK, aunque no se observaron diferencias significativas en parámetros como el PYY y los niveles de saciedad [143].

En ratas hay poco estudios sobre el efecto de las emulsiones grasas sobre la ingesta, pudiéndose destacar el estudio de Wang *et al.* [144], donde prueban emulsiones vegetales y biopolímeros con y sin almidón, demostrándose una mayor influencia sobre la ingesta debido a la presencia de almidón más que la atribuible a la emulsión de la grasa [144].

La gran mayoría de los estudios realizados hasta la fecha en humanos, se han realizado con emulsiones comerciales, entre las que destaca Fabules<sup>™</sup> u Olibra<sup>™</sup>. En los estudios realizados a corto plazo con esta emulsión [128,145-147], se ha observado un aumento de la saciedad así como su contribución al mantenimiento del BW, tras una pérdida de éste en mujeres obesas [148]. Por otro lado, no se han observado resultados concluyentes en otros estudios realizado a corto [149] y largo plazo [150,151] o con diferentes formatos de consumo [152]. Como se resume en la revisión de Appleton *et al.* [153], la variedad de resultados puede deberse a la influencia de

distintos factores como el tipo de procesado del producto o las distintas dosis utilizadas.

En otro estudio realizado en humanos se utilizaron cuatro tipos de emulsiones: control (Ivelip<sup>®</sup>), aceite de canola estabilizado con estearoil lactilato de sodio (SSL-LO), aceite de canola más aceite hidrogenado de colza y estearoil lactilato (SSL-LO/SF) y un último grupo con canola y colza más una mezcla de caseinato de sodio y monoglicéridos (CasMag). Los mejores resultados se obtuvieron en el grupo CasMag que mostró una menor liberación postprandial en plasma de TG, aunque no se observaron diferencias significativas en la liberación postprandial de GP (CCK, GLP-1 y PYY) con respecto al control [154].

Recientemente se ha desarrollado una patente en Estados Unidos [155] basada en emulsiones ricas en ácido palmítico y esteárico con lecitina y/o galactolípidos como emulgente. Estas emulsiones son capaces de formar cristales en el intestino delgado, lo que promueve la llegada de lípidos sin digerir a íleon y en consecuencia la activación de las señales de saciedad previamente comentadas [155].

A pesar de todos los estudios antes expuestos, todavía no existen evidencias científicas relevantes que permitan presentar un producto con alguna alegación funcional, por lo menos a corto plazo.

Table 3. Examples of foods or food ingredients that may potentially be considered as “functional” in the field of body weight regulation.

<b>FOOD/INGREDIENT</b>	<b>TARGET</b>
Soy	Satiety
Low glycemic index starchy foods	
Medium chain triglycerides	
Polyunsaturated fat (PUFA) and Omega-3	
Fiber-rich foods	
Low dairy products	Adipocyte physiology
Non-caloric sweeteners	
Phenolic compounds	
Medium chain triglycerides	
Fat replacers	Energy intake
Caffeine, capsaicin and green tea	Energy expenditure
Oleyl Estrone	
Plant extracts (algae, tea polyphenols and metabolites of microorganisms)	Pancreatic lipase

Taken from Riccardi *et al.* and Martínez-Augustín *et al.* [100,101].

Por otra parte, es sabido desde hace muchos años, que distintas plantas medicinales utilizadas en China o Corea tienen efectos beneficiosos sobre la salud. Sobre esta base diferentes grupos de todo el mundo se encuentran investigando extractos de plantas que puedan tener efectos beneficiosos en las personas obesas. Son muchos los compuestos que se han probado o se están probando, tal y como se recoge en el trabajo de Yun *et al.* [156].

Mención especial merecen los compuestos que producen una inhibición de la lipasa pancreática (emulando el efecto del orlistat), los cuales se han aislado de plantas, algas, hongos o bacterias, más concretamente. La mayoría de dichas sustancias son polifenoles y saponinas presentes en el té, soja, ginseng, mate, manzana o uva [157] o procedentes de corteza y madera de plantas como *Juniperus communis* e *Illicium religiosum* [158].

Finalmente, la revisión sistemática de Hasani-Ranjbar *et al.* [159], se centra en estudios en animales y humanos que miden parámetros relacionados directamente con la grasa corporal y/o la ingesta tales como la masa grasa/masa total, porcentaje grasa/grasa visceral, pliegues cutáneos, circunferencia de cadera o cintura, apetito o cantidad de alimento ingerido. Los resultados más significativos se observaron con extractos procedentes de efedra (*Ephedra Sinica*), ginseng (*Panax ginseng*), melón amargo (*Momordica charantia*), jengibre (*Zingiber officinale*) y *Cissus quadrangularis* [159].

#### **1.5.4. Terapia del comportamiento**

Las terapias de comportamiento que hagan cambiar la alimentación y el ejercicio físico deben basarse en adquirir hábitos y técnicas como auto-seguimiento, manejo del estrés con meditación o técnicas anti estrés, control de estímulos o reestructuración cognitiva para cambiar pensamientos negativos; éstas pueden hacer perder a un sujeto hasta un 10% del BW en un periodo de un año o menos, siendo el factor clave que el sujeto adquiriera dichas recomendaciones para no perderlas a largo plazo [160].

## **1.6. MODELOS PARA EL ESTUDIO DE LA OBESIDAD**

Desde hace más de medio siglo se lleva intentando desarrollar modelos animales que mimeticen todos o muchos de los desórdenes fisiológicos que posee un individuo obeso. A nivel genético, los estudios GWAS, ha servido de guía para conocer los genes sobre los que realizar el principal esfuerzo de estudio, pero como la mayoría de los casos de obesidad son poligénicos, otros modelos como los de obesidad inducida por la dieta nos dan una visión más general de dicho trastorno.

### **1.6.1. Celulares**

Un conocimiento detallado de las rutas moleculares que regulan el desarrollo y el metabolismo del adipocito son necesarios para desarrollar estrategias frente a las enfermedades metabólicas ya mencionadas. Actualmente se emplean líneas celulares como las 3T3-L1, 3T3-F442A y Ob17 (que son preadipocitos) o las células C3H10T1/2, "ES" y "DFEAT" como ejemplos de células madre capaces de diferenciarse en adipocitos. Dichos modelos se utilizan en cultivos tridimensionales, aisladas o cocultivadas con otros tipos celulares para estudiar la relación del tejido adiposo con otros tejidos [161].

### **1.6.2. Animales**

Los modelos animales han supuesto una gran contribución para el entendimiento de los parámetros que regulan el apetito y el balance energético. Dentro de ellos se pueden diferenciar diferentes tipos según el origen de la obesidad, los cuales se resumen en la siguiente tabla [162,163]:



Table 4. Animal models of obesity.

	<b>MODELS</b>	<b>EXAMPLES</b>
<b>Genetic</b>	Single-gene mutation dominant	- Agouti mice
	Single-gene mutation recessive	- Ob mice - Db mice - Zucker rat
	Polygenic mutation	- New Zealand mice - KK mice - NH mice
	Random mutation	
	Genetically engineered	- <i>Knockout</i> of NPY1 receptor - Beta 3 adrenergic receptor
<b>Nutritional</b>	Diet-Induced Obesity	- Wistar with cafeteria diet or high fat diets (HFD) - Sprague Dawley with HFD - DR/DS SD rat
<b>Pharmacological</b>		- Ciproheptadine - Clonidine
<b>Surgery</b>	Hypothalamus	- Hypothalamic lesions
	Ovaries	- Ovariectomy
<b>Others</b>	Selective breeding	

Taken from Speakman *et al.* and Lutz *et al.* [162,163]

De todos ellos, el fenotipo que más se acerca a la situación que experimenta el ser humano es el modelo de obesidad inducida por la dieta, del cual hay numerosas variantes normalmente utilizando ratas Wistar, Sprague Dawley o Long Evans alimentadas con dietas hipercalóricas como la dieta cafetería o las dietas con alto contenido en grasa (HFD), cuyo contenido en estos macronutrientes está en torno al 45-60% [164]. En general estos modelos presentan la mayor parte de las características del fenotipo obeso humano, tales como un aumento de los FFA, triglicéridos, glucosa e INS en sangre, esteatosis hepática moderada o grave y aumento de los factores inflamatorios [165]. Las características de dicho modelo dependerán del tipo de grasa (manteca de cerdo, oliva, pescado o coco), del porcentaje presente en la dieta y de la duración del periodo de inducción, observándose una obesidad y resistencia a la INS más marcada con las dietas que contienen grasa procedente de aceite de oliva o manteca de cerdo [166].

Entre las alteraciones asociadas a la ingesta de HFD se incluyen:

- Modificación de la morfología intestinal: incremento de la altura de las vellosidades, de la profundidad de las criptas y del grosor de las microvellosidades, lo que hace que se incremente el número de enterocitos por vellosidad y se aumente la absorción de grasa [167,168].
- Cambios en las funciones gastrointestinales:
  - o Modificación de la secreción pancreática [169], en particular incremento de la secreción de lipasa pancreática [170] y disminución de la amilasa pancreática en respuesta a CCK [171].
  - o Mayor velocidad de vaciado gástrico [131], aceleración del tránsito en intestino delgado [172] y aumento de la motilidad antropiloro duodenal [130], todo ello relacionado con la menor exposición del intestino distal a la grasa al aumentar la eficacia de absorción [173].
- Transcritos de genes relacionados con la absorción de grasa que están disminuidos tras una ingesta de HFD a corto plazo [174] y aumentados a largo plazo (más de un 20% de energía en forma de grasa) [175].

- Disminución del periodo entre comidas así como aumento del tamaño de la segunda y la tercera comida [176].
- Remodelación neuronal del hipotálamo, que redundaría en una alteración del balance energético en el individuo y una reprogramación al alza del BW teórico en el hipotálamo [177].

Además existen otros modelos como los cerdos minipig [164] o los monos rhesus, macaco o babuino a los cuales también se les induce obesidad por medio de la dieta, aunque son mucho menos utilizados debido a la necesidad de instalaciones y permisos específicos [178].

## **2. REGULACIÓN DEL PESO CORPORAL. BALANCE DE ENERGÍA**

### **2.1. INTRODUCCIÓN**

El equilibrio de energía corporal tiene dos componentes: las entradas de energía, representadas por la ingesta de alimentos y, por lo tanto, la energía absorbida y metabolizada que contienen, y las salidas de energía, es decir, los gastos energéticos. La estabilidad del BW requiere que la cantidad de energía ingerida y la cantidad de energía consumida (o gasto energético total (GET)) se encuentren en equilibrio. Si el equilibrio anterior no está balanceado se puede producir un déficit de energía (si es prolongado haría que disminuyera el BW) o un exceso, que a medio-largo plazo hace que la energía se almacene en forma de grasa con el consecuente aumento del BW [179].

La ingesta de alimentos es un proceso que se encuentra altamente regulado tanto por un control nervioso y endocrino de carácter homeostático como por otros factores que actúan de un modo no homeostático, dicese de la apariencia de la comida, el sabor, disponibilidad, factores sociales, culturales y económicos. En conjunto dichos factores interaccionan generando respuestas orexigénicas o anorexigénicas según el momento [180].

Dicha regulación homeostática se encuentra encaminada a controlar tanto la cantidad de alimento ingerido en una comida (saciación), como el tiempo transcurrido entre una comida y otra (saciedad). Ambos conceptos a menudo se confunden en la bibliografía y a la saciedad la definen como una combinación entre saciación y saciedad [181].

Aparte de los anteriores, existen otros conceptos necesarios para entender la regulación de la ingesta [98]:

- Hambre: Sensación biológica de necesidad de alimento.
- Apetito: Deseo de alimento.
- Tasa de ingesta: Cantidad de alimento/duración de la comida.
- Relación de saciedad: Intervalos entre comidas/cantidad de alimento.
- Palatabilidad: Medición subjetiva de placer debida a la comida.
- Índice de saciedad: Cálculo de la saciedad basado en índices subjetivos después de ingerir alimentos.

## **2.2. ENTRADA DE ENERGÍA (INGESTA DE ALIMENTOS) Y SU REGULACIÓN**

La regulación de la ingesta involucra principalmente una red neuronal que incluye estructuras desde el hipotálamo hasta el bulbo raquídeo, la cual es sensible a señales relacionadas con la ingesta y con el estado energético del individuo así como otra red que se encarga de procesos relacionados con el apetito y de la recompensa (involucrado entre otros el sistema cortico-límbico), la cual no posee un control homeostático y que se encuentra constantemente bombardeada por señales externas del ambiente que pueden resultar en un incremento de energía en individuos genéticamente predispuestos [182].

### **2.2.1. Recepción y generación de señales**

#### ***Señales sensoriales y cognitivas***

Los alimentos ingeridos entran por la cavidad bucal siendo triturados y lubricados por la saliva e iniciándose la digestión de los hidratos de carbono y los TGs en menor

medida. Esta cavidad posee un componente sensitivo importante a la hora de informar de los sabores de los diferentes alimentos, detectando el sabor dulce, salado, ácido, amargo y umami (asociado al glutamato) [183]. Recientemente se ha visto en ratones que existen unos receptores de unión a ácidos grasos denominados CD36, posiblemente asociadas a vías gustativas [184], lo que puede indicar que el cerebro pueda “saborear” las grasas, así como ciertos receptores detectarían aminoácidos (AA) [185]. Ambos hechos revelan una posible detección de nutrientes ya en la cavidad bucal. Por otra parte también se genera información sobre diferentes parámetros físicos del alimento, como la textura y la temperatura, que pueden influir sobre la ingesta [186].

### ***Señales generadas en el sistema digestivo y páncreas***

Cuando la comida pasa al estómago, en él se producen cambios de volumen, los cuales son detectados por mecanorreceptores que captan tensión y estiramiento, transmitiendo dicha información a través de aferencias vagales, lo que puede inhibir la ingesta de forma acusada [187-189].

El sistema digestivo tiene enormemente desarrollada la función secretora endocrina siendo el mayor sistema endocrino del cuerpo. Las células encargadas de dicha función se denominan enteroendocrinas (EEC) y se localizan en la mucosa, intercaladas entre el resto de células, constituyendo el 1% del total. Se distribuyen desde el estómago hasta las partes más distales del intestino y se caracterizan (con alguna excepción) por poseer una diferenciación apical con el típico borde en cepillo y una base con una desarrollada maquinaria secretora. Poseen distintos receptores capaces de detectar los nutrientes y otras sustancias presentes en la luz, y se pueden distinguir al menos 20 tipos diferentes, cuyos productos ejercen diversas funciones relacionadas con la ingesta y sistema inmune, entre otras [190,191].

En los últimos 50 años, poco a poco se ha ido aclarando la compleja red que supone la regulación del apetito y la ingesta, descubriéndose numerosos reguladores peptídicos que, además de en el control de la ingesta, participan en diversas funciones del sistema digestivo como la motilidad gastrointestinal, digestión y absorción de nutrientes, efecto trófico digestivo y secreción de otros péptidos. Sus mecanismos de

acción son variados, actuando de forma neurocrina, endocrina, paracrina y autocrina [192].

De entre estos péptidos nos vamos a centrar en algunos de los que por ahora mejor se han estudiado, como son la AMY, CCK, GIP, GLP-1, PP y PYY, todos ellos relacionados con la ingesta a corto plazo. Revisaremos también el papel de las hormonas INS y LEP, más implicadas en la regulación a largo plazo.

### **Amilina (AMY)**

#### ***Descubrimiento y estructura***

A principios del siglo pasado se describieron por primera vez los denominados agregados amiloides que se presentaban de una forma muy marcada en el páncreas de enfermos con T2DM [193]. Posteriormente en 1987, dos laboratorios de forma independiente analizaron más detalladamente dichas formaciones desvelándose la estructura del polipéptido amiloide de los islotes o amilina (AMY) [194,195].

Se trata de un polipéptido de 37 AA, formado por un núcleo central bastante conservado y dos secuencias variables que lo flanquean, las cuales son eliminadas [196]. Comparte homología con la calcitonina y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), agrupándose en la familia de péptidos de la calcitonina [197].

Una de sus características es la existencia de un puente disulfuro entre dos cisteínas en las posiciones 2 y 7 que es clave en su actividad biológica [198], así como la formación de los ya comentados agregados amiloides en humanos y felinos, no así en otros mamíferos con una secuencia similar, lo que ha hecho que su implicación en la T2DM no haya sido generalmente aceptada. Dichos agregados han sido ampliamente estudiados y se conoce bastante su fisiología, sin embargo, se desconoce exactamente el mecanismo concreto por el cual afectan a las células pancreáticas en la T2DM [199].

#### ***Secreción y regulación***

La AMY se obtiene a partir de un precursor de 89 AA denominado proamilina la cual es procesada en el retículo endoplasmático y aparato de Golgi para ser almacenada junto con la INS y el péptido C en los gránulos de las células  $\beta$  del páncreas [200]. Dicha colocalización con la INS hace que ambas tiendan a secretarse juntas en una relación

AMY:INS de 1:100, proporción que puede variar dependiendo del estímulo [201] y del estado fisiológico del individuo, como en el caso de la obesidad, donde se produce un desajuste (con un aumento de la AMY respecto a la INS) tanto en humanos como en roedores [202,203].

El principal estimulante de su secreción es la glucosa, produciéndose en humanos una respuesta postprandial aguda tras la ingesta de alimento que puede llegar a cuadruplicar o quintuplicar la concentración de AMY basal y que va en proporción de la cantidad ingerida de éste [204]. Además, se produce un aumento significativo ante una comida estándar [205] o rica en carbohidratos [206].

### ***Receptores: tipos, señalización y localización***

El caso de los receptores de la AMY es poco común, ya que no posee receptores específicos, sino que son complejos formados por el receptor de la calcitonina (CTR) y por una proteína modificadora de la actividad del receptor (RAMP). La unión de RAMP, hace que aumente la afinidad por la AMY unas 20 o 30 veces más que sin ésta (según estudios en células COS-7) [207]. Existen dos tipos de CTR (a y b) y tres tipos de RAMPs (1, 2 y 3), los cuales se pueden combinar de seis formas diferentes [208]. Estudios de hibridación *in situ* han puesto de manifiesto la expresión de CTRa-RAMP2 y CTRa-RAMP3 en el área postrema (AP) [209].

En estudios como el anterior y otros [210], se ha visto que la lesión en el AP bloquea la respuesta a la AMY y que si los antagonistas de este péptido disminuyen la actividad en dicha zona, todo lo cual muestra de forma evidente que el AP es crucial para la regulación de la ingesta mediada por la AMY. No obstante, la AMY también podría actuar (probablemente de forma indirecta debido al aislamiento por la barrera hematoencefálica (BBB)) en otras zonas del tronco encefálico, como el núcleo del tracto solitario (NTS) y el núcleo parabraquial (NPB) [211-213]. Tampoco se descarta una actuación de la AMY sobre el hipotálamo y núcleo central de la amígdala mediante acciones indirectas mediadas por neuronas histaminérgicas [214-216].

Por último, en experimentos en los que se alimenta a ratas con dietas altamente palatables se ha visto una disminución de la ingesta a corto y largo plazo tras la administración del péptido, lo que se asocia a la activación del NA (implicado en los

fenómenos de recompensa y hedonismo), efecto que probablemente sea indirecto, como en el caso del NTS y NPB [217].

### ***Concentraciones circulantes, tiempo de vida media y degradación***

Las concentraciones basales de AMY están en torno a 50-138 pg/ml en ratas [218,219] y 15.6 pg/ml en humanos, con un tiempo de residencia media en estos últimos de aproximadamente 180 minutos tras un test de tolerancia a glucosa (OGTT) [220].

Debido a que este péptido tiene la tendencia a agregarse en condiciones que favorecen la T2DM, conviene diferenciar entre la degradación intracelular, llevada a cabo por la enzima degradadora de INS (capaz de degradar gran parte de la AMY presente) [221] y la degradación sistémica que se produce en el riñón casi en su totalidad [222].

### ***Efectos sobre la ingesta***

En numerosos estudios se puso de manifiesto una disminución en la ingesta tras la administración periférica de AMY [223-225], subrayando que dicho efecto parece ser independiente de las concentraciones plasmáticas basales de dicho péptido y está más influenciado por el aumento súbito postprandial [226]. Dicha acción puede estar mediada en menor o mayor medida por una disminución en el vaciado gástrico [227-229].

La administración periférica (subcutánea) de AMY produce en ratas un efecto mayor y más sostenido durante el periodo diurno que nocturno, mientras que cuando la administración es central -intracerebroventricular- ocurre a la inversa Olsson *et al.* [230], lo que hace pensar que hay variaciones en el mecanismo de acción dependiendo de la fase del día [230]. La acción anorexigénica de la AMY no es debido a un efecto de aversión por la comida [231]. En ratas Zucker obesas genéticas (hiperinsulinémicas, hiperleptinémicas e hiperamilinémicas) [232,233], la administración de un antagonista de la AMY (AC 187) aumenta la ingesta respecto a los controles [234].

Las investigaciones que se han hecho a largo plazo, han demostrado también una disminución de la ingesta y del BW, sobre todo debido a la disminución del tejido



adiposo [235]. Como es de esperar, el bloqueo de la AMY propicia un incremento de la ingesta y de la adiposidad a largo plazo [236].

En humanos la mayoría de estudios se han llevado a cabo con el análogo pramlinitida (usado como tratamiento de la diabetes), la cual puede tener un gran potencial como tratamiento contra la obesidad [237,238].

### ***Obesidad y AMY***

En los últimos años diferentes estudios han puesto de manifiesto un posible papel de la AMY (además de como señal a corto plazo) como reguladora del gasto energético y a través de actuaciones a largo plazo:

- Efectos a largo plazo, como inhibir la frecuencia de la ingesta tras una administración crónica [239].
- En situaciones de obesidad en animales y en humanos aumentan las concentraciones plasmáticas basales de AMY en comparación con individuos delgados [240,241]. No obstante, parece que no se desarrolla resistencia como ocurre con la LEP y la INS, tal y como demuestran estudios en los que la administración aguda de AMY en dosis altas a ratas con obesidad inducida por la dieta, sigue produciendo efectos anorexígenos hasta 10 semanas desde la introducción de la dieta, disminuyendo solo ligeramente tras periodos más largos [242].
- Además se ha observado un aumento en el gasto energético en ratas tras la administración en agudo del péptido [243].
- Como mencionamos anteriormente, la administración a ratas Zucker obesas genéticas (hiperinsulinémicas, hiperleptinémicas e hiperamilinémicas), de un antagonista de la AMY (AC 187) aumenta la ingesta respecto a los controles [234].

Todos estos argumentos revelan un gran potencial de la AMY en su uso en la obesidad, ya que aparentemente en dicho estado no se produce una resistencia, al contrario de lo que ocurre con la INS, LEP y probablemente con la CCK.

### ***Relación con otros péptidos***

#### **CCK**

Existe un efecto sinérgico muy acusado entre la CCK y la AMY en la disminución de la ingesta a corto plazo [244]. De acuerdo con los trabajos de Mollet *et al.* [245] en ratones, parte del efecto anorexigénico de la CCK se debe a la AMY, posiblemente porque module la acción de la CCK a nivel del sistema nervioso central (CNS) [245].

#### **Leptina**

Se han llevado a cabo diferentes estudios en ratas [246-248] que han demostrado tanto una disminución en la ingesta (hasta el 15%) como en el BW tras la administración conjunta de AMY y LEP. La disminución del BW se debía, además, a una reducción de los depósitos grasos, a su vez relacionada con un descenso de la expresión de las enzimas implicadas en la síntesis de grasa y un aumento de las relacionadas con la utilización de lípidos [246-248].

Los mecanismos de cooperación de AMY y LEP se han estudiado ampliamente, existiendo revisiones como la de Trevaskis *et al.* [249], que destacan una posible interacción de ambos péptidos a nivel tanto del tallo (AP) y del hipotálamo (principalmente ARC), aunque se desconoce la espacio-temporalidad. Estos estudios constituyen un campo para posibles fármacos anti-obesidad.

En humanos sometidos a un ayuno prolongado (disminución de la LEP en un 21% y de la AMY en un 67%), el reemplazo de la LEP no afecta a las concentraciones plasmáticas de AMY ni de forma aguda, ni crónica (en mujeres con hipoleptinemia no severa), hecho que no excluye la interacción de ambos péptidos a otro nivel [250].

#### **GLP-1**

Ambos péptidos, AMY y GLP-1, activan neuronas del AP en situación de ayunas, hecho que revierte tras la administración de aminoácidos. No obstante, estudios de marcaje neuronal indican que las vías de actuación de estos dos péptidos no solo son complejas, sino que difieren entre sí [251]. En humanos, la secreción de AMY, al igual que la de INS, se estimula por GLP-1, sin producirse cambios en la proporción INS:AMY.

## INS

Aunque no existe demasiada información al respecto, parece ser que tras la administración conjunta de AMY e INS conjuntamente en ratas genera una disminución en la ingesta acumulada en un plazo de 4 horas, hecho que no se produce tras su administración por separado [252].

## PYY

Roth *et al.* [253] refieren una disminución de la ingesta en 24 horas en dos tipos de ratas y uno de ratón con obesidad inducida por HFD [253] tras la administración de forma intraperitoneal (i.p.) de AMY junto con PYY (3-36). Dicho efecto parece producirse a nivel del área postrema [254]. No obstante no se conocen en profundidad los mecanismos de la interacción entre ambos péptidos.

### ***Perspectivas futuras***

En general, aunque se conocen bastantes aspectos de la fisiología de la AMY, quedan por dilucidar muchos de los mecanismos subyacentes en relación con la regulación de la ingesta, del BW y del gasto energético. Nuevas técnicas como el análisis mediante escáner cerebral y más estudios en humanos serán vitales para aclarar su fisiología, pudiendo así servir de herramienta eficaz en la lucha contra la obesidad.

## **Puntos clave**

Existen numerosas evidencias de su papel como señal anorexígena a corto plazo.

Posible influencia sobre la ingesta a largo plazo con la consecuente implicación en la obesidad.

Sus características convierten a este péptido en un buen candidato a ser utilizado como fármaco (sobre todo análogos como la pramlintida).

## **Colecistoquinina (CCK)**

### ***Descubrimiento y estructura***

El péptido colecistoquinina (que literalmente significa “movera de bilis de la vesícula”), fue descubierto, o más bien propuesta su existencia por Ivy y Oldberg [255] en 1928 cuando observaron una contracción de la vesícula biliar tras la inyección de

una infusión lipídica en el intestino delgado. Un tiempo después (1943), Harper y Raper [256] extrajeron una sustancia de la mucosa intestinal que inducía la secreción pancreática denominándola pancreozimina. No fue hasta 1968 cuando Jorpes y Mutt [257] aislaron de la mucosa intestinal del cerdo un péptido de 33 aminoácidos que resultó ser la misma sustancia que la CCK y pancreozimina, denominándola de la primera forma definitivamente.

Dicha molécula es sintetizada a partir de un péptido precursor de 95 AA designado pro-CCK, el cual tras someterse a un proceso de amidación en la secuencia 84-86 (Gly-Arg-Arg), es procesado por convertasas y carboxipeptidasas para producir en primera instancia un péptido de 83 AA denominado CCK-83 que puede ser escindido (dependiendo el tejido), obteniéndose las denominadas CCK-58, CCK-33, CCK-22 o CCK-8, hallándose todas tanto en roedores como en humanos [258].

### ***Secreción y regulación***

La CCK es secretada por las células EEC de tipo I, que se encuentran mayoritariamente en la zona superior del intestino delgado (duodeno y yeyuno) [259]. Son típicas células secretoras endocrinas, con una marcada polaridad apical-basal, en cuya base se encuentran los gránulos que contienen la CCK, así como unas estructuras parecidas a pseudópodos recientemente descubiertas que pueden relacionarse con la comunicación con células adyacentes [260].

Su secreción es estimulada principalmente por proteínas [261] y grasa [261,262] y en menor medida por carbohidratos [261]. Dicha estimulación concuerda con el hecho de que los alimentos ricos en esos nutrientes muestran el mayor índice de saciedad [263]. En el caso de la grasa se observa un mayor efecto por parte de los ácidos grasos de cadena larga (>12 C) [264]. Además, dichos FFA actúan de forma indirecta sobre el vago ya que promueven la liberación de CCK que actúa de forma paracrina sobre receptores para CCK presentes en las terminaciones aferencias vagales del intestino [265]. Es capaz de estimular la secreción de lipasa gástrica hasta el cuádruple de la secreción normal [266]. Se observa un incremento de los niveles de CCK con la edad en humanos [267].

Respecto a las concentraciones circulantes, en diversos estudios en los que se utilizan diferentes inhibidores de proteasas en sangre, se detectaba fundamentalmente la CCK-8, 22 y 33 y ausencia de la CCK-58. Tras un revelador estudio llevado a cabo por Reeve *et al.* [268], usando CCK de los diferentes tipos marcadas radioactivamente, se llegó a la conclusión de que el protocolo utilizado para obtener las muestras causaba una alta degradación de la CCK-58 y de que los anticuerpos utilizados fallaban en su detección, proponiéndose un método optimizado de recuperación gracias al cual se dedujo que la CCK58 es la forma predominante en ratas (probablemente también en humanos y perros) [268].

### ***Receptores: tipos, señalización y localización***

Existen dos tipos de receptores para la CCK que pertenecen al grupo de los receptores acoplados a proteína G identificados conocidos como CCK1R (CCKAR) y CCK2 (CCKBR), los cuales tienen un 50% de homología entre sí. El CCK1R se localiza en la capa muscular de la vesícula biliar, neuronas pancreáticas (en humanos, en ratas además los hay en las células acinares), músculo liso pilórico y neuronas entéricas. Los CCK2R se sitúan en la mucosa oxíntica del estómago y en diversas zonas del encéfalo como el núcleo estriado, corteza y sistema límbico, lugares que se relacionan con su función como neurotransmisor [269].

### ***Concentraciones circulantes, tiempo de residencia media y degradación***

Gran parte de la CCK secretada actúa de forma paracrina activando las fibras nerviosas vagales y el resto entra en la circulación portal y pasa por el hígado antes de detectarse en plasma [270]. Debido a la degradación que se produce en dicho recorrido la concentración de CCK en estado de ayunas está en torno a 70-250 pg/ml [271,272] en ratas y 1-2,5 pM en el ser humano, aumentando hasta 5-6 pM alrededor de los 15-30 minutos postprandiales y produciéndose un descenso paulatino hasta el retorno a valores basales más allá de los 60 minutos [273,274].

### ***Efectos sobre la ingesta***

Como se ha comentado, las concentraciones plasmáticas de CCK son bajas en ayunas, lo que por un lado hace que aumente la expresión de receptores cannabinoides de tipo 1 (CB1) [275] y hormona concentradora de melanina 1 (MCH-1) [276], y por otro

se bloquee la expresión del transcrito regulado por cocaína y anfetamina (CART) en las neuronas vagales, hechos que redundan en una estimulación de la ingesta. Los sucesos opuestos ocurren cuando se ingiere alimento y se secreta CCK (disminuye la expresión de los receptores CB1 y MCH-1 [276] y la expresión del péptido CART [277]), de forma que se inhibe la ingesta. No obstante se ha propuesto que dichas regulaciones se llevan a cabo gracias a la cooperación de la CCK con la LEP (ver más adelante).

Es un hecho bastante conocido que la CCK secretada por las células de tipo I actúa en parte a nivel de las terminaciones nerviosas que expresan CCK1R [278,279]. Este hecho se manifiesta en una activación del NTS en conexión con la amígdala [280], lo que deriva en una serie de efectos que van desde disminución del vaciado gástrico [281] hasta contracción de la vesícula biliar [282] y estimulación de la secreción pancreática [283].

En relación con la ingesta, numerosos estudios en diferentes modelos (entre los que se encuentra el ser humano) han puesto de manifiesto que tras una inyección intravenosa (i.v.) de CCK-8 se produce una disminución del tamaño de las comidas [284-286], no así la ingesta total diaria, lo que revela una implicación principalmente en el proceso de terminación de la comida o saciación más que en la duración del periodo entre comidas o saciedad [281].

No obstante, podría haber también un efecto sobre la ingesta a largo plazo. Así, las ratas OLETF (*Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty*), las cuales no expresan los receptores CCK1R, se caracterizan por una mayor ingesta de alimento en un mismo periodo de tiempo respecto al control, con el consecuente desarrollo de obesidad [287]. En estas ratas, la ausencia de receptores CCK1R en el hipotálamo dorsomedial (DHM) hace que en esta región se sobre-exprese el neuropéptido Y (NPY) [288], siendo esto la causa del aumento en la ingesta y el BW en este modelo.

Por otra parte, en ratones con una mutación similar se produce un aumento del tamaño de las comidas pero la ingesta total diaria es similar a los controles [289]. Al contrario que las ratas, éstos son capaces de compensar la falta de señal de la CCK sin

que aumenten los niveles de NPY, lo que hace que no se produzca la hiperfagia y obesidad de las primeras [290].

De los estudios anteriores parece deducirse una relación entre la CCK y NPY más compleja de lo que se pensaba, lo que requiere la realización de estudios más detallados.

### ***Obesidad y CCK***

El papel de la CCK en la obesidad no está del todo claro, ya que en algunos modelos de ratas existe una disminución de la sensibilidad a la CCK [291], pero en otros como las ratas con obesidad inducida por dieta o *diet-induced obesity* (DIO) aumenta [292]. En humanos se ha descrito una respuesta bilio-pancreática a CCK exógena menor en obesos [293], sugiriendo una disminución de la sensibilidad a la acción del péptido. Sin embargo, otros trabajos han mostrado un efecto saciante similar en sujetos obesos y delgados tras una la administración de una infusión de CCK [294]. Por otro lado las concentraciones circulantes en humanos permanecen iguales [295] o aumentan en mujeres obesas [296].

Estos datos, junto con los comentados anteriormente, muestran que la interacción de la CCK con el resto de péptidos (véase LEP, GRN e INS) es clave en la regulación de la ingesta y el BW tanto en roedores como en humanos.

### ***Relación con otros péptidos***

#### **Grelina**

Estudios como el de Kobelt *et al.* [297] han demostrado que la CCK inhibe el efecto orexigénico de la GRN cuando ambas se administran de forma periférica [297].

#### **Insulina**

En humanos la CCK parece potenciar la secreción de INS estimulada por aminoácidos [298]. Por otro lado, la administración de CCK en ratas es capaz de reducir el aumento en el tamaño de la comida y la hiperfagia inducidas por dosis hipoglucemiantes de INS [299]. Todo ello hace pensar en la acción de la CCK no sólo como señal periférica y central de saciedad, sino también con una implicación en vías glucorreguladoras.

### Leptina

La importancia de la CCK en la regulación del BW es significativa, observándose en diferentes estudios que ésta actúa en conjunción con la LEP sobre el hipotálamo [300,301], de forma que produce una disminución del BW respecto a los controles, hecho que por separado no ocurre y que probablemente se deba a que la CCK facilita la acción de la LEP sobre el sistema nervioso central [302]. La interacción entre LEP y CCK podría darse adicionalmente a nivel periférico, como sugiere la colocalización de receptores para ambos péptidos en neuronas aferentes vagales [303].

### PP

Aunque son escasos y algo antiguos los estudios que relacionan ambos péptidos, se ha descrito que la CCK secretada en respuesta a la comida promueve la secreción del PP en humanos y en perros [304,305].

### PYY

Estudios realizados en perros [104] indican que la CCK es capaz de estimular la secreción de PYY.

### ***Perspectivas futuras***

Por sí sola, la CCK no tiene una influencia determinante a medio-largo plazo sobre la ingesta; no obstante, la conexión que tiene con el resto de péptidos tanto a corto (GRN y AMY) como a largo plazo (LEP e INS) es determinante para su acción fisiológica. En este sentido, la combinación de las distintas hormonas para tratar la obesidad supone un campo inexplorado de estudio.



## Puntos clave

La secreción de CCK se estimula preferentemente por nutrientes como AA y ácidos grasos de cadena larga.

Actuación sobre los receptores Y2 (situados en el nervio vago) y estimulación de la expresión de la proteína reguladora CART, así como inhibe la acción de los receptores CB1 y la expresión del MCH-1.

Interacción con péptidos que actúan sobre la ingesta a corto plazo (GRN y AMY) y a largo plazo (INS y LEP).

### **Péptido insulínico dependiente de glucosa (GIP)**

#### **Descubrimiento y estructura**

En 1971 Brown y Dryburgh [306] fueron los primeros en publicar la secuencia del péptido que denominaron péptido inhibidor gástrico, ya que en perros (no así en humanos) se observó un efecto inhibidor de la secreción gástrica [307]. La denominación inicial derivó en péptido insulínico dependiente de glucosa, quedando clara su implicación en la homeostasis glucídica [308,309]. De este modo, se ha agrupado al GIP junto al GLP-1 en el denominado grupo de hormonas incretinas, concepto propuesto por primera vez por Starling y Bayliss hace más de un siglo [310]. El efecto incretina se define como la amplificación de la respuesta insulínica que se produce tras la ingestión oral de glucosa frente a la administración de una cantidad equivalente por vía intravenosa. Este efecto se debe a la estimulación que GLP-1 y GIP ejercen sobre el páncreas [311], contribuyendo ambas a tal efecto de forma equitativa [312].

El GIP deriva de un péptido precursor denominado preproGIP que consta de 144 AA en roedores y 153 en humanos, cuya maduración parece llevarse a cabo de forma mayoritaria debido a la proteasa PC1/3, según muestran estudios en roedores *knockout* para dicha proteína. Dicho proceso genera de forma predominante el GIP 1-42 que se considera como la forma activa, siendo la mejor estudiada, aunque se pueden producir procesamientos alternativos que generan GIP 1-30 amida y otro péptido de 6.5 kDa, cuyo efecto no es del todo conocido [313].

### ***Secreción y regulación***

Secretado por las células K que se encuentran de forma predominante en el duodeno y yeyuno superior, se detecta también en células endocrinas en las que el GLP-1 y GIP se co-localizan [314]. Además de en el intestino, se ha puesto de manifiesto la presencia de ARNm de GIP en el páncreas, glándulas salivares, estómago y diferentes áreas del encéfalo, aunque poco se conoce sobre la función del GIP en dichos lugares [313].

La ingestión de comida en humanos produce un aumento de la secreción de GIP proporcional al tamaño de ésta (mayor estímulo con grasas y glucosa), con un pico máximo que aparece entre los 15-30 minutos [315,316], y permaneciendo sus concentraciones elevadas hasta por lo menos 2 horas más tarde [317]. Dicho incremento postprandial es más rápido que lo cabría esperar en base a la interacción de dichos nutrientes con las células K, por lo que se ha postulado que la secreción de GIP está en parte sometida a regulación nerviosa [318].

La secreción de este péptido se correlaciona con la absorción de nutrientes [319], prueba de ello es la disminución drástica de su secreción hacia la linfa [320-322] tras la administración de un inhibidor de la síntesis de quilomicrones. En definitiva, para que los lípidos estimulen la secreción de GIP es necesario que se absorban [319].

Además, referido a la secreción estimulada por nutrientes, existen diferencias entre humanos y roedores:

- En humanos, se estimula por la ingestión de comidas mixtas [323], así como carbohidratos [323] y grasas [115], siendo más potentes los FFA de cadena larga (>12 C) e insaturados [115,324]. En humanos, la manteca y la palmito oleína interesterificada (IPO) disminuyen la secreción del GIP en comparación con el aceite de girasol alto oleico (HOSO) y la palmito oleína (PO) [325]. Esto sugiere que la conformación de los TG afectan a la secreción de GIP (el IPO tiene idéntica composición que el PO pero mayor proporción de palmítico en sn-2). La proteína parece tener poco efecto estimulante [323], aunque algunos AA libres favorecen su secreción [326].

- En ratas y cerdos, la grasa por sí sola estimula débilmente la secreción de GIP, hecho que cambia cuando se administra conjuntamente con glucosa [327,328]. La acción estimuladora de la glucosa requiere del transporte de ésta al interior de la célula K, como demuestra la ausencia de secreción de GIP tanto en presencia de phloridzina (un inhibidor del transportador SGLT-1) [329] como en ratones *knockout* para dicho transportador [330]. La secreción se estimula de forma significativa debido a TG [331], pero los monoglicéridos y diglicéridos hacen que disminuya la secreción de GIP, aparentemente debido a una interacción con los transportadores de glucosa (SGLT-1) y de grasa (FAT/CD36), aunque se desconocen el resto de mecanismos que pueden estar implicados [331]. Además, parece observarse en ratas [332] y perros [333] una respuesta marcada ante la administración intragástrica de proteína, hecho que está influido por la acidez de la secreción gástrica [332].

### ***Receptores: tipos, señalización y localización***

El receptor del GIP (GIPR), es un receptor acoplado a proteínas G cuya expresión es bastante ubicua, hallándose su ARNm en páncreas, estómago, intestino delgado, tejido adiposo, glándula pituitaria, corazón, testículos, células endoteliales, así como en varias regiones cerebrales como el córtex cerebral, hipocampo y bulbo olfatorio [334].

### ***Concentraciones circulantes, tiempo de residencia media y degradación***

Este péptido sufre una degradación muy rápida por la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4), habiéndose establecido su vida media en sangre en tan sólo 7 minutos hasta que se degrada a la forma inactiva GIP 3-42 [317]. Esto hace que las concentraciones plasmáticas en ayunas sean bajas, alrededor de 20-100 pg/ml en ratas [218,335] y 20 pg/ml en humanos [336].

### ***Efectos sobre la ingesta***

Existe toda una plétora de estudios en relación con el papel del GIP en la secreción de INS inducida por glucosa y en la disminución de la apoptosis de las células  $\beta$  pancreáticas, así como su implicación en el metabolismo lipídico, remodelación ósea

[337,338] y actuación como neurotransmisor y posible factor neuroprotector [339-341].

Respecto a su papel en la ingesta y apetito no hay un efecto inhibitor ni en roedores [342,343] ni en humanos [344,345] en situación normal, no así en otras condiciones como las del estudio de Kim *et al.* [346], donde se observó que en ratones transgénicos que sobreexpresaban el GIP mantenidos con una HFD durante 18 semanas, se producía una inhibición del apetito y reducción de la adiposidad y la inflamación, todo ello en asociación con una mayor expresión de dicho péptido en zonas del hipotálamo relacionadas con la regulación de la ingesta [346].

### ***Obesidad y GIP***

La ingestión de grasas y glucosa incrementa de forma significativa la secreción de GIP, cuyas concentraciones plasmáticas están aumentadas en individuos obesos, generándose una insensibilidad a dicho GP [347,348]. Además, el GIP promueve la acumulación de grasa en los adipocitos y su ausencia provoca un aumento del gasto energético asociado a la combustión de grasas, lo que se relaciona con el hecho de que dicho péptido aumenta la actividad lipoproteína lipasa (LPL) en el tejido adiposo [349]. Este efecto es dependiente de la INS, ya que en ausencia de ésta, el GIP no tiene capacidad lipogénica [350].

En íntima relación con lo descrito anteriormente, cabe resaltar que los ratones *knockout* para el receptor GIPR son resistentes a la obesidad inducida tanto por HFD [350] como por ovariectomía [351]. En este último trabajo, la menor ingesta de alimento observada en los animales deficientes en GIPR se asoció con una menor expresión hipotalámica de NPY, lo que sugiere la existencia de interacciones entre GIPR y los estrógenos a nivel de la regulación hipotalámica de la ingesta. Este último hecho puede ser importante de cara a desarrollar fármacos para tratar la obesidad [351].

### ***Relación con otros péptidos***

#### **GLP-1**

La colocalización del GIP con GLP-1 en algunas células EEC y su efecto común sobre la secreción de INS son el exponente de la relación entre ambos péptidos, la cual

aparentemente no va más allá de la colaboración en el efecto incretina. El GLP-1 está más implicado en el control de la ingesta y funciones relacionadas con el sistema cardiovascular, mientras que el GIP se relaciona más con funciones óseas.

### ***Perspectivas futuras***

Existen muchas lagunas en lo referente al papel del GIP en la regulación de la ingesta, hecho que cambiará a corto plazo debido al auge del estudio de estos péptidos en relación con el tratamiento de la obesidad.

### **Puntos clave**

Debido a sus acciones en la lipogénesis y a su efecto incretina, el GIP influye en la adiposidad del individuo.

No se descarta que el GIP tenga un papel en la regulación de la ingesta y el apetito, pero se necesitan estudios más detallados.

### ***Péptido análogo al glucagón-1 (GLP-1)***

#### ***Descubrimiento y estructura***

Ya se había observado en los años 60 en islotes pancreáticos de peces y mamíferos la existencia de ARNm con dos secuencias peptídicas en tándem relacionadas con el glucagón, las cuales no fueron secuenciadas hasta 1983 en hámster por el equipo de Bell, denominándose péptidos similares al glucagón 1 y 2 (GLP-1 y GLP-2) [352].

En humanos y en ratas existen dos formas activas, el GLP-1 (7-37), que es el predominante, y el GLP-1 (7-36) amida, las cuales son degradadas a GLP-1 (9-36) amida y GLP-1 (9-37) [353].

#### ***Secreción y regulación***

El precursor proglucagón es un péptido de 160 AA que se expresa por un lado en las células  $\alpha$  pancreáticas, dando lugar al polipéptido pancreático relacionado con la glicentina (GRPP), el glucagón, y el fragmento principal del proglucagón (MPF), y por otro, en las células L intestinales donde es procesado para producir el péptido glicentina, GLP-1 y GLP-2 [354,355].

Es importante destacar el hecho de que el GLP-1 se expresa tanto en el sistema nervioso central (existen células inmunoreactivas para este péptido en el NTS de ratas, monos y humanos [356,357]) como en el sistema digestivo. Es producido en las células L, las cuales son EEC de tipo abierto y se encuentran más concentradas en el yeyuno e íleon en humanos y cerdos, y en el íleon en ratas, aunque se encuentran de forma dispersa por todo el intestino delgado y grueso [358].

Su secreción aumenta con la mera presencia de nutrientes en el intestino [319,359] y se correlaciona con el tamaño de la comida [323]. Su principal estímulo es la glucosa (a través de los transportadores SGLT) [360] y también se estimula por la grasa [116], con una mayor secreción en respuesta a ácidos grasos de cadena larga (>12 C) [361] y preferentemente los monoinsaturados respecto a los poliinsaturados [362], aunque no está del todo claro hasta qué punto el grado de insaturación influye en la respuesta [363]. Proteínas y AA también promueven su secreción [323,364].

Su secreción en humanos es bifásica, con un pico postprandial a los 10-15 minutos seguido de un aumento menos marcado a los 30-60 minutos. Se ha propuesto para la fase temprana la existencia de mecanismos nerviosos, aunque esto ha sido cuestionado por estudios con íleon aislado y perfundido, que indican que la inervación simpática del intestino inhibe la secreción del GLP-1, mientras que la inervación extrínseca vagal no tiene efecto; en general una actividad colinérgica intrínseca parece ser la predominante [365-367]. En ratas se produce un aumento progresivo en las concentraciones circulantes hasta alcanzar un máximo a los 30 minutos, momento en el que los valores van descendiendo de forma progresiva [368].

En mujeres se ha observado que con la edad se produce una mayor secreción de GLP-1 tras la ingesta de HDC [369], aunque otros autores no han encontrado diferencias entre sujetos mayores y de mediana edad (de ninguno de los dos sexos) en la respuesta de GLP-1 a una comida estándar [370].

### ***Receptores: tipos, señalización y localización***

El receptor GLP-1R, del tipo asociado a proteína G, se encuentra ampliamente distribuido en lugares como islotes pancreáticos, pulmones, corazón, riñón, estómago, intestino, pituitaria, piel, ganglios nerviosos y diferentes regiones del CNS [371,372].

### ***Concentraciones circulantes, tiempo de residencia media y degradación***

La vida media del GLP-1 es de menos de 2 minutos debido a que es rápidamente degradado intravascularmente por la enzima DDP-4 a GLP-1 (9-37) o GLP-1 (9-36) [373]. El sitio más aparente de limpieza de éste es el riñón [374].

Del 100% que se secreta sólo el 25% entra intacto en la vena porta [375] y llega al hígado, donde se produce una degradación del 40-50%, estimándose que únicamente un 10% alcanza el nivel sistémico. Las concentraciones plasmáticas basales del péptido activo se encuentran en ratas en un intervalo de 50-120 pg/ml [218,376,377] y 30-50 pg/ml en humanos [336,378]. Los metabolitos producidos son también rápidamente degradados en el riñón, con una vida media de 4-5 minutos [367].

### ***Efectos sobre la ingesta***

El GLP-1 es capaz de inhibir el vaciamiento gástrico en dosis fisiológicas y de manera dosis-dependiente, de forma que la presencia de nutrientes en el íleon inhibe la motilidad antro-piloro-duodenal así como el tono del fundus, y a la vez aumenta el tono pilórico haciendo que disminuya la transferencia de nutrientes hacia el intestino distal, lo que se denomina “freno ileal” [379]. Estos efectos se llevan a cabo, al menos en parte, a través de mecanismos nerviosos, como se ha observado en animales con ablación de las aferencias vagales [380,381]. Junto con el GIP, el GLP-1 interviene en el aumento postprandial de las concentraciones plasmáticas de INS (efecto incretina). Además, el GLP-1 promueve la síntesis de INS e inhibe la secreción de glucagón, estimula la diferenciación y proliferación de las células  $\beta$  pancreáticas y tiene una acción conservadora del hueso [382].

Respecto a la ingesta, en roedores se ha visto una disminución tras la administración de GLP-1 tanto central [383,384], como intraperitoneal [385,386] e intravenosa [387], así como de los análogos liraglutida y exendina-4 en agudo y crónico, periférico y central [388]. Además la administración central de exendina-9 (antagonista del GLP-1) anula el efecto anorexígeno del GLP-1 administrado directamente al CNS, pero no el efecto del GLP-1 periférico. Por su parte, la exendina-9 periférica anula el efecto del GLP-1 periférico, pero no tiene efecto si la administración de GLP-1 es central [389]. Se ha advertido que si se une el GLP-1 con albúmina (evitando así el paso de la BBB) se

sigue produciendo una disminución en la ingesta [390]. Además tanto en animales [381,391], como en humanos [392], la vagotomía previene el efecto anorexígeno del GLP-1.

Todos los efectos anteriores parecen deberse a su acción sobre zonas del tallo encefálico como el NTS y el AP, y a nivel hipotalámico en los núcleos LH, PVN, DMH y VMH [393,394] y en el ARC, donde sin embargo el efecto parece más relacionado con el control de la homeostasis glucídica que de la ingesta [395]. Recientemente se ha descubierto que el efecto anorexígeno producido por el GLP-1 en el cerebro depende de la presencia de glucosa en sangre [396].

Teniendo en cuenta todos los estudios anteriores, parece evidente que el GLP-1 está implicado en la regulación de la ingesta a corto plazo, no obstante, no queda del todo claro si el efecto es predominantemente periférico o central. Ello es debido a varios factores, como el hecho de que los experimentos en los que se administra de forma exógena pueden no simular las condiciones fisiológicas, ya sea por la amplia distribución del GLP-1R o porque los compuestos sintéticos tienen una vida media más larga. Además en el cerebro no se sintetiza DPP-4 lo que también hace que el efecto sea posiblemente más prolongado. En definitiva el factor clave para conocer los efectos locales será el conocer los receptores que se activan en los diferentes lugares en los que se administre [397].

### ***Obesidad y GLP-1***

Aunque el GLP-1 parece jugar un papel importante en la regulación de la ingesta, la influencia en la obesidad no está tan clara. Tanto en obesos como en obesos mórbidos parece ser que la respuesta a la comida [398] y la secreción total, estimada por el AUC [399], es menor en comparación con individuos normopeso. Una pérdida de BW en los individuos obesos normaliza la situación [399], y así como también el bypass yeyuno-ileal, en asociación con el aumento de la secreción de las células L ante un incremento de la llegada de nutrientes no absorbidos a la porción distal del intestino [400]. A pesar de esto, el efecto inhibitor de la ingesta aparentemente no se modifica en la obesidad [401].



En estudios con obesidad inducida por HFD en ratas se observa un retardo en el efecto que producen los agonistas del GLP-1, así como un aumento de los GLP1R en el intestino y disminución en el cerebro [402]. Además, otros estudios con obesidad inducida por dieta pero diferenciando entre ratas propensas o resistentes a desarrollar la obesidad, sugieren que esta se asocia a un defecto en la secreción y actuación del GLP-1, cuya resultante sería la hiperfagia y ganancia de BW [403].

### ***Relación con otros péptidos***

#### **CCK**

Son diversas las similitudes en la forma de actuar de ambas hormonas, liberándose rápido y siendo degradadas también en poco tiempo y ejerciendo su efecto anorexigénico a nivel del NTS. Igualmente, existen numerosas evidencias, del papel de estos dos péptidos en la ingesta a corto plazo [389]. Además la CCK es capaz de activar las neuronas productoras de GLP-1 que se encuentran en el tallo y que proyectan a regiones del hipotálamo, lo que podría relacionarlas con los mecanismos de saciedad de dichos péptidos [404].

#### **PYY**

En ratas, la administración i.p. conjunta de PYY y GLP-1 en dosis (3 y 30 nmol/kg, respectivamente) que por sí solas no producen efecto (subumbrales), causa una reducción significativa en la ingesta de alimento, Resultados similares se han descrito en ratones delgados y obesos, así como en humanos. Este efecto aditivo muy probablemente tiene lugar a nivel del ARC [405,406]. Por otra parte, se ha descrito en humanos que el GLP-1 exógeno inhibe la secreción de PYY, lo que sugiere la existencia de un *feedback* negativo del GLP-1 sobre las células L [407].

### ***Perspectivas futuras***

Como se ha visto, parece estar claro que el GLP-1 regula la ingesta a corto plazo debido a su acción sobre los centros de integración nerviosos, aunque no se sabe concretamente si el efecto se lleva a cabo a través de vías nerviosas (vagal), endocrinas (acción directa sobre el encéfalo) o incluso debido a su expresión *in situ* en este último. En resumen, queda mucho trabajo por realizar para concretar la fisiología de este GP.

## Puntos clave

Su efecto anorexígeno a corto plazo es evidente, aunque queda por dilucidar si se lleva a cabo a través de una actuación en el vago, debido a una acción endocrina del GLP-1 en el encéfalo o al propio GP que es expresado en este último.

El desarrollo de análogos que posean una mayor resistencia a la degradación está suponiendo el principal avance en el desarrollo de herramientas contra la obesidad.

### **Grelina (GRN)**

#### **Descubrimiento y estructura**

Es uno de los péptidos más recientemente descubiertos, en torno a 1999, cuando el grupo de Kojima [408] logró aislarlo del estómago de la rata, tras una larga investigación previa en búsqueda de un compuesto liberador de hormona del crecimiento que actuaba por una vía diferente de la hormona liberadora de hormona del crecimiento (GHRH) [409].

Consta de 28 AA y es sintetizado a partir de un péptido mayor de 117 AA denominado preprogrelina (del cual se obtiene también la obestatina [307]), que es procesado por la convertasa PC 1/3 y modificado por la grelina O-aciltransferasa (GOAT). Esta enzima le añade un ácido graso de cadena media (radical acilo) en la serina 3, un tipo de modificación única en péptidos de este tipo y que le confiere gran parte de su actividad biológica. Dicha modificación puede ser de tipo octanoica (8:0), decanoica (10:0) o decenoica (10:1) Aunque la GRN desacilada (sin adición) se ha considerado inactiva, trabajos recientes informan de un posible un efecto orexígeno [410].

#### **Secreción y regulación**

Las células X/A (P/D en humanos) se identifican como células productoras de GRN, denominándose "X" por no conocerse su producto de secreción y "A" por la similitud de sus gránulos con los de las células  $\alpha$  del páncreas [411]. Se localizan en la mucosa gástrica y en el íleon, ciego y colon, siendo las gástricas en su mayoría de tipo cerrado (morfología poco común en las células EEC) y las otras de tipo abierto [412].

Los mecanismos fisiológicos en el tipo cerrado han sido difíciles de estudiar; no obstante, estudios *in vivo* han mostrado que su secreción está regulada por el vago, ya que en ratas vagotomizadas disminuyen las concentraciones circulantes a corto plazo pero aumentan con el tiempo, lo que hace ver una regulación más compleja [413]. Además la mayoría de los nutrientes producen una inhibición de su secreción [414], al igual que hace la INS, somatostatina (no en todos los experimentos) e hiperglucemia [415].

Resultados de distintos estudios muestran la complejidad de esta regulación. Por ejemplo, se ha descrito que la administración i.p. de gastrina y CCK aumenta la secreción de GRN (activa y total) en ratas [416], Sin embargo, el hecho de que gastrina y CCK se secretan después de la comida y exhiben concentraciones plasmáticas bajas en ayunas nos llevaría más bien a pensar que ambos péptidos inhiben la secreción de GRN. Por otro lado, la GRN estimula la secreción ácida del estómago vía nervio vago [417], lo que sugiere que CCK y gastrina podrían estimular la GRN para aumentar la secreción gástrica.

La supresión de la secreción se encuentra directamente relacionada con las calorías ingeridas la una comida [418] y parece depender de la longitud de exposición del intestino delgado (al menos en el caso de la glucosa) [419]. Respecto a los macronutrientes, en ratas se ha observado el mismo nivel de inhibición con proteínas (caseína y peptona), aceite de maíz, mezcla de triglicéridos de cadena media y por último dextrosa [414], todo ello administrado intragástricamente. En humanos la mayor inhibición se debe a glucosa [420] y a proteína [421] (aunque no en todos los estudios [422]), siendo el efecto de la grasa menor en comparación con los otros dos macronutrientes [423,424]. En ratas se ha observado una mayor supresión de la secreción tras la administración intraduodenal de FFA de cadena larga (12 C) en comparación a los de cadena corta (10C) [119].

El perfil de secreción en ratas es bimodal, con un pico sobre las 15.00 h y otro sobre las 6.00 h, lo que coincide con el menor y mayor volumen gástrico, respectivamente, hecho que *a priori* no concuerda con la función orexigénica de la GRN y que probablemente se deba a una mayor complejidad en la función de esta. Una posible

explicación, de nuevo, es que el primer pico estimule la ingesta y el segundo la secreción gástrica. Se deben plantear estudios más detallados para dilucidar exactamente la función de la GRN en ratas [416].

En humanos, a pesar de que existe una gran variabilidad interindividual, por término medio se observa un pico alrededor de las 8.00 de la mañana para decaer a la mitad de estos valores después del desayuno, ocurriendo lo mismo antes y después del almuerzo y la cena (aunque los niveles mínimos son progresivamente mayores), y culminando en un ascenso durante la noche hasta la mitad de ésta con un posterior descenso previo el amanecer [425].

Respecto a la influencia de la edad sobre los niveles circulantes, han referido aumentos en ratas adultas [426], no existiendo un consenso en humanos aunque parece que disminuye [427] o no cambia [428]. Las concentraciones plasmáticas de esta hormona están influenciadas por el sexo (hasta tres veces superiores en mujeres que en hombres) [429] y también por el BMI [430], factores que pueden influir en los resultados obtenidos en los diferentes estudios.

### ***Receptores: tipos, señalización y localización***

La GRN es un ligando endógeno del receptor denominado GHS-R o GRLN-R, el cual se expresa en diferentes áreas del encéfalo, en el nervio vago, islotes pancreáticos, hígado y en menor medida en músculo [431].

La acción de la GRN es directa sobre el sistema nervioso central, ya que es capaz de atravesar la BBB actuando sobre el ARC donde activa las neuronas que expresan el neuropéptido Y/péptido relacionado con la proteína agoutí (NPY/AgRP) e inhibe las que poseen el péptido precursor de la pro-opiomelanocortina/transcrito regulado por cocaína y anfetamina (POMC/CART). Además, recientemente se ha visto que activa neuronas del área hipotalámica lateral y del NTS (muy posiblemente a través del nervio vago), así como de la amígdala, corteza orbitofrontal, ínsula anterior y núcleo estriado, que controlan el comportamiento respecto a la comida [432]. Por último hay que añadir que la GRN se expresa en el CNS, más concretamente en neuronas adyacentes al tercer ventrículo, entre los núcleos dorsal, ventral, PVN y ARC. Usando técnicas de registro electrofisiológico se ha revelado la acción de este péptido

imitando al NPY en el PVN, esto es indicativo de una acción directa *in situ* en el CNS, además de las ya comentadas [433].

### ***Concentraciones circulantes, tiempo de residencia media y degradación***

La concentración sanguínea del péptido activo suele estar en torno a 80-90 pg/ml en ratas [434,435]. En humanos oscilan alrededor de 500-600 pg/ml para la GRN total y 200-250 pg/ml para la forma activa [436].

El tiempo de residencia media depende de las señales que regulan negativamente la ingesta como se ha comentado anteriormente, y de su degradación. Sobre esta última se sabe que la eliminación del grupo acilo es llevada a cabo por la enzima lisofosfolipasa APT1 en el estómago y quizás en sangre [437], y se ha propuesto la posibilidad de una degradación por proteólisis N-terminal por carboxipeptidasas [438].

### ***Efectos sobre la ingesta***

La GRN es el único péptido circulante cuyo efecto es orexigénico, demostrado en diferentes estudios tras administración tanto central en roedores [439] como periférica en humanos [440], lo que se ve reforzado por el efecto opuesto de algunos antagonistas de los GRLN-R [441,442]. Su concentración es más alta en individuos con anorexia y se produce una mejora de los síntomas de la caquexia tras su administración exógena [443]. Además de su acción sobre el ARC [444], recientemente se ha puesto de manifiesto su posible actuación a nivel del PVN [445]. Teniendo en cuenta lo anterior parece quedar claro que la GRN tiene un efecto en la ingesta a corto plazo sobre todo por acción directa sobre el CNS.

Por otra parte, estudios en ratas confirman que la vagotomía anula el efecto orexigénico de la GRN en administración periférica (4,9 µg/rata), pero no si la dosis es de 12 µg/rata [446]. Estos efectos dosis-dependientes merecen estudio más detallado, aunque parece claro que la GRN puede actuar por vía endocrina o nerviosa.

La GRN, al estimular la ingesta, hace que a largo plazo se acumule tejido adiposo [447], existiendo una interacción más o menos directa con la INS y posiblemente con la LEP, como se abordará más adelante.

### ***Obesidad y grelina***

Como es de esperar, y de manera opuesta a lo que ocurre en pacientes con anorexia [448], las concentraciones plasmáticas de GRN están disminuidas en individuos obesos [449]. Paralelamente existe una correlación negativa entre concentraciones circulantes y BMI, así como una menor supresión postprandial de su secreción, factor que puede ser importante para una predisposición a la obesidad [449].

Además, la concentración basal de este péptido también se encuentra disminuida en ratones obesos [450].

### ***Relación con otros péptidos***

CCK, GLP-1 y AMY

La acción orexigénica de la GRN como es lógico pensar, está inhibida por CCK [297] y GLP-1 [451], no siendo así en el caso de la AMY [452].

Insulina

La relación entre uno y otro péptido es de antagonismo, claramente demostrado en roedores [453,454] y en humanos (niveles farmacológicos) [455,456]. Además, como se ha mencionado anteriormente, las células X/A muestran mecanismos para la detección de glucosa, lo que concuerda claramente con las observaciones de que las concentraciones de una y otra hormona se relacionan inversamente [425].

Leptina

Hay suficientes evidencias, como muestra la revisión de Wisser *et al.* de 2010 [457], que sugieren un antagonismo entre ambas hormonas. Ejemplos de esto son la inhibición mutua al administrarse periféricamente, o la estimulación de la ingesta por parte de la GRN debido a la activación de las neuronas NPY/AgRp del ARC, ocurriendo a la inversa en el caso de la LEP [457].

### ***Perspectivas futuras***

La GRN presenta un futuro prometedor en el tratamiento contra la obesidad con diferentes frentes abiertos, como son el desarrollo de antagonistas, o el bloqueo de la GOAT y/o de la secreción [91]. Los problemas que se pueden presentar, como casi siempre en estos casos, se asocian a los efectos secundarios.

## Puntos clave

Es la única señal circulante con efectos orexigénicos lo que la hace una diana interesante de cara al desarrollo de fármacos antiobesidad.

El efecto sobre la ingesta se produce directamente en el encéfalo (hipotálamo, NTS y otras áreas superiores), debido a su capacidad para atravesar la BBB, y posiblemente también de manera indirecta a través de vías aferentes vagales.

### **Insulina (INS)**

#### **Descubrimiento y estructura**

Su nombre deriva del latín *insula*, que significa isla, en alusión a su síntesis en los islotes de Langerhans, tratándose de uno de los péptidos que mejor se ha caracterizado.

Es un péptido de 51 AA [458,459] producido por las células  $\beta$  pancreáticas, cuya principal función es regular la concentración plasmática de glucosa gracias a un *feedback* negativo, lo que hace que en caso de ausencia, resistencia o disminución del transporte al CNS provoque la enfermedad denominada diabetes tipo I para el primer caso y II para los otros respectivamente [460]. Dicha enfermedad ya fue descrita por los antiguos egipcios como un trastorno en el cual se perdía mucho BW y se orinaba en abundancia. Poco a poco se fueron haciendo avances; en 1889 Mering y Minkowski descubrieron la muerte de perros por diabetes al eliminarles el hígado y páncreas, y en 1910 Sharpey-Schafer propusieron la existencia de una sustancia producida en el páncreas que era responsable de la diabetes. No fue hasta 1921 cuando Banting y Best revirtieron la diabetes en perros con un extracto de páncreas, a partir del cual consiguieron (colaborando con Collip y Macleod) purificar la INS, siendo los primeros en administrarla a pacientes diabéticos [461].

#### **Secreción y regulación**

La secreción de INS se encuentra principalmente regulada por glucosa como se ha comentado, siendo ésta capaz de entrar en la célula  $\beta$  pancreática por difusión facilitada, y activar la maquinaria energética lo que eleva el cociente adenosín

trifosfato/adenosín difosfato (ATP/ADP), que en última instancia hace que se cierren los canales de potasio sensibles a ATP ( $K_{ATP}$ ), generando una despolarización en la membrana que abre los canales de calcio dependientes de voltaje, estimulándose la exocitosis de los gránulos de INS. Posteriormente hay una segunda fase de secreción dependiente de nucleótidos de adenina basada en un aumento de la eficacia del calcio en la secreción de los gránulos [462]. Además existen evidencias de un efecto autocrino así como una estimulación por el factor de crecimiento insulínico (IGF) y una inhibición por la AMY, NPY y otros factores [463].

Las concentraciones plasmáticas son bajas en ayunas y aumentan postprandialmente de forma aguda, debido principalmente a nutrientes en sus formas más simples como monosacáridos, AA y FFA de cadena larga [117], siempre que la glucemia sea normal (con excepción de la leucina [464]) y de forma proporcional a la cantidad de grasa del cuerpo [465].

### ***Receptores: tipos, señalización y localización***

El receptor de la INS o IR, está formado por una cadena  $\alpha$  superficial y dos  $\beta$  transmembrana, y tiene actividad tirosin-quinasa intrínseca, de manera que al activarse es capaz de fosforilar diferentes proteínas llamadas en conjunto sustratos del receptor de INS (IRS), del que existen cuatro tipos: 1, 2, 3 y 4, así como otras moléculas implicadas en la cascada de señalización de los receptores [466]. Quizás la similitud entre los IRS, su coexpresión en tejidos y la implicación de otras moléculas asociadas hagan su estudio algo más complejo que el del resto de péptidos. Al estudiar la acción de la INS en ratones *knockout* para los diferentes IRS [467,468], se ha puesto de manifiesto un papel más destacado del IRS-1 en tejido muscular mientras que la implicación de IRS-3 sería mayor en hígado, tejido adiposo y en la respuesta compensadora del páncreas a la resistencia insulínica. IRS-1 e IRS-3 también se expresan a nivel cerebral [469,470].

La INS es capaz de atravesar la BBB debido a un transporte mediado por los receptores IR [471], siendo sobre todo captada en la áreas del puente/bulbo e hipotálamo (en el ARC principalmente) [472], así como es capaz de adentrarse en regiones tales como el bulbo olfatorio o la amígdala [473].



### ***Concentraciones circulantes, tiempo de residencia media y degradación***

En ayunas, la concentración plasmática de INS en ratas Wistar es de aproximadamente 500 pg/ml [474,475], y de 420 pg/ml en humanos [378], aunque los valores varían mucho dependiendo de la cantidad de grasa corporal.

La vida media de este péptido (en humanos) se encuentra en torno a 5-10 minutos, dependiendo del sexo [476,477], siendo dicho tiempo difícil de medir, ya que la mayoría de la INS secretada es captada y metabolizada por el hígado [478]. Al llegar al riñón, antes de ser degradada, ejerce sobre éste un efecto positivo en la reabsorción de minerales [479].

### ***Efectos sobre la ingesta***

Mientras la INS periférica ejerce un control metabólico sobre las rutas anabólicas y almacenamiento de grasa [480], de forma central actúa como señal homeostática energética, incidiendo sobre las redes neuronales hipotálamicas (del ARC fundamentalmente), donde inhibe las neuronas de tipo NPY/AgRP y activa las POMC/CART lo que redundará en una disminución de la ingesta [481], efecto que se observa tanto en roedores [482] como en monos [483]. Por otro lado, en humanos, aunque parece haber diferencias dependiendo del sexo, existen pruebas de que la administración intranasal disminuye la ingesta, hecho que puede ser debido al aumento de los niveles cerebrospinales [484,485].

La señal en el CNS es indispensable para una correcta homeostasis energética, como confirman estudios con ratones *knockout* para los IR, a los que se somete a una restauración selectiva de los mismos en distintos tejidos [486]. Además estudios recientes [487], también indican que el efecto anorexigénico de la INS no solo se debe a su acción a nivel hipotálamico, sino también sobre la amígdala (relacionada con la recompensa). Esta respuesta es muy sensible a la elevación de la cantidad de grasa ingerida, puesto que desaparece después de tan solo 3 días con una HFD [487].

Por último, un aspecto importante a tener en cuenta es que el efecto anorexigénico de la INS sólo se producen en situaciones de euglucemia [488,489], lo que es lógico, ya que las consecuencias podrían ser fatales si persiste este efecto en caso de hipoglucemia.

### ***Obesidad e insulina***

Hace ya más de 50 años se planteó la idea de la existencia de señales que informan al encéfalo del tamaño de los almacenes de grasa en el cuerpo, lo que se denominó *feedback* negativo adiposo. Con el tiempo se ha ido llegando a la conclusión de que este *feedback* está mediado únicamente por INS y LEP, ya que cumplen los requisitos necesarios: sus concentraciones circulantes son proporcionales a la cantidad de grasa corporal [465,490] y su bloqueo en el CNS hace que se incremente la ingesta y el BW [491]. No obstante, autores como Gloy *et al.* [492] ponen esto en duda; en su estudio en ratas, la alimentación forzada por tubo intragástrico produjo obesidad y aumento en la INS circulante. Sin embargo, la normalización de su alimentación hizo que la concentración de INS disminuyera de forma drástica y muy rápidamente, incluso cuando la cantidad de tejido adiposo era todavía elevada.

Las concentraciones basales de INS en ratones alimentados con una HFD (45% de Kcal en forma de grasa) [493] y en ratas DIO (HFD/HFS durante 18 semanas) están aumentadas en comparación a las control, así como también es mayor la respuesta ante una carga oral de glucosa [494].

Una de las características de la obesidad es la hiperinsulinemia, la cual puede tener distintos orígenes, ya sea por el aumento de la secreción de INS, una disminución de su degradación o una combinación de ambas [495,496]. Otro rasgo típico en las personas obesas es la pérdida de la sensibilidad a la INS [76], la cual mejora cuando se pierde BW y se agrava al ganarlo [497]. Una de las explicaciones más plausibles a dicha resistencia se relaciona con diferentes hechos como la disminución del transporte al CNS (roedores y perros obesos) [498], cambios en la permeabilidad de la BBB a la INS [499] o bien a una disfunción de los receptores encefálicos [500].

### ***Relación con otros péptidos***

#### **CCK**

Hay evidencias de una influencia positiva en la secreción de INS, mecanismo que parece depender de la presencia de aminoácidos como la arginina [298].

## GLP-1 Y GIP

Es bien conocido, como se ha comentado, el efecto positivo que tienen ambos péptidos sobre la síntesis y secreción de INS, aunque los estudios que se han llevado a cabo están más relacionados con la regulación del metabolismo glucídico que con el papel de la INS en la regulación de la ingesta.

## Leptina

Aunque existe una controversia acerca del hecho de si la INS promueve la secreción de la LEP, hay indicios de que es así a largo plazo [501], existiendo algunos puntos en común en el modo de acción a nivel hipotalámico [502].

### ***Perspectivas futuras***

El CNS siempre se ha considerado un sistema independiente de la INS, idea que está cambiando según se van caracterizando las acciones de esta hormona a ese nivel, entre las que se encuentra la de la regulación de la ingesta o funciones cognitivas. Trastornos como la obesidad provocan un menor transporte insulínico al CNS, fenómeno que puede ser clave en el desarrollo de la obesidad, y que podría ser atajado con medicamentos que lo faciliten.

## **Puntos clave**

Actúa a nivel central como señal anorexigénica y reguladora de la homeostasis energética.

La resistencia periférica y central a la INS que se produce en la obesidad puede ser un factor clave en el desarrollo de este trastorno.

### **Polipéptido pancreático (PP)**

#### ***Descubrimiento y estructura***

El descubrimiento del PP se produjo en 1973 en estudios de purificación de INS en pollos [503]. Se trata de un péptido de 36 AA sintetizado de forma mayoritaria en el páncreas, más concretamente en las células PP o F de los islotes de Langerhans [504], aunque una pequeña parte se sintetiza en el colon y recto [505]. Forma parte de la familia PP junto con el PYY y el NPY, debido a que comparte el “pliegue PP”

característico de estos péptidos, siendo bastante probable que compartan origen a partir de un gen común [506].

### ***Secreción y regulación***

La secreción de PP está claramente condicionada por una respuesta vagal ante la ingesta de alimento [507,508] y es estimulada por glucosa [509], una comida estándar [510,511] o comidas ricas en proteína [512] o en grasa [513], generándose en humanos pico muy pronunciado alrededor de los treinta minutos, descendiendo y surgiendo otra elevación mucho menos pronunciada, para ir disminuyendo de forma paulatina a lo largo de 4 a 6 horas [514,515]. Se observa un ritmo circadiano diurno con un pico máximo en torno a las 7 de la tarde [715] y unas concentraciones circulantes superiores en hombres [516].

Existen pocos trabajos donde se aborde el efecto de la edad sobre esta hormona, aunque se han referido aumentos en su secreción en individuos mayores de 35 años [517,518].

### ***Receptores: tipos, señalización y localización***

Los receptores para este péptido forman parte del grupo de receptores tipo Y, asociados a proteínas G y de los cuales existen 6 subtipos (del Y1 al Y6) [519]. El Y4 es el que muestra más afinidad por el PP [520], estando presente en diferentes localizaciones, incluyendo áreas del CNS relacionadas con la ingesta como el AP, NTS, DVN, ARC y PVN [521], aunque existe una gran proporción en el AP [522].

### ***Concentraciones circulantes, tiempo de residencia media y degradación***

El PP es degradado de forma rápida, probablemente por diferentes peptidasas circulantes entre las que se encuentran la aminopeptidasa P, merpina, DPP-4 o neprilisina [523,524], lo que hace que el tiempo de residencia media sea de aproximadamente 7 minutos en humanos [525] y probablemente parecido en roedores. Esta pronta degradación hace que las concentraciones plasmáticas basales se encuentren en torno a 20-40 pg/ml en ratas [526,527] y 50 pg/ml en humanos [336].

### ***Efectos sobre la ingesta***

El PP ejerce toda una serie de acciones en el organismo entre las que destacan la inhibición del vaciado gástrico, de la motilidad de la vesícula biliar y de la secreción pancreática exocrina [528]. Además, administrado periféricamente es capaz de inhibir la cantidad de alimento ingerida en roedores [529] y en humanos [530,531].

No está del todo claro si el efecto anorexigénico se debe a una acción directa sobre el encéfalo, aunque hay bastantes indicios de que es así. Es posible el acceso al AP, al estar libre de la BBB [522], existiendo también datos que sugieren una acción directa sobre el hipotálamo (ARC principalmente), ya que se ha puesto de manifiesto un transporte de este péptido a través de la BBB [532] y una expresión de sus receptores en dicha región [533].

La administración periférica de PP activa neuronas en las zonas encefálicas antes mencionadas, lo cual sugiere que también existe una acción indirecta del PP sobre el CNS mediada por vías vagales [534].

### ***Obesidad y PP***

La comparación de la concentración circulante de PP entre sujetos delgados y obesos es poco concluyente [535], aunque parece ser que las concentraciones plasmáticas son menores en estos últimos [536], mientras que en enfermos de anorexia se han observado respuestas muy marcadas a la ingestión de comida [537]. Además en el síndrome de Prader-Willi, sus concentraciones están disminuidas pudiendo contribuir ello a la hiperfagia observada en estos enfermos [538].

### ***Relación con otros péptidos***

#### **GRELINA**

Las concentraciones plasmáticas de GRN están disminuidas tanto en ratones que sobreexpresan PP como en ratones normales a los que se administra PP exógeno [529]. Por otra parte, estudios en humanos han mostrado que la administración de GRN se asocia a aumentos en la secreción de PP [539]. Poco se conoce de la fisiología de esta interacción.

### ***Perspectivas futuras***

Dicho péptido es uno de los candidatos para el desarrollo de fármacos antiobesidad, centrándose sobre todo en la síntesis de análogos con una mayor vida media en sangre.

### **Puntos clave**

Su efecto a corto plazo deja claro que el PP es una de las señales de terminación de la comida, aunque los mecanismos y circuitos implicados no se conocen de forma exacta.

### ***Péptido tirosina tirosina (PYY)***

#### ***Descubrimiento y estructura***

Se aisló y caracterizó en 1982 por Tatemoto *et al.* [540] a partir de extractos de intestino superior de cerdos. Comparte homología con el PP y el NPY, perteneciendo estos a la ya comentada familia con el “pliegue PP”.

#### ***Secreción y regulación***

Consta de 36 aminoácidos (PYY 1-36) y es co-secretado con el GLP-1 por las células L (especialmente abundantes en íleon y colon) [541] tras la ingestión de nutrientes y de manera proporcional a la energía ingerida [542]. No existen resultados concluyentes respecto a la estimulación de su secreción por glucosa y proteína en humanos [543,544], siendo más claros los que se refieren a la grasa, la cual la aumenta de forma clara [118,545]. Respecto a tipo de grasa, parece ser que los FFA de cadena larga (12 C) [119] y los monoinsaturados [546] promueven una mayor secreción.

En humanos se produce un pico entre la primera y segunda hora postprandial [547], el cual parece tener un componente nervioso ya que aparece mucho antes de que los nutrientes hayan alcanzado el intestino distal. Además, su secreción se inhibe por la vagotomía, y por bloqueo de la señal nerviosa [548].

Una vez secretado, es rápidamente degradada por la DDP-4, que elimina los dos primeros AA para pasar a PYY (3-36), siendo esta última la forma predominante en la circulación [549].

Con la edad las concentraciones plasmáticas de PYY tienden a aumentar, tanto en ratas como en humanos [550]. Este péptido está relacionado con el freno ileal, estimulado sobre todo por ácidos grasos no absorbidos que puedan llegar a las partes distales del intestino delgado y colon [607].

### ***Receptores: tipos, señalización y localización***

El PYY (1-36) posee una alta afinidad por los subtipos Y1, Y2 e Y5 de los receptores de tipo Y. Sin embargo, su conversión en PYY (3-36) aumenta la afinidad por el subtipo Y2 [551].

### ***Concentraciones circulantes, tiempo de residencia media y degradación***

La concentración basal tanto en ratas como en humanos es baja, alrededor de 17-25 pg/ml [218,377,552] en las primeras y 20-80 pg/ml en los segundos [336,378].

La vida media del PYY en humanos es bastante corta, de aproximadamente 8 minutos [553]. Aunque no se ha estudiado exhaustivamente, las mismas peptidasas que degradan el PP podrían ser las que intervienen en la degradación del PYY.

### ***Efectos sobre la ingesta***

La administración i.v. de PYY, en dosis que dan lugar a concentraciones plasmáticas dentro del rango fisiológico, inhibe la ingesta tanto en humanos delgados [554] como obesos (náuseas y vómitos a dosis altas) [555]. En roedores la administración i.p. tanto aguda [556] como crónica [557] produce una disminución de la ingesta acumulada además de disminuir el BW [558]. No obstante no hay un consenso absoluto respecto a su efecto sobre la ingesta, como muestra la intensiva revisión de Tschop *et al.* [559]. El PYY (3-36) se une a los receptores Y2 por los que tiene más afinidad, siendo capaz de actuar en el ARC hipotalámico, donde disminuye la expresión del NPY/AgRP y aumenta la expresión de POMC/CART. Además, es plausible un efecto a nivel vagal, ya que estos receptores también están presentes en las terminaciones vagales aferentes del sistema digestivo [558,560].

Parece ser que las proteínas tienen un papel principal en el efecto saciante del PYY, ya que en ratones *knockout* para el PYY se produce una resistencia al efecto saciante y

antiobesogénico de las dietas ricas en proteína, todo lo cual revierte tras la administración exógena del péptido [544].

### **Obesidad y PYY**

Los ratones *knockout* para el PYY son obesos, desapareciendo este estado si se administra el péptido exógeno [558]. Los humanos parecen no desarrollar resistencia a este péptido, ya que la ingesta calórica durante una comida *ad libitum* ofrecida 2 horas tras la infusión i.v. de PYY disminuyó hasta en un 30% tanto en sujetos obesos como delgados [555]. Se ha descrito una disminución de las concentraciones plasmáticas de PYY, tanto basales como postprandiales, en personas con sobrepeso y obesidad mórbida [561,562].

### **Relación con otros péptidos**

#### CCK y GRELINA

Existen evidencias en perros de la estimulación de la secreción de PYY por CCK [563]. También hay relación entre PYY y GRN, puesto que ambos péptidos actuarían sobre el mismo grupo de neuronas en el ARC: PYY las inhibiría cuando el estatus de energía es positivo, mientras que la GRN las activaría cuando el estatus de energía es negativo [444].

#### INSULINA

Los trabajos de Sloth *et al.* [564], muestran que el PYY (en dosis altas de 0.8 pmol/kg/min) potencia la secreción de INS en respuesta a una comida ingerida a posteriori. El mecanismo propuesto por los autores se basa en el efecto lipolítico de la infusión de PYY, de modo que sería el aumento en los FFA circulantes los directamente responsables de la mayor respuesta insulínica observada posteriormente, tras la administración de la comida. Una mayor profundización en dicha relación deberá abordarse en un futuro [564].

#### LEPTINA

Estudios en ratas mostraron que la administración de LEP durante 7 días (en dosis subumbrales para su efecto sobre la ingesta) prolonga el efecto anorexigénico del PYY (3-36) desde 2 días (si se inyecta sólo) hasta 6 días (de hacerlo combinado con LEP), además de disminuir el BW [565]. Por otra parte, en humanos sometidos a ayuno (lo



que hace disminuir el PYY y la LEP en torno a un 40-60% y 20-30%, respectivamente), no se presentan cambios en los niveles de PYY tras restaurar la LEP hasta sus concentraciones fisiológicas [566].

### ***Perspectivas futuras***

Queda mucho para entender de forma global la fisiología del PYY, debiéndose centrar el trabajo futuro en los mecanismos de degradación para el desarrollo de fármacos cuya vida media sea más larga que la del péptido original.

## **Puntos clave**

Su papel en la disminución de la ingesta a corto plazo sigue siendo controvertido.

Su implicación en la obesidad no parece ser determinante, aunque se requieren estudios más completos en este sentido.

## ***Señales generadas en el tejido adiposo***

### **Leptina (LEP)**

#### ***Descubrimiento y estructura***

A finales de los 70, Coleman *et al.* [567] describieron los denominados ratones ob/ob cuya mutación en el cromosoma 6, generaba hiperfagia y obesidad, así como los mutantes db/db (mutación en el cromosoma 4), con un fenotipo similar [567], pero no fue hasta 1994 cuando el grupo de Zhang consiguió clonar el “gen obeso” o gen *ob* [568], del que deriva este péptido cuyo peso molecular es de 16 kDa y posee 146 aminoácidos, proviniendo su nombre del griego *leptos* que significa delgado [569].

#### ***Secreción y regulación***

La LEP es producida en el tejido adiposo (la mayor parte) de forma que su secreción es proporcional a la cantidad de dicho tejido en humanos y roedores [570,571], siendo las concentraciones circulantes de LEP y el grado de obesidad más evidente en ratas que en humanos, donde hay más variabilidad [570]. Su liberación es pulsátil, ocurriendo 3-4 pulsos diarios cada 2 ó 3 horas después de las comidas [572], sin

observarse aumentos postprandiales muy acusados [573]. Las concentraciones medias son mínimas en plasma durante el día y aumentan durante la noche [572].

Poco a poco se ha ido evidenciando que, además de en el tejido adiposo, se expresa en otros tejidos como placenta [574], músculo esquelético [575] o estómago [576]. En el caso del estómago se ha observado la presencia de este péptido tanto en las células principales como en células de tipo endocrino, ambas situadas en las glándulas fúndicas [577-579], hecho que podría tener relación con algún efecto a nivel de la mucosa gástrica, ya que se expresan los receptores para la LEP en ella, aunque se desconoce tal efecto [580,581].

De acuerdo con algunos trabajos, la secreción de esta hormona no se modifica significativamente tras la ingesta de una comida mixta [582], aunque otros han descrito aumentos ligeros después de 6 h de un desayuno rico en grasa [583] y tras 4 horas de una comida rica en carbohidratos [584]. Referente a la influencia de la edad en su secreción, en ratas se ha visto un incremento con la vejez [585-587] aunque no en todos los estudios [588]. En humanos en general también se ha observado un aumento con la edad [267,589], aunque hay estudios en los que no cambian los valores basales ni la respuesta [590,591], todo lo cual puede estar en parte relacionado con la complejidad de su regulación.

### ***Receptores: tipos, señalización y localización***

El receptor de la LEP se conoce en general como Ob-R y pertenece a la familia de las citoquinas de clase I. Se ha observado que debido a *splicing* alternativos se producen los tipos a, b, c, d y e, que se encuentran tanto en roedores como en humanos de forma muy ubicua. La forma Ob-Rb posee una alta plasticidad funcional debido a su interacción con diferentes cascadas de activación como las JAK/STAT, fosfoinositol 3-quinasa, quinasas activadoras de mitógenos, etc., hecho que deja ver la importancia de la LEP en diferentes funciones como el control de la masa corporal, la reproducción, angiogénesis, inmunidad, etc. [592].

En el encéfalo, el receptor Ob-R se expresa en diferentes regiones, tanto del tallo encefálico (NTS) como en el ARC (mayor densidad), PVN y LHA hipotalámicos [593], así como en zonas relacionadas con la percepción sensorial [594].

### ***Concentraciones circulantes, tiempo de residencia media y degradación***

El tiempo de residencia media es variable dependiendo de la especie; en humanos y en pollos se ha estimado en aproximadamente 23-24 minutos [595], 96.4 en monos y 49.5 en ratones (administración de LEP humana) [596] así como 5.46 minutos en ratas Zucker delgadas y 6.99 en obesas [597]. La degradación se produce principalmente en el riñón [598].

Las concentraciones plasmáticas en ayunas dependen en gran parte a la cantidad de grasa del cuerpo, aunque en general en ratas se encuentran en un rango de 1300-1600 pg/ml [474,599] y en humanos giran en torno 6000-10000 pg/ml en ambos sexos [378].

### ***Efectos sobre la ingesta***

La administración aguda de LEP por vía periférica, es capaz de disminuir la ingesta en ratas en ayunas pero no en ratas con acceso libre a la comida [600,601]. Inyectada de forma crónica reduce la ingesta en ratas, tanto *ad libitum* como *pair fed* [602]. Cuando se administra a nivel central disminuye el tamaño de la comida así como la tasa de ingesta (tamaño comida/duración comida) [603].

En principio, como se dijo anteriormente, las concentraciones plasmáticas de LEP no cambian postprandialmente de forma marcada [572], lo que ha sugerido que el efecto sobre la ingesta es a medio-largo plazo. Sin embargo este hecho se está empezando a cuestionar debido a diferentes hallazgos como:

- Expresión de sus receptores en neuronas aferentes y eferentes del nervio vago [604].
- Activación del NTS e hipotálamo tras administración periférica [605].
- Disminución del tamaño de la comida tras su administración a nivel de la arteria celíaca [606].
- Inervación del tejido adiposo, aunque por ahora se ha relacionado más con el proceso de lipólisis controlada por el CNS [607].
- Secreción de LEP gástrica en respuesta a CCK [608].
- Existencia de una interacción funcional entre la LEP y los receptores CCK, interacción que se da a nivel de fibras vagales y que causa inhibición del

vaciamiento gástrico y disminución a corto plazo de la ingesta de alimentos [609].

- En ratones en ayunas las concentraciones plasmáticas de LEP caen de forma considerable y se producen una serie de cambios a nivel de los ejes gonadal, adrenal y tiroideo en machos, así como el retraso de ovulación en hembras, todo lo que se previene con la administración exógena de LEP, no siendo así en el caso de la disminución del BW o de la glucosa en sangre [610].
- En personas sometidas a periodos prolongados de ayuno, la concentración plasmática de LEP disminuye más de lo que cabría esperarse a base de la reducción en la masa grasa [611].

En conjunto, todos estos datos hacen que se plantee un mecanismo adicional a corto plazo de la LEP, hecho que requiere una investigación más detallada en un futuro.

El mecanismo de actuación de la LEP a nivel central se ha estudiado en numerosos trabajos, tal y como se recoge en diversas revisiones de las cuales se puede concluir que existe una acción a nivel del tallo (NTS), la cual es suficiente para disminuir la ingesta. Gracias a receptores Ob-Ra, la LEP atraviesa la BBB accediendo al hipotálamo, más concretamente al ARC, donde inhibe las neuronas NPY/AgRP y potencia las POMC/CART de forma que se reduce la ingesta, además de influir sobre otros circuitos neuronales que generan información sobre la homeostasis energética, produciéndose un *crossstalk* con el resto de hormonas [612-614].

### ***Obesidad y leptina***

La LEP, al igual que se dijo anteriormente de la INS, posee las características que definen a una señal de homeostasis energética, como es el hecho de que sus concentraciones plasmáticas se correlacionan con la cantidad de grasa corporal [570,571] (siendo más bajas en individuos con anorexia nerviosa y disminuyendo tras una pérdida de BW) [615], tiene un efecto anorexígeno [602,603,616], y la disminución de su señal aumenta la ingesta [568,617].

Comúnmente la obesidad cursa con concentraciones elevadas de LEP, lo que se relaciona con una resistencia a dicho péptido, y ello se observa tanto en ratones [618] como en humanos [619]. Aun así, no se conoce exactamente si la obesidad es causa o consecuencia a esta resistencia [620]; lo que parece claro es que se produce una alteración de la señal a nivel central, cuyo origen puede ser diverso, por ejemplo, un menor transporte, una disminución de los receptores o un problema en la señalización en las neuronas diana [621,622].

Además de las funciones mencionadas, la LEP posee una acción lipolítica, confirmada tanto en ratones *ob/ob* como *delgados* (a dosis altas) aunque no ocurre así en ratones *db/db*, lo que muestra el papel del receptor *Ob-Rb* en este cometido [623].

De nuevo el estudio de Gloy *et al.* [492] se opone a la idea de que LEP y grasa corporal siempre estén correlacionados, ya que tras inducir obesidad en ratas mediante alimentación, la vuelta a la alimentación normal hace que las concentraciones circulantes de LEP disminuyan de forma drástica y rápida, aun cuando la cantidad de tejido adiposo no se reduce de forma proporcional.

### ***Relación con otros péptidos***

#### **GLP-1**

El pretratamiento de ratas con LEP (sub-umbral) antes de administrar GLP-1 *i.p.* consigue un aumento del efecto anorexígeno y de la disminución de BW en 24 horas [386], efecto que aparentemente parece producirse a nivel del tallo encefálico [624]. Además, la exendina-9 (antagonista del GLP-1), bloquea el efecto anorexígeno de la LEP administrada tanto por vía *i.p.* como intracerebroventricular (*i.c.v.*) [625].

### ***Perspectivas futuras***

La LEP resulta ser eficaz para disminuir la ingesta de algunos individuos obesos en los cuales no se produce la resistencia antes comentada, pero estos casos son raros. Para el resto, el futuro está en desarrollar fármacos que aumente la sensibilidad a esta hormona.

## Puntos clave

El papel de la LEP como señal de homeostasis energética está bien estudiado, no así su posible actuación a nivel vagal como señal a corto plazo.

Su función en la obesidad es importante, como sugiere el hecho de que su ausencia se asocia a obesidad, así como la aparición de resistencia en algunos casos.

La interacción con otras hormonas en el NTS es clave para la actividad de este péptido.

### ***Señales directas debidas a nutrientes***

Los nutrientes juegan un papel principal en la regulación de la ingesta ya que son las únicas señales que informan de lo que estamos ingiriendo, pudiendo actuar de forma directa o a través de los GP.

En ratas y humanos (con algunas excepciones en el caso de determinados nutrientes) se ha observado que las proteínas son las que producen una mayor saciedad, seguidas por los carbohidratos y, por último, las grasas [626,627].

Dicha saciedad se produce a través de diversos mecanismos, los cuales en principio no son excluyentes y normalmente varían de un nutriente a otro:

- Actuando de forma directa sobre los centros de regulación de la ingesta (sobre el hipotálamo y NTS predominantemente).
- Incidiendo sobre el sistema nervioso periférico, que de forma indirecta va a activar o inhibir diferentes regiones del CNS.
- Promoviendo la liberación de GP, los cuales juegan un papel fundamental en la regulación de la ingesta y BW.

No todos los carbohidratos siguen un mismo patrón respecto a la regulación de la ingesta. En el caso de la glucosa, aparte de desencadenar diversas señales endocrinas, actúa de forma directa en el encéfalo activando la ruta glucolítica en las neuronas con el consiguiente aumento en el ATP y descenso de la actividad de la AMP quinasa (AMPK) y del AMP. Por otro lado, la acetil CoA carboxilasa (ACC) es activada para producir malonil-CoA, sobre el cual existen numerosas evidencias de su papel como

señal del estado energético corporal a nivel del hipotálamo, suprimiéndose la ingesta cuando se acumula, mediante la inhibición del NPY/AgRP y aumento de la expresión del POMC/CART. Respecto a la fructosa, parece no activar la ruta del malonil-CoA, causando así un efecto orexigénico. Por último, la fibra no posee un efecto claro sobre la ingesta o tiende a inhibirla (seguramente debido a mecanismos diferentes a la glucosa) [628].

Las grasas son capaces de ser detectadas ya a nivel oral, debido principalmente a los receptores CD36 y diversos tipos de receptores acoplados a proteínas G (GPR), los cuales se asocian con respuestas relacionadas con la recompensa (lo que puede derivar en una preferencia hacia el consumo de grasas) y otras respuestas como un aumento de los triglicéridos, inducción de la lipasa gástrica y enzimas pancreáticas, y liberación de algunos GP [629].

Una vez liberados y absorbidos los ácidos grasos de cadena larga (LCFA), pueden pasar a la sangre y llegar al CNS donde son captados por las neuronas del hipotálamo gracias a los transportadores CD36 o FATP1 o penetrando por difusión simple, siendo esterificados (LCFA-CoA) por las acyl-CoA sintetetas y transportados a la mitocondria - vía carnitina palmitoil transferasa 1 y 2 (CPT-1 y CPT-2)- donde sufren  $\beta$  oxidación hasta malonil-CoA. Este último (que puede provenir tanto de ácidos grasos como de glucosa), cuando se acumula en gran cantidad inhibe la CPT1, con lo cual no se transportarán más LCFA-CoA a la mitocondria y esto produce a nivel hipotalámico inhibición de la ingesta; por otro lado se da una interacción con receptores N-metil-D-aspartato (relacionados con la sensibilidad a lípidos) en las neuronas del complejo dorsal vagal (DVC), gracias a lo cual se envían órdenes vía eferencias vagales para que se inhiba la producción hepática de glucosa [630].

Respecto a las proteínas, es más complejo su estudio en relación con la ingesta. Está claro que existe una actuación de los AA mediada por los GP (CCK, GLP-1 y PYY), que pueden actuar sobre el CNS por vía vagal o directamente. Paralelamente hay estudios que muestran un efecto de los AA sobre el vago hepatoportal y directamente sobre el ARC [631,632], que redundaría en una disminución de la ingesta. De entre ellos, la

leucina es de la que se tienen más evidencias de su efecto anorexigénico llevado a cabo a través del eje tallo encefálico-hipotálamo [633].

Como hemos ido viendo, la fisiología de algunos GP es más conocida que la de otros, sobre todo en lo referente a la respuesta ante nutrientes, la cual en mayor o menor medida se ha estudiado tanto en animales como en humanos, como se recoge en diferentes revisiones como la de Karhunen *et al.* [634]. De ésta [634] se puede destacar lo siguiente:

- Los macronutrientes ejercen un efecto inhibitor de la secreción de GRN.
- Las proteínas, grasas y carbohidratos simples tienden en general a aumentar la secreción de los GP, con alguna excepción en que no hay efecto.
- Los carbohidratos complejos y la fibra, o no tienen efecto o bien hacen que la secreción esté disminuida.

### ***Otras señales***

Además de los péptidos gastrointestinales, hay una diversidad de moléculas que parecen influir sobre la ingesta (con más o menos importancia), encontrándose entre ellas determinados neuropéptidos [635], citoquinas y adipoquinas, así como la apolipoproteína A-IV (glicoproteína secretada en el intestino y que forma parte de los quilomicrones). Todos ellos se muestran en la Tabla 5, en asociación con aquellos trabajos realizados en humanos y animales que muestran indicios de un efecto sobre la ingesta. No obstante, algunos de estos estudios no reproducen condiciones fisiológicas, hecho que si ocurre en estudios con ratones *knockout*, que muestran efectos variables dependiendo sobre todo del receptor implicado [636].



Table 5. Intake related peptides

	<b>ANOREXIGENIC PEPTIDES</b>	<b>OREXIGENIC PEPTIDES</b>
<b>GP</b>	GLP-2 [637] Glucagon [638] Oxyntomodulin [639,640] Enterostatin [641] Secretin [642]	
<b>Protein transports</b>	Apolipoprotein A-IV [643,644]	
<b>Adipokines</b>	Resistin [645]  Adiponectin (indirect effect) [646]	
<b>Cytokines</b>	TNF- $\alpha$ and IL-1 $\beta$ [647]	
<b>Neuropeptides</b>	Cocaine-amphetamine-regulated transcript (CART) [656]	NPY [648,649] AgRP [650] Orexins A and B [651] Cannabinoids [652,653] Melanin-concentrating hormone (MCH) [654] Corticotrophin-releasing factor (CRF) [655]

### ***Ritmos circadianos***

Los ritmos circadianos son muy importantes en la regulación de muchos procesos del organismo. Estos ritmos se encuentran controlados de forma principal por el denominado “reloj biológico” localizado en el núcleo supraquiasmático (SCN), el cual, junto a relojes secundarios como el tejido adiposo y el hígado, ajusta las fases de los comportamientos rítmicos como el sueño/vigilia, alimentación, o actividad anticipatoria a la comida. Dichos comportamientos están influidos por señales externas, u osciladores externos, en un continuo *feedback* [657].

### ***Estrés***

Un factor que influye en el comportamiento hacia la ingesta de alimento es el estrés, entendido como una reacción fisiológica ante algún factor tanto interno como externo, que va en contra de la homeostasis del organismo, como puede ser el hambre, frío, heridas o una restricción física. La respuesta del organismo a largo plazo hace que se liberen, entre otras hormonas, los glucocorticoides, los cuales estimulan comportamientos relacionados con la obtención de placer, de forma que favorecen la ingesta [658].

#### **2.2.2. Integración de las señales en el CNS**

El estudio del efecto que la comida produce en el CNS se ha llevado a cabo mayoritariamente determinando la expresión de c-fos, lo cual tiene algunos inconvenientes como la imposibilidad de detectar activación neuronal en momentos concretos o la incapacidad de detectar inhibición neuronal, lo que lo convierte en una herramienta muy limitada [659]. Posteriormente han ido surgiendo técnicas como la electrofisiología o el análisis de la imagen por resonancia magnética funcional (fMRI), que sí permiten analizar la secuencia de cambios en el tiempo e incluso el comportamiento de una red de neuronas [660].

Una de las regiones con gran influencia en la regulación de la ingesta es el tallo encefálico, donde se localizan una serie de núcleos como el complejo dorsal vagal (DVC, que engloba al NTS, AP y el núcleo dorsal motor del vago (DMV)), así como el núcleo parabraquial (NPB). Dichos núcleos integran información periférica recogida

por aferencias vagales con información proveniente del hipotálamo; además, el AP detecta directamente señales del torrente circulatorio ya que queda libre de la BBB. Los detalles de relación entre estos núcleos, los GP y el vago (se detallarán más adelante) [661,662]. Además, en el tallo encefálico se localizan los centros de integración para actividades como la masticación o la deglución [663] y es capaz por sí mismo de controlar la terminación de la ingesta [664].

Otra región encefálica importante en la regulación de la ingesta de alimentos es el hipotálamo, formado por varias poblaciones o núcleos que se reparten de forma simétrica a ambos lados del tercer ventrículo. Las neuronas de estos núcleos están interconectadas entre sí, además de comunicarse con otras regiones como el tallo (NTS) y zonas superiores de la corteza. Los núcleos hipotalámicos más involucrados en la regulación de la ingesta y la homeostasis energética son (como hemos venido nombrando previamente) el núcleo arcuato (ARC), el núcleo paraventricular (PVN), núcleo ventromedial (VMH), núcleo dorsomedial (DMH) y el hipotálamo lateral/área perifrntal (LHA/PFA). Estas poblaciones neuronales secretan neurotransmisores específicos que median efectos diversos, además de existir conexión entre ellas a diferentes niveles [665].

En el ARC se encuentran dos tipos de neuronas de primer orden bien diferenciadas, mostradas en rojo y verde en la Figura 3 [666,667]:

- Neuronas NPY/AgRP promueven el anabolismo (señales orexigénicas): Coexpresan el NPY (el cual por sí constituye una señal que actúa vía receptores NPY) y la AgRP, que bloquea la acción de la hormona estimulante de melanocitos ( $\alpha$ -MSH).
- Neuronas POMC/CART que favorecen el catabolismo (señales anorexígenas), que expresan CART y POMC; este último se escinde para generar  $\alpha$ -MSH, que a su vez se une a receptores específicos (MC3R y MC4R) en neuronas de otras estructuras cerebrales.

Ambos grupos neuronales proyectan sus axones hacia otras regiones cerebrales, muchas de ellas comunes a los dos, como el PVN, en el cual se expresan neuropéptidos anorexígenos como la hormona liberadora de corticotropina (CRH),

oxitocina (OXY), o como el LHA/PFA, en el que se localizan las orexinas y la hormona concentradora de melanina (MHC) con carácter orexigénico [667].

Por último, hay que citar que estas neuronas del núcleo arqueado son sensibles a niveles locales de nutrientes energéticos, como glucosa [668] o ácidos grasos como el oleico [669].

En definitiva, tanto por sus conexiones como por su BBB relativamente permeable, el ARC resulta clave como centro de control de la homeostasis energética, la ingesta de alimentos y la regulación del BW, pues integra señales tanto periféricas como centrales.

Asimismo todas estas estructuras se encuentran conectadas formando una compleja red, como muestra la Figura 3, existiendo conexiones nerviosas entre las áreas comentadas y otras regiones del encéfalo [670], destacando:

- AP y NTS en el tallo encefálico.
- Centros superiores como el hipocampo y la amígdala (memoria).
- NA y globo pálido (recompensa).
- Región orbitofrontal y la circunvolución del cíngulo (representación de la comida y expectativa de recompensa),
- Ejecución de funciones motoras situadas en la corteza dorsolateral y prefrontal.

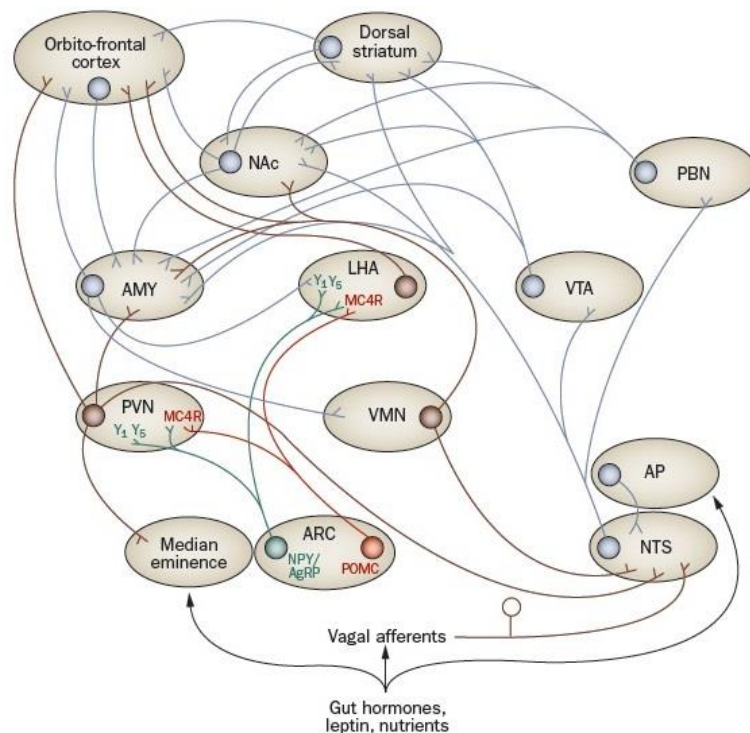


Figure 3. Neuronal network within CNS control energy homeostasis. AMY: amygdala, AP: area postrema, ARC: arcuate nucleus, LHA: lateral hypothalamic area, NAc: nucleus accumbens, NTS: nucleus of the tractus solitarius, PBN: parabrachial nucleus, PVN: paraventricular nucleus, VMN: ventromedial nucleus, VTA: ventral tegmental area. Taken from Field *et al.* 2010 [670].

### 2.2.3. Otros factores que influyen en la ingesta de alimentos

De todos los factores que regulan la ingesta, existen aquellos que no implican estructuras del sistema cortico-límbico y que constituyen un sistema homeostático, existiendo por otro lado otros que sí implican la intervención de este sistema y que se encuentran fuera de este *feedback* metabólico denominándose no homeostáticos, como son aspectos cognitivos, de recompensa y emocionales.

#### **Recompensa**

Se puede definir la recompensa como un estímulo de refuerzo que también es placentero, desencadenando la activación de circuitos implicados en la sensación de

placer (ver más abajo). Dicho refuerzo se produce cuando se incrementa la relación entre el estímulo y el comportamiento que desencadena, como por ejemplo cada vez que un ratón presiona un botón se le recompensa con azúcar [671].

De acuerdo con las teorías de Berridge *et al.* [672], la recompensa tienen tres componentes: placer, aprendizaje y motivación, los cuales son distinguibles a nivel cerebral, por ejemplo, la dopamina parece contribuir al refuerzo del aprendizaje pero no al placer [672].

Refiriéndose al placer derivado de la comida, se activan sistemas GABA/benzodiacepinas situados en la zona ventral del globo pálido y el área gustativa primaria del tallo. Por otro lado la motivación debida al apetito se localiza más en la zona del NA y la amígdala con implicación de sistemas dopaminérgicos. Dichos hallazgos se deben fundamentalmente a estudios en animales, como aquel en el que se administró a ratas 6-hidroxidopamina (6-OHDA), lo que inhibió la ingesta pero dejó intacta la percepción del placer, ya que seguían eligiendo azúcar y rechazando la quinina [672-674].

Además, con el tiempo se han ido acumulando evidencias sobre el papel de péptidos como la LEP y GRN en la recompensa, observándose que dichos péptidos están involucrados en rutas dopaminérgicas, pudiendo la primera (junto con la INS) disminuir tanto la secreción basal como estimulada de dopamina en el área ventral tegumental (VTA), un efecto opuesto al de la GRN [675,676].

### ***Memoria y aprendizaje***

La memoria ante un estímulo, la asociación de ese estímulo con la recompensa y la asociación de la respuesta con el refuerzo, se produce en la zona de la amígdala, siendo la corteza orbitofrontal la que se encarga de mantener dichas asociaciones y actualizarlas [677].

### ***Variedad***

Como se ha visto antes la “variedad” -entendida como la posibilidad de escoger entre diferentes alimentos- se relaciona con un aumento en la ingesta en humanos, debido a

mecanismos como la deshabitación de la respuesta salival y el efecto positivo sobre el *feedback* sensorial. Además intervienen otros factores como la socialización, la ingesta de alcohol o el visionado de televisión durante las comidas, que también tienden a aumentar la ingesta [58].

Finalmente, tras la integración de todas las señales comentadas, se producirá el cese de la ingesta, situación que *a priori* puede ser simple, pero como se ha visto depende una red compleja de regulación.

### **2.3. SALIDA DE ENERGÍA. GASTO ENERGÉTICO Y SU REGULACIÓN**

Las salidas de energía se pueden agrupar en lo que se denomina el gasto energético total (GET), el cual engloba a una serie de componente que son los siguientes:

- Gasto energético basal (GEB) (60-75% del GET): Cantidad de energía que se consume en estado de reposo y ayunas; es la energía necesaria para mantener -en las condiciones mencionadas- los procesos metabólicos de las células y tejidos, incluyendo el mantenimiento de la temperatura corporal.
- Gasto energético por actividad física (15-30% del GET): Tanto ejercicio físico programado como espontáneo (asociado a las actividades cotidianas).
- Termogénesis inducida por los alimentos (5-10% del GET): Energía necesaria para digerir, transportar y metabolizar los alimentos. Su valor depende del tipo de alimentación.

En ciertas situaciones fisiológicas (embarazo, lactancia, crecimiento...), hay que considerar otros componentes del GET, como la energía destinada al crecimiento del feto, formación de leche y formación de estructuras corporales, respectivamente.

Distintos factores (estado psicológico, enfermedades, fármacos y otras sustancias) pueden modificar el GET, normalmente porque afectan a alguno de los componentes anteriores (fundamentalmente al GEB).

### **2.3.1. Regulación del gasto energético**

La regulación global depende principalmente del hipotálamo, el cual recibe señales tanto nerviosas como endocrinas provenientes de la periferia y de otras estructuras del CNS y, actúa como centro integrador responsable de la homeostasis energética [665].

El GET puede ser modificado principalmente debido a la modificación de la actividad física y/o la termogénesis adaptativa, regulación llevada a cabo debido al sistema nervioso central y periférico y sistema endocrino, con la implicación de hormonas como la del crecimiento, INS, esteroides sexuales y la tiroxina [64].

En el caso de la termogénesis adaptativa, ésta ocurre principalmente en el tejido adiposo marrón, el cual está inervado por neuronas que provienen del rafe caudal y que se encargan de la regulación de dicha la actividad termorreguladora [678]. Además, al tejido adiposo blanco llegan fibras nerviosas que provienen de la medula ventrolateral y del NTS, capaces de influir en la movilización de grasa en dicho tejido [679].

## **2.4. INTEGRACIÓN DE LA REGULACIÓN DE LA INGESTA Y EL GASTO ENERGÉTICO**

En base a lo comentado anteriormente, el tamaño de la comida, la frecuencia de las comidas o ambas cosas deben estar supeditadas a las reservas energéticas. El principal factor que influye en el tamaño de la comida es el inicio de la saciación, el cual es un estado neuro-humoral generado durante el proceso de alimentación y que promueve la terminación de la ingesta. Por otra parte el inicio de la comida está supeditado por diferentes señales tanto homeostáticas como no homeostáticas, no así la finalización, que parece estar más controlada por señales homeostáticas [680].

Tanto factores homeostáticos como no homeostáticos son capaces de modularse unos a otros, denominándose “bottom-up” cuando las señales metabólicas influyen en funciones nerviosas superiores como la recompensa o cognición del individuo. Ejemplo de ello lo tenemos en la LEP, que, por tener receptores en diferentes áreas



(corticales, hipotálamicas, relacionados con los receptores del sabor etc.), consigue influir sobre procesos tanto homeostáticos como no homeostáticos [681].

Por otra parte, las funciones superiores, como las cognitivas o de recompensa, pueden afectar al metabolismo periférico y/o los sistemas cerebrales implicados en el estado energético del individuo, lo que se denomina procesos “top-down”. Como ejemplo, las ratas sobrealimentadas con dietas ricas en grasas y azúcares, a pesar de que producen señales anorexigénicas, siguen ingiriendo un exceso de energía, lo que muestra una disfunción en su recepción a nivel central [682].

En general todos estos factores se pueden integrar en el ciclo de iniciación y finalización de la ingesta, en el cual se distingue claramente una fase sensorial y cognitiva de anticipación a la comida, y una fase post ingestión, en la cual se generan señales que determinan el cese de la comida y otras que influyen en el tiempo hasta que se produce la siguiente comida. No obstante, no hay una delimitación estricta, siendo más bien un proceso continuo [683].

#### **2.4.1. Fase sensorial y cognitiva**

La mayoría de las señales que han sido integradas en centros del tallo o el hipotálamo alcanzan la corteza orbitofrontal (OFC), combinándose con información de experiencias previas y sensaciones olfativas y visuales. Dicha integración se correlaciona con los índices subjetivos del placer del sabor y del olor de la comida. Los factores cognitivos tales como descripciones a nivel de palabras y la atención modulan la representación de la recompensa hacia un alimento en la OFC y la región sobre la que esta proyecta, la corteza anterior del cíngulo. Estos hallazgos nos muestran una base para el entendimiento de cómo la información que se genera en la boca se representa debido a información generada por canales independientes, cómo la información de estos canales se combina y cómo y dónde la recompensa y el valor subjetivo de la comida se representa y está influenciado por las señales de saciedad [684,685]. Todo ello genera una decisión acerca del comportamiento relacionado con la ingestas de alimento, que será más o menos consciente dependiendo de la especie a la que nos refiramos.

Paralelamente, conforme va pasando el tiempo desde la finalización de la anterior comida, se van produciendo señales orexigénicas como la GRN o el NPY que hacen que vaya aumentando la sensación de hambre y otras asociadas a la fase cefálica de la digestión (disparada por estímulos visuales, olfativos, etc.), como el aumento de las concentraciones circulantes de GLP-1, CCK, AMY, INS y PP, y que preparan al cuerpo para evitar una hiperglucemia [686].

Las señales percibidas en la cavidad bucal (sabor, temperatura, textura, composición, etc.) influyen (como se ha visto) en la ingesta, aunque esta influencia es mínima respecto al resto de señales como muestran experimentos de “alimentación simulada” usando animales fistulizados (a nivel del esófago o estómago), para impedir el *feedback* postprandial debido a los nutrientes [687].

#### **2.4.2. Fase post-ingestión**

Una vez que se ingiere el alimento, se inician una serie de señales que poco a poco generan una sensación de saciación, siendo uno de los estímulos más poderosos la distensión del estómago, la cual es captada por mecanorreceptores de la pared de este órgano, dando lugar a señales nerviosas que informan al CNS a través del nervio vago [688].

Además, como se ha ido describiendo, un conjunto muy numeroso de señales está constituido por distintos GP y hormonas, algunos de los cuales pueden ser secretados incluso antes de que los nutrientes alcancen el intestino delgado, debido a una influencia nerviosa, como es el caso de GIP [318], PP [507,508] y PYY [548], o bien secretarse al paso de los nutrientes por el intestino proximal (CCK y GIP) o distal (GLP-1 y PYY [689]). De entre estos péptidos, la CCK (junto con la LEP) [609] y el GLP-1 son capaces de disminuir el vaciamiento gástrico y además el GLP-1 ralentiza el paso de nutrientes por el intestino delgado debido al “freno ileal” [689]. Junto a estos GP también se secretan de forma aguda desde el páncreas la INS [117] y la AMY [204], así como de forma más amortiguada la LEP desde el tejido adiposo [573].

Respecto a su acción sobre el CNS, CCK [690], PYY [558,560] y GLP-1 [381,391] parecen ejercer sus acciones fundamentalmente a nivel vagal, aunque GLP-1 junto con la AMY

[210] y PP [522] también actúan sobre el romboencéfalo. Además, GLP-1 [393,394] y PP [532] junto con INS y LEP actúan sobre el hipotálamo.

Toda esta red compleja de regulación de la ingesta, dista todavía mucho de ser comprendida en su totalidad (se muestra en gran parte en la Figura 4), encontrándose este campo abierto para futuras investigaciones que puedan mejorar su comprensión y aplicarlo a los problemas de obesidad del ser humano.

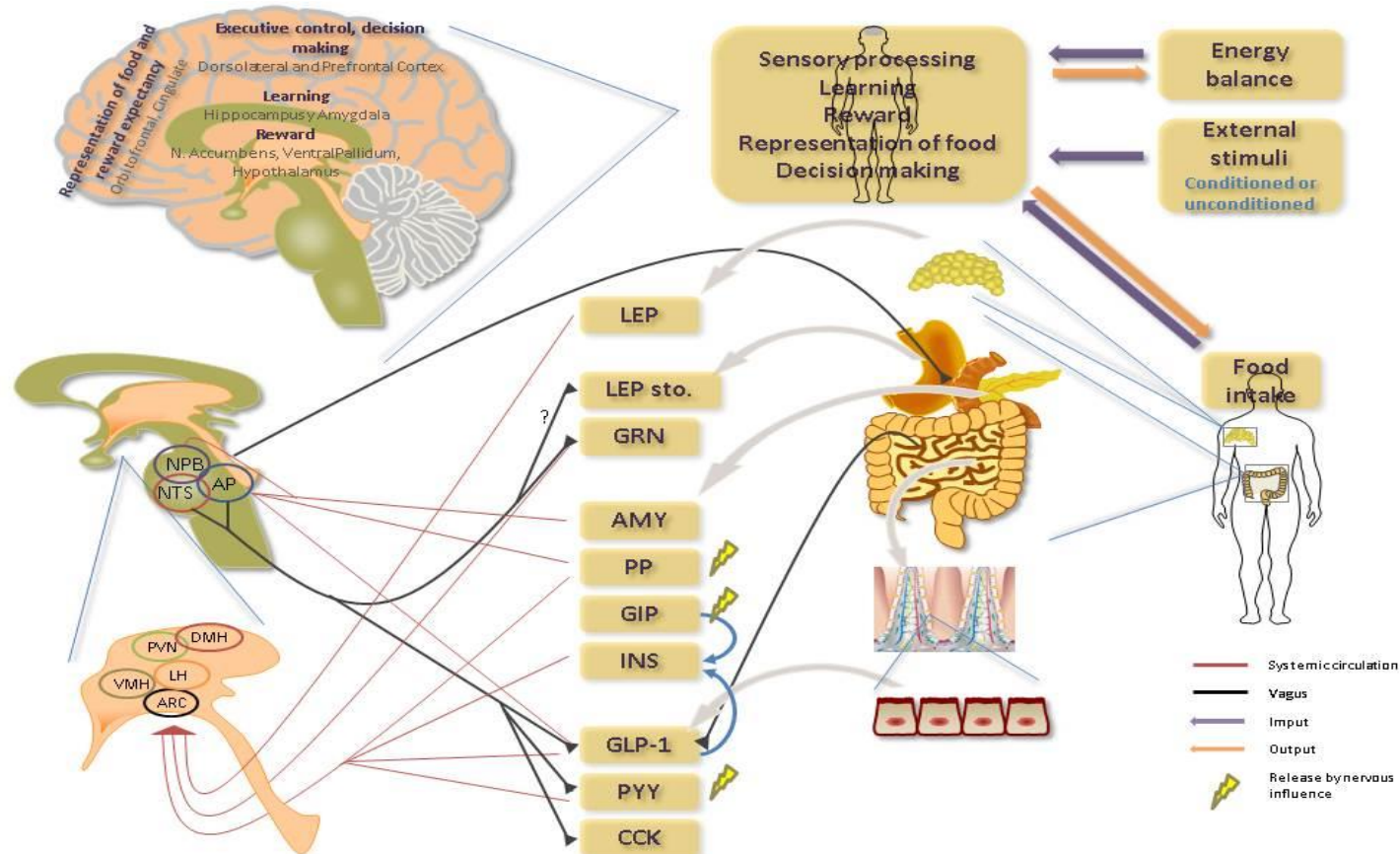


Figure 4. Schematic diagram showing some factors (no all) determining neural control of appetite. The brain monitors the nutrient sensing the internal hormonal and neural nutrient sensing mechanisms and is under constant influence of the environment (conditioned and unconditioned stimuli) through the senses and mainly the cognitive and emotional brain. The internal and external stimuli are integrated to generate adaptive behavioral (food intake) and autonomic/endocrine responses determining nutrient partitioning, energy expenditure and overall energy balance. Nutrients stimulate the release of gut hormones like LEP and GRN from the stomach, and the former from the adipose tissue, AMY, PP, GIP and INS from the pancreas and GLP-1, PYY and CCK from the intestine with may influence food intake at three sites: the vagus nerve, brainstem and hypothalamus. Release of PP, GIP and PYY can be mediated by the vagus and GLP-1 and GIP stimulate the release of INS (incretin effect).

## 3. UTILIZACIÓN NUTRITIVA DE PROTEÍNA Y GRASA

### 3.1. CONCEPTOS

Referido a la utilización nutritiva de los nutrientes en general, existen una serie de términos que son base para entender todo este proceso [691,692]:

- Digestibilidad: Índice que muestra la efectividad del paso de un alimento desde el intestino al medio interno.
- Biodisponibilidad: La fracción los nutrientes ingeridos que están disponibles para su utilización en condiciones normales fisiológicas.
- Bioeficacia: Fracción de los nutrientes ingeridos que tiene un efecto nutricional.
- Bioaccesibilidad: Fracción que es liberada de la matriz del alimento y que está disponible para su absorción intestinal (basado en experimentos *in vitro*).

### 3.2. FACTORES QUE AFECTAN A LA UTILIZACIÓN NUTRITIVA

#### 3.2.1. Dependientes de la dieta

##### *Proteína*

##### *Cantidad y calidad proteica*

El principal factor que condiciona la calidad nutritiva de una proteína es su propia composición en aminoácidos. La riqueza en aminoácidos esenciales, la variedad y una buena distribución porcentual de dichos aminoácidos, el elevado valor de graduación química (*Chemical score*) del aminoácido limitante y la disponibilidad de todos los aminoácidos esenciales y no esenciales, son los factores que definen una proteína de elevada calidad biológica [693].

Un concepto importante relacionado con la fuente proteica es el balance de AA referido a la proporción en la que se presentan los AA esenciales en ella [694]. Este se puede corregir bien mediante suplementación artificial o bien ingiriendo una mayor cantidad de proteínas de menor calidad. En general la mejor estrategia es ingerir proteínas de distinta procedencia de forma que se complementen [695].

La digestibilidad de una proteína parece estar sobre todo influenciada por la secuencia de aminoácidos y por su configuración espacial [696], y mucho menos por la proporción de proteína presente en la dieta [697].

### **Interacción con otros nutrientes**

Aparentemente, los carbohidratos no afectan a la digestibilidad de la proteína, pero sí los lípidos, que son capaces de disminuir el vaciamiento gástrico facilitando la digestión ácida de las proteínas [698].

### **Estructura de la matriz del alimento**

El efecto de la matriz sobre la digestibilidad de la proteína se ha investigado sobre todo en estudios de alergenicidad de semillas y legumbres. En ellos se ha visto que la liberación de las proteínas en este tipo de alimentos está directamente relacionada con la composición de dicha matriz y de la existencia de interacciones entre proteínas, fitoquímicos, inhibidores de proteasas y otras sustancias [699].

### **Componentes antinutricionales**

Existen diversos componentes que se incluyen en los alimentos y se denominan antinutricionales, ya que son capaces de dificultar la absorción de nutrientes. Para las proteínas existen inhibidores de la tripsina presentes en las legumbres, que pueden disminuir la absorción hasta en un 50%, o los fitatos de cereales y semillas, que la dificultan en torno a un 20% en animales de laboratorio [700].

### **Grasa**

Los factores que determinan su digestión y absorción son [701-705]:

- El tipo de grasa, siendo los triglicéridos (TG) con ácidos grasos de cadena corta más fáciles de absorber que los de cadena larga.
- El estado de cristalización de los lípidos, ya que tienen más probabilidad de formar cristales cuando los ácidos grasos sobrepasan los 16 carbonos.

- La presencia de galactolípidos que favorecen la formación de cristales y “atrapan” los ácidos grasos libres reduciendo su absorción y permitiendo que alcancen porciones más distales del intestino.
- La posición del ácido graso en el TG determina si se absorbe como FFA o diacilglicérido.
- Incorporación de la grasa (normalmente emulsionada) en la matriz alimentaria o presentación como emulsión en una solución hidrosoluble, siendo en el último caso más fácil la digestión cuanto más pequeñas sean las gotículas en las que estén incluidos las grasas, ya que de esta forma la lipasa tiene más fácil acceso.

### **Interacción con otros nutrientes**

Una interacción con el calcio puede ser motivo de una disminución en la absorción de ácidos grasos saturados ya que se forman jabones insolubles, como bien ha sido confirmado por diferentes investigadores tanto en ratas como en el hombre [706,707].

### **3.2.2. Dependientes del modelo experimental**

Lo normal es que en los modelos experimentales habituales (roedores y humanos) tanto la digestibilidad de la proteína como la de la grasa sean altas (más de un 95%), con pequeñas variaciones dependiendo del modelo en concreto y la fuente alimentaria [708,709].

### ***Estado fisiológico (obesidad)***

#### **Proteína**

La inducción de obesidad (ratas Wistar con dieta cafetería) no parece interferir en la asimilación de uno u otro tipo de aminoácidos, lo que hace pensar en la fuerte regulación de estos procesos en dichos animales [710].

Estudios con ratas Zucker en los que se incluyen delgadas (Fa/?) alimentadas con dieta comercial o con dieta cafetería así como obesas genéticas (fa/fa) con las mismas dietas, se observaron los siguientes hechos [711]:

- El grupo cafetería tanto delgado como obeso genético poseía una mayor digestibilidad, absorción y retención de aminoácidos, así como una menor excreción urinaria.
- Existen diferencias en el aprovechamiento de los aminoácidos de la dieta dependiendo de si eran obesas inducidas o genéticas: las primeras conseguían absorber y retener una mayor proporción de aminoácidos que las segundas.
- La deposición de proteína durante el crecimiento es mayor en el grupo cafetería que en el control y posteriormente disminuye para igualarse con este último. Este hecho no ocurre con las obesas genéticas, en las cuales no hay cambios (al menos en el periodo del estudio).
- El porcentaje de energía obtenido de la proteína era mayor en las ratas alimentadas con dieta de referencia comparado con las de dieta cafetería, hecho que puede influir en los cambios observados en el metabolismo proteico.

Así mismo, en un estudio similar pero realizado en ratas Wistar, se observó una retención de proteína bruta similar. No obstante, las pérdidas urinarias, aunque pequeñas en ambos grupos, fueron mayores en el grupo control, lo que llevaba a un porcentaje de retención respecto a la absorción superior en el grupo obeso. Se ha propuesto que el menor porcentaje calórico de proteína en la dieta cafetería -y no su cantidad en términos absolutos- puede desencadenar algún mecanismo de control que posiblemente se asocia a una mayor biodisponibilidad de aminoácidos, lo que conlleva un aumento de la deposición de proteína total [712].

En humanos se ha estudiado poco el tema, aunque podemos destacar que la obesidad no genera cambios en el metabolismo proteico (síntesis, oxidación proteica y proteólisis) o quizás aumenta ligeramente la proteólisis; que la oxidación proteica parece relacionarse directamente con la oxidación de la glucosa e inversamente con la oxidación lipídica; y por último, que la cantidad de grasa visceral se correlaciona negativamente con los parámetros de metabolismo proteico anteriores [713,714]. Además, aunque no hay un consenso unánime, parece que la obesidad disminuye el anabolismo proteico estimulado por INS, produciéndose una disminución de la tasa



de síntesis proteica en el músculo esquelético en el periodo postprandial y en respuesta a otros factores estimuladores [715,716].

### **Grasa**

Apenas hay información de cómo afecta a largo plazo la obesidad al aprovechamiento de la grasa, habiéndose descrito sin embargo a corto plazo un aumento de la apolipoproteína B y AIV, y la proteína de transferencia de triglicéridos microsomal (MTP) en el intestino de ratones, lo que derivaría en una mayor absorción de grasa y formación de quilomicrones de mayor tamaño [717,718]. Además más recientemente (ver revisión de Khan *et al.* [719]), se ha sugerido que las dietas ricas en grasa (HFD) afectan las proteínas de las uniones estrechas, de forma que puede que aumenten la permeabilidad intestinal [719].

Los cambios fisiológico en la digestibilidad y metabolismo lipídico en situación de obesidad (tanto genética como inducida por HFD), han sido explorados relativamente poco, aunque se han hecho grandes avances gracias a estudios en roedores con obesidad inducida por la dieta (DIO) y humanos obesos [629].

Hasta la fecha, uno de los grupos que ha trabajado más intensamente en este campo es el de Frank Duca y Mihai Covasa, los cuales han observado que las HFD aumentan la eficiencia en la digestión, absorción, metabolismo y excreción de la grasa, debido a cambios fisiológicos tanto a nivel de pared del tubo digestivo como en las rutas metabólicas Además un factor importante es la interacción con la microbiota, la cual se ve alterada en los individuos obesos, pudiendo ser determinante en algunos procesos relacionados con la digestibilidad y metabolismo lipídico [629]



# MATERIAL Y MÉTODOS

*“No hay nada que no sea practicado por los que están inspirados por Buda. Cuando son capaces de vivir de esta manera, no hay nada carente de valor”.*

*(SiddharthaGautama)*



## 1. ESTUDIO EXPERIMENTAL EN ANIMALES

### 1.1. ANIMALES

Se utilizaron ratas Wistar macho (*Rattus Norvegicus*) como modelo experimental, siendo facilitadas por Harlan Laboratories® (Estados Unidos) y Charles Rivers® (Estados Unidos).

El número, BW y edad de los animales empleados en cada experimento fue el siguiente:

- Experimento I: 30 ratas de 6 semanas de edad y  $192 \pm 7.85$  g de peso inicial.
- Experimento II: 30 ratas de 6 semanas de edad y  $180 \pm 5.82$  g de peso inicial.
- Experimento III: 30 ratas de 6 semanas de edad y  $199 \pm 7$  g de peso inicial.

Los animales se dispusieron en jaulas de policarbonato individuales (para el control de la ingesta de alimento y periodos de recogida de heces y orina) o grupales, con un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas, una temperatura controlada de 21-23°C y dieta *ad libitum* según el grupo asignado.

Las condiciones de bienestar animal siguieron las directrices que se postulan en el BOE (Real Decreto 53/2013), el cual regula la investigación con animales de experimentación.

### 1.2. JAULAS

Se utilizaron dos tipos de jaulas (Fig. 5):

- Jaulones de policarbonato grupales para 3 ratas con rejilla de acero inoxidable (Tecniplast®).
- Jaulas metabólicas de policarbonato con recogida automática de heces y orina (Tecniplast®).



Figure 5. Metabolic cage and normal cage

### 1.3. INGREDIENTES FUNCIONALES

Los ingredientes funcionales utilizados en las dietas experimentales fueron facilitados por Biosearch Life®, nombrándose como E1, E2 y E3, por cuestiones de confidencialidad y posible desarrollo de patentes, y por tratarse de emulsiones obtenidas con distinta tecnología. La emulsión E1 se ensayó tanto en los experimentos realizados en ratas como los realizados en humanos.

### 1.4. DIETAS

La dieta base sobre la que se partió es la AIN-93M (Tabla 6), dieta semisintética formulada en el Instituto Americano de Nutrición [720] para cubrir los requerimientos nutricionales de las ratas adultas.

Como dieta control (siguiendo las recomendaciones de BiosearchLife®) usamos como base la dieta AIN-93M, sustituyendo el aceite de soja por aceite de girasol alto en oleico (HOSO). Por su parte, en las dietas experimentales (nombradas como E1, E2 y E3) el HOSO se reemplazó por una emulsión (E1, E2 o E3 según el caso) que contenía las sustancias bioactivas a testar, de tal forma que el tipo y cantidad total de grasa en todas las dietas era la misma. Todas las dietas utilizadas eran isocalóricas e isoproteicas, excepto la dieta semisintética D21492 (Research Diets®, Estados Unidos) que se utilizó para la inducción de obesidad en las ratas en el experimento III (ver tabla 6). Antes de cada experimento se confeccionó la cantidad de dieta necesaria para llevarlo a cabo.

Table 6. Composition of the control and experimental diets (formulation)

<b>COMPONENT</b>	<b>CONTROL DIET (AIN-93M mod.) (g/100 g)</b>	<b>E1 DIET (g/100g)</b>	<b>E2<sup>@</sup> DIET (g/100 g)</b>	<b>D12492 DIET (g/100 g)</b>
<b>Casein</b>	14	14	14	25.9
<b>Methionine</b>	0.5	0.5	0.5	0.39
<b>Sucrose</b>	10	10	10	8.89
<b>Cellulose</b>	5	5	5	6.46
<b>Fat</b>	4 <sup>†</sup> (HOSO)	4 <sup>‡</sup>	4 <sup>‡</sup>	34.89 <sup>¤</sup>
<b>Choline</b>	0.25	0.25	0.25	0.26
<b>Starch</b>	62,1	62,1	62,1	-
<b>Maltodextrin</b>	-	-	-	16.2
<b>Mineral complex</b>	3.5 <sup>ϕ</sup>	3.5 <sup>ϕ</sup>	3.5 <sup>ϕ</sup>	1.29 <sup>¥</sup> +1.68 CaHPO <sub>4</sub> +0.71 CaCO <sub>3</sub> +2.13 C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> K <sub>3</sub> O <sub>7</sub> ·H <sub>2</sub> O
<b>Vitamin complex</b>	1 <sup>£</sup>	1 <sup>£</sup>	1 <sup>£</sup>	1.29 <sup>∅</sup>

† HOSO (4%) + 6% of water, ‡ 4% fat emulsified components, ¤ 3.23 g of soy oil + 31.66 g of lard, ϕ Mineral complex AIN-93M, ¥ Mineral complex S10026, £ Vitamin complex AIN-93M and ∅ Vitamin complex V10001. @ The E3 diet is the same as E2 with a different technical process for making the emulsion. HOSO: High oleic sunflower oil. CaHPO<sub>4</sub>: Dicalcium phosphate, CaCO<sub>3</sub>: Calcium carbonate, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>K<sub>3</sub>O<sub>7</sub>: Potassium citrate. FM: fresh matter.

### **1.4.1. PREPARACIÓN DE LA DIETA CONTROL, E1, E2 Y E3**

Se eligió como proveedores de los ingredientes a Farmusal® (Granada) y Panreac® (Barcelona).

#### ***Procedimiento***

- 1- Todos los componentes se mezclaron en orden creciente de peso, añadiendo la grasa o la emulsión en última instancia procurando no dejar ningún resto en el recipiente en el que se haya pesado esta.
- 2- Finalmente las dieta control, E1, E2 y E3 se envasaron en bolsas opacas a 7°C hasta su uso (máximo un mes) y la 12492D directamente se conservó a la misma temperatura.

## **1.5. ANÁLISIS DE LAS DIETAS**

### **1.5.1. HUMEDAD**

El objetivo de esta prueba analítica es el de determinar el contenido en agua de las dietas. Se realizó mediante desecación en estufa (Memmert®, Alemania) a  $105\pm 1^\circ\text{C}$ , hasta alcanzar peso constante.

### **1.5.2. CENIZAS**

Las cenizas se determinaron mediante horno mufla (Mod. L9/C19, Nabertherm®, Alemania), programado a  $550^\circ\text{C}$  durante 3600 minutos, hasta obtener cenizas de aspecto blanquecino.

### **1.5.3. PROTEÍNA, GRASA Y CARBOHIDRATOS TOTALES**

Se analizaron la proteína y grasa mediante las mismas técnicas que se detallan más adelante en el análisis de heces y orina. Los carbohidratos totales se estimaron mediante diferencia con el resto de componentes medidos (agua, proteína, grasa total y cenizas).



## 1.6. DISEÑO EXPERIMENTAL

### 1.6.1. EXPERIMENTO I (CORTO PLAZO)

Se utilizaron 30 ratas, a las cuales se dispuso de forma aleatoria en los grupos denominados control, E1 y E2, resultando 10 ratas en cada grupo.

Tras 2 días de adaptación con pienso comercial (Teklad Global Diets 2014 Harlan Laboratories®), los animales se alojaron en jaulas metabólicas durante 6 días, con libre acceso a las dietas semisintéticas (C, E1 y E2), y realizándose a diario un control de la ingesta, así como la recogida de heces y orina. Las ratas se pesaron al inicio, mitad y final periodo dietético así como al final del Experimento (al sacrificio). Tras finalizar el periodo dietético se llevó a cabo un estudio con el objetivo de determinar las concentraciones plasmáticas de distintos péptidos gastrointestinales y hormonas en los estados de ayuno y postprandial (ver apartado 1.8.1).

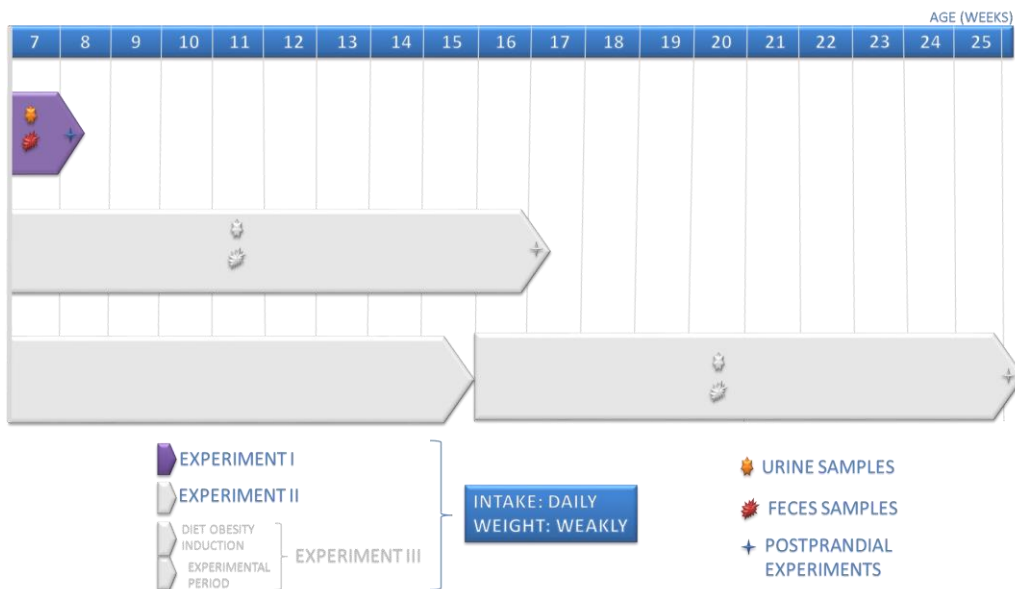


Figure 6. Time schedule of Experiment I. The diets used were control (C), E1 and E2.

### 1.6.2. EXPERIMENTO II (LARGO PLAZO)

Se dispusieron 30 ratas de la misma forma que en el Experimento I. E igualmente, tras una adaptación de 2 días con pienso comercial las ratas se ubicaron en jaulas metabólicas y se mantuvieron con la dieta control o las dietas experimentales (las mismas que en el experimento I), en este caso durante 10 semanas, controlándose la ingesta de forma diaria y el peso semanalmente, y llevándose a cabo una recogida de heces y orina a lo largo de la semana 5. Al final del periodo dietético se realizó el mismo estudio que en el experimento I para determinar las concentraciones plasmáticas de péptidos gastrointestinales y hormonas.

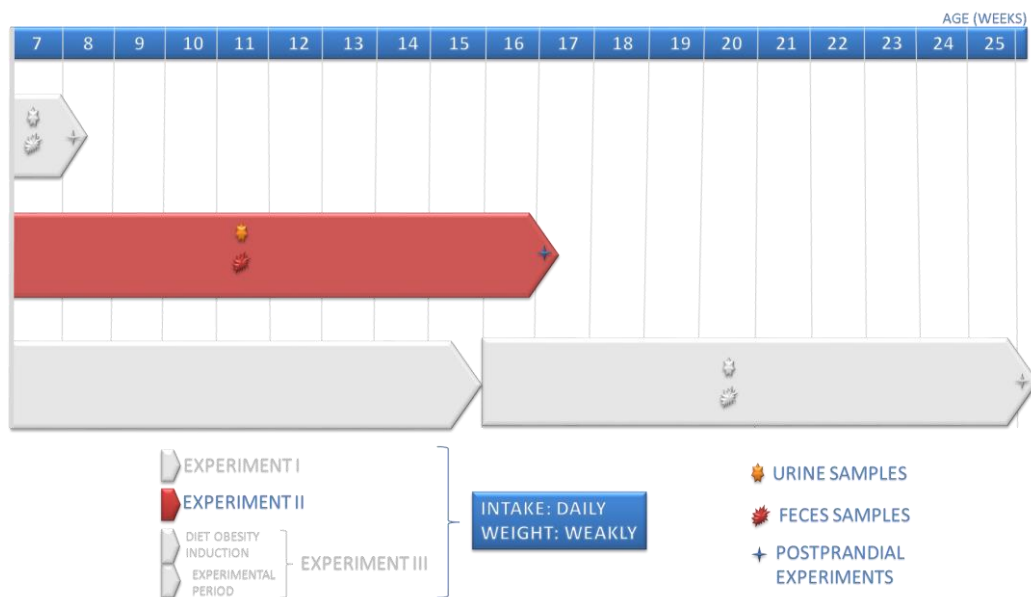


Figure 7. Time schedule of Experiment II. The diets used were control (C), E1 and E2.

### **1.6.3. EXPERIMENTO III (LARGO PLAZO CON INDUCCIÓN PREVIA DE OBESIDAD)**

Para la inducción de obesidad se utilizó una dieta rica en grasa (D12492, Research Diets®, Estados Unidos) (ver Tabla 6), la cual se ofreció a los animales *ad libitum* durante 9 semanas, periodo que, tal y como se discute más adelante, se consideró el más conveniente para nuestros objetivos tras una revisión bibliográfica exhaustiva.

Posteriormente, terminado el periodo de inducción de obesidad, se distribuyeron las ratas de forma que hubiera en los diferentes grupos tanto ratas resistentes como propensas a la inducción de obesidad (hecho que ocurre de forma natural), y se les alimentó *ad libitum* con las dietas de estudio durante otras 10 semanas experimentales. Este diseño nos permitirá comparar la influencia de las dietas en ratas obesas -experimento III- con ratas no obesas -experimento II-.

Durante ambos periodos se realizó un control diario de la ingesta, así como una recogida de heces y orina durante 7 días en la semana 5 del periodo experimental. El BW se registró semanalmente y al final del segundo periodo dietético se realizó el estudio para determinar las concentraciones plasmáticas de hormonas y péptidos, como en los estudios anteriores.

Para comprobar si las dietas experimentales modificaban la tolerancia a la glucosa con respecto a la situación durante la inducción de obesidad, se realizaron tests de tolerancia a la glucosa (OGTT) en ambos periodos (ver epígrafe 1.10).

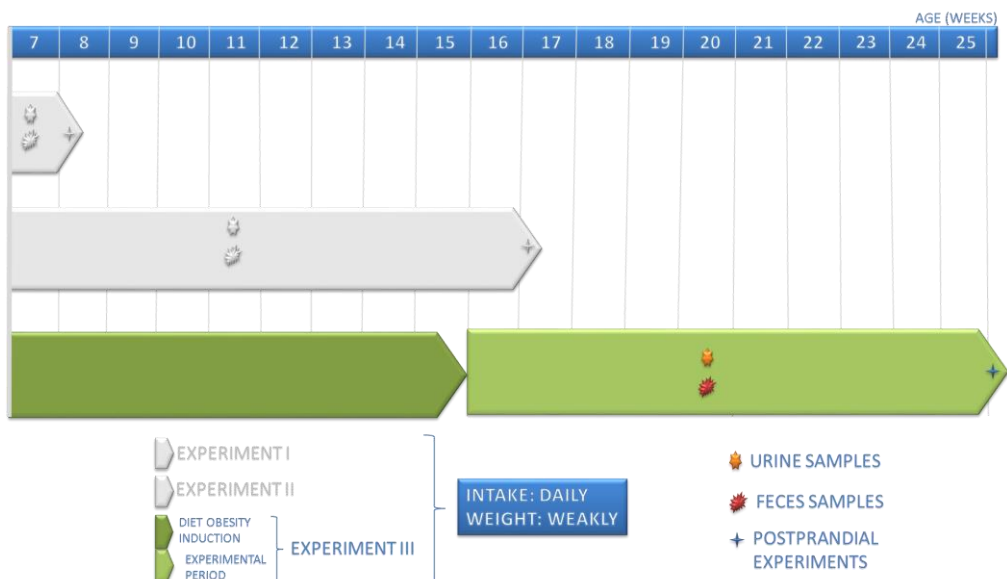


Figure 8. Time schedule of Experiment III. The diet used in the obesity induction period was the diet D12492, and those used in the experimental period were control (C), E1 and E3.

## 1.7. CONTROL DE LA INGESTA Y DEL PESO

Para el control de la ingesta se alojaron los animales en las jaulas metabólicas individuales:

- 1- Se pesaron los comederos vacíos (Mod. 125A, Precisa®, Suiza), anotándose el valor.
- 2- Se llenaron de forma que posibilitase una alimentación *ad libitum*.
- 3- Tras 24 horas, aproximadamente, se volvió a pesar el comedero.

El control de BW se realizó en los animales en estado de ayunas. Concretamente, se retiraba la comida de las jaulas aproximadamente a las 21.00 horas y los animales se pesaban en ayunas al día siguiente alrededor de las 9.00 horas.

## 1.8. ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE PÉPTIDOS GASTROINTESTINALES Y HORMONAS

### 1.8.1. DISEÑO DEL ESTUDIO Y PROCEDIMIENTO DE RECOGIDA DE MUESTRAS DE SANGRE

Para la obtención de las muestras de plasma se dejó a los animales en ayunas (36h). Al finalizar este periodo los animales se pesaban y a continuación se iniciaba el estudio. Se inmovilizó a los animales en un *restrainer* o cepo (Mod. LE502, Panlab®, Barcelona) y se tomó una muestra de sangre en ayunas (basal) practicando un pequeño corte en el extremo de la cola y ejerciendo presión sobre ésta. A continuación se les introdujo en la jaula con acceso *ad libitum* a la comida durante 15 minutos. En general, la ingesta observada durante este tiempo osciló entre 1 y 3 gramos. Se anotó como tiempo 0 el momento en que se les volvió a retirar el alimento, tomándose la siguiente muestra a los 15 minutos (muestra S15) y, sucesivamente, a los 30 (S30), 60 (S60) y 120 (S120) minutos, como indica la Fig. 9.

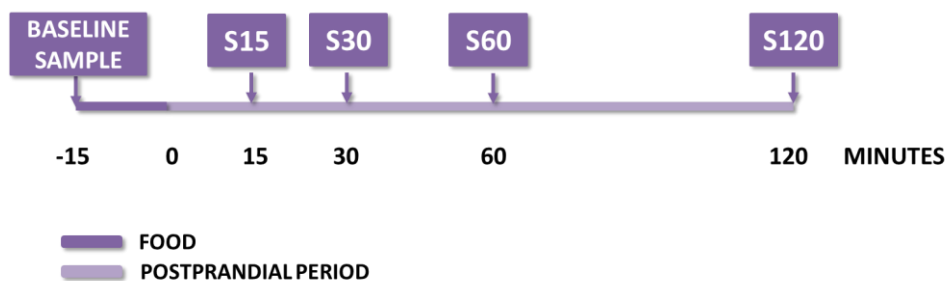


Figure 9. Time schedule of the blood sample recollection.

### 1.8.2. PROCESADO DE MUESTRAS

Tras recogerse las correspondientes muestras de sangre en viales con EDTA 0,340 M en salina tamponada con fosfatos (PBS), con una relación de 60  $\mu$ l por cada ml de sangre, se añadieron inmediatamente los inhibidores de proteasas según las cantidades recomendadas por el fabricante, siendo estas:

- Aprotinina (Ref: A1153, Sigma-Aldrich®): Tras preparar una solución acuosa del producto, se añadió a la muestra el volumen adecuado para lograr una actividad final de unos 500 KIU/ml sangre
- Pefabloc (Ref: 11429868001, Roche®): Tras preparar una solución acuosa del producto, se añadió a la muestra el volumen adecuado para lograr una concentración final (en sangre) de 4 mM.
- DPPIV (Ref: DPP4-010, Millipore®): La solución comercial (lista para su uso) se añadió en proporción de 10  $\mu$ l/ml sangre.

Conforme se iban recogiendo las muestras en viales (tras reunir un número de 10), se procedía a su centrifugación (Mod. 5810R, Eppendorf®, Alemania) a 2057xg durante 15 minutos, para posteriormente separar el plasma del sedimento. Tras disponerse en viales de polipropileno, se guardaron dichas muestras a -80º para su posterior análisis.

### 1.8.3. MEDICIÓN DE CONCENTRACIONES

***Determinación de AMY (activa), GRN (activa), GIP (total), GLP-1 (activo), LEP, INS, PP y PYY (total).***

#### **Fundamento**

La determinación de las hormonas y péptidos mencionados se llevó a cabo gracias a la tecnología Milliplex™ Luminex® X-Map® (resumida en la Fig. 10), más concretamente usando el kit LINCOplex Kit #RGT-88K (*Rat Gut Hormone Panel*), suministrado por la empresa Millipore® (España).

La tecnología xMAP® en la que se basa el kit consiste en asociación de un citómetro de flujo y una reacción de tipo ELISA en sándwich utilizando como superficie la de unas microesferas.

Para la detección del tipo de microesfera se lleva a cabo un marcaje fluorescente gracias a dos colorantes que se encuentran en proporciones que van del 1% al 99% y del 99% al 1%, respectivamente. Así se consiguen un total de 100 diferentes tipos de microesferas marcadas en el rango que va desde el rojo al infrarrojo, de forma que teóricamente se pueden medir 100 analitos diferentes en una misma muestra.

Por otro lado se asocia a cada tipo de microesfera el anticuerpo primario al que se va a unir el analito en cuestión, asociándose posteriormente a este conjugado un anticuerpo secundario ligado a biotina, la cual reacciona con la estreptavidina-ficoeritina para producir fluorescencia. Así, el aparato lleva un láser rojo que detecta el tipo de microesfera, y otro verde que detecta la cantidad de fluorescencia de la estreptavidina-ficoeritina. La concentración del analito en la muestra se puede determinar tras extrapolar dichos valores en una curva estándar de concentración/fluorescencia.

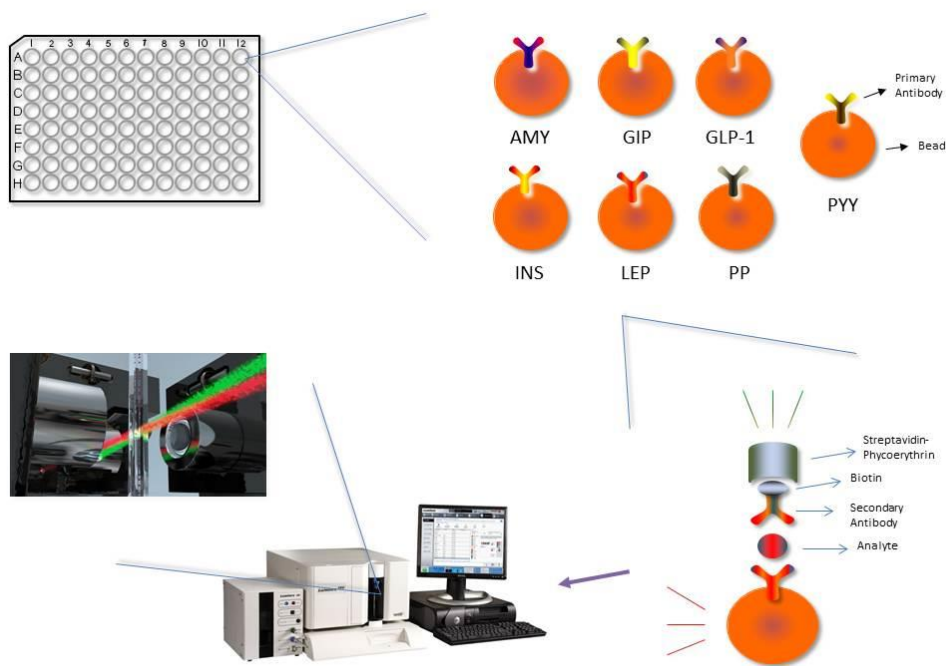


Figure 10. Principle of the technology Milliplex™ Luminex® X-Map®.

Respecto a la sensibilidad para cada analito y el rango de medición del kit se muestran en la Tabla 7.

Table 7. Sensitivities and ranges of the kit LINCOpex Kit #RGT-88K.

	<b>SENSITIVITY</b>	<b>RANGE</b>
<b>AMY (pg/ml)</b>	20	41.2-30000
<b>GIP (pg/ml)</b>	1	2.7-2000
<b>GLP-1 (pg/ml)</b>	28	41.2-30000
<b>GRN (pg/ml)</b>	2	6.9-5000
<b>INS (pg/ml)</b>	28	68.5-50000
<b>LEP (pg/ml)</b>	27	68.5-50000
<b>PP (pg/ml)</b>	17	6.9-5000
<b>PYY (pg/ml)</b>	16	6.9-5000

### **Equipo**

El equipo es el modelo Luminex 200™ y consta de una unidad encargada de gestionar los fluidos y un citómetro con los dos láseres mencionados, todo ello asociado al software xPonent®, que gestiona los datos obtenidos.

### **Reactivos y material**

- Kit LINCOpex #RGT-88K
  - Placa de 96 pocillos
  - Estándar de péptidos gastrointestinales y hormonas de rata (1 vial)
  - Controles 1 y 2 (2 viales)
  - Solución de ensayo (1 vial)
  - Diluyente de microesferas (1 vial)
  - Solución de lavado 10X (1 vial)
  - Anticuerpos de detección (1 vial)
  - Estreptavidina-ficoeritrina (1 vial)
  - Botella para mezcla de microesferas



- Viales con solución de las microesferas (8 viales)
  
- Muestras de plasma con inhibidores de proteasas
- Pipetas calibradas (Eppendorf®, Alemania)
- Puntas de pipeta VWR® (EE.UU)
- Agitador de placas (Mod. PSU-2T, Boeco®, Alemania)
- Vortex (Mod. SA6, Stuart Scientific®, Reino Unido)
- Sonicador (Mod. 200, Branson®, Estados Unidos)
- Material general de vidrio (Pyrex®, Reino Unido y Pobel®, Madrid)
- Papel de filtro y absorbente

### **Procedimiento**

- 1- Preparación de las microesferas: Se sonicaron (30 segundos) y agitaron en vortex (1 minuto) los 8 viales que contienen las microesferas para cada una de las hormonas/péptidos. De cada vial se obtuvieron 150 µl que se iban añadiendo a un vial especial de mezcla y al que posteriormente se adicionaron 1800 µl de diluyente de microesferas, para así alcanzar un total de 3 ml de nuestra mezcla de microesferas.
- 2- Preparación de los controles: Se reconstituyeron el control QC1 y el QC2, los cuales contienen, respectivamente, dos concentraciones conocidas de todas las hormonas/péptidos a ensayar.
- 3- Preparación de la curva estándar:
  - a. Disponer 6 viales numerados del 1 al 6.
  - b. Reconstituir el vial con la solución estándar original y a partir de ésta realizar diluciones seriadas de 1:4 con solución de ensayo.
- 4- Montaje de la placa:
  - a. Primero se añade el estándar, controles y solución de ensayo.
  - b. Centrifugamos las muestras de plasma a 3000xg durante 5 minutos y cogiendo 25 µl de la zona superior se agregan al pocillo correspondiente.
  - c. Por último se añaden las microesferas a todos los pocillos.

- 5- Incubación nocturna durante 18 horas a 4°C con agitación constante y posteriormente 3 lavados utilizando solución de lavado, centrifugando a 1300xg durante 5 minutos, volcando y secando la placa.
- 6- Adición del anticuerpo secundario e incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 7- Agregar la estreptavidina-ficoeritrina e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 8- Realizar tres lavados de la misma forma que en el punto 5 y añadir líquido vehiculizador finalmente.
- 9- Leer utilizando el equipo Luminex 200™.
- 10- Análisis de los resultados mediante el software Luminex® xPonent®, el cual calcula las concentraciones de la muestra en base a la curva estándar.

### ***Determinación de CCK***

#### **Fundamento**

Se ha dispuesto del kit CCK (26-33) *Extraction Free* (EKE-069-04) de Phoenix Pharmaceuticals®, cuya sensibilidad es de 0.04 ng/ml y rango de medida de 0-100 ng/ml.

Dicho kit se basa en un inmunoensayo de tipo ELISA sándwich, para el cual se dispone de una placa de 96 pocillos en los cuales se ha asociado a la superficie el anticuerpo secundario con las uniones no específicas bloqueadas. El anticuerpo primario puede unirse al Fragmento cristalizante (Fc) del anticuerpo secundario y, por otro lado, el fragmento de unión al antígeno (Fab) del anticuerpo primario puede unirse de forma competitiva bien a un péptido biotinilado (que nos servirá para la detección) o bien al péptido problema que se desea medir en las muestras (analito).

El péptido biotinilado es capaz de interactuar con la estreptavidina-peroxidasa de rábano (SA-HRP), que a su vez podrá actuar sobre un sustrato produciendo color amarillo. La intensidad de color se correlaciona directamente con la concentración de anticuerpo biotinilado e inversamente con la concentración de péptido problema de la

muestra. Una curva estándar de concentraciones conocidas del péptido problema nos permitirá determinar su concentración en la muestra por extrapolación.

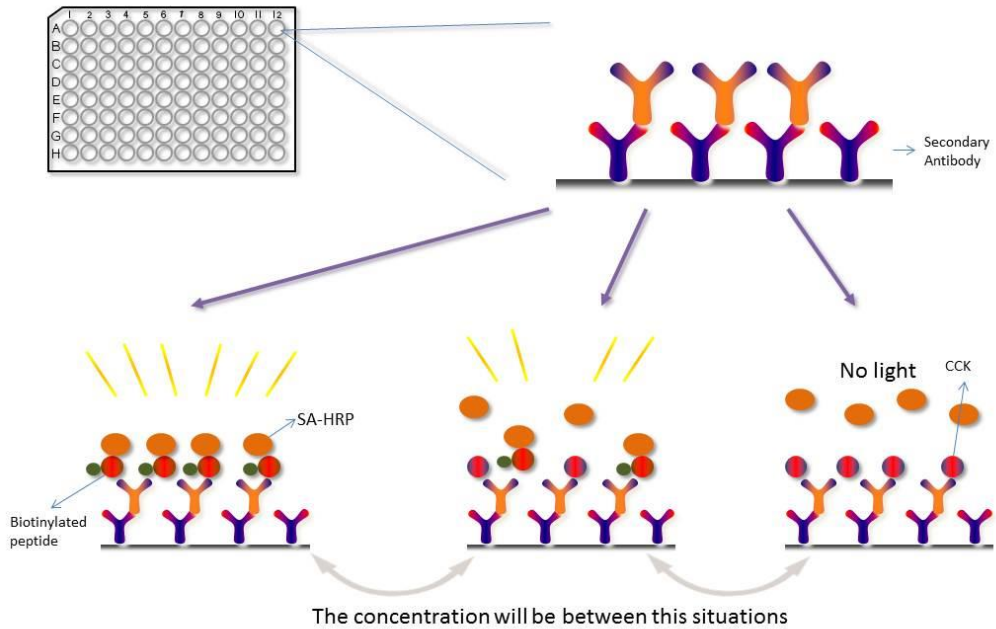


Figure 11. ELISA immunoassay for CCK measurement.

### **Equipo**

El equipo utilizado para la lectura de la placa fue un lector de placas (Mod. Synergy™ HT, BioTek® Instruments, Alemania), que consta del módulo de lectura y un ordenador asociado con el software Gen 5 para análisis de los resultados.

### **Reactivos y material**

- Kit CCK 26-33 (Human, Rat, Mouse) EIA *Extraction Free* (EKE-069-04)
  - o Solución de ensayo concentrada 20x (1 vial)
  - o Placa de 96 pocillos con anticuerpo secundario adherido
  - o Péptido (CCK) estándar (1 vial)

- Péptido biotinilado (1 vial)
- Estreptavidina-peroxidasa de rábano (SA-HRP) (1 vial)
- Control positivo (2 viales)
- Solución sustrato (TMB) (1 vial)
- 2N HCl (1 vial)
- Solución diluyente (1 vial)
- Pipetas calibradas Eppendorf® (Alemania)
- Puntas de pipeta VWR® (EE.UU)
- Agitador de placas Boeco® (Alemania)
- Material general de vidrio general
- Papel de filtro y absorbente

### **Procedimiento**

- 1- Preparación de las soluciones y componentes del kit:
  - a. Diluir 20x la solución de ensayo con agua bidestilada.
  - b. Rehidratar y llevar a 5 ml con solución de ensayo y diluyente el péptido biotinilado y el anticuerpo primario.
  - c. Reconstituir el control positivo.
- 2- Reconstituir el vial del estándar y preparar la curva estándar en 5 viales con una proporción 1:5 de forma seriada.
- 3- Montaje de la placa:
  - a. Añadir la solución de dilución en los pocillos de unión total, la curva estándar y los controles positivos.
  - b. Disponer las muestras (previa centrifugación a 3000 rpm durante 5 minutos) en los pocillos correspondientes de acuerdo con la plantilla.
  - c. Agregar el anticuerpo primario y el péptido biotinilado. Tapar e incubar durante dos horas a temperatura ambiente. Descartar el contenido, secar y lavar 4 veces con solución de ensayo.
  - d. Añadir el SA-HRP y lavar como en el punto anterior.
  - e. Adicionar el TMB e incubar 1 hora y posteriormente el HCl 2N para detener la reacción.
  - f. Leer en el lector de placas a 450 nm en un tiempo de 20 minutos.

- g. Análisis de los resultados con el programa Gen 5™, utilizar una curva de 4 parámetros para interpolar los resultados en la curva estándar.

## **1.9. ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE NITRÓGENO EN HECES Y ORINA, Y DE GRASA EN HECES**

### ***RECOGIDA DE LAS MUESTRAS***

La recogida de heces y orina se llevó a cabo por una mera separación mecánica gracias al diseño de la jaula metabólica.

Para que el nitrógeno de la orina no se evaporase, se dispuso en cada tubo una cantidad de aproximadamente 10 ml de solución de ácido clorhídrico (5N) junto con el indicador Shiro-Tashiro, cuyo viraje nos indica el pH de la muestra.

#### **1.9.1. PROCESADO DE LAS MUESTRAS**

##### ***Orina***

Las orinas se filtraron y se llevaron a un volumen conocido de orina en solución ácida (ácido clorhídrico (5N) e indicador Shiro-Tashiro).

##### ***Heces***

Recolección, molienda (Foss®, Barcelona) y liofilización (Cryodos, Telstar®, España) de las heces del periodo de recogida y posterior congelación a -80°C.

#### **1.9.2. ANÁLISIS DE MUESTRAS**

##### ***Contenido en nitrógeno (heces y orina)***

El nitrógeno total de origen orgánico se cuantificó median el método Kjeldahl [721], aplicada de manera automatizada (Mod. K-350/K-355, Buchi®, Suiza).

##### ***Contenido en grasa (heces)***

Para conocer la grasa total presente en la muestra inicialmente se realizó una hidrólisis

ácida (para liberar la grasa de la matriz que la contiene) y después la extracción con solvente orgánicos (Soxhlet) (Mod. B-811/B-811 SLV, Buchi®, Suiza) [722].

### 1.9.3. ÍNDICES BIOLÓGICOS

A partir de los datos de I (ingerido), F (excreción fecal) y U (excreción urinaria), se calcularon los siguientes índices biológicos [723]:

Coeficiente de digestibilidad aparente (CDA) (*apparent digestibility coefficient*, ADC): Es la relación porcentual entre la cantidad absorbida de la ingerida, sin tener en cuenta las pérdidas endógenas.

$$CDA = \left( \frac{I - F}{I} \right) \cdot 100$$

Balance o retención (R) (*balance or retention*): Refleja la retención (de nitrógeno en nuestro caso) en el organismo en valor absoluto.

$$R = I - (F + U)$$

Relación porcentual de lo retenido en relación al absorbido (% R/A, *percent of retention/absorption*): Expresa porcentualmente la cantidad retenida con respecto a la absorbida.

$$\% R/A = \left( \frac{(I - (F + U))}{I - F} \right) \cdot 100$$

## 1.10. CURVA DE GLUCEMIA (EXPERIMENTO III)

### 1.10.1. FUNDAMENTO

Se realizó un test de tolerancia a la glucosa (OGTT) (véase más abajo), siguiendo el protocolo descrito en el trabajo de Prieto *et al.* [724].

### 1.10.2. REACTIVOS Y MATERIAL

- Medidor de glucosa (Accu-Chek® Compact Plus, Roche®, Alemania) y tiras reactivas

- Jeringas de 1 ml y 5 ml
- Sonda intragástrica de material plástico
- Cepo (Mod. LE5025, Panlab®, Barcelona)
- Agua caliente
- Tijeras (varias)
- Solución glucosada extemporánea

### **1.10.3. PROCEDIMIENTO**

- 1- Preparar la solución de glucosa en solución salina de concentración 1,725 M.
- 2- Pesar al animal (Mod. Alc 30100.2, Aculab®, Reino Unido) y calcular el volumen de solución de glucosa a administrar (dosis: 4 µl de la anterior solución glucosada por cada gramo de BW).
- 3- Cargar dicha cantidad en una jeringa.
- 4- Medir la glucosa al inicio del experimento (Accu-Chek® Compact Plus, Roche®, Alemania) (ayunas). Se practica un pequeño corte en la punta de la cola y se deposita una gota de sangre en la tira reactiva.
- 5- Administrar la glucosa mediante la sonda intragástrica, procurando un manejo que minimice el estrés del animal.
- 6- Medir de nuevo la concentración de glucosa en sangre a los 15, 30, 60 y 90 minutos.

## **1.11. EUTANASIA Y OBTENCIÓN DE ÓRGANOS *POSTMORTEN***

### **1.11.1. EUTANASIA**

Se anestesió a los animales con Ketamina/Xilacina (40-90/5-10 mg/kg) mediante inyección i.p., extrayéndose la sangre por punción cardiaca.

### **1.11.2. OBTENCIÓN Y CONSERVACIÓN DE LOS ÓRGANOS**

- 1- Se obtuvieron los órganos mencionados a continuación (si no se indica experimento en concreto se extrajeron en los tres) y de la forma más rápida posible se dispusieron en paquetes hechos con papel de aluminio:
  - Hígado

- Colon
- Ciego
- Bazo
- Cerebro (Experimento II y III)
- Grasa (Experimento III)
  - i. Subcutánea
  - ii. Epididimal
  - iii. Abdominal

2- Dichos paquetes se introdujeron lo más rápido posible en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C en congelador (Thermo Scientific®, Alemania).

## **1.12. DETERMINACIÓN DE COLESTEROL Y TRIGLICÉRIDOS EN HÍGADO**

### **1.12.1. FUNDAMENTO**

La determinación de triglicéridos y colesterol se llevó a cabo mediante kits comerciales (Ref: 1001310 y 1001091, respectivamente; Spinreact®, Gerona).

### **1.12.2. REACTIVOS Y MATERIAL**

- Kit GPO-POD Enzimático Colorimétrico (Spinreact®, Gerona) para triglicéridos y para colesterol.
  - Buffer R1 (*buffer*) y Buffer R2 (enzimas)
  - Control
- Reactivos para extracción
  - Solución etanólica de hidroxitolueno butilado (BHT) al 0,01% (p/v)
  - Mezcla de etanol (0,01% BHT) y KOH 11M (razón 10:1)
  - NaCl (9%)
  - Hexano (95%)
- Centrífuga de viales (Mod. 5810R, Eppendorf®, Alemania)
- Pipetas y puntas (Eppendorf®, Alemania)
- Material de vidrio (tubos especiales para sonicar)
- Microbatidora (Micra®, Alemania) y sonicador (Bandelin®, Alemania)
- Baño caliente automático (Mettmert®, Alemania)



- Nitrógeno gaseoso (Air Liquide®, Granada)
- Tubos y aparataje para evaporación
- Liofilizador (Mod. Cryodos, Telstar®, España)

### **1.12.3. PROCEDIMIENTO**

#### ***Extracción***

- 1- Liofilizar el hígado durante 48 horas el hígado.
- 2- Triturar 0,3 g de hígado.
- 3- Homogeneizar y sonicar, añadiendo al tejido 1 ml de NaCl (9%) y 3 ml de etanol (0,01% BHT).
- 4- Adicionar 0.5 ml de la solución de etanol:KOH.
- 5- Saponificar en baño caliente (Memmert®, Alemania) a 60°C durante 40 minutos.
- 6- Extracción con hexano y agua bidestilada.
- 7- Centrifugar a 790xg durante 10 minutos.
- 8- Tomar la fase orgánica que queda en la parte superior.
- 9- Evaporar con nitrógeno gaseoso en campana.
- 10- Adicionar hexano hasta 1 ml y conservar las muestras a -20° C.

#### ***Medición de triglicéridos***

- 1- Mezclar buffer 1 y 2 (Solución de ensayo).
- 2- Añadir en una placa de 96 pocillos la solución de ensayo solamente y ésta mezclada con hexano por duplicado.
- 3- Disponer el control por duplicado.
- 4- Adicionar las muestras por duplicado en los pocillos asignados.

#### ***Medición de colesterol***

- 1- Realizar los mismos pasos que en los TGs.

#### ***Lectura y análisis de los resultados***

- 1- Leer en el lector de placas BIO-TEK® a 505 nm.

- 2- Realizar los cálculos pertinentes para obtener los mg/ml de TGs y colesterol y en relación al peso total del hígado.

### **1.13. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DE SANGRE TOMADAS AL SACRIFICIO**

Se obtuvo toda la sangre posible en tubos con EDTA tripotásico 0,324 M (20 µl/500 µl de sangre) y aprotinina (8 µl/500 ml de sangre). Se tomó una alícuota de sangre fresca para el estudio hematológico, y el resto se centrifugó para obtener el plasma, el cual se alícuotó y congeló hasta su posterior análisis.

#### **1.13.1. HEMOGRAMA**

En una alícuota de sangre fresca se midieron los siguientes parámetros mediante un analizador hematológico (Mod. kx-21, Sysmex®, Japón):

- WBC (*White blood cells*): Recuento de glóbulos blancos.
- RBC (*Red blood cells*): Recuento de glóbulos rojos.
- HGB (*Haemoglobin*): Concentración de hemoglobina en sangre.
- HCT (*Haematocrit*): Hematocrito.
- MCV (*Mean corpuscular volume*): Volumen corpuscular medio.
- MCH (*Mean corpuscular haemoglobin*): Hemoglobina corpuscular media.
- MCHC (*Mean corpuscular haemoglobin concentration*): Concentración de hemoglobina corpuscular media.
- PLT (*Platelets*): Recuento de plaquetas.

#### **1.13.2. ANÁLISIS BIOQUÍMICO DEL PLASMA**

La determinación de la concentración de triglicéridos y colesterol plasmáticos se llevó a cabo mediante kits comerciales (Ref: 1001310 y 1001091, respectivamente; Spinreact®, Gerona).

## 2. ESTUDIO EXPERIMENTAL EN HUMANOS

### 2.1. VOLUNTARIOS

Quince voluntarios normoglucémicos jóvenes sin ninguna complicación médica (9 mujeres y 6 hombres) de Granada (España) cuyas características eran las siguientes (media±EEM):

- Edad: 28,13±4,63 años
- Peso: 70,45±12,64 kg
- Altura: 165,9±9,6 cm
- BMI: 21,15±3,06 kg/m<sup>2</sup>
- Superficie corporal: 1,78±0,19 m<sup>2</sup>

### 2.2. PRODUCTOS

Los productos a testar fueron para el grupo control un desayuno estándar que consistió en una rebanada de pan integral (28 g), un plato de pasta (30 g /m<sup>2</sup> de área corporal), un yogur desnatado, y aceite de girasol (50 g/m<sup>2</sup> de área corporal), y para el grupo E1 el mismo desayuno adicionado con 10 gramos de emulsión E1.

La superficie de área corporal (SAC) se calculó según la fórmula de Dubois y Dubois [725]:

$$SAC = \frac{(0,7184 \cdot a^{0,725} \cdot p^{0,425})}{100}$$

**SAC** = Superficie de área corporal (m<sup>2</sup>)

**a** = altura (cm)

**p** = peso (kg)

### 2.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

Todos los voluntarios ingresaron por la mañana en la Unidad Metabólica de Biosearch Life® (10-12 horas de ayuno, tomando solo agua) y permanecieron en la Unidad Metabólica (climatizada a 22°C), en reposo.

Tras tomar una primera muestra de sangre en ayunas, los participantes consumían el desayuno estándar a lo largo de un periodo de 10 minutos. Durante las ocho horas siguientes se les tomaron muestras de sangre y se evaluó la saciedad (ver protocolo más adelante).

Todo el protocolo se repitió al día siguiente, pero en vez del desayuno estándar los participantes ingirieron el desayuno adicionado con la emulsión E1.

La dieta de los voluntarios fue controlada a lo largo del estudio mediante encuestas nutricionales de recordatorio 24 horas y un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos dónde se muestran las diferencias observadas entre ambos productos con respecto a los cambios en la ingesta diaria de energía, macronutrientes y ciertos micronutrientes a lo largo del estudio.

## 2.4. ESTUDIO DE SACIEDAD

Como se ha comentado, cada hora se realizó a los voluntarios una encuesta basada en la escala de Haber [726], que cuantifica la sensación de hambre o saciedad puntuando en una escala de 10 (saciedad) a -10 (hambre):

- Extremadamente hambriento ..... -10
- Hambriento ..... -8
- Bastante hambriento (deseo comer) ..... -6
- Poco hambriento (no hambriento pero me complacería comer) ... -4
- Hambre muy ligera ..... -2
- Sin hambre ..... 0
- Parcialmente satisfecho ..... 2
- Saciado pero podría comer algo más ..... 4
- Saciado de forma complaciente ..... 6
- Demasiado lleno ..... 8
- Absolutamente saciado (no puedo más) ..... 10

Se analizaron 4 parámetros: tiempo de saciedad, intensidad de saciedad (incremento del área bajo la curva para saciedad), tiempo de hambre e intensidad de hambre (incremento del área bajo la curva para hambre).

## 2.5. ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE PÉPTIDOS GASTROINTESTINALES

### 2.5.1. DISEÑO DEL ESTUDIO Y PROCEDIMIENTO DE RECOGIDA DE MUESTRAS DE SANGRE

Las muestras de sangre se obtuvieron de la vena antecubital mediante la colocación de una vía. Tras recogerse una muestra de sangre en ayunas (basal, tiempo 0)), los participantes ingirieron el desayuno (a lo largo de 10 min), tomándose sucesivas muestras de sangre (3,5 ml) durante el periodo postprandial (1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup>, 5<sup>a</sup> y 8<sup>a</sup> horas).

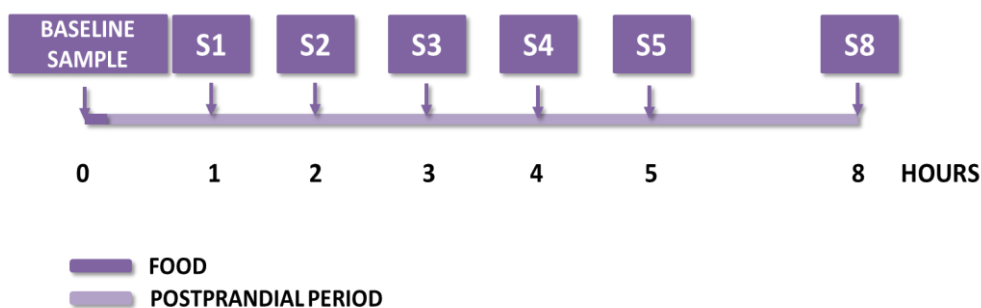


Figure 12. Time schedule of the blood sample recollection.

### 2.5.2. PROCESADO DE MUESTRAS

Conforme se iban recogiendo las muestras en viales (tras reunir un número de 15), se procedía a coagulación durante 30 minutos, para posteriormente retirar el coágulo y centrifugar el suero remanente a 1000xg (Mod. 5810R, Eppendorf®, Alemania) durante 10 minutos.

Posteriormente se dispuso el suero en viales de 60 añadió al vial de suero

- Cóctel de inhibidores de proteasas (Ref: 04693116001, Roche®): Se preparó la solución acuosa 1X de la cual se tomaron 40 µl por cada mililitro de sangre.

- Pefabloc (Ref: 11429868001, Roche®): Tras preparar una solución acuosa del producto, se añadió a la muestra el volumen adecuado para lograr una concentración final (en sangre) de 4 mM.
- DPPIV (Ref: DPP4-010, Millipore®): La solución comercial (lista para su uso) se añadió en proporción de 10 µl/ml sangre.

Tras disponerse en viales de polipropileno, se guardaron dichas muestras a -80º para su posterior análisis.

### 2.5.3. MEDICIÓN DE CONCENTRACIONES

#### *Determinación de GRN (activa), GIP, LEP, INS, PP y PYY (total).*

Se llevó a cabo gracias al kit LINCOpIex#HGT-68K (*Human Gut Hormone Panel*), suministrado por la empresa Millipore® (España).

El fundamento, equipo, reactivos y material y procedimiento fueron mismos ya descritos para los péptidos gastrointestinales y hormonas de rata, siendo en este caso la sensibilidad y el rango para cada analito los recogidos en la Tabla 8.

Table 8. Sensitivities and ranges of the kit LINCOpIex Kit #RGT-88K.

	<b>SENSITIVITY</b>	<b>RANGE</b>
<b>GIP (pg/ml)</b>	0.2	2.7-2000
<b>GRN (pg/ml)</b>	1.8	13.7-10000
<b>INS (pg/ml)</b>	44.5	137-100000
<b>LEP (pg/ml)</b>	157.2	137-100000
<b>PP (pg/ml)</b>	2.4	13.7-10000
<b>PYY (pg/ml)</b>	8.4	13.7-10000

### **3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y CÁLCULO DE LAS VARIABLES**

En primer lugar se realizó una estadística descriptiva básica para cada uno de los grupos. La normalidad de la distribución de valores se examinó mediante el test de Shapiro-Wilk. Para las variables que no siguieron una distribución normal, se sometieron a transformación logarítmica con base 10, logarítmica neperiana y a raíz cuadrada, de forma que si no cambió la distribución se utilizaron los test no paramétricos U de Mann-Whitney y H de Kruskal-Wallis.

Para las variables con una distribución normal, se aplicó el test de Dunnet de homogeneidad de varianzas, examinándose posteriormente las diferencias entre las medias de los diferentes grupos experimentales mediante ANOVA de una vía (procedimiento one-way de SPSS), seguido del test a posteriori (post-hoc) de Duncan, o bien, dependiendo de la variable a analizar, un test de la t de Student (t-test) para muestras relacionadas.

El área bajo la curva se calculó mediante el método trapezoidal [727] y se analizaron las diferencias mediante un t-test para variables no relacionadas teniendo en cuenta la homogeneidad de varianzas para la significación.

Los resultados presentados en el texto, tablas y figuras son valores medios y sus errores estándar (media±EEM). En todos los casos, sólo se consideraron significativas aquellas diferencias con valores de  $P < 0.05$ .

Para el análisis estadístico se utilizó la aplicación informática SPSS para Windows (versión 19.0).





# RESULTADOS

*“El trabajo científico consiste en ver lo que todo el mundo ha visto, pero pensar en lo que nadie ha pensado”.*  
(Albert Szent-Györgyi)



## 1. COMPOSICIÓN DE LAS DIETAS Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Table 9. Composition of experimental diets.

	<b>E1</b>	<b>E2<sup>@</sup></b>	<b>C</b>	<b>DIO</b>
<b>HUMIDITY (%)</b>	13.33 ± 0.34	12.80 ± 0.41	12.23 ± 0.81	3.60 ± 0.20 *
<b>PROTEIN (%)</b>	13.14 ± 0.56	13.12 ± 0.52	12.17 ± 0.41	21.16 ± 0.26 *
<b>FAT (%)</b>	3.88 ± 0.05	4.08 ± 0.15	3.62 ± 0.13	34.76 ± 1.25 *
<b>TOT CHO (%)</b>	68.11 ± 0.64	68.16 ± 0.76	70.34 ± 1.17	40.30 ± 1.20 *
<b>ASH (%)</b>	1.80 ± 0.13	2.02 ± 0.07	2.02 ± 0.07	0.21 ± 0.01 *

Values are expressed as mean ± SEM (n=6-8). @ The E3 diet has the same composition as the E2 but the emulsion was made by a different technological process. DIO: Diet for the induction of obesity (D12492, Research Diets®). The asterisk (\*) indicates that all the parameters of the DIO diet differ significantly from the other diets. Abbreviations: TOT CHO (total carbohydrates).

Se muestran los resultados analíticos de las dietas utilizadas en los diferentes experimentos.

## 2. EXPERIMENTOS EN RATAS CON NORMOPESO

### 2.1. CORTO PLAZO

#### 2.1.1. Ingesta

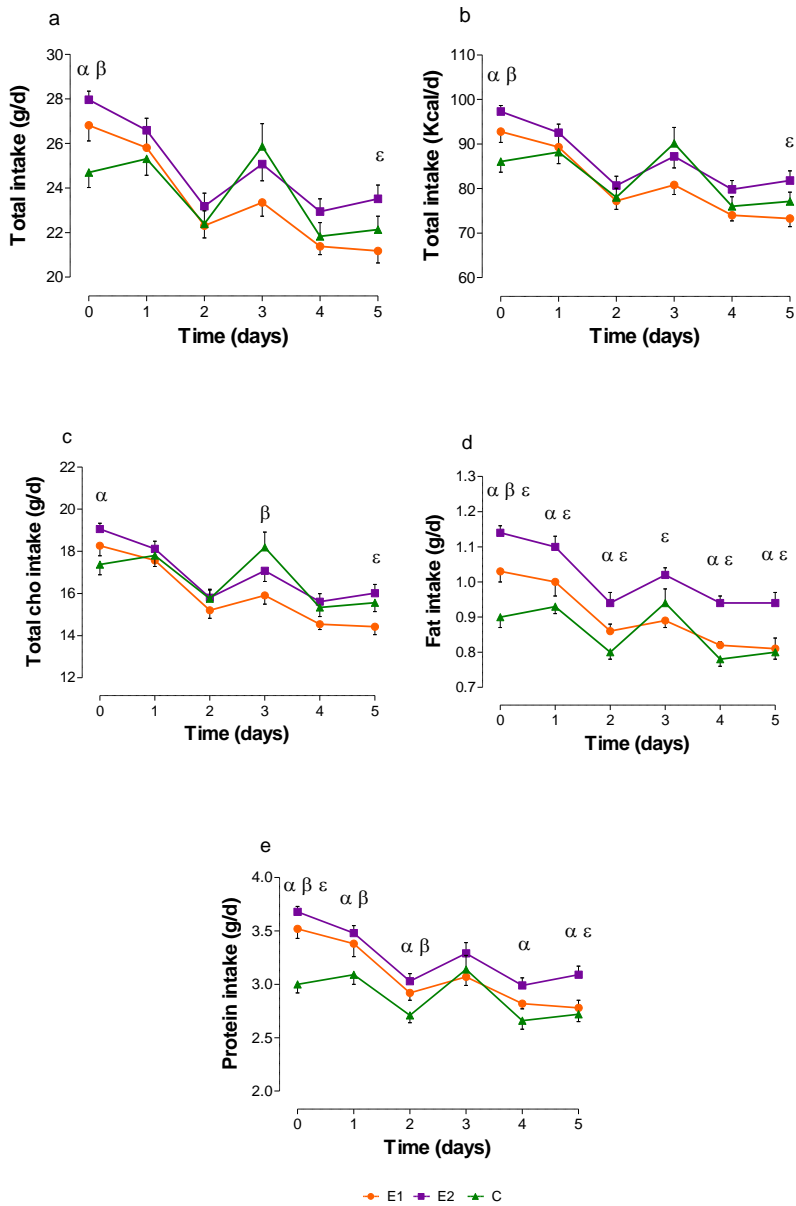


Figure 13. Daily intake of food (a), energy (b), total carbohydrates (c), fat (d) and protein (e) in rats fed for 6 days with standard diet (C) or diets containing two different functional ingredients (E1 and E2). Values represent mean  $\pm$  SEM (n = 8-10). For a given time point, statistical significance (P < 0.05) between the groups is indicated as follows:  $\alpha$ : C vs E2,  $\beta$ : C vs E1, and  $\epsilon$ : E1 vs E2. Abbreviations: CHO (carbohydrates). The age of the rats at the beginning of the experimental period was 6-7 weeks.

La ingesta de alimento (Fig. 13 a) y de energía (Fig. 13 b) es similar en los tres grupos a lo largo de la mayor parte del periodo experimental exceptuando el día 0, en que los valores de ambos parámetros en los grupos experimentales (E1 y E2) son significativamente mayores que en el grupo control, y el día 5, en que las diferencias significativas aparecen exclusivamente entre los grupos E1 y E2, con valores mayores en el último.

Refiriéndonos a los HDC (Fig. 13 c), existen diferencias significativas el día 0, con una ingesta mayor en el grupo E2 frente a control, el día 3, en el que la ingesta de HDC del grupo control es significativamente mayor que en E1, y el día 5, en el que las diferencias alcanzan significación estadística entre los grupos E1 y E2, siendo los valores mayores en E2.

Como se aprecia en la Fig. 13 d, la ingesta de grasa en el día 0 es diferente ( $P < 0.05$ ) entre todos los grupos de nuestro estudio, siendo mayor en E2, intermedia en E1 y menor en el grupo control. Del día 1 al 5, las diferencias significativas se ponen de manifiesto solamente entre el grupo E2 frente los otros dos (mayor en E2).

En cuanto a la ingesta de proteína (Fig. 13 e), a lo largo de la mayor parte del periodo experimental (excepto en el día 3), aparecen diferencias ( $P < 0.05$ ) entre los grupos E2 y control, con menores valores en el último. Comparando el grupo E1 y el control, podemos ver que la ingesta proteica es mayor en el grupo E1 durante los tres primeros días, y si comparamos los grupos E1 y E2 se observan diferencias significativas en el primer y último día, siendo mayor el valor observado en E2.

El patrón de evolución temporal de ingesta de alimento, energía y macronutrientes es similar en los tres grupos, de forma que disminuye la ingesta de forma significativa los días 1 y 2, y posteriormente se mantienen constantes hasta el final del periodo experimental, existiendo un ligero aumento, no significativo, en el día 3.

## 2.1.2. Peso corporal y de órganos

### *Evolución ponderal*

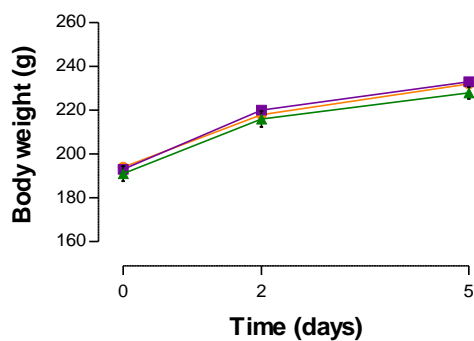


Figure 14. Body weight evolution in rats fed for 6 days with standard diet (C) or diets containing two different functional ingredients (E1 and E2). Values represent mean  $\pm$  SEM ( $n = 8-10$  per group). The age of the rats at the beginning of the experimental period was 6-7 weeks.

El peso de los animales (Fig. 14) aumenta de forma significativa desde el inicio al final de la experiencia, siendo el aumento más pronunciado entre los días 0 y 2.

***Peso corporal y de órganos al sacrificio***

Table 10. Body and organ weight at sacrifice.

	E1			E2			C		
<b>BODY WT (g)</b>	255.50	±	3.85 a	254.44	±	1.37 a	267.89	±	3.94 b
<b>LIVER (g)</b>	7.31	±	0.39	8.23	±	0.37	8.35	±	0.42
<b>COLON (g)</b>	0.98	±	0.07	0.96	±	0.04	0.97	±	0.04
<b>CECUM (g)</b>	0.54	±	0.02 b	0.61	±	0.02 a	0.62	±	0.02 a
<b>SPLEEN (g)</b>	0.55	±	0.03	0.56	±	0.02	0.55	±	0.01
<b>LIVER (g/100g BW)</b>	2.87	±	0.14	3.21	±	0.15	3.19	±	0.17
<b>COLON (g/100g BW)</b>	0.39	±	0.03	0.3	±	0.02	0.37	±	0.02
<b>CECUM (g/100g BW)</b>	0.22	±	0.01	0.24	±	0.01	0.24	±	0.01
<b>SPLEEN (g/100g BW)</b>	0.22	±	0.01	0.22	±	0.01	0.20	±	0.01

Rats were previously fed for 6 days with standard diet (C) or diets containing two different functional ingredients (E1 and E2). Results are expressed as absolute weight (g) and relative organ weight (g per 100 g of body weight). Values represent mean  $\pm$  SEM (n = 8-10 per group). Different letters in the same row indicate significant difference ( $P < 0.05$ ) between the groups.

El peso de los animales al sacrificio es significativamente mayor en el grupo control al compararlo con los otros dos grupos.

Además el peso total del ciego es significativamente menor en el grupo control respecto a los otros dos grupos. No existen diferencias significativas en el peso de los demás órganos recogidos.

## 2.1.3. Coeficientes de utilización digestiva y nutricional de proteína y grasa

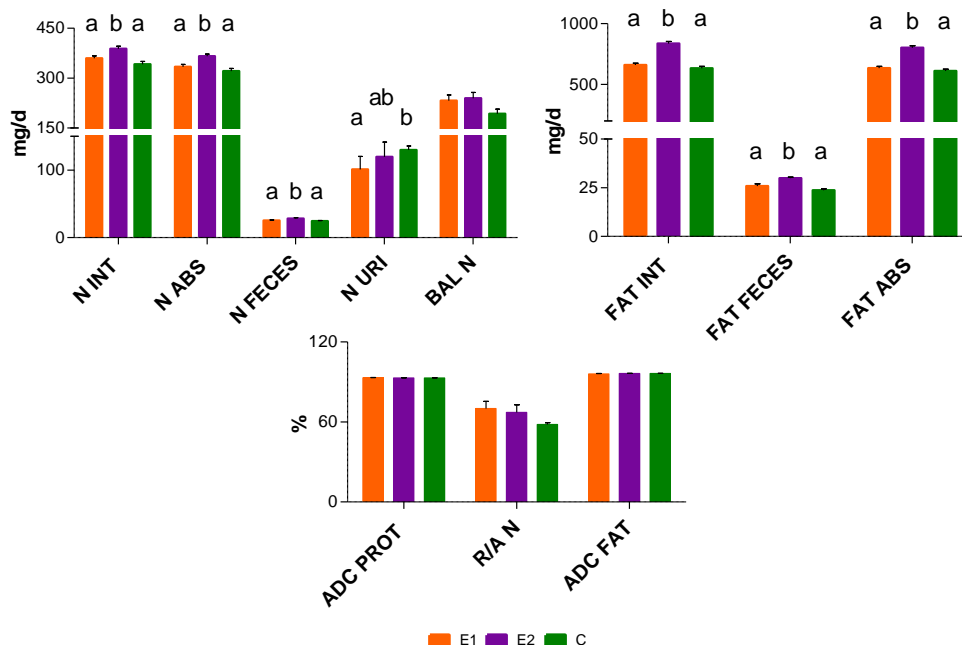


Figure 15. Coefficients of digestive and nutritive utilization of protein and fat in rats fed for 6 days with standard diet (C) or diets containing two different functional ingredients (E1 and E2). Values represent mean  $\pm$  SEM ( $n = 8-10$  per group). For a given parameter, different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ) between the groups. Abbreviations: N INT (nitrogen intake), N ABS (nitrogen absorbed), N FECES (fecal nitrogen), N URI (urinary nitrogen), BAL N (nitrogen retention), FAT INT (fat intake), FAT FECES (fecal fat), FAT ABS (fat absorbed), ADC PROT (apparent digestibility coefficient of protein), R/A N (percent nitrogen retention/nitrogen absorption), ADC FAT (apparent digestibility coefficient of fat).

Como puede apreciarse en la Fig. 15, la cantidad nitrógeno ingerido, absorbido y excretado en heces es significativamente mayor en el grupo E2 respecto a los otros dos grupos. El nitrógeno urinario en el grupo control es significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) al compararlo con el grupo E1, mostrando el grupo E2 valores intermedios. Por otro lado, los índices de utilización digestiva (CDA, balance y R/A) no presentan diferencias significativas al comparar los tres grupos.



La ingesta, absorción y excreción de grasa del grupo E2 es significativamente superior a la encontrada en los grupos control y E1, siendo similar en estos dos últimos. La digestibilidad de la grasa no presenta diferencias significativas entre los grupos.

**2.1.4. Concentración plasmática de hormonas gastrointestinales**

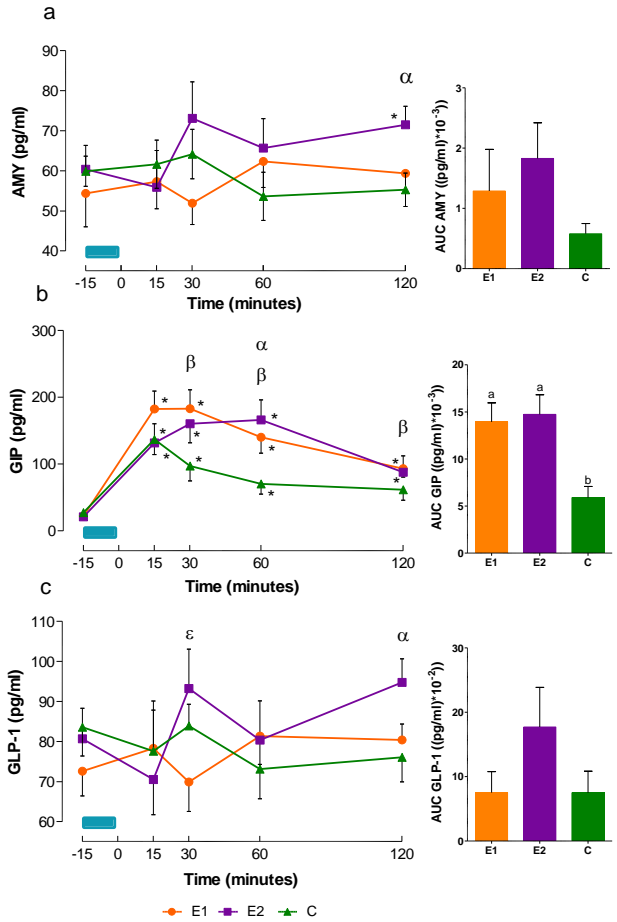


Figure 16. Plasma concentrations of AMY (a), GIP (b) and GLP-1 (c) in rats previously fed for 6 days with standard diet (C) or diets containing two different functional ingredients (E1 and E2). Results are expressed as time-course changes (left) and as area under the curve (AUC, right). Values represent mean ± SEM (n = 8-10). Time-course charts: the blue bar indicates the duration of the meal; for a given group, the asterisk (\*) indicates significant difference (P<0.05) compared to basal (-15); for a given time point, statistical significance (P<0.05) between the groups is indicated as follows: α: C vs E2, β: C vs E1, and ε: E1 vs E2. Bar charts: different letters indicate significant difference (P<0.05) between the groups.

Las concentraciones plasmáticas basales de AMY son:  $54.4 \pm 8.36$  pg/ml en el grupo E1,  $60.39 \pm 5.97$  pg/ml en el grupo E2 y  $59.91 \pm 3.75$  pg/ml en el grupo control (C), no existiendo diferencias significativas entre estos valores. Tras la ingesta de alimento (ver Fig. 16 a), únicamente se observa una elevación significativa de la concentración con respecto al basal en el grupo E2 a los 120 minutos. En este último tiempo la concentración plasmática de AMY en el grupo E2 alcanza valores significativamente superiores ( $P < 0.05$ ) que las del grupo C. No existen diferencias significativas en el AUC entre ninguno de los grupos.

En el caso del GIP (Fig. 16 b), las concentraciones en ayunas son muy similares en todos los grupos ( $22.3 \pm 3.76$  pg/ml en E1,  $21.1 \pm 2.8$  pg/ml en E2 y  $27.4 \pm 5.56$  pg/ml en C). También en todos ellos se produce una respuesta significativa a la ingestión de alimento, manteniéndose los valores elevados con respecto al basal ( $P < 0,05$ ) durante todo el periodo postprandial (con excepción del grupo C, en el que la concentración de GIP a los 120 min. vuelve a valores similares a los de ayunas). La concentración postprandial de GIP tiende a ser menor en el grupo C que en los otros dos grupos, alcanzándose significación estadística a los 30, 60 y 120 min. con respecto al grupo E1, y únicamente a los 60 min. con respecto al grupo E2. La respuesta integrada, expresada por el AUC, es similar en E1 y E2, y a su vez significativamente mayor a la del grupo control.

Las concentraciones basales de GLP-1 son:  $72.6 \pm 6.15$  pg/ml,  $80.7 \pm 7.62$  pg/ml y  $83.6 \pm 7.19$  pg/ml en los grupos E1, E2 y control, respectivamente, sin observarse diferencias significativas en ningún caso (Fig. 16 c). No hay una respuesta significativa a la comida en ninguno de los grupos. No obstante, pequeñas variaciones a lo largo del periodo digestivo hacen que existan diferencias significativas puntuales en el minuto 30 entre los grupos E1 y E2, y en el minuto 120 entre los grupos E2 y C. No aparecen diferencias entre los grupos en lo que respecta al AUC.

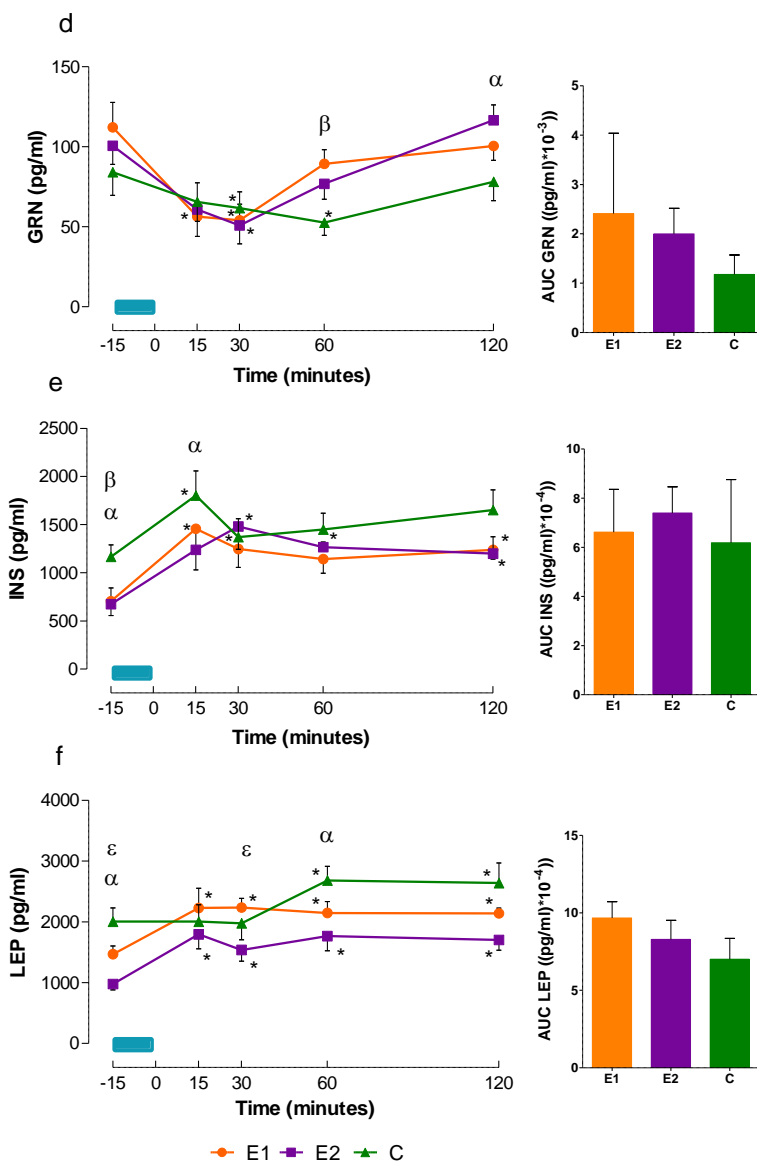


Figure 17. Plasma concentrations of GRN (d), INS (e) and LEP (f) in rats previously fed for 6 days with standard diet (C) or diets containing two different functional ingredients (E1 and E2). Results are expressed as time-course changes (left) and as area under the curve (AUC, right). Values represent mean  $\pm$  SEM (n = 8-10). Time-course charts: the blue bar indicates the duration of the meal; for a given group, the asterisk (\*) indicates significant difference (P<0.05) compared to basal (-15); for a given time point, statistical significance (P<0.05) between the groups is indicated as follows:  $\alpha$ : C vs E2,  $\beta$ : C vs E1, and  $\epsilon$ : E1 vs E2.

En condiciones basales, las concentraciones de GRN en plasma no presentan diferencias significativas entre los grupos, siendo los valores:  $112.04 \pm 15.75$  pg/ml en el grupo E1,  $100.55 \pm 11.53$  pg/ml en el grupo E2 y  $84.02 \pm 14.31$  pg/ml en el grupo C. Tras la ingesta de alimento, dichas concentraciones disminuyen significativamente ( $P < 0.05$ ) en el grupo E1 a los 15 minutos y en los otros dos (E2 y C) en el minuto 30, momento en el que se alcanzan los valores mínimos para todos ellos (Fig. 17 d). Al final del periodo postprandial se vuelven a recuperar los valores basales en todos los grupos. No se aprecian diferencias significativas entre grupos en relación al AUC.

La concentración de INS en ayunas es de  $703 \pm 138$  pg/ml en el grupo E1,  $672 \pm 117$  pg/ml en el grupo E2, y  $1165 \pm 124$  pg/ml en el grupo C, siendo este último valor (como se observa en la Fig. 17 e) significativamente mayor que el obtenido en los grupos E1 y E2. Existe una clara respuesta a la ingestión de las dietas experimentales, de forma que las concentraciones plasmáticas de la hormona se muestran significativamente mayores que las de ayunas en los minutos 15 y 30 en el grupo C, en los minutos 15 y 120 en el grupo E1 y en los minutos 30, 60 y 120 en el caso del E2. La concentración de INS en el grupo control vuelve a valores estadísticamente similares a los basales al final del periodo postprandial, no así en el caso de los grupos E1 y E2, en los que se mantienen elevadas ( $P < 0.05$ ). Las AUC no muestran diferencias entre los grupos de estudio.

En condiciones basales (tiempo -15 min.), la concentración circulante de LEP en el grupo E2 ( $977 \pm 97$  pg/ml) es significativamente menor que la de E1 ( $1465 \pm 136$  pg/ml) y control ( $2002 \pm 225$  pg/ml). En los grupos E1 y E2, la ingestión de alimento se asocia a aumentos significativos de la LEP plasmática (en comparación con el basal) que se ponen de manifiesto ya a los 15 min., manteniéndose los valores elevados durante todo el periodo postprandial (Fig. 17 f). Por el contrario, en el grupo control solo hay diferencias significativas respecto al basal en los minutos 60 y 120. La comparación entre grupos a los distintos tiempos del periodo postprandial revela la existencia de diferencias significativas entre los grupos E1 y E2 en el minuto 30, y entre los grupos E2 y C en el minuto 60. La secreción total de LEP en respuesta al alimento, representada por el área bajo la curva, es similar en todos los grupos.

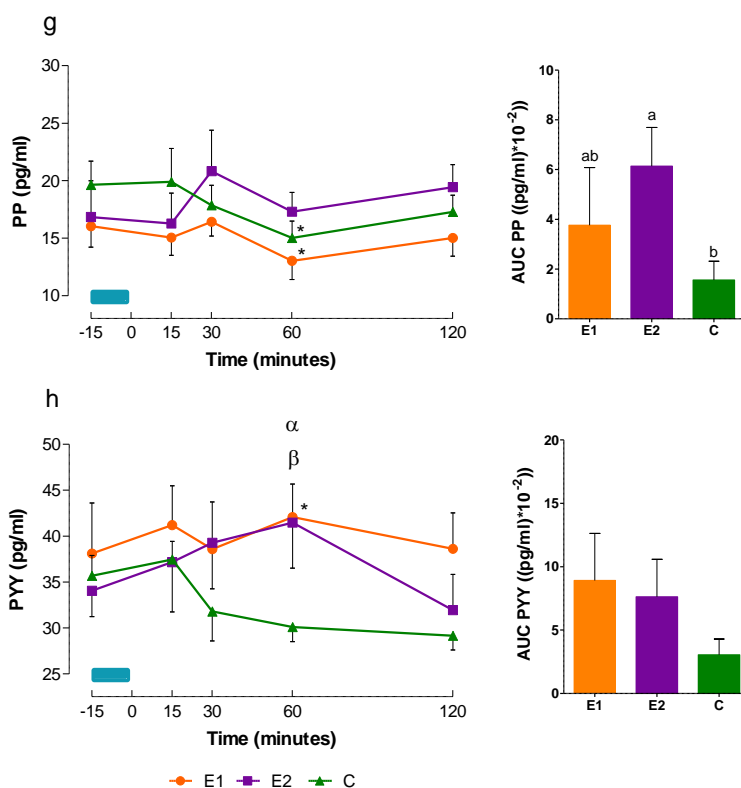


Figure 18. Plasma concentrations of PP (g) and PYY (h) in rats previously fed for 6 days with standard diet (C) or diets containing two different functional ingredients (E1 and E2). Results are expressed as time-course changes (left) and as area under the curve (AUC, right). Values represent mean  $\pm$  SEM ( $n = 8-10$ ). Time-course charts: the blue bar indicates the duration of the meal; for a given group, the asterisk (\*) indicates significant difference ( $P < 0.05$ ) compared to basal (-15); for a given time point, statistical significance ( $P < 0.05$ ) between the groups is indicated as follows:  $\alpha$ : C vs E2,  $\beta$ : C vs E1, and  $\epsilon$ : E1 vs E2. Bar charts: different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ) between the groups.

En condiciones de ayunas, las concentraciones de PP en plasma son semejantes en los tres grupos de animales, con valores de  $16.05 \pm 1.83$  pg/ml en el grupo E1,  $16.84 \pm 3.15$  pg/ml en el grupo E2, y  $19.64 \pm 2.07$  pg/ml en el grupo control. Como puede verse en la Fig. 18 g, no existe en ningún caso una respuesta clara a la ingestión de alimento, siendo los valores de PP plasmático al final del periodo postprandiales similar a los

basales en todos los grupos. Tampoco se aprecian en los distintos tiempos del periodo digestivo diferencias significativas en las concentraciones de la hormona entre los diferentes grupos. A pesar de ello, el AUC en el grupo E2 es mayor ( $P < 0,05$ ) que en el grupo C, mostrando el grupo E1 valores intermedios.

No existen diferencias significativas en la concentración basal del PYY al comparar los tres grupos estudiados (E1:  $38.10 \pm 5.51$  pg/ml; E2:  $34.04 \pm 2.80$  pg/ml; C:  $35.68 \pm 2.21$  pg/ml), ni existe una respuesta marcada a la comida en ninguno de ellos (Fig. 18 h). No obstante, pequeños cambios en la evolución temporal de las concentraciones plasmáticas de este péptido en los distintos grupos, hacen que en el minuto 60 los valores del grupo C sean significativamente inferiores a los de los grupos E1 y E2. No hay diferencias en ningún caso para el AUC, aunque tiende a ser menor (sin alcanzarse significación estadística) en el grupo control.

## 2.2. LARGO PLAZO

### 2.2.1. Ingesta

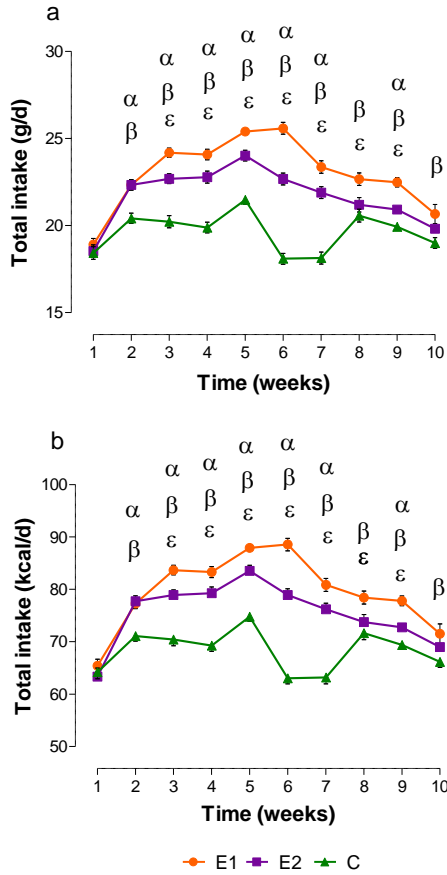


Figure 19. Weekly intake of food (a) and energy (b) in rats fed for 10 weeks with standard diet (C) or diets containing two different functional ingredients (E1 and E2). Values represent mean  $\pm$  SEM (n = 8-10). For a given time point, statistical significance (P<0.05) between the groups is indicated as follows:  $\alpha$ : C vs E2,  $\beta$ : C vs E1, and  $\epsilon$ : E1 vs E2. The age of the rats at the beginning of the experimental period was 6-7 weeks.

Como muestra la Fig. 19, el grupo E1 ingiere una cantidad mayor de alimento y energía que el grupo E2, y ambos a su vez mayor que el grupo control, de forma sostenida desde la semana 3 a la 7. En la primera semana del periodo experimental no hay diferencias significativas entre los grupos, y en las semanas 2, 8, 9 y 10 sigue manteniéndose la diferencia entre los grupos E1 y C.

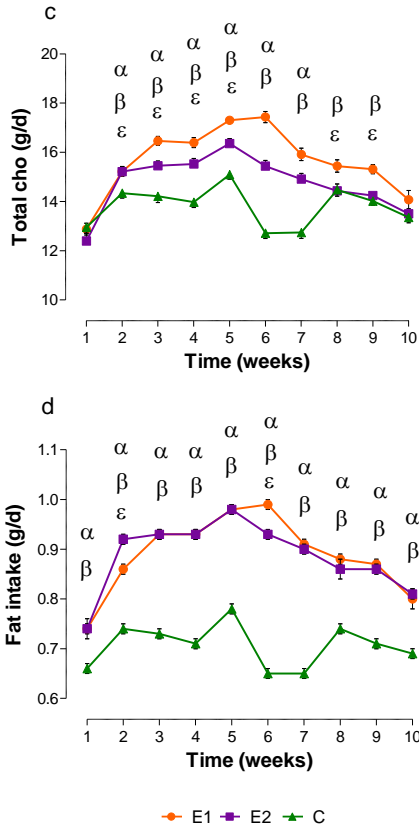


Figure 20. Weekly intake of total carbohydrates (c) and fat (d) in rats fed for 10 weeks with standard diet (C) or diets containing two different functional ingredients (E1 and E2). Values represent mean  $\pm$  SEM (n = 8-10). For a given time point, statistical significance ( $P < 0.05$ ) between the groups is indicated as follows:  $\alpha$ : C vs E2,  $\beta$ : C vs E1, and  $\epsilon$ : E1 vs E2. Abbreviations: CHO (carbohydrates). The age of the rats at the beginning of the experimental period was 6-7 weeks.



La ingesta de HDC (Fig. 20 c) es significativamente mayor en el grupo E1 comparado con el grupo E2 y a su vez ambas superiores a los valores observados en el grupo control desde la semana 2 a la 5. En la semana 6 y 7 se observan diferencias significativas entre los dos grupos experimentales (E1 y E2) y el control, así como en la semana 8 y 9 las diferencias significativas se presentan entre E1 y los otros dos grupos.

La ingesta de grasa en los dos grupos experimentales es significativamente superior a la del grupo control en todas las semanas del periodo experimental (Fig. 20 d). Existen únicamente diferencias puntuales significativas entre los grupos experimentales E1 y E2 en las semanas 2 y 6.

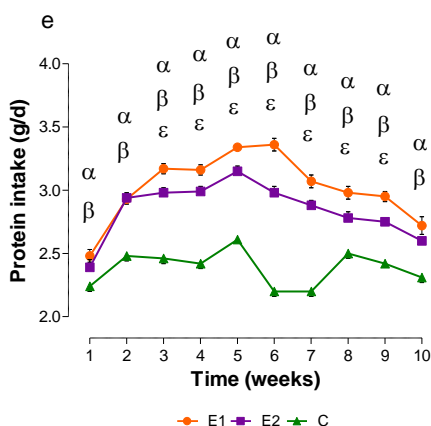


Figure 21. Weekly intake of protein (e) in rats fed for 10 weeks with standard diet (C) or diets containing two different functional ingredients (E1 and E2). Values represent mean  $\pm$  SEM (n = 8-10). For a given time point, statistical significance ( $P < 0.05$ ) between the groups is indicated as follows:  $\alpha$ : C vs E2,  $\beta$ : C vs E1, and  $\epsilon$ : E1 vs E2. The age of the rats at the beginning of the experimental period was 6-7 weeks.

La ingesta de proteína es mayor ( $P < 0.05$ ) en el grupo E1 respecto al grupo E2 y a su vez ambos superiores respecto al control desde la semana 3 a la 9, igualándose los valores de los grupos experimentales (E1 y E2) a la vez que se mantienen las diferencias con el grupo control en las semanas 1 y 10 (Fig. 21).

Desde el inicio del periodo experimental y en todos los parámetros de ingesta (Fig. 19-21), el grupo control experimenta una ligera subida hasta la mitad del mismo para luego caer, recuperarse y volver a descender las últimas dos semanas aunque de forma más moderada. Los patrones de ingesta en los grupos E1 y E2 son similares, con un ascenso continuo hasta la semana 6, en que se inicia un descenso progresivo hasta que en la última semana los valores se acercan ligeramente a los de partida.

### **2.2.2. Peso corporal**

#### ***Evolución ponderal***

El BW inicial de los animales es de  $194 \pm 0.7$  g en el grupo E1,  $193 \pm 0.7$  g en el grupo E2 y  $191 \pm 3.5$  g en el grupo control, siendo la evolución ponderal ascendente y pronunciada hasta la semana 4, a partir de la cual dicho incremento es más amortiguado (Fig. 22).

Los animales del grupo E1 muestran, a partir de la semana 4, un mayor BW que los de los otros grupos. En comparación con el grupo C, las diferencias alcanzan significación estadística en las semanas 4 a 7, y además en la semana 9. Por su parte, en relación al grupo E2, las diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) se observan desde la semana 4 hasta la 10.

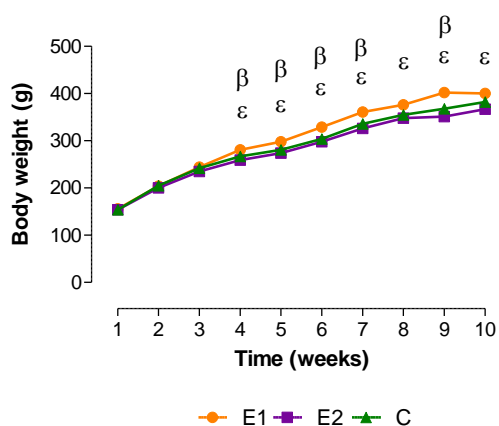


Figure 22. Body weight evolution in rats fed for 10 weeks with standard diet (C) or diets containing two different functional ingredients (E1 and E2). Values represent mean  $\pm$  SEM (n = 8-10 per group). For a given time point, statistical significance ( $P < 0.05$ ) between the groups is indicated as follows:  $\alpha$ : C vs E2,  $\beta$ : C vs E1, and  $\epsilon$ : E1 vs E2. The age of the rats at the beginning of the experimental period was 6-7 weeks.

***Peso corporal y de órganos al sacrificio***

Table 11. Body and organ weight at sacrifice.

	<b>E1</b>			<b>E2</b>			<b>C</b>					
<b>BODY WT</b> (g)	402.89	±	6.58	a	366.56	±	8.88	b	383.44	±	8.80	ab
<b>LIVER</b> (g)	7.95	±	0.20		7.59	±	0.29		7.45	±	0.26	
<b>COLON</b> (g)	0.91	±	0.03	a	1.14	±	0.09	ab	1.21	±	0.03	b
<b>CECUM</b> (g)	0.61	±	0.02		0.57	±	0.03		0.57	±	0.02	
<b>SPLEEN</b> (g)	0.67	±	0.01		0.62	±	0.04		0.67	±	0.04	
<b>BRAIN</b> (g)	2.02	±	0.02	a	1.90	±	0.03	b	1.93	±	0.02	b
<b>LIVER</b> (g/100 g BW)	2.04	±	0.04		2.02	±	0.03		1.94	±	0.05	
<b>COLON</b> (g/100 g BW)	0.24	±	0.01	a	0.32	±	0.02	b	0.31	±	0.01	b
<b>CECUM</b> (g/100 g BW)	0.15	±	0.01		0.16	±	0.01		0.15	±	0.01	
<b>SPLEEN</b> (g/100 g BW)	0.17	±	0.01		0.16	±	0.01		0.18	±	0.01	
<b>BRAIN</b> (g/100 g BW)	0.50	±	0.01		0.51	±	0.01		0.49	±	0.01	

Rats were previously fed for 10 weeks with standard diet (C) or diets containing two different functional ingredients (E1 and E2). Results are expressed as absolute weight (g) and relative organ weight (g per 100 g of body weight). Values represent mean ± SEM (n = 8-10 per group). Different letters in the same row indicate significant difference (P<0.05) between the groups.

Tal y como se puede apreciar en la Tabla 11, el peso del colon, expresado como valor absoluto, es mayor ( $P < 0.05$ ) en el grupo control que en el E1, mostrando el grupo E2 valores intermedios. Tras expresarlo como peso relativo al BW se igualan los valores de los grupos E2 y control, haciéndose significativamente mayores respecto al grupo E1.

El peso del encéfalo, también expresado en términos absolutos, es significativamente mayor en el grupo E1 que en los otros dos, desapareciendo estas diferencias al expresarlo en términos relativos al BW.

### 2.2.3. Coeficientes de utilización digestiva y nutricional de proteína y grasa

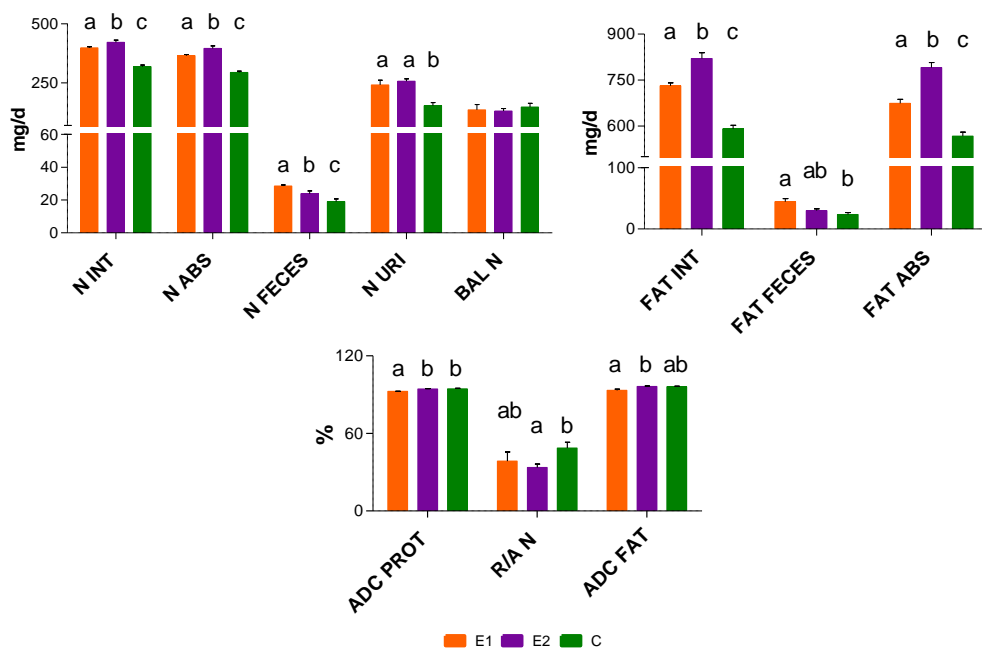


Figure 23. Coefficients of digestive and nutritive utilization of protein and fat in rats fed for 10 weeks with standard diet (C) or diets containing two different functional ingredients (E1 and E2). Values represent mean  $\pm$  SEM ( $n = 8-10$  per group). For a given parameter, different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ) between the groups. Abbreviations: N INT (nitrogen intake), N ABS (nitrogen absorbed), N FECES (fecal nitrogen), N URI (urinary nitrogen), BAL N (nitrogen retention), FAT INT (fat intake), FAT FECES (fecal fat), FAT ABS (fat absorbed), ADC PROT (apparent digestibility coefficient of protein), R/A N (percent nitrogen retention/nitrogen absorption), ADC FAT (apparent digestibility coefficient of fat).

Los valores de ingesta, absorción y excreción fecal de nitrógeno (Fig. 23) difieren de forma significativa entre los tres grupos, siendo superiores en el grupo E2, intermedios en el grupo E1 e inferiores en el grupo C. El contenido de nitrógeno urinario es similar en los dos grupos experimentales (E1 y E2) y a su vez significativamente superiores al valor obtenido en el grupo control.

La digestibilidad de la proteína es inferior en el grupo E1 de forma significativa respecto a los otros dos grupos. El balance de nitrógeno no varía en ningún caso y el nitrógeno R/A en el grupo control es significativamente superior al del grupo E2, situándose el grupo E1 en valores similares a ambos.

Los valores de ingesta y absorción de grasa difieren de forma marcada y significativa de acuerdo con este orden: E2>E1>C. La grasa en heces es mayor ( $P<0.05$ ) en el grupo E1 respecto al control e intermedia en el E2.

La digestibilidad de grasa (Fig. 23) es superior en el grupo E2 de forma significativa al grupo E1, situándose entre ambos los valores del grupo C.

2.2.4. Concentración plasmática de hormonas gastrointestinales

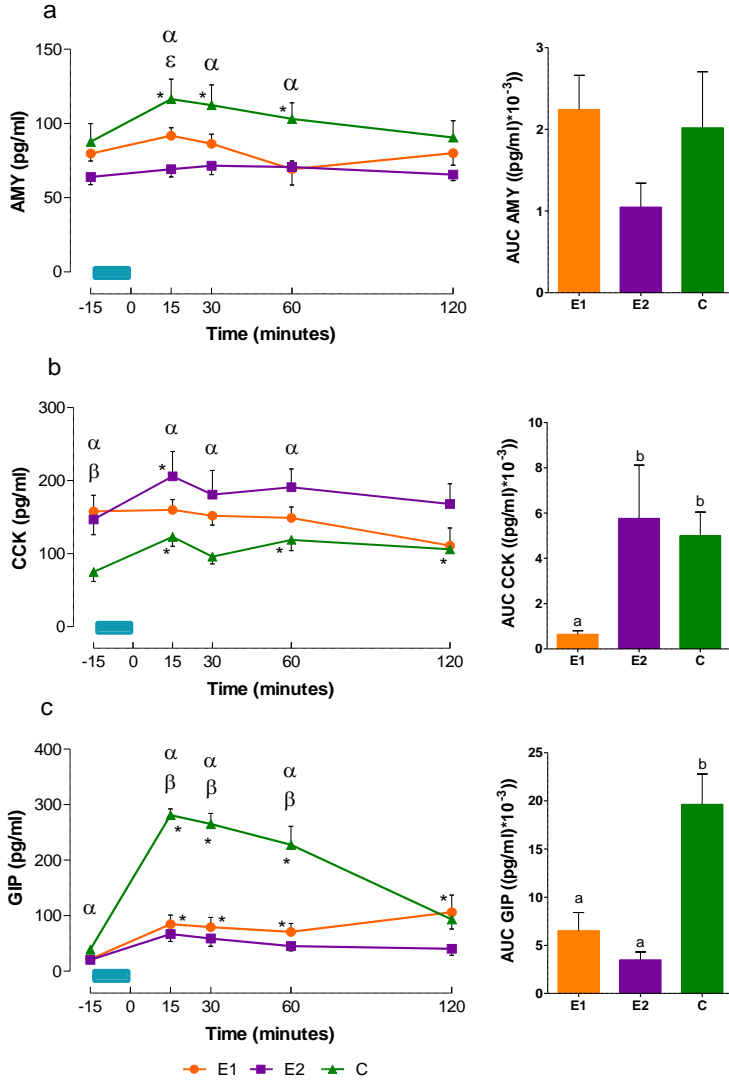


Figure 24. Plasma concentrations of AMY (a), CCK (b) and GIP (c) in rats previously fed for 10 weeks with standard diet (C) or diets containing two different functional ingredients (E1 and E2). Results are expressed as time-course changes (left) and as area under the curve (AUC, right). Values represent mean  $\pm$  SEM (n = 8-10). Time-course charts: the blue bar indicates the duration of the meal; for a given group, the asterisk (\*) indicates significant difference (P<0.05) compared to basal (-15); for a given time point, statistical significance (P<0.05) between the groups is indicated as follows:  $\alpha$ : C vs E2,  $\beta$ : C vs E1, and  $\epsilon$ : E1 vs E2. Bar charts: different letters indicate significant difference (P<0.05) between the groups.

Las Figuras 24-26 muestran los cambios en la concentración de péptidos gastrointestinales y otras hormonas en ayunas y en respuesta a la comida en ratas previamente alimentadas durante 10 semanas con las dietas control, E1 y E2. Las concentraciones plasmáticas basales de AMY son:  $79.7 \pm 5$  en el grupo E1,  $63.9 \pm 5.1$  en el grupo E2 y  $87.7 \pm 12.2$  en el grupo C, no existiendo en este momento ( $t = -15$  min.) diferencias significativas entre los diferentes grupos. Como se ve en la Fig. 24 a, sólo se observa una respuesta significativa a la comida en el grupo control. Al final del experimento, la concentración de AMY en todos los grupos vuelve a valores similares a los de ayunas. Durante el periodo postprandial, las mayores concentraciones de AMY se dan en el grupo C, alcanzándose significación estadística en comparación con el grupo E2 a los tiempos 15, 30 y 60 min. En el tiempo 15 min. también los valores de E1 son mayores ( $P < 0.05$ ) que los de E2. Respecto al AUC, no existen diferencias significativas entre grupos.

En lo que respecta la CCK (Fig. 24 b), la concentración plasmática en condiciones basales es significativamente menor en el grupo control ( $75 \pm 13$  pg/ml) en relación a los grupos experimentales ( $158 \pm 22$  pg/ml en el grupo E1 y  $147 \pm 21$  pg/ml en el grupo E2). Se aprecia una respuesta significativa a la ingestión de alimento tanto en el grupo control como en el E2, aunque en el primer caso (grupo C) los valores se mantienen significativamente elevados frente al valor de ayunas hasta el final del periodo postprandial, mientras que en el grupo E2 el aumento es transitorio, solo significativo con respecto al basal en el tiempo 15 min, y volviendo a continuación a valores cercanos a los basales. Existen diferencias significativas entre el grupo E2 y control (con mayores valores en el primero) en los minutos 15, 30 y 60 del periodo postprandial. La secreción total de CCK en respuesta al alimento, expresada como AUC, es significativamente mayor en los grupos control y E2 que en el grupo E1.

La concentración basal de GIP es superior ( $P < 0.05$ ) en el grupo control ( $39 \pm 5.1$  pg/ml) que en el grupo E2 ( $20.4 \pm 2.8$  pg/ml), mostrando valores intermedios en el grupo E1 ( $21.3 \pm 3.1$  pg/ml). La ingestión de alimento produce un aumento significativo en los grupos control y E1, alcanzándose en el primero concentraciones plasmáticas más de tres veces superiores respecto al basal (Fig. 24 c). El rápido y pronunciado aumento postprandial en este grupo hace, además, que se alcancen valores de GIP en plasma



muy superiores a los de los grupos experimentales E1 y E2, aunque al final del experimento se retorna a valores próximos a los basales, lo que sin embargo no ocurre en el grupo E1, en el que la concentración de GIP se mantiene todavía a los 120 min. significativamente elevada en comparación con el valor basal. La secreción total de GIP (AUC) en el grupo control es marcada y significativamente mayor que la de los grupos experimentales (E1 y E2), y semejante en estos dos últimos.

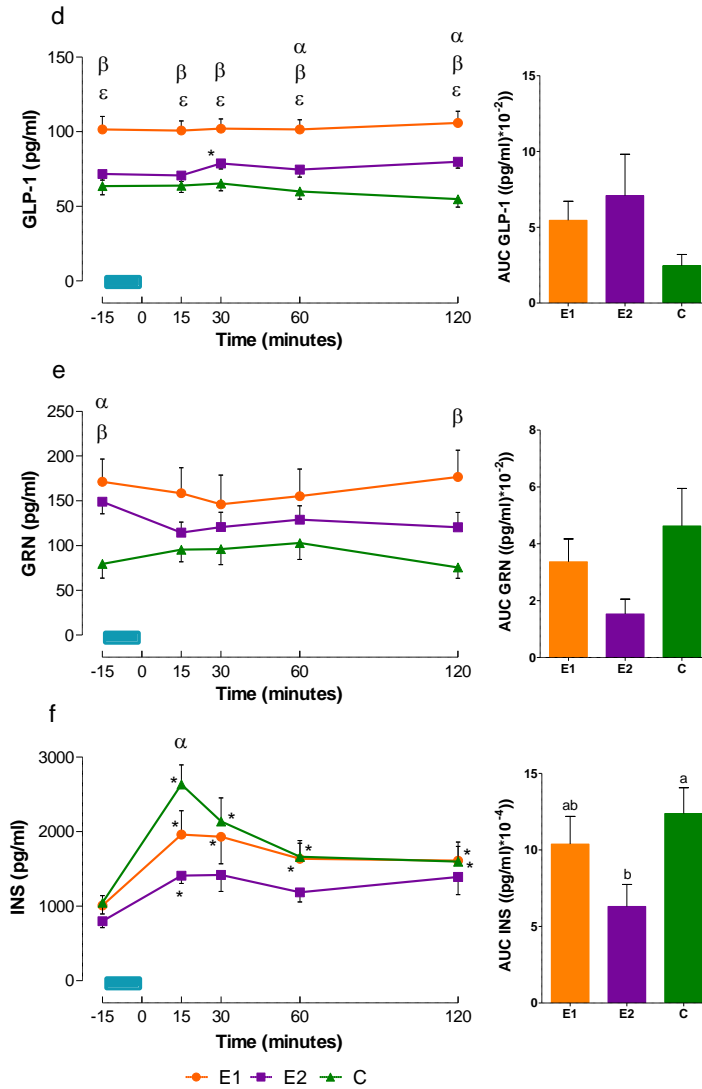


Figure 25. Plasma concentrations of GLP-1 (d), GRN (e) and INS (f) in rats previously fed for 10 weeks with standard diet (C) or diets containing two different functional ingredients (E1 and E2). Results are expressed as time-course changes (left) and as area under the curve (AUC, right) . Values represent mean  $\pm$  SEM (n = 8-10). Time-course charts: the blue bar indicates the duration of the meal; for a given group, the asterisk (\*) indicates significant difference (P<0.05) compared to basal (-15); for a given time point, statistical significance (P<0.05) between the groups is indicated as follows:  $\alpha$ : C vs E2,  $\beta$ : C vs E1, and  $\epsilon$ : E1 vs E2. Bar charts: different letters indicate significant difference (P<0.05) between the groups.

En ayunas, la concentración de GLP-1 en plasma es muy superior ( $P < 0.05$ ) en el grupo E1 ( $101.6 \pm 8.6$  pg/ml) respecto a los otros dos grupos ( $71.7 \pm 4.1$  pg/ml en E2 y  $63.6 \pm 5.9$  pg/ml en C). No se observa una clara respuesta a la comida en ninguno de los grupos de estudio y prácticamente se mantienen los valores de concentración constantes hasta el final del periodo postprandial (Fig. 25 d). La concentración de GLP-1 en el grupo E1 se mantiene en valores significativamente mayores que en los otros dos grupos a lo largo del experimento. Además, a partir del 60 min. y hasta el final (120 min.), también la concentración de GLP-1 en el grupo E2 alcanza valores significativamente mayores que los del grupo control. No se aprecian diferencias significativas en el área bajo la curva en ningún caso.

Como puede advertirse en la Fig 25 e, las concentraciones basales de GRN son significativamente superiores en los grupos E1 ( $171.3 \pm 25.3$  pg/ml) y E2 ( $148.9 \pm 13.3$  pg/ml) respecto al control ( $79.5 \pm 16$  pg/ml). La ingestión de las correspondientes dietas no causa cambios significativos en la GRN plasmática en ningún grupo, siendo en todos ellos las concentraciones finales (120 min.) son similares a las basales. La secreción total, estimada mediante el cálculo del AUC, es comparable en los tres grupos.

Las concentraciones basales de INS son semejantes en todos los grupos ( $1008 \pm 131$  pg/ml (E1),  $798 \pm 88$  pg/ml (E2) y  $1047 \pm 152$  pg/ml (C)). Tras la ingestión de alimento, en todos los grupos se producen ya a los 15 min. aumentos significativos en la concentración de INS en plasma (Fig. 25 f). Sin embargo, en los grupos control y E1 los valores se mantienen elevados ( $P < 0.05$ ) con respecto a los basales hasta el final del periodo postprandial, en tanto que en el grupo E2, aunque tienden a mantenerse elevados, se pierde la significación estadística a partir del min. 30. El gráfico de AUC para el GLP-1 muestra valores mayores ( $P < 0.05$ ) en el grupo control respecto al grupo E2, situándose entre ellos los del grupo E1.

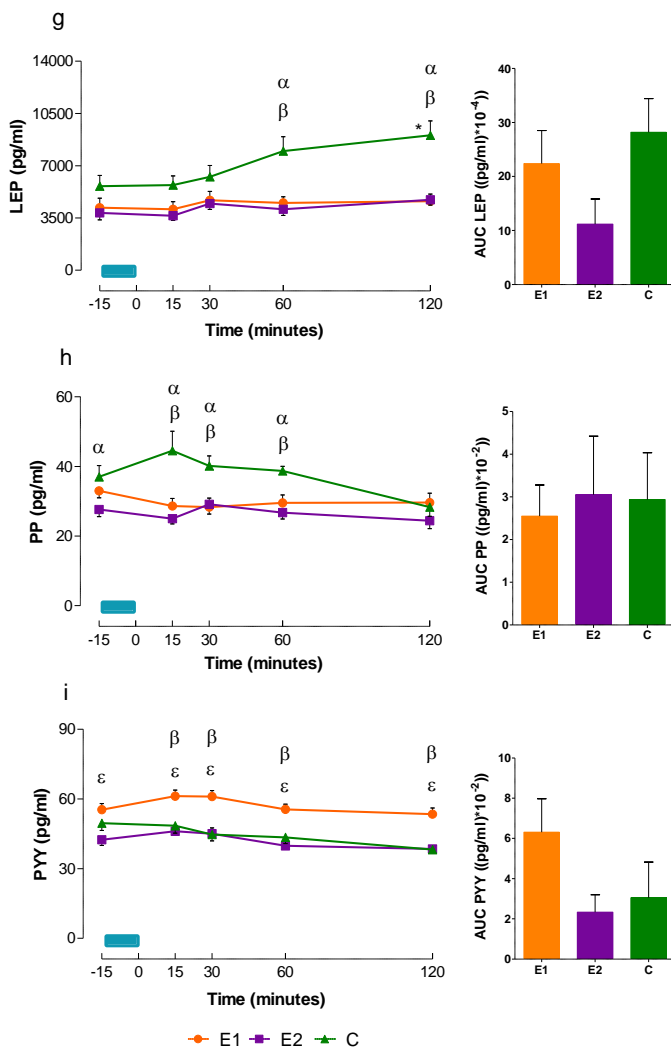


Figure 26. Plasma concentrations of LEP (g), PP (h) and PYY (i) in rats previously fed for 10 weeks with standard diet (C) or diets containing two different functional ingredients (E1 and E2). Results are expressed as time-course changes (left) and as area under the curve (AUC, right). Values represent mean  $\pm$  SEM (n = 8-10). Time-course charts: the blue bar indicates the duration of the meal; for a given group, the asterisk (\*) indicates significant difference ( $P < 0.05$ ) compared to basal (-15); for a given time point, statistical significance ( $P < 0.05$ ) between the groups is indicated as follows:  $\alpha$ : C vs E2,  $\beta$ : C vs E1, and  $\epsilon$ : E1 vs E2.

En ayunas, la concentración plasmática de LEP es similar en todos los grupos:  $4186 \pm 641$  pg/ml en el grupo E1,  $3834 \pm 455$  pg/ml en el grupo E2 y  $5635 \pm 714$  pg/ml en el grupo control. No se observan aumentos significativos tras la ingestión de alimento en ninguno de los casos (Fig. 26 g), aunque los valores del grupo control (C) experimentan a partir del min. 30 una tendencia a elevarse de manera progresiva, haciéndose finalmente significativos con respecto al valor basal a los 120 min. Debido a este comportamiento, la comparación de los 3 grupos de estudio a los distintos tiempos pone de manifiesto la existencia de diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre el grupo control (mayores) en relación a los dos grupos experimentales (E1 y E2). Las AUC son, no obstante, similares en los tres grupos.

Las concentraciones circulantes de PP en condiciones basales (ayunas) son de  $27.6 \pm 2$  pg/ml (grupo E2),  $37 \pm 3.2$  pg/ml (grupo control), y  $33 \pm 2$  pg/ml (grupo E1), con significación estadística entre los grupos C y E2 (Fig. 26 h). No hay una clara respuesta postprandial en ningunos de los grupos, a pesar de lo cual los valores de concentración en grupo control son significativamente mayores que los de los grupos E1 y E2 desde el min. 15 hasta el 60. El área bajo la curva (AUC) para el PP es similar en todos los grupos.

En cuanto al péptido tirosina tirosina (PYY), los resultados de nuestro estudio (Fig. 26 i) muestran concentraciones basales del orden de  $55.4 \pm 2.6$  pg/ml en el grupo E1,  $42.5 \pm 2.5$  pg/ml en el grupo E2, y  $49.6 \pm 3.1$  pg/ml en el grupo C, siendo los valores medios de los grupos E1 y E2 significativamente diferentes entre sí. No hay cambios tras la ingestión de alimento en ninguno de los grupos. No obstante, la concentración de PYY en plasma alcanza en el grupo E1 valores superiores ( $P < 0.05$ ) a los observados en los grupos E2 y C a lo largo de todo el periodo postprandial. La secreción total (AUC) no difiere significativamente entre ninguno de los grupos.

### 3. EXPERIMENTO EN RATAS OBESAS

#### 3.1. PERIODO DE INDUCCIÓN DE OBESIDAD POR LA DIETA

##### 3.1.1. Ingesta

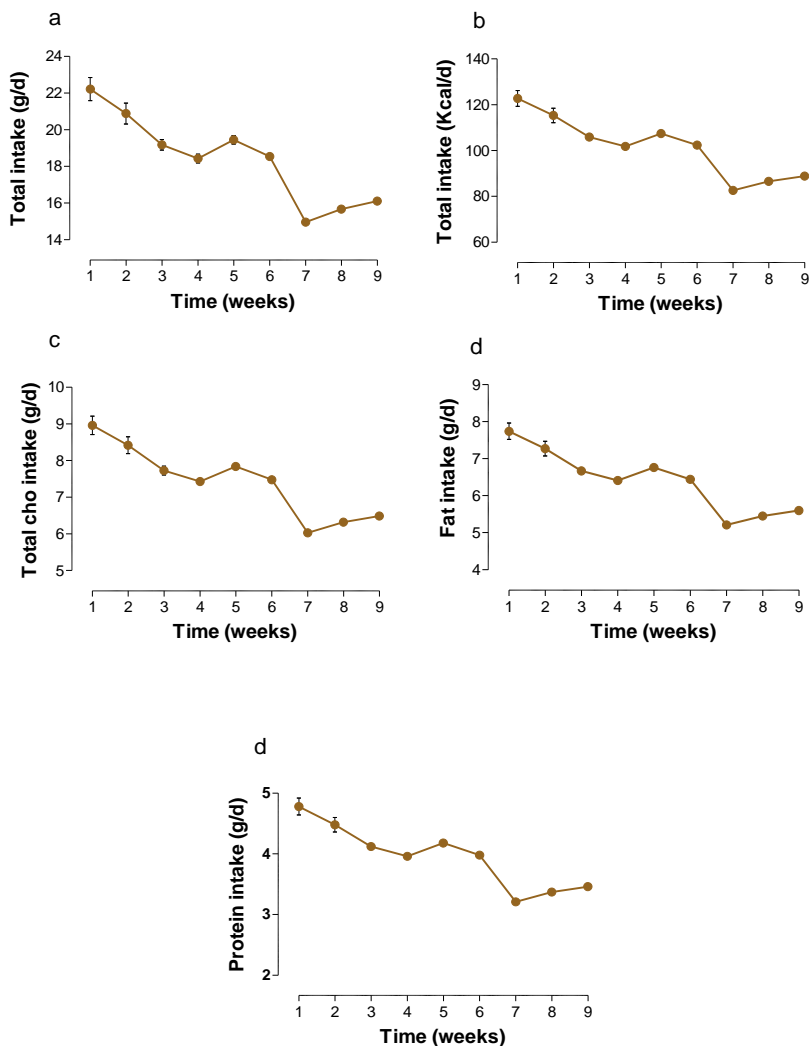


Figure 27. Weekly intake of food (a), energy (b), total carbohydrates (c), fat (d) and protein (e) in rats fed for 9 weeks with the DIO diet (D12492, Research Diets®). Values represent mean  $\pm$  SEM (n = 28-30). Abbreviations: CHO (carbohydrates), DIO (diet-induced obesity). The age of the rats at the beginning of the obesity induction period was 6-7 weeks.

Durante el periodo de inducción de obesidad, la ingesta de alimento y de energía, que parte inicialmente de valores en torno a 22 g/d y 122 kcal/d, respectivamente, experimenta una disminución progresiva hasta llegar a un mínimo en la semana 7 (con valores medios de 14.9 g/d y 82 kcal/d), para volver a continuación a aumentar ligeramente durante las 3 últimas semanas (Fig. 27 a y b).

La ingesta inicial de HDC, grasa y proteína (Fig. 27 c-e) se sitúa en unos valores medios de 8.9, 7.7 y 4.8 g/d, respectivamente, y su evolución temporal presenta un patrón similar al de la ingesta de alimento y de energía (antes descrito), con un mínimo en la semana 7 donde se alcanzan valores medios de 6, 5.5 y 3.2 g/d, respectivamente.

### 3.1.2. Evolución ponderal

El peso de los animales al inicio del periodo de inducción es de  $184 \pm 1.2$  g, aumentando de forma acusada la primera semana para después ir disminuyendo el incremento ponderal de forma paulatina hasta prácticamente estabilizarse en la última semana en un valor de  $441 \pm 10$  g (Fig. 28).

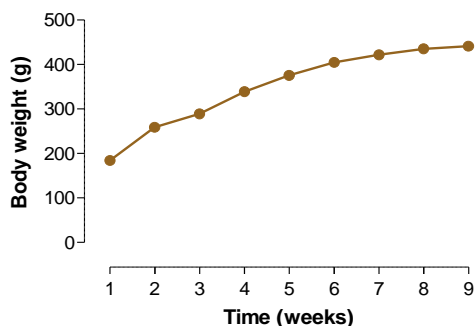


Figure 28. Body weight evolution in rats fed for 9 weeks with the DIO diet (D12492, Research Diets®). Values represent mean  $\pm$  SEM ( $n = 28-30$  per group). Abbreviations: DIO (diet-induced obesity). The age of the rats at the beginning of the obesity induction period was 6-7 weeks.

## 3.2. PERIODO EXPERIMENTAL

### 3.2.1. Ingesta

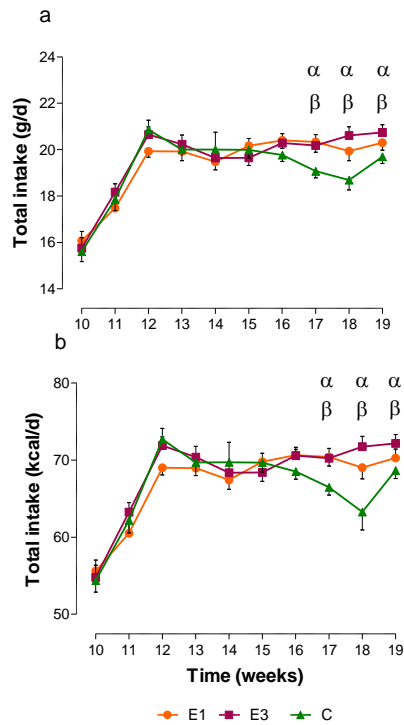


Figure 29. Weekly intake of food (a) and energy (b) in DIO rats subsequently fed for 10 weeks with standard diet (C) or diets containing two different functional ingredients (E1 and E3). Values represent mean  $\pm$  SEM ( $n = 8-10$ ). For a given time point, statistical significance ( $P < 0.05$ ) between the groups is indicated as follows:  $\alpha$ : C vs E3,  $\beta$ : C vs E1, and  $\epsilon$ : E1 vs E3. Abbreviations: DIO (diet-induced obesity). The age of the rats at the beginning of the experimental period was 16 weeks.



Tal y como se aprecia en la Fig. 29, la ingesta de alimento (Fig. 29 a) y de energía (Fig. 29 b) tras la asignación de las ratas obesas a los distintos grupos experimentales (C, E1 y E3) muestra valores semejantes a los alcanzados en la última semana de inducción de obesidad, estando alrededor de 16 g y 55 kcal, respectivamente, y sin existir diferencias significativas entre grupos. En las dos semanas siguientes se observa un aumento muy acusado (25%), para posteriormente estabilizarse en torno a 20 g y 70 kcal hasta el final del periodo experimental. Cabe destacar en el grupo control la existencia de una ligera disminución entre las semanas 17 a 19 para volver de nuevo a alcanzar, en la última semana, los valores mencionados anteriormente. Este comportamiento en el grupo C lleva a que aparezcan, en ambos parámetros, diferencias significativas con respecto a los dos grupos experimentales (E1 y E3) en las semanas 17 a 19.

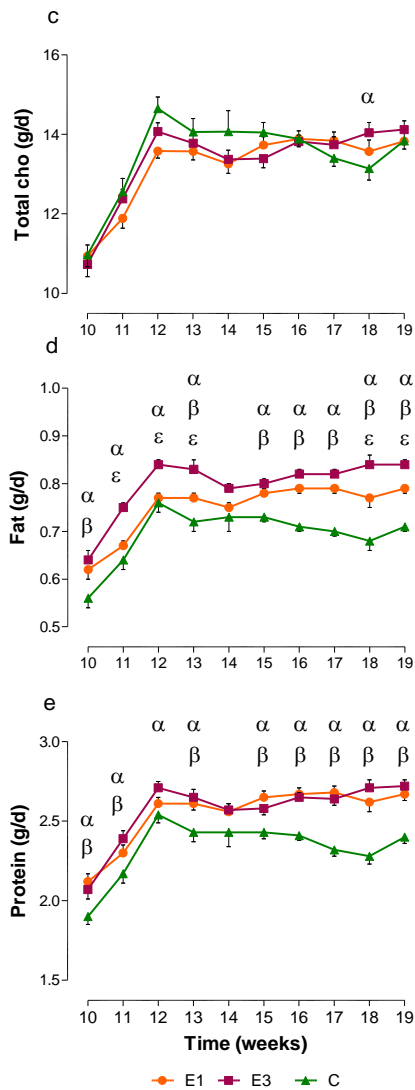


Figure 30. Weekly intake of total carbohydrates (c), fat (d) and protein (e) in DIO rats subsequently fed for 10 weeks with standard diet (C) or diets containing two different functional ingredients (E1 and E3). Values represent mean  $\pm$  SEM (n = 8-10). For a given time point, statistical significance (P<0.05) between the groups is indicated as follows:  $\alpha$ : C vs E3,  $\beta$ : C vs E1, and  $\epsilon$ : E1 vs E3. Abbreviations: DIO (diet-induced obesity). The age of the rats at the beginning of the experimental period was 16 weeks.

La ingesta de HDC, al igual que la de alimento y la de energía, experimenta en los tres grupos experimentales un aumento del 25% durante las dos primeras semanas para posteriormente estabilizarse en valores medios cercanos a 13-14 g hasta la semana final del experimento (Fig. 30 c). En este caso sólo existe una diferencia puntual ( $P<0.05$ ) en la semana 18 entre los grupos E3 y control, con mayores valores en el primero, no existiendo diferencias significativas en ningún otro momento entre los grupos de estudio.

La evolución temporal de la ingesta de grasa (Fig. 30 d) sigue de nuevo la misma pauta que lo descrito para los HDC. En este caso los valores alcanzados por el grupo E3 son significativamente superiores a los del grupo control a lo largo de todo el experimento (excepto en la semana 14) y superiores ( $P<0.05$ ) a los del grupo E1 en las semanas 11-13, 18 y 19. Por su parte, el propio grupo E1 muestra valores de ingesta de grasa mayores ( $P<0.05$ ) que el grupo control (C) en las semanas 10, 13, y 15-19.

Con la ingesta de proteína ocurre lo mismo (Fig. 30 e), aunque en este caso los grupos E1 y E2 muestran valores muy semejantes entre sí, y a su vez mayores ( $P<0.05$ ) que los del grupo control durante la mayor parte del periodo experimental.

### **3.2.2. Peso corporal y de órganos**

#### ***Evolución ponderal***

Al comenzar a alimentar a los animales con las diferentes dietas experimentales se produce un pequeño descenso inicial en el BW (Fig. 31), el cual da paso a un ligero aumento hasta la semana 14 para volver a disminuir en la semana 15. A partir de este momento el BW aumenta hasta que se estabiliza en la última semana. En general, los mayores valores de BW se dan en el grupo E1, aunque la diferencia solo alcanza significación estadística al comparar con el grupo E3 y únicamente durante la primera mitad del periodo experimental (semanas 10-14), ya que posteriormente los valores medios de todos los grupos se hacen comparables..

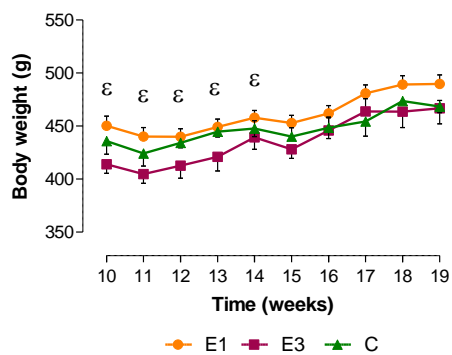


Figure 31. Body weight evolution in DIO rats subsequently fed for 10 weeks with standard diet (C) or diets containing two different functional ingredients (E1 and E3). Values represent mean  $\pm$  SEM (n = 8-10 per group). For a given time point, the symbol  $\epsilon$  indicates a significant difference (P < 0.05) between E1 and E3. Abbreviations: DIO (diet-induced obesity). The age of the rats at the beginning of the experimental period was 16 weeks.

***Peso corporal y de órganos al sacrificio***

Table 12. Body and organ weight at sacrifice.

	<b>E1</b>			<b>E3</b>			<b>C</b>					
<b>BODY WT (g)</b>	477.7	±	8.9	448.8	±	13.9	471.9	±	6.02			
<b>LIVER (g)</b>	10.34	±	0.49	10.24	±	0.37	9.57	±	0.13			
<b>COLON (g)</b>	1.55	±	0.05	a	1.05	±	0.07	b	1.60	±	0.10	a
<b>CECUM (g)</b>	1.09	±	0.10	a	1.16	±	0.11	a	0.71	±	0.03	b
<b>SPLEEN (g)</b>	0.86	±	0.09	a	0.74	±	0.04	ab	0.67	±	0.03	b
<b>KIDNEY (g)</b>	2.30	±	0.06		2.28	±	0.07		2.27	±	0.06	
<b>GASTROCN. (g)</b>	4.67	±	0.16	ab	4.93	±	0.15	a	4.31	±	0.20	b
<b>HEART (g)</b>	1.19	±	0.03	a	1.14	±	0.02	ab	1.09	±	0.02	b
<b>SUB FAT (g)</b>	5.93	±	0.50		6.24	±	0.85		7.34	±	0.69	
<b>EPI FAT (g)</b>	18.54	±	0.98	a	15.30	±	0.92	b	17.22	±	0.79	ab
<b>ABD FAT (g)</b>	17.51	±	1.33		15.48	±	1.38		18.49	±	1.26	
<b>BRAIN (g)</b>	2.08	±	0.04	a	1.96	±	0.03	b	2.02	±	0.03	ab

DIO rats were subsequently fed for 10 weeks with standard diet (C) or diets containing two different functional ingredients (E1 and E3). Results are expressed as absolute weight (g). Values represent mean  $\pm$  SEM (n = 8-10 per group). Different letters in the same row indicate significant difference (P<0.05) between the groups. Abbreviations: DIO (diet-induced obesity), GASTROCN. (gastrocnemius), SUB FAT (subcutaneous fat) fat, EPI FAT (epididymal fat) ABD FAT (abdominal fat).

Table 13. Relative organ weight at sacrifice.

	E1			E3			C		
<b>LIVER</b> (g/100 g BW)	2.22	±	0.06 a	2.18	±	0.06 ab	2.04	±	0.03 b
<b>COLON</b> (g/100 g BW)	0.34	±	0.01 a	0.23	±	0.02 b	0.35	±	0.02 a
<b>CECUM</b> (g/100 g BW)	0.24	±	0.02 a	0.24	±	0.02 a	0.16	±	0.01 b
<b>SPLEEN</b> (g/100 g BW)	0.19	±	0.04	0.16	±	0.01	0.14	±	0.01
<b>KIDNEY</b> (g/100 g BW)	0.49	±	0.01	0.52	±	0.01	0.50	±	0.01
<b>GASTROCN.</b> (g/100 g BW)	1.03	±	0.03 a	1.08	±	0.04 a	0.94	±	0.03 b
<b>HEARTH</b> (g/100 g BW)	0.25	±	0.01	0.24	±	0.01	0.23	±	0.01
<b>SUB FAT</b> (g/100 g BW)	1.29	±	0.09	1.32	±	0.14	1.60	±	0.17
<b>EPI FAT</b> (g/100 g BW)	4.02	±	0.23	3.51	±	0.17	3.71	±	0.14
<b>ABD FAT</b> (g/100 g BW)	4.02	±	0.31	3.40	±	0.25	3.98	±	0.21
<b>BRAIN</b> (g/100 g BW)	0.44	±	0.01	0.43	±	0.02	0.45	±	0.01

DIO rats were subsequently fed for 10 weeks with standard diet (C) or diets containing two different functional ingredients (E1 and E3). Results are expressed as relative organ weight (g per 100 g of body weight). Values represent mean ± SEM (n = 8-10 per group). Different letters in the same row indicate significant difference (P<0.05) between the groups. Abbreviations: DIO (diet-induced obesity), GASTROCN. (gastrocnemius), SUB FAT (subcutaneous fat), EPI FAT (epididymal fat) and ABD FAT (abdominal fat).

El grupo control presenta un peso del ciego, tanto absoluto como relativo, significativamente menor comparado con los grupos experimentales (E1 y E3).

El peso del gastrocnemio en valor absoluto (Tabla 12) es significativamente menor en el grupo control que en el E3, y ambos a su vez iguales al grupo E1. Al expresarlo relativo al BW (Tabla 13), el valor es menor en el grupo control respecto a E1 y E3.

En cuanto a bazo y corazón, el peso absoluto es mayor ( $P < 0.05$ ) en el grupo E1 en comparación con el grupo C, situándose entre ambos el grupo E3. Las diferencias desaparecen al expresar el peso en términos relativos.

No hay diferencias en el peso absoluto del hígado entre los 3 grupos del estudio. Sin embargo, el peso del órgano relativo a 100 g de animal es significativamente menor en el grupo control que en el E1, mostrando el grupo E3 valores intermedios.

La cantidad total de grasa epididimal y el peso del encéfalo son menores ( $P < 0.05$ ) en el grupo E3 con respecto al grupo E1, y ambos a su vez similares al control (Tabla 12). Al expresar este parámetro como peso relativo los valores obtenidos son similares en todos los grupos (Tabla 13).

El peso del colon, tanto absoluto como relativo, es significativamente menor en el grupo E3 respecto a los otros dos grupos.

### 3.2.3. Coeficientes de utilización digestiva y nutricional de proteína y grasa

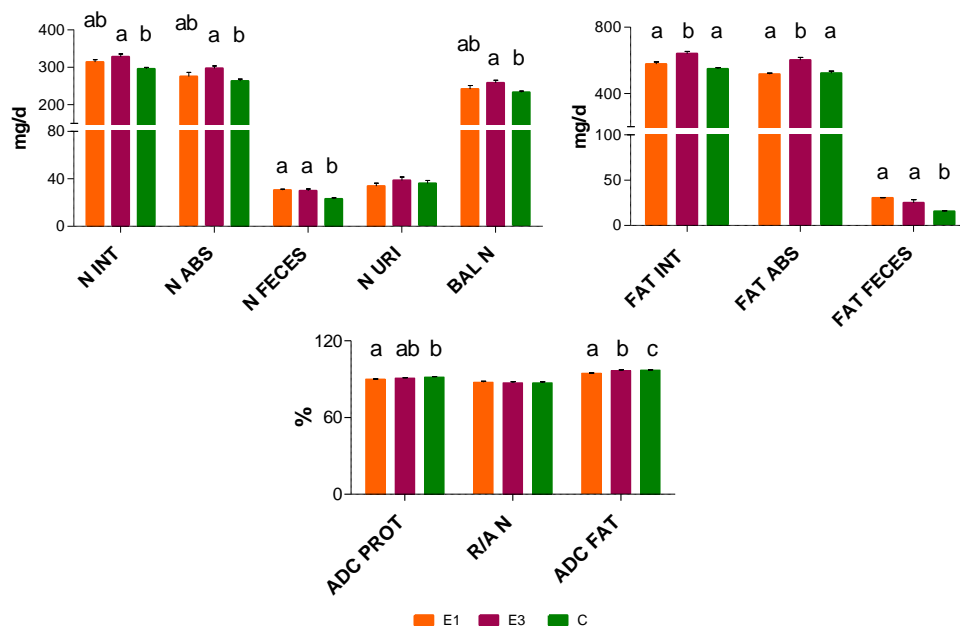


Figure 32. Coefficients of digestive and nutritive utilization of protein and fat in DIO rats subsequently fed for 5 weeks with standard diet (C) or diets containing two different functional ingredients (E1 and E3). Values represent mean  $\pm$  SEM (n = 8-10 per group). For a given parameter, different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ) between the groups. Abbreviations: N INT (total nitrogen intake), N ABS (nitrogen absorbed), N FECES (fecal nitrogen), N URI (urinary nitrogen), BAL N (nitrogen retention), FAT INT (total fat intake), FAT ABS (fat absorbed), FAT FECES (fecal fat), ADC PROT (apparent digestibility coefficient of protein), R/A N (percent nitrogen retention/nitrogen absorption), ADC FAT (apparent digestibility coefficient of fat).

Tal y como se puede apreciar en la Fig. 32, la ingesta, absorción y balance de nitrógeno es significativamente mayor en el grupo E3 en comparación con el grupo control, mostrando el grupo E1 valores intermedios. En lo que se refiere al nitrógeno en heces, los valores de los grupos experimentales (E1 y E3) son similares entre ellos y superiores ( $P < 0.05$ ) al control. La digestibilidad de proteína en el grupo control (C) es mayor ( $P < 0.05$ ) que en el grupo E1 y ambos a su vez semejantes al grupo E3.



En cuanto a los parámetros de utilización de la grasa, los valores de grasa ingerida y absorbida son significativamente mayores en el grupo E3 respecto a los otros dos grupos, que tienen valores similares entre sí. La cantidad de grasa en heces es más elevada ( $P < 0.05$ ) en los grupos E1 y E3 comparado con el grupo control. Respecto a la digestibilidad de grasa, los tres grupos poseen valores significativamente diferentes, mostrando el grupo control la mayor utilización digestiva de este nutriente, seguido del grupo E3 y, finalmente, del grupo E1.

### 3.2.4. Curva de glucemia

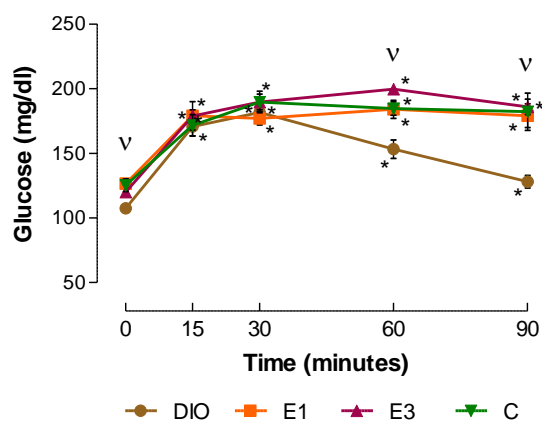


Figure 33. Plasma glucose concentrations during oral glucose tolerance tests (OGTT) conducted at the end of the obesity induction period (DIO) and, subsequently, after feeding the obese rats for 10 weeks with standard diet (C) or diets containing two different functional ingredients (E1 and E3). Values represent mean  $\pm$  SEM ( $n = 28-30$  for DIO, and  $n=8-10$ /group for C, E1 and E3). For a given group, the asterisk (\*) indicates significant difference ( $P < 0.05$ ) compared to basal (time 0); for a given time point, statistical significance ( $P < 0.05$ ) between the groups is indicated as follows: v: DIO vs. E1, E3 and C.

La Fig. 33 muestra los cambios en la concentración de glucosa plasmática durante tests de tolerancia a glucosa oral (OGTT) realizados en el periodo de inducción de obesidad (DIO) y, posteriormente, en el periodo experimental, en el que las ratas obesas fueron asignadas a los grupos control, E1 y E3. En condiciones de ayunas, la concentración de glucosa en el grupo DIO es menor ( $P < 0.05$ ) que la registrada en los animales durante el periodo experimental (C, E1 y E3). Se observa respuesta a la glucosa oral en todos los grupos y también en todos ellos la glucemia se mantiene significativamente elevada con respecto al basal hasta el min. 90, aunque en las ratas DIO los valores van cayendo progresivamente en tanto que en los grupos C, E1 y E3 se mantienen constantes a partir del min. 30. Todo ello hace que en los dos puntos finales del test (60 y 90 min.) la glucosa plasmática en el grupo DIO muestre valores significativamente menores respecto a los obtenidos cuando el test se realizó durante el periodo experimental (C, E1 y E3).

3.2.5. Concentración plasmática de hormonas gastrointestinales

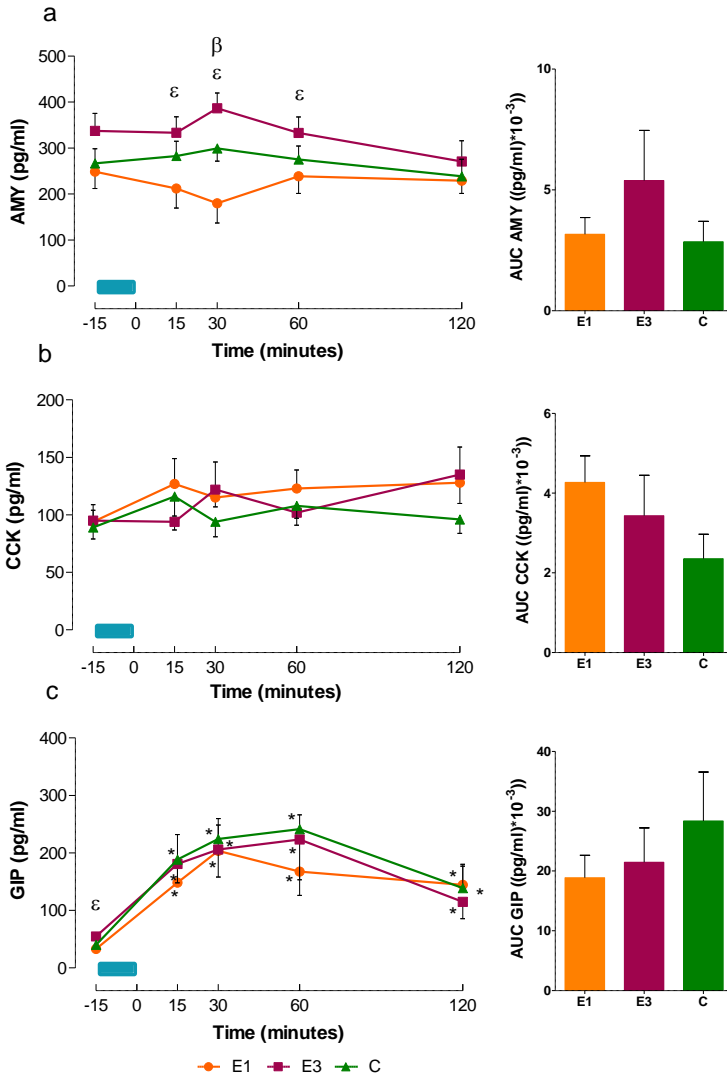


Figure 34. Plasma concentrations of AMY (a), CCK (b) and GIP (c) in DIO rats subsequently fed for 10 weeks with standard diet (C) or diets containing two different functional ingredients (E1 and E3). Results are expressed as time-course changes (left) and as area under the curve (AUC, right). Values represent mean  $\pm$  SEM (n = 8-10). Time-course charts: the blue bar indicates the duration of the meal; for a given group, the asterisk (\*) indicates significant difference (P<0.05) compared to basal (-15); for a given time point, statistical significance (P<0.05) between the groups is indicated as follows:  $\alpha$ : C vs E3,  $\beta$ : C vs E1, and  $\epsilon$ : E1 vs E3. Abbreviations: DIO (diet-induced obesity).

Como pone de manifiesto la Fig. 34 a, no existen diferencias significativas en concentración basal de AMY entre ninguno de los grupos ( $248.3 \pm 36.3$  pg/ml (E1),  $337.1 \pm 38.2$  pg/ml (E3) y  $266.4 \pm 32.1$  (C)). Tampoco hay en ninguno de ellos una respuesta significativa tras la ingestión de alimento. A los distintos tiempos del periodo postprandial, las mayores diferencias se dan entre los grupos E3 y E1, con mayores ( $P < 0.05$ ) valores en E3 a excepción del min. 120. No existen diferencias significativas en el AUC en ningún caso.

Refiriéndonos a las concentraciones basales de CCK, son:  $94 \pm 15$  pg/ml en el grupo E1,  $95 \pm 0.9$  pg/ml en el grupo E3 y  $89 \pm 1$  pg/ml en el grupo control, muy similares entre sí. La ingestión de alimento no ocasiona cambios en las concentraciones circulantes de este péptido, ni tampoco se presentan diferencias significativas entre los grupos en ninguno de los tiempos medidos (Fig. 34 b). Las AUC de los tres grupos son también semejantes.

Las concentraciones plasmáticas de GIP en condiciones de ayunas difieren ( $P < 0.05$ ) entre el grupo E1 ( $32.9 \pm 5.4$  pg/ml) y E3 ( $54.8 \pm 4.5$  pg/ml), siendo ambas similares a las del grupo control ( $40.1 \pm 5.7$  pg/ml). Existe una marcada y significativa respuesta al alimento en todos los grupos de estudio (Fig. 34 c), con valores que, aunque tienden a disminuir, siguen elevados ( $P < 0.05$ ) en comparación con el basal hasta el final (min. 120). Cabe resaltar la ausencia de diferencias significativas entre los tres grupos para cualquiera de los tiempos del periodo postprandial. El AUC tampoco varía de forma significativa en ninguno de los casos.

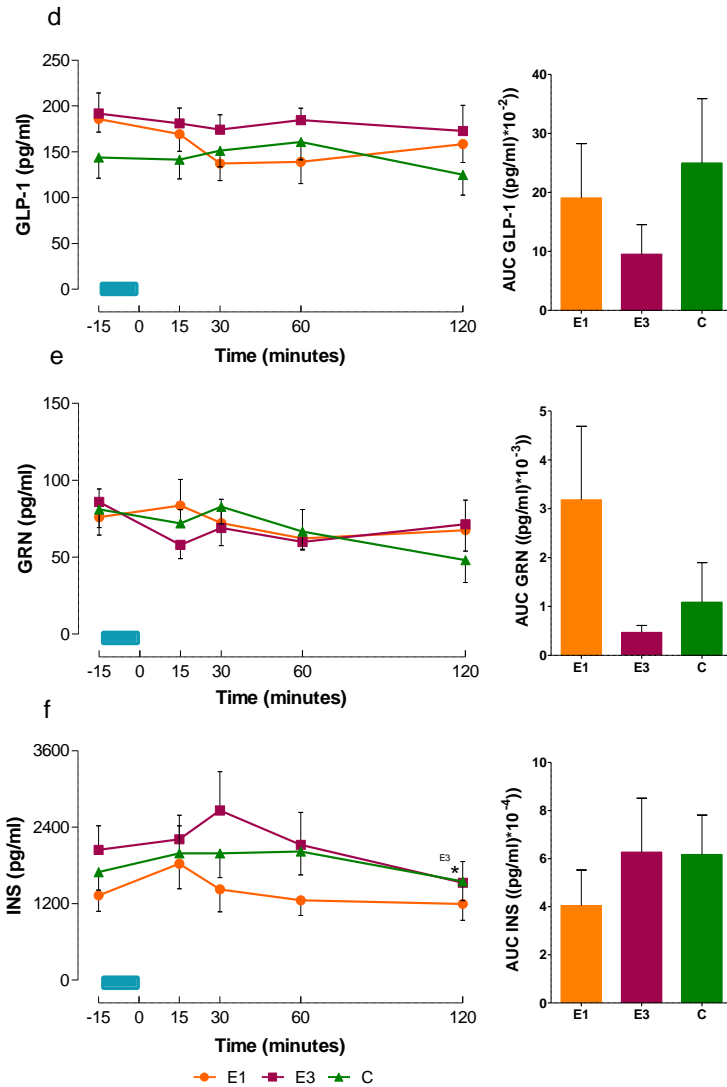


Figure 35. Plasma concentrations of GLP-1 (d), GRN (e) and INS (f) in DIO rats subsequently fed for 10 weeks with standard diet (C) or diets containing two different functional ingredients (E1 and E3). Results are expressed as time-course changes (left) and as area under the curve (AUC, right). Values represent mean  $\pm$  SEM ( $n = 8-10$ ). Time-course charts: the blue bar indicates the duration of the meal; for a given group, the asterisk (\*) indicates significant difference ( $P < 0.05$ ) compared to basal (-15); for a given time point, statistical significance ( $P < 0.05$ ) between the groups is indicated as follows:  $\alpha$ : C vs E3,  $\beta$ : C vs E1, and  $\epsilon$ : E1 vs E3. Abbreviations: DIO (diet-induced obesity).

Respecto al GLP-1 (Fig. 35 d), la concentración basal para el grupo E1 es de  $185.7 \pm 14.2$  pg/ml, para el grupo E3 de  $191.8 \pm 22.2$  pg/ml y  $143.8 \pm 22.6$  pg/ml en el grupo C, no existiendo diferencias significativas entre estas. No se aprecian aumentos postprandiales estadísticamente significativos en ningún caso y tampoco hay diferencias entre grupos en las concentraciones plasmáticas de GLP-1 a los diferentes tiempos. La secreción total en respuesta al alimento, estimada por el AUC, es similar en todos los grupos.

Las concentraciones basales de GRN son semejantes en los tres grupos, mostrándose unos valores de  $76 \pm 18.3$  pg/ml en el grupo E1, de  $85.9 \pm 16.6$  pg/ml en el E3, y  $81.1 \pm 16.8$  pg/ml en el control. En lo que respecta a la GRN postprandial (Fig. 35 e), le es de aplicación todo lo dicho anteriormente para el GLP-1.

Las concentraciones de INS en situación de ayunas se sitúan en torno a  $1330 \pm 250$  pg/ml en el grupo E1,  $2043 \pm 378$  pg/ml en el grupo E3 y  $1695 \pm 283$  pg/ml en el grupo C. Aunque en algunos grupos se pueden apreciar ligeros aumentos en la INS plasmática tras la comida (Fig. 35 f), los cambios en general no alcanzan significación estadística, con la excepción del valor observado en el grupo E3 al final del estudio (120 min.), que llega a ser inferior ( $P < 0.05$ ) al correspondiente basal. No existen diferencias significativas en ningún momento entre los grupos y tampoco en las AUC.

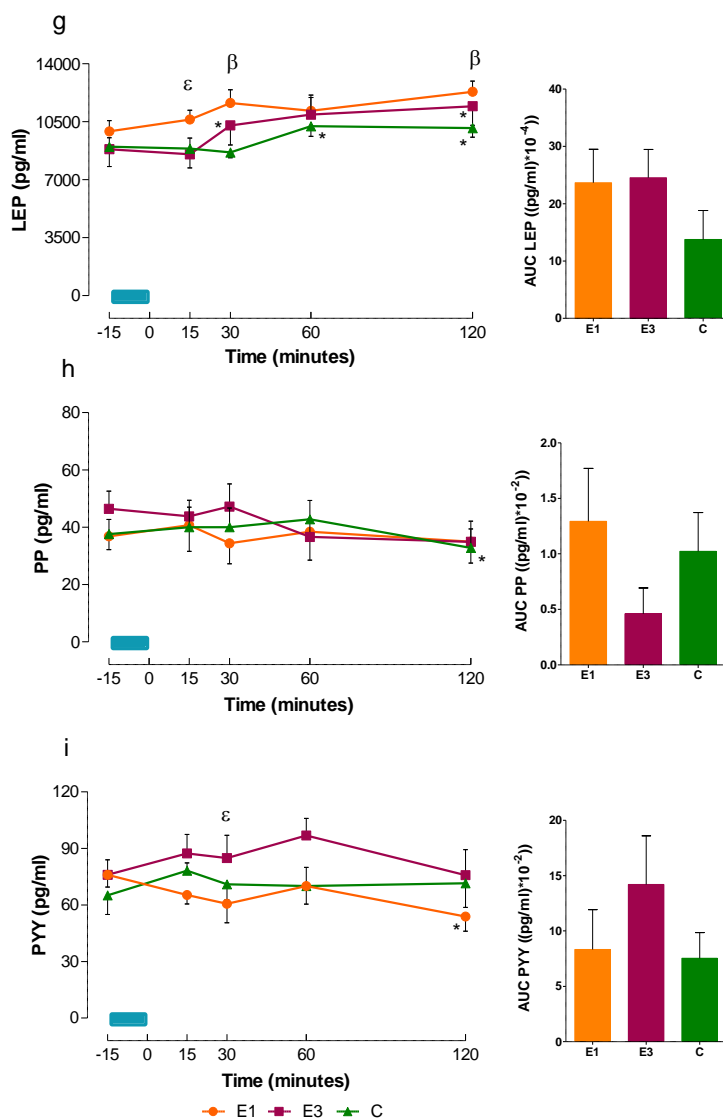


Figure 36. Plasma concentrations of LEP (g), PP (h) and PYY (i) in DIO rats subsequently fed for 10 weeks with standard diet (C) or diets containing two different functional ingredients (E1 and E3). Results are expressed as time-course changes (left) and as area under the curve (AUC, right). Values represent mean  $\pm$  SEM (n = 8-10). Time-course charts: the blue bar indicates the duration of the meal; for a given group, the asterisk (\*) indicates significant difference (P<0.05) compared to basal (-15); for a given time point, statistical significance (P<0.05) between the groups is indicated as follows:  $\alpha$ : C vs E3,  $\beta$ : C vs E1, and  $\epsilon$ : E1 vs E3. Abbreviations: DIO (diet-induced obesity).

La LEP presenta concentraciones basales de  $9913 \pm 646$  pg/ml en el grupo E1,  $8833 \pm 1038$  pg/ml en el grupo E3 y  $8982 \pm 540$  pg/ml en el grupo control, todos semejantes entre sí (Fig. 36 g). Existe una respuesta significativa al alimento en el grupo E3 en los minutos 30 y 120, y el caso del grupo control en los minutos 60 y 120. Por el contrario, no hay cambios en la concentración plasmática de esta hormona tras la ingestión de comida en el grupo E1. Existen diferencias significativas puntuales entre los grupos E1 y E3 en el tiempo 15, y entre E1 y control en los minutos 30 y 120. Las AUC de los tres grupos son similares.

En situación de ayunas, la concentración circulante de PP es de  $36.8 \pm 4.6$  pg/ml en el grupo E1,  $46.4 \pm 6.2$  pg/ml en el grupo E3 y  $37.6 \pm 5.1$  pg/ml en el grupo C. Únicamente se producen cambios postprandiales en el PP plasmático en el grupo control y al final del experimento (120 minutos). De acuerdo con nuestros datos (Fig. 36 h), no existen diferencias entre los grupos en ninguno de los tiempos estudiados. Los valores de AUC son similares entre los tres grupos.

Por último, los valores de concentración basal para el PYY son:  $76 \pm 6.6$  pg/ml en el grupo E1,  $76 \pm 7.9$  pg/ml en el grupo E3 y  $65.1 \pm 10.2$  pg/ml en el grupo C, no existiendo diferencias ( $P < 0.05$ ) entre ellos. En términos generales (ver Fig. 36 i), la ingestión de alimento no produce cambios importantes en la concentración de PYY en plasma, apareciendo únicamente una disminución significativa respecto al basal en el grupo E1, en el último tiempo. Aunque los valores en el grupo E3 tienden a ser ligeramente mayores que los de los otros grupos a lo largo del periodo postprandial, sólo en el minuto 30 la diferencia alcanza significación estadística al comparar con el grupo E1. No existen diferencias en la secreción total de péptido (AUC) en ningún caso.

## **4. PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS**

### **4.1 PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS**



Table 14. Hematologic parameters of the three experiments.

	E1			E2			C					
<b>EXPERIMENT I</b>												
<b>WBC</b> ( $\times 10^3 / \mu\text{l}$ )	4.86	±	0.85	6.02	±	0.48	6.19	±	0.41			
<b>RBC</b> ( $\times 10^6 / \mu\text{l}$ )	7.37	±	0.16	7.13	±	0.15	7.20	±	0.19			
<b>HGB</b> (g/dl)	7.88	±	3.67	13.38	±	0.21	10.76	±	2.77			
<b>HCT</b> (%)	40.39	±	0.93	39.98	±	0.74	25.99	±	10.11			
<b>MCHC</b> (g/dl)	33.06	±	0.24	33.08	±	0.29	32.86	±	0.12			
<b>EXPERIMENT II</b>												
<b>WBC</b> ( $\times 10^3 / \mu\text{l}$ )	5.13	±	0.83	6.67	±	0.53	6.62	±	0.82			
<b>RBC</b> ( $\times 10^6 / \mu\text{l}$ )	8.56	±	0.23	a	7.95	±	0.09	b	7.71	±	0.21	b
<b>HGB</b> (g/dl)	14.98	±	0.35	a	13.96	±	0.11	b	14.30	±	0.37	ab
<b>HCT</b> (%)	46.63	±	0.74	a	43.01	±	0.36	b	40.72	±	0.86	c
<b>MCV</b> (fL)	53.33	±	0.26		54.10	±	0.39		53.22	±	0.34	
<b>MCH</b> (pg)	17.53	±	0.18		17.80	±	0.18		17.70	±	0.46	
<b>MCHC</b> (g/dl)	32.85	±	0.38		32.55	±	0.13		27.23	±	6.23	
<b>EXPERIMENT III</b>												
	E1			E3			C					
<b>WBC</b> ( $\times 10^3 / \mu\text{l}$ )	3.59	±	0.42	a	4.92	±	0.44	a	8.10	±	0.74	b
<b>RBC</b> ( $\times 10^6 / \mu\text{l}$ )	7.97	±	0.42		8.09	±	0.26		8.72	±	0.10	
<b>HGB</b> (g/dl)	13.41	±	1.19		14.08	±	0.54		14.53	±	0.17	
<b>HCT</b> (%)	42.19	±	2.30	a	40.32	±	1.53	a	48.42	±	0.39	b
<b>MCV</b> (fL)	52.34	±	1.33		49.82	±	0.54		55.56	±	0.57	
<b>MCH</b> (pg)	17.01	±	0.50		17.39	±	0.22		16.85	±	0.18	
<b>MCHC</b> (g/dl)	30.83	±	2.06		34.91	±	0.15		30.01	±	0.17	

Blood was collected at sacrifice. Experiment I: lean rats, short-term (6 days) administration of experimental diets; Experiment II: lean rats, long-term (10 weeks) administration of experimental diets; Experiment III: DIO rats, long-term (10 weeks) administration of experimental diets. Values represent mean  $\pm$  SEM (n = 8-10 per group). Different letters in the same row indicate significant difference (P<0.05) between the groups. Abbreviations: DIO (diet-induced obesity), WBC (White blood cells), RBC (Red blood cells), HGB (Haemoglobin), MCV (Mean corpuscular volume), MCH (Mean corpuscular haemoglobin) and MCHC (Mean corpuscular haemoglobin concentration).

Como puede apreciarse en la Tabla 14, no existen diferencias significativas en ninguno de los parámetros hematológicos medidos en el primer experimento (corto plazo).

En el experimento a largo plazo en ratas normopeso (II), el recuento de glóbulos rojos (RBC) es significativamente menor en los grupos E2 y control en comparación con el grupo E1. El hematocrito (HCT) muestra valores diferentes ( $P < 0.05$ ) entre los grupos, de forma que el menor valores el del grupo control, seguido del grupo E2 y por último el grupo E1. La concentración de hemoglobina (HGB) disminuye significativamente en el grupo E2 respecto al E1, siendo ambos valores similares a los del grupo control. Respecto al resto de parámetros, no se encuentran diferencias significativas entre los grupos.

En el tercer experimento (largo plazo en ratas obesas), el recuento de glóbulos blancos (WBC) y el hematocrito (HCT) son significativamente superiores en el grupo C respecto a los otros dos grupos, entre los que no existe diferencia. En el resto de parámetros hematológicos no existen diferencias significativas entre los grupos (Tabla 14).

## 4.2 PARÁMETROS BIOQUÍMICOS PLASMÁTICOS Y HEPÁTICOS

Table 15. Biochemical parameters in plasma and liver

	E1		E2		C	
EXPERIMENT II						
<b>GLU PL</b> (mg/dl)	82.48	± 5.12	91.88	± 5.15	75.78	± 5.86
<b>CHL PL</b> (mg/dl)	49.00	± 3.10	55.74	± 5.56	50.18	± 4.17
<b>HDL CHL PL</b> (mg/dl)	11.66	± 2.70	16.18	± 1.41	15.38	± 1.74
<b>TRG PL</b> (mg/dl)	71.46	± 6.71	104.16	± 18.46	86.40	± 14.10
<b>PLFA PL</b> (mg/dl)	89.86	± 6.50	104.70	± 7.95	96.08	± 8.17
<b>CHL LIV</b> (mg/g liv)	3.37	± 0.43	3.97	± 0.75	2.86	± 0.12
<b>TRG LIV</b> (mg/g liv)	4.98	± 0.92 a	3.73	± 0.59 a	8.44	± 0.55 b
EXPERIMENT III						
	E1		E3		C	
<b>GLU PL</b> (mg/dl)	157.73	± 13.50 a	166.42	± 11.70 a	113.31	± 4.95 b
<b>CHL PL</b> (mg/dl)	63.60	± 2.85	60.38	± 2.80	64.60	± 6.64
<b>HDL CHL PL</b> (mg/dl)	23.23	± 0.97	22.77	± 1.61	22.39	± 2.29
<b>TRG PL</b> (mg/dl)	128.17	± 20.37	98.87	± 35.65	110.43	± 20.11
<b>PLFA PL</b> (mg/dl)	133.81	± 6.85	116.33	± 7.97	129.51	± 13.12
<b>CHL LIV</b> (mg/g)	4.60	± 0.19 a	2.80	± 0.48 b	3.54	± 0.70 ab
<b>TRG LIV</b> (mg/g liv)	8.45	± 1.09	10.16	± 3.09	12.51	± 1.68

Samples collected at sacrifice. Experiment I: lean rats, short-term (6 days) administration of experimental diets; Experiment II: lean rats, long-term (10 weeks) adm. of exp. diets; Experiment III: DIO rats, long-term (10 weeks) adm. of exp. diets. Values represent mean ± SEM (n = 8-10 per group). Different letters in the same row indicate significant difference (P<0.05) between the groups. Abbreviations: GLU PL (plasma glucose), CHL PL (plasma cholesterol), HDL CHL PL (High-density lipoprotein cholesterol in plasma), TRG PL (plasma triglycerides), PLFA PL (plasma phospholipids), CHL LIV (liver cholesterol), and TRG LIV (liver triglycerides).

En el experimento II, los triglicéridos hepáticos en el grupo control son superiores ( $P < 0.05$ ) a los de los grupos experimentales E1 y E2, como puede apreciarse en la Tabla 15. En el resto de variables no existen diferencias significativas entre los grupos.

La concentración de glucosa en plasma en la tercera experiencia (III) es significativamente mayor en los grupos E1 y E3 con respecto al grupo control. Por otro lado, como se puede apreciar en la Tabla 15, el colesterol en hígado es mayor ( $P < 0.05$ ) en el grupo E1 que en el E3, mostrando el grupo C valores intermedios. No hay cambios significativos en el resto de variables.

## 5 EXPERIENCIA EN HUMANOS

### 5.1 Dieta del periodo experimental

Table 16. Energy, macro- and micronutrient intakes of human volunteers during the experimental period assessed by 24-h recall.

PARAMETERS	CONTROL		E1	
Energy (Kcal)	1592.62	± 86.33	1545.00	± 107.46
Water (g)	1858.57	± 255.53	1869.91	± 220.44
Proteins (g)	76.24	± 4.18	74.23	± 4.70
Fat (g)	69.88	± 5.53	62.12	± 6.00 *
Saturated fat (g)	14.65	± 1.22	12.98	± 1.62
Mon. fat (g)	17.80	± 1.68	15.64	± 1.76 *
Pol. fat (g)	23.02	± 2.37	18.57	± 1.90 *
Cholesterol (mg)	228.09	± 22.04	205.87	± 25.66
Carbohydrates (g)	160.37	± 9.98	162.53	± 10.76
Dietary fiber (g)	11.10	± 0.91	9.67	± 0.61
Sodium (mg)	1415.81	± 139.73	1261.05	± 131.19 *
Potassium (mg)	1852.23	± 111.87	1815.46	± 108.10
Calcium (mg)	796.95	± 37.28	796.95	± 50.47
Magnesium (mg)	234.98	± 15.77	218.59	± 14.36
Phosphorus (mg)	1142.17	± 52.43	1106.47	± 74.77
Iron (mg)	20.97	± 7.50	11.51	± 0.91
Copper (mg)	0.63	± 0.06	0.64	± 0.12
Zinc (mg)	7.60	± 0.79	5.96	± 0.56 *
Chloride (mg)	1048.35	± 129.61	1036.64	± 94.33
Manganese (mg)	7.43	± 2.44	4.99	± 1.78
Selenium (µg)	44.70	± 3.80	50.27	± 8.52
Iodine (µg)	36.60	± 5.01	30.80	± 3.34
Vita A	509.72	± 39.40	503.68	± 40.81
Vitamin B1	1.41	± 0.20	3.85	± 1.45
Vitamin B2	1.53	± 0.07	1.44	± 0.12
Vitamin B3	24.39	± 2.20	22.04	± 1.89
Vitamin B5	3.45	± 0.26	3.37	± 0.23
Vitamin B6	1.61	± 0.09	1.59	± 0.09
Vitamin B7	5.15	± 0.98	3.68	± 0.65 *
Vitamin B9	165.43	± 10.14	160.23	± 16.19
Vitamin B12	5.58	± 0.45	5.67	± 0.60
Vitamin C	65.38	± 9.03	53.35	± 6.78
Vitamin D	3.41	± 0.46	4.95	± 1.36
Vitamin E	19.10	± 1.95	15.12	± 1.99 *

Values represent mean ± SEM (n = 8-15 per group). For a given parameter, the asterisk (\*) indicates significant difference (P<0.05) between the groups.

Abbreviations: Mon. (Monounsaturated) and Pol. (Polyunsaturated).

## 213 Resultados

La ingesta de nutrientes en el periodo experimental, evaluada a través de recordatorios de 24 h, resultó en algunas diferencias significativas entre los dos grupos de voluntarios, en particular en lo referente a ingesta de grasa total, grasa monoinsaturada y poliinsaturada, sodio, zinc, biotina y vitamina E, siendo los valores en todos los casos menores en el grupo E1.

## 5.2 Concentración plasmática de hormonas gastrointestinales

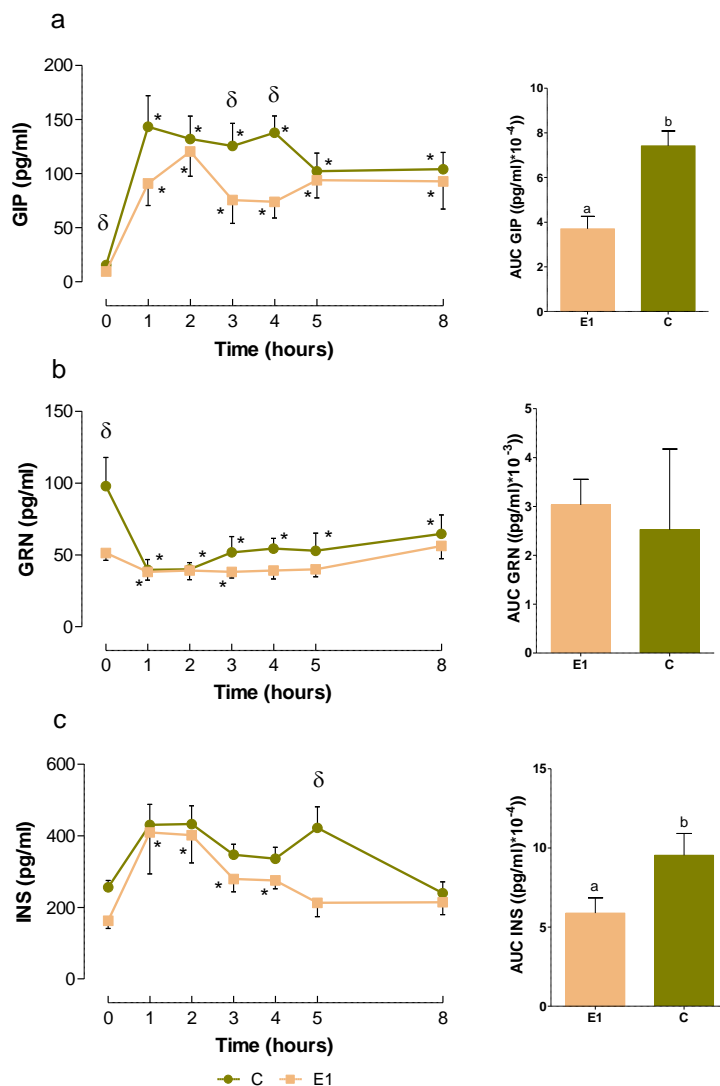


Figure 37. Plasma concentrations of GIP (a), GRN (b), and INS (c) in healthy volunteers before (time 0) and after the administration of a standard meal (group C) or the standard meal added with the functional ingredient E1 (group E1). Values represent mean  $\pm$  SEM (n = 8-15). For a given group the asterisk (\*) indicates significant difference (P < 0.05) compared to basal (0). For a given time point the symbol  $\delta$  denotes a significant difference (P < 0.05) between the groups.

Las concentraciones basales de GIP fueron:  $15.4 \pm 1.8$  pg/ml en el grupo control y  $9.6 \pm 1.9$  pg/ml en el grupo E1, siendo la diferencia entre medias estadísticamente significativa (Fig. 37 a). En respuesta al alimento se producen en ambos grupos aumentos significativos, manteniéndose las concentraciones plasmáticas elevadas ( $P < 0.05$ ) con respecto al valor de ayunas hasta la 8ª hora postprandial, pudiéndose apreciar diferencias significativas entre ambos grupos en la 3ª y 4ª hora tras la comida, con mayores valores en el grupo control. La respuesta postprandial total, estimada por el AUC, fue significativamente mayor en el grupo control.

Para la GRN, las concentraciones basales se sitúan en el grupo control en  $97.9 \pm 19.9$  pg/ml y en  $51.3 \pm 5.1$  pg/ml en el grupo E1 ( $P < 0.05$ ), sin aparecer diferencias significativas entre los grupos en los distintos tiempos del periodo postprandial. La comida causa una marcada ( $P < 0.05$ ) disminución en el grupo control, alcanzándose valores significativamente inferiores a los de ayunas hasta el final del estudio como refleja la Fig. 37 b. En el grupo E1, el descenso postprandial es menor y solo se alcanza significación estadística en comparación con el basal en la primera y tercera hora. El AUC es similar en ambos grupos.

Nuestros resultados (Fig. 37 c) muestran concentraciones basales de INS de  $256 \pm 19.2$  pg/ml en el grupo control y  $162.4 \pm 21.5$  pg/ml en el grupo E1, valores estadísticamente comparables. La respuesta al alimento es significativa en el grupo E1, aunque únicamente hasta la cuarta hora. Tras la comida, la insulinemia muestra valores similares en ambos grupos exceptuando la quinta hora, donde la concentración de esta hormona es significativamente superior en el grupo control comparada con la observada en el grupo E1. El AUC es mayor ( $P < 0.05$ ) en el grupo control que en el E1.



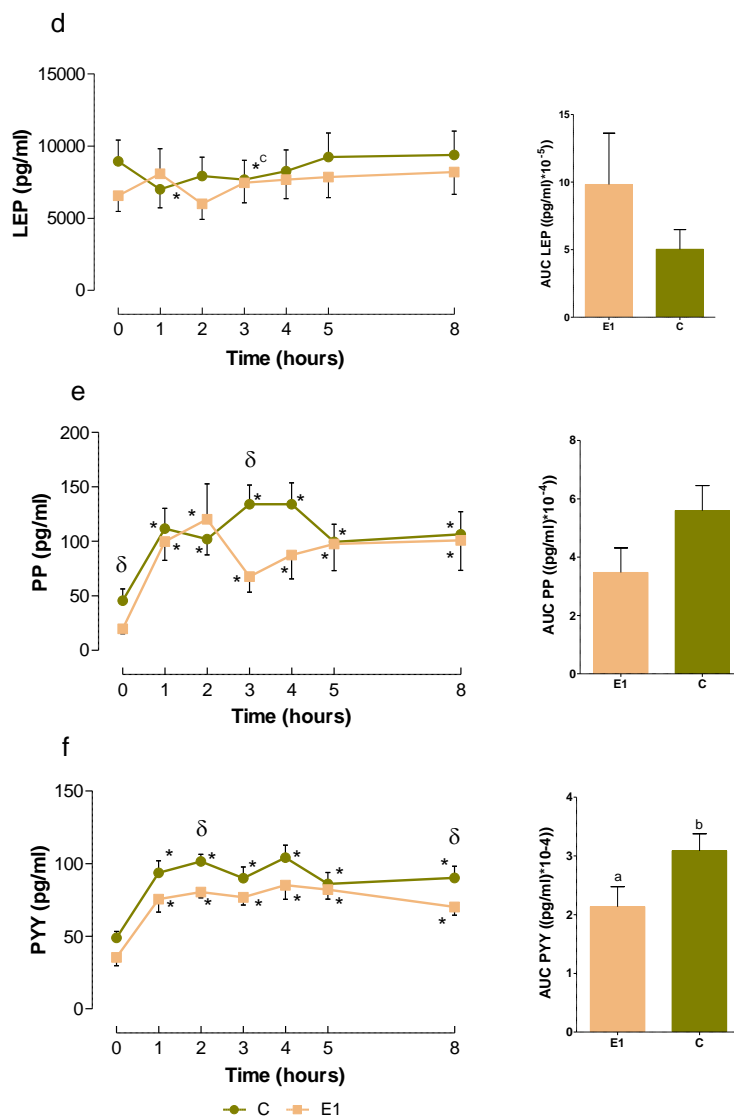


Figure 38. Plasma concentrations of LEP (d), PP (e) and PYY (f) in healthy volunteers before (time 0) and after the administration of a standard meal (group C) or the standard meal added with the functional ingredient E1 (group E1). Values represent mean  $\pm$  SEM ( $n = 8-15$ ). For a given group the asterisk (\*) indicates significant difference ( $P < 0.05$ ) compared to basal (0). For a given time point the symbol  $\delta$  denotes a significant difference ( $P < 0.05$ ) between the groups.

Las concentraciones basales de LEP son de  $8937 \pm 1472$  pg/ml en el grupo control y  $6558 \pm 1096$  pg/ml en el grupo E1, similares entre sí. No existe una respuesta significativa tras la ingesta de alimento en ningún grupo (excepto en algún punto aislado) y los valores de concentración a lo largo del periodo postprandial son semejantes en los dos grupos (Fig. 38 d). El AUC no se ve afectada por los tratamientos experimentales.

En condiciones de ayunas, la concentración plasmática de PP es mayor ( $P < 0.05$ ) en el grupo control que en el grupo E1 ( $45.6 \pm 10.8$  pg/ml y  $19.8 \pm 4.6$  pg/ml, respectivamente). La ingesta de la comida se asocia a una respuesta marcada (Fig. 38 e), con valores que se mantienen en los dos grupos significativamente elevados frente al basal hasta el final de la experiencia. La existencia de patrones temporales ligeramente distintos en los dos grupos hace que en la tercera hora postprandial la concentración de PP del grupo control sea superior ( $P < 0.05$ ) a la del grupo E1. No obstante, el área bajo la curva es similar en los dos grupos.

La Fig. 38 f refleja los cambios en la concentración circulante de PYY en los pacientes de nuestro estudio. Las concentraciones basales fueron:  $48.8 \pm 4.4$  pg/ml en el grupo control y  $35.3 \pm 5.6$  pg/ml en el grupo E1 (similares entre ellas). Tras la administración de la comida, el PYY aumenta significativamente en ambos grupos y se mantiene elevado ( $P < 0.05$ ) por encima de los valores basales hasta la finalización del experimento. Se observan diferencias significativas puntuales entre los grupos en las horas 2 y 8, con concentraciones mayores en el grupo control. La secreción total de péptido (AUC) es significativamente superior en el grupo control comparado con el E1.

### 5.3 Parámetros de saciedad y hambre

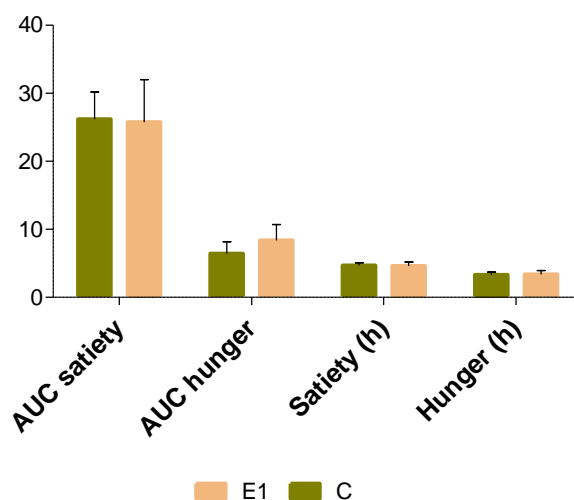


Figure 39. Hunger/satiety parameters in healthy volunteers after the administration of a standard meal (group C) or the standard meal added with the functional ingredient E1 (group E1). Satiety/hunger feelings were assessed hourly during the postprandial period according to Haber [726]. Satiety and hunger intensity is expressed as area under the curve (AUC) of satiety and hunger, respectively. Satiety and hunger time is expressed in hours. Values represent mean  $\pm$  SEM (n = 8-15).

No existen diferencias significativas entre los dos grupos en las AUC indicativas de la intensidad de saciedad o hambre, ni tampoco en el tiempo que los sujetos están saciados o hambrientos.

# DISCUSIÓN

*“Un buen viajero no tiene planes fijos ni la intención de llegar”.*

*(Lao Tse)*



## 1. ASPECTOS GENERALES

En el estudio de los aspectos relacionados con la fisiología, los modelos *in vitro* presentan limitaciones de cara a su posible extrapolación a los seres humanos, lo que hace que se necesiten modelos que simulen las condiciones propias de un organismo complejo. El modelo animal más utilizado en este sentido son los roedores [728], existiendo numerosos tipos dependiendo de los objetivos de estudio. Concretamente, en el campo de la fisiología de la nutrición se suelen utilizar modelos con alteraciones genéticas (globales o locales) u obtenidos por cría selectiva [162]. Además existen también modelos que nos revelan aspectos ambientales, tales como: la influencia de dietas altas en grasas y/o en azúcares, los efectos de la restricción dietética sobre la masa corporal o el impacto de distintos fármacos sobre algunos componentes del equilibrio energético [162].

En el trabajo que nos ocupa, la rata Wistar macho fue elegida como modelo experimental debido a una serie de ventajas (aparte de su fácil manejabilidad y mantenimiento):

- Amplio conocimiento de su fisiología tanto gastrointestinal como neuroendocrina, y posible extrapolación al ser humano, como se ha recogido en los antecedentes de esta tesis.
- Recientemente se han podido realizar estudios postprandiales más completos en la rata gracias a la tecnología Milliplex<sup>TM</sup> X-Map®, que adaptada específicamente a esta especie, nos permite trabajar con pequeños volúmenes de plasma.
- Los machos poseen una mayor proporción de grasa visceral en comparación a las hembras (como ocurre en humanos), lo que se asocia a una obesidad de tipo androide, la cual es más severa que la ginoide [729].

Respecto a la dieta utilizada se escogió la AIN-93M como control y base de la dieta experimental. Se trata de una dieta semipurificada estándar cuya formulación fue publicada en 1993 [720] y que ha sido ampliamente utilizada en estudios relacionados

con la fisiología de la ingesta y el BW [730-732]. Además nuestro Departamento posee una amplia experiencia tanto en su preparación, como en su utilización en estudios de este tipo [733,734].

En relación al diseño experimental, primero se decidió realizar un experimento a corto plazo como estudio piloto para estudiar el comportamiento general de los parámetros objeto de nuestro estudio en respuesta a las dietas experimentales a ensayar, tras su administración durante un periodo breve de tiempo. Con este conocimiento previo, se planteó un estudio a largo plazo (segundo experimento), el cual simula mejor la realidad de un posible uso en humanos de estos ingredientes funcionales con el objetivo de controlar el BW. Ambos se llevaron a cabo en animales con normopeso.

Por último, se planteó un tercer experimento con animales con obesidad inducida por la dieta, para conocer el papel de las dietas experimentales en la pérdida de peso y los posibles mecanismos implicados (cambios en la ingesta de alimentos, en la utilización digestiva y metabólica de los macronutrientes y en las concentraciones plasmáticas, basales y postprandiales, de diferentes péptidos gastrointestinales y hormonas implicados en el control del balance de energía corporal. Para llevar a cabo este último experimento se realizó una revisión bibliográfica exhaustiva sobre los modelos animales de obesidad más usados y se optó por un modelo de obesidad inducida por la dieta en ratas utilizando una dieta hipercalórica con el 60% de las kilocalorías en forma de grasa. En general, está aceptado que este tipo de modelo es el que más se asemeja a la situación de obesidad que ocurre mayoritariamente en humanos [165].

Además, se incluye un estudio agudo en humanos con uno de los ingredientes funcionales (E1), en el que se evalúan parámetros relacionados con la sensación de hambre y saciedad de los participantes, así como las concentraciones plasmáticas, en ayunas y tras la comida, de algunos de los péptidos y hormonas más importantes en la regulación de la ingesta de alimentos.

Por último, hay que destacar que no existe a día de hoy ningún estudio en el que se haya probado el efecto de este tipo de componentes dietéticos sobre parámetros de digestibilidad, metabólicos y concentraciones circulantes de hormonas

gastrointestinales relacionadas con el control de la ingesta. Todo ello subraya lo novedoso de este estudio, que permitiría obtener datos inéditos de gran valor que podrían apoyar la posible utilización de estos componentes en dietas dirigidas al control del BW, objetivo del proyecto global donde se enmarca esta memoria, el Proyecto PRONAOS.

## 2. EXPERIMENTOS EN RATAS NORMOPESO

### 2.1. CORTO PLAZO

#### 2.1.1. Ingesta

La ingesta media de alimento en las ratas control a lo largo del periodo experimental fue de  $23.6 \pm 0.53$  g/d. Esta ingesta promedio es semejante a la obtenida por Bocanegra *et al.* [735] y Donato *et al.* [736], con valores medios de  $20.2 \pm 1.7$  g/d y  $22.6$  g/d respectivamente.

Por otro lado, la ingesta de energía a lo largo del periodo experimental disminuyó de forma progresiva y significativa desde  $359 \pm 10$  Kj/d al inicio hasta  $322 \pm 9$  Kj/d al final. En el trabajo de Jean *et al.* [737], las ratas comienzan con una ingesta energética de  $366 \pm 4$  Kj/d manteniéndose constante durante un periodo comparable al nuestro. Las diferencias entre dicho estudio y el nuestro pueden considerarse poco relevantes, ya que la evolución ponderal es la misma en ambos casos.

Volviendo a nuestro estudio, se observa que el patrón temporal de ingesta de alimento, calorías y macronutrientes es similar en los tres grupos, exceptuando algún punto aislado donde aparecen diferencias significativas. Como puede apreciarse en la Fig. 13, hay una disminución significativa (excepto el primer día en los grupos E1, E2 y control, y el tercer día en el último grupo) de la ingesta de alimento en todo el periodo experimental, que puede deberse probablemente al cambio de la dieta de adaptación en “pellets” (Teklad 2014) a la dieta en polvo utilizada, que hace que la rata ingiera menos cantidad de dieta a corto plazo [738,739], hasta que se produce una adaptación a dicha textura y se estabiliza la ingesta [740]. No podemos descartar que



las pérdidas de comida que se producen con esta dieta no granulada, tengan una influencia en el descenso observado.

Por otra parte, las diferencias existentes entre el grupo E2 y el control en la ingesta de proteína y grasa se pueden atribuir a ligeras diferencias (no significativas) en la cantidad de estos macronutrientes en la dieta, que ejercen un efecto aditivo en la ingesta diaria.

En definitiva, las emulsiones E1 y E2 no causan una modificación significativa en la ingesta de alimento y de energía ni de macronutrientes a corto plazo.

### **2.1.2. Evolución ponderal**

La evolución ponderal del grupo control fue similar a la publicada en el estudio de Jean *et al.* [737], único trabajo en el que se controla el BW durante un periodo de tiempo similar.

La presencia en la dieta de grasa en forma de emulsiones obtenidas con distinta tecnología (ingredientes funcionales E1 y E2), no afectó a la evolución ponderal, al menos a corto plazo, lo cual se corresponde con ingestas de energía similares en los tres grupos estudiados.

### **2.1.3. Peso corporal y de órganos al sacrificio**

Los pesos de los diferentes órganos están dentro de la normalidad para esta cepa alimentada con esta dieta, de acuerdo con datos de experimentos realizados en el Departamento de Fisiología [Porres *et al.*, comunicación personal] en condiciones similares a las nuestras.

### **2.1.4. Parámetros e índices de utilización nutricional de proteína y grasa**

En el grupo control, el Coeficiente de Digestibilidad Aparente de la proteína (CDA proteína) alcanzó un valor de  $91\pm 1\%$ , similar al observado en trabajos que utilizan la misma cepa y edad [741,742]. La ingesta de proteína en nuestro estudio para ese grupo se situó alrededor de  $14.9\pm 0.4$  g/semana, la cual se aproxima a lo descrito en el único estudio comparable con el nuestro desarrollado por Gudiel-Urbano *et al.* [742], en el que la ingesta total de proteína se situó en  $19.3\pm 0.8$  g/semana.

La utilización digestiva (CDA proteína) y metabólica (Balance y R/A) de nitrógeno del grupo control no presentó diferencias con los valores obtenidos en el grupo E1, pero sí con los del grupo E2.

La utilización digestiva de la grasa, estimada por su coeficiente de digestibilidad, fue de  $96\pm 0.14\%$ , en el grupo control, similar a lo recogido en el trabajo de Kapravelou *et al.* ( $96.5\pm 0.27\%$ ) [733] y algo menor que el valor referido por Gudiel-Urbano ( $99\pm 0.24\%$ ) [742], siendo esta última diferencia poco relevante si se tiene en cuenta el rango tan elevado de valores en el que nos movemos.

Como se ha comentado, los valores de los diferentes índices en el grupo control están de acuerdo con la bibliografía. Además, no se produce un cambio notable en los índices de utilización digestiva y metabólica de los macronutrientes estudiados al comparar los grupos experimentales con el grupo control.

#### **2.1.5. Concentración plasmática de hormonas gastrointestinales**

La concentración plasmática basal de AMY fue de  $59.91\pm 3.75$  pg/ml en el grupo control, ligeramente superior a los valores obtenidos por Shin *et al.* [218], Hallam [743] y Zhao *et al.* [744]. La edad de los animales en los estudios antes citados fue de 27, 22 y 13 semanas respectivamente, factor que en el caso de los dos primeros estudios puede explicar las diferencias observadas con nuestros resultados, desconociéndose la causa de la discrepancia con el último trabajo (Zhao *et al.* [744]) ya que no existen diferencias en la cepa, dieta, edad o en el método analítico utilizado. No se han encontrado estudios en ratas que investiguen la influencia de la edad sobre las concentraciones basales de este péptido, pero sí hay datos en humanos, observándose menores concentraciones plasmáticas de AMY en individuos de mediana edad (41-60 años) respecto a individuos más jóvenes (20-40 años) [745]. Este efecto de la edad que parece darse en humanos concuerda con lo observado en los dos primeros estudios [218,743] en comparación al nuestro, ya que a esas edades (22-27 semanas) las ratas se consideran adultas de edad media (equivalencia a 50-60 años en humanos) [746].

No hay respuesta de AMY al alimento en el grupo control, al igual que encuentran Maurer *et al* [747] en tests de tolerancia a glucosa oral (OGTT), y que contrasta con lo

observado en el estudio de Shin *et al.* [218] donde se describe un aumento significativo de las concentraciones de esta hormona a los 10 minutos, descendiendo progresivamente hasta alcanzar valores cercanos a los basales a los 40 minutos. La discrepancia en la respuesta al alimento entre el último estudio y el nuestro puede deberse a la composición de la dieta experimental (*standard chow vs. AIN-93M*) y/o a las diferencias en los experimentos de ayunas-postprandial (administración intraoral por fístula de 1 ml/min (5 en total) de solución de Ensure® vs. ingesta *ad libitum* de dieta en nuestro caso). En otros modelos como el felino tampoco se ha descrito una respuesta significativa tras la ingesta de alimento [748], aunque en humanos parece que si se produce [205].

Si comparamos la respuesta a la comida del grupo control respecto a la del grupo E1, no se observan diferencias significativas. Por su parte, los mayores valores de AMY que encontramos de manera aislada (120 minutos) en el grupo E2 en comparación con el control se asocian a un aumento postprandial (pequeño pero significativo) que se da al final del experimento, para el cual no tenemos una explicación plausible.

Teniendo en cuenta el papel de esta hormona en la saciación, la ausencia de aumentos postprandiales en los grupos experimentales teóricamente haría que no se produjera la señal anorexigénica que este péptido posee en base a estudios en los que se administró periféricamente [223-225].

Por otro lado, la co-secreción de AMY con INS en proporción 1/100 [201,218], no se corresponde con lo observado en el grupo control (en que esta relación fue 0.05) ni en los grupos experimentales (0.09 y 0.08 en los grupos E2 y E1, respectivamente). Se desconocen las causas de la no correspondencia con la literatura científica; respecto a nuestro experimento, la diferencia en la relación AMY/INS entre el grupo control y los grupos experimentales posiblemente se deba a la emulsión (ingrediente funcional), que es la única variable que se modificó entre dichos grupos.

La concentración plasmática basal de GIP en el grupo control fue de  $27.4 \pm 5.56$  pg/ml, la cual es similar a la encontrada en la bibliografía, que se sitúa en torno a 20-50 pg/ml en ratas [218,335]. El perfil temporal de respuesta al alimento en este grupo (ver Fig.

16), fue similar al descrito por Kindel *et al.* [335], aunque la caída desde el pico máximo fue menos acusada en dicho estudio en comparación al nuestro. Las ratas del citado estudio tenían 6 semanas más de edad, lo que seguramente no sea un factor a tener en cuenta, ya que no se conoce que exista una influencia de la edad en la secreción de GIP en ratas normopeso. En humanos, la edad tampoco influye en la concentración plasmática de este péptido, ni en condiciones de ayuno ni en respuesta a un OGTT [749].

Las dietas experimentales (conteniendo las emulsiones E1 y E2) también inducen una respuesta significativa al alimento. Además, la secreción total (AUC) es significativamente superior en los dos grupos experimentales en comparación con el control. En roedores se ha observado que los triglicéridos y los FFA estimulan tanto la liberación de INS como de GIP [115,117,331]. Por otro lado los monoglicéridos (como la 1-monooleína) y los DG disminuyen la secreción de GIP e INS [331]. Es posible que cambios en las proporciones de los diferentes productos de la digestión de la grasa presentes en la luz intestinal puedan explicar el comportamiento del GIP en los grupos experimentales, aunque con la información disponible no se puede ofrecer una explicación más concreta.

En relación a la ingesta, el aumento de la secreción de este péptido no afectaría en principio a la ingesta a corto ni a largo plazo en roedores con normopeso [342,343], pudiendo influir de forma positiva sobre el anabolismo lipídico [349], hecho que hay que comprobar si se produce a largo plazo y que en principio sería de relevancia, ya que el objetivo de estas emulsiones es disminuir el BW y por tanto los depósitos de grasa.

En nuestras condiciones experimentales, la concentración plasmática basal en el grupo control para el GLP-1 fue de  $83 \pm 7$  pg/ml, similar a la observada por Reimer *et al.* [730] y Zhao *et al.* [744], que osciló en torno a  $60 \pm 20$  pg/ml. Respecto a la respuesta postprandial en comparación con lo descrito por Reimer *et al.* [730], para un OGTT (2 g/kg). Estos autores no encuentran ninguna elevación postprandial, manteniéndose las concentraciones en torno a 40-60 pg/ml. En nuestro estudio las concentraciones

medias del péptido en el periodo postprandial del grupo control se situaron alrededor de 70-90 pg/ml, valores ligeramente superiores a los comentados [730].

No se puede asegurar con certeza el incremento (no significativo) al final del experimento en el grupo E2, pudiéndose especular alguna hipótesis como una estimulación tardía debido a ácidos grasos que alcanzan las partes distales del intestino como consecuencia de que las emulsiones favorecen este hecho, que estimularían al GLP-1 [116,750,751].

En ayunas, la concentración plasmática de GRN en el grupo control fue de  $84 \pm 14.3$  pg/ml, semejante a la referida por Ghanbari-Niaki *et al.* [435], aunque muy inferior a la observada en las ratas del estudio de Zhao *et al.* [744] que fue de aproximadamente 190 pg/ml. La diferencia con el segundo estudio citado puede radicar en el tiempo de ayuno, que es de 48 horas en comparación con las 36 horas de nuestro estudio, habiéndose descrito una correlación lineal positiva entre tiempo de ayuno y concentraciones circulantes de ghrelina [752]. Por otro lado, la disminución que se produce en nuestro grupo control en respuesta a la comida se asemeja a la de otros estudios como el de Reimer *et al.* [730], aunque ellos sólo miden el péptido hasta los 90 minutos tras la ingestión de alimento y no observan una recuperación de los niveles basales, hecho que si ocurre en nuestro caso a partir de los 60 minutos.

Cuando comparamos el perfil postprandial del grupo control frente a los grupos experimentales (E1 y E2) se observa que la caída inicial tras la comida se prolonga hasta los 60 minutos en el primero y sólo hasta los 30 minutos en los dos últimos. El descenso más prolongado en el grupo control teóricamente redundaría en una saciedad más mantenida en el tiempo, aunque dicha asunción se basa en los resultados de trabajos en humanos a los que se administró GRN exógena [440].

La insulinemia basal en estudios similares al nuestro [218,335] se encuentra alrededor de 1000-1500 pg/ml, lo que coincide con los valores que hemos obtenido en el grupo control. La respuesta a la comida en el citado grupo es comparable a la encontrada por Kindel *et al.* [335] y Shin *et al.* [218] en sus investigaciones, por lo que se puede asumir que la respuesta es la normal para estas ratas.

Tanto en el grupo E1 como en el E2 las concentraciones basales de INS se encuentran significativamente disminuidas respecto al grupo control. No tenemos una explicación para dicho comportamiento ya que no se ha encontrado bibliografía relacionada. *A priori*, un menor valor de INS en ayunas en los grupos experimentales (E1 y E2) podría contribuir a un aumento de la ingesta a largo plazo si tenemos en cuenta el papel de dicha hormona como señal anorexigénica a nivel central [481].

En lo referente a la hormona LEP, su concentración basal fue de  $1375 \pm 184$  pg/ml en el grupo control, mayor que la que dan autores como Yavuz *et al.* [753] ( $780 \pm 120$  ng/ml). Aparentemente esta diferencia no se debe al peso de los animales, ya que las ratas de Yavuz y colaboradores [753] pesan de hecho algo más que las nuestras, por lo que posiblemente haya que buscar la causa en el método de medida. Aunque en la publicación [753] no se menciona, un hipotético empleo de RIA para medir la LEP en las muestras de plasma podría resultar en mayores valores plasmáticos, ya que generalmente este método posee una mayor sensibilidad que el utilizado por nosotros. Este trabajo [753] es el único con el que se pueden comparar nuestros resultados, ya que el resto de bibliografía encontrada difiere mucho en los valores de BW y, por tanto, en la masa grasa de los animales, siendo esto último un factor determinante de las concentraciones plasmáticas de esta hormona. Respecto a la respuesta postprandial de LEP, la bibliografía para ratas con este rango de peso es nula, pudiéndose comentar que en ratas de 600 g de peso se produce un aumento significativo a los 30 minutos, estando la concentración plasmática de LEP en un rango de valores de hasta más de tres veces mayores que los nuestros [730].

Hay que destacar que las concentraciones en ayunas de LEP en nuestros grupos experimentales (E1 y E2) fueron significativamente menores que las del grupo control, lo cual probablemente no se pueda asociar a una menor cantidad de grasa corporal en los grupos experimentales [570,571], ya que ha transcurrido muy poco tiempo desde que están tomando la dieta.

Hemos observado que existe respuesta al alimento en nuestros tres grupos de estudio, aunque en el grupo control se encuentra retrasada en el tiempo. Este hecho hace más complejo el poder explicar el efecto que las emulsiones E1 y E2 tienen sobre la

secreción de esta hormona. Por último, las dietas experimentales no afectan a la secreción total de LEP (AUC) respecto al control.

En definitiva, la menor leptinemia en ayunas en los grupos E1 y E2 (con significación estadística para el grupo E2) redundaría en una menor señal anorexigénica a largo plazo en comparación con el grupo C, haciendo aumentar la ingesta de los grupos experimentales (especialmente E2). Por otro lado, la respuesta postprandial significativa (y más temprana) observada en estos últimos podría quizás tener el efecto contrario, aunque dicho efecto no está del todo claro y únicamente se ha podido estudiar tras administración exógena de la hormona [602].

La concentración basal de PP en el grupo control ( $19.6 \pm 2$  pg/ml) es semejante a la referida en el único estudio comparable encontrado en la literatura científica, que fue de  $18 \pm 2$  pg/ml (Zhao *et al.* [744]). Cabe destacar en lo referente a este péptido la ausencia de estudios que examinen su respuesta postprandial en ratas; solamente hemos encontrado un trabajo en el que administran una suplemento nutricional por vía intragástrica y describen un aumento postprandial a partir de los 15 minutos de dicha administración [754]. Dado el componente nervioso que tiene la respuesta postprandial del PP [507,508], el hecho de que nuestra primera muestra postprandial se tomara a los 30 minutos desde el inicio de la comida podría haber enmascarado la posible respuesta al alimento. En humanos se suele producir un aumento significativo a los 15 minutos y un descenso acusado en los siguientes 15 minutos para luego decrecer paulatinamente [248,283].

No hemos hallado, en los distintos tiempos del periodo postprandial, diferencias significativas entre los grupos E1 o E2 con respecto al control, siendo además el patrón temporal de respuesta a la comida similar en E1 y control, mientras que en el grupo E2, la ingestión de alimento produce un aumento (no significativo) en el minuto 30, posiblemente responsable de que la secreción total (AUC) de PP en E2 sea mayor ( $P < 0.05$ ) respecto al control, con valores intermedios en el grupo E1. Una mayor secreción total de PP teóricamente se asociaría a un efecto anorexigénico, el cual no se traduce en una disminución de la ingesta como se ha descrito antes.

La concentración basal de PYY en plasma en nuestras ratas control fue de  $35.7 \pm 2.2$  pg/ml, que es ligeramente menor a la obtenida por Zhao *et al.* [744] y Shin *et al.* [218], que encuentran unas concentraciones en torno a 50 pg/ml, siendo en el primero las condiciones experimentales muy similares a las de nuestro estudio y en el segundo la única diferencia es la cepa de ratas (Sprague Dawley). No podemos, por tanto, justificar la falta de concordancia entre nuestros datos y los de Zhao *et al.* [744]. Por otro lado, la respuesta a la comida en el estudio de Shin *et al.* [218] no fue significativa, lo mismo que ocurre con el grupo control en nuestro caso.

Tras la comida, las concentraciones plasmáticas de PYY se incrementan ligeramente en ambos grupos experimentales (E1 y E2), aunque los valores solo se hacen significativos frente al basal en el grupo E2 en el minuto 60. Aquí sí parece haber un efecto de las emulsiones testadas, las cuales quizás posibilitan la llegada de más productos de digestión de la grasa sin absorber al intestino distal, lo que se vería reflejado en el aumento de las concentraciones de este GP. De hecho, la secreción total (AUC) es superior en los dos grupos experimentales, aunque no se alcanza significación estadística.

## 2.2. LARGO PLAZO

### 2.2.1. Ingesta

La ingesta media en el grupo control fue de  $19.6 \pm 0.3$  g/d y  $68.3 \pm 1.1$  kcal/d (alimento y energía, respectivamente), similar a la publicada en los estudios de Reimer *et al.* [730] y de Totani *et al.* [755], por lo que se puede considerar normal para esta especie y cepa.

Como se mencionó en Resultados, ambas emulsiones producen un aumento en la ingesta de alimento y energía, hecho que no se puede comparar con bibliografía similar en roedores. Por otra parte, en humanos a los que se administra la emulsión Olibra™ (ver apartado de Antecedentes) se observa, a diferencia de nosotros, una menor ingesta de alimento [145,146] o no se produce modificación significativa [147,148].



Debido a que la composición y la densidad energética de las tres dietas es la misma, excepto en lo que se refiere a las características fisicoquímicas de la grasa, podemos atribuir este aumento en la ingesta en los grupos E1 y E2 o bien a cambios en la palatabilidad o a una influencia sobre los factores que regulan la ingesta, lo que se comentará más adelante.

### **2.2.2. Evolución ponderal**

La evolución ponderal de los animales del grupo control se encuentra dentro del rango normal para la rata Wistar alimentada con dieta AIN-93M [743,756].

El mayor BW observado en el grupo E1 durante la mayor parte del periodo experimental se puede corresponder con el aumento de la ingesta de energía antes mencionado. Sin embargo, y a diferencia de lo que sucede en el grupo E1, el BW de los animales del grupo E2 es similar al control, a pesar de tener una ingesta energética mayor que este último.

### **2.2.3. Peso corporal y de órganos al sacrificio**

En nuestras condiciones experimentales, se observan diferencias significativas en el peso de algunos órganos lo que puede atribuirse a la variación normal entre los individuos de una población y que no posee mayor relevancia.

### **2.2.4. Parámetros e índices de utilización nutricional de proteína y grasa**

La ingesta de nitrógeno en el grupo control fue de  $318.7 \pm 6.5$  mg/d, valor que está por debajo de los mostrados en el estudio de Lecumberri *et al.* [757] y Martín-Carrón *et al.* [758], siendo estos de aproximadamente 425 y 409 mg/d, respectivamente. La discrepancia con el primer trabajo [757] se puede deber al periodo de 21 días muestreado frente a los 7 días del nuestro, y con el segundo [758] a pequeñas diferencias en la composición de la dieta AIN-93M (relacionadas con el contenido en almidón y el tipo de grasa), o en el contenido proteico de la caseína utilizada en las dietas (más raramente).

En nuestro experimento a largo plazo en ratas normopeso, el CDA (digestibilidad de la proteína) y el balance de nitrógeno se sitúan en  $94.5 \pm 0.5\%$  y  $148 \pm 15.8$  mg/d, respectivamente. Si comparamos estos datos con los de Martín-Carrón *et al.* [758],

que obtuvieron valores respectivos de  $89.1 \pm 0.2\%$  y  $130 \pm 10$  mg/d, vemos que nuestros valores son mayores para ambos parámetros. Aunque no sabemos a qué pueden deberse estas diferencias creemos que no tienen mucha relevancia, ya que en los dos estudios los valores se mueven dentro de un rango muy alto. Por otra parte, no se han encontrado datos comparables sobre la utilización metabólica de la proteína expresada como nitrógeno retenido frente al absorbido (R/A).

En el grupo E1 se observa una digestibilidad proteica menor ( $P < 0.05$ ) que en el grupo control, lo cual, de nuevo, no posee mayor significación biológica debido a que los valores son muy altos y en este rango las diferencias no deberían suponer un factor a tener en cuenta. El balance y el R/A son similares entre el grupo E1 y control, lo que indica que la emulsión E1 no modifica la utilización metabólica de la proteína.

En el grupo E2 no se modifica la digestibilidad de proteína ni tampoco el balance de nitrógeno respecto al control. Sí lo hace, de forma significativa, la retención de nitrógeno en relación al absorbido (R/A), con menores valores en el grupo E2 que en el control. Considerando que la rata en este periodo se encuentra en fase de crecimiento, este hecho podría explicar la ausencia de diferencias en el BW entre estos dos grupos, a pesar de una mayor ingesta en el grupo E2.

Con respecto a la utilización digestiva de la grasa, Martín-Carrón *et al.* [758] dan un CDA de  $94.1 \pm 0.8\%$ , similar al obtenido por nosotros ( $95.9 \pm 0.6\%$ ) en el grupo C (control).

En el grupo E1 la digestibilidad de la grasa es similar al grupo control, observándose en el grupo E2 un aumento ligero (aunque significativo) de este parámetro en comparación con el primero. De nuevo, el alto aprovechamiento digestivo de este macronutriente en los tres grupos estudiados nos hace descartar una influencia decisiva de este factor sobre la evolución del BW en el grupo E2.

### **2.2.5. Parámetros hematológicos y bioquímicos**

El perfil hematológico de las ratas del grupo control está dentro de los valores normales para una rata de la cepa Wistar de edad similar [733,759]. Para algunos parámetros hematológicos se han encontrado de manera puntual diferencias entre los

grupos. En principio dichas diferencias no se escapan del rango descrito en la bibliografía [733,759].

En cuanto a la bioquímica plasmática, los valores observados en el grupo control concuerdan con lo descrito por Aparicio *et al.* [760,761]. Ninguna de las emulsiones administradas con las dietas experimentales (E1 y E2) induce cambios significativos en los parámetros bioquímicos medidos en el experimento.

En comparación con otro estudio de Aparicio *et al.* [734], los niveles de colesterol en hígado del grupo control son similares y los triglicéridos en este órgano son superiores en nuestro caso. En el caso del estudio de Aparicio *et al.* se utiliza como fuente de grasa aceite de oliva en contraste con el HOSO utilizado por nosotros. Esto contrasta con lo observado en el estudio de Perona *et al.* [762], en el cual se observan valores superiores de triglicéridos en hígado en el grupo que ingiere aceite de oliva con fuente de grasa dietética respecto al que ingiere HOSO.

Hay que destacar que los triglicéridos presentes en hígado son significativamente menores en los animales que ingieren las emulsiones que en los del grupo control, lo que no es atribuible a la fuente de grasa, ya que en todos los grupos la fuente de grasa en las dietas es HOSO.

### **2.2.6. Concentración plasmática de hormonas gastrointestinales**

La concentración plasmática basal de AMY fue de  $87.7 \pm 12.2$  pg/ml en el grupo control, superior a la que da Hallam ( $43.1 \pm 6.8$  pg/ml) [743]. Esta diferencia puede deberse a la edad de sus animales, que es de 22 semanas, frente a 16 semanas de los nuestros, como ya discutimos anteriormente en el experimento I. Respecto al perfil de respuesta a la ingesta de alimento del grupo control, es similar al descrito en el estudio de Shin *et al.* [218].

La respuesta postprandial observada en el grupo control desaparece en ambos grupos experimentales, lo que podría en parte contribuir a la mayor ingesta observada en los animales de ambos grupos, ya que de acuerdo con la literatura [763], la acción anorexígena de este péptido depende en gran medida de su aumento postprandial.

Si comparamos el perfil de respuesta al alimento de esta hormona (ver Fig. 24) con el de la INS (ver Fig. 25), ambas hormonas se comportan de igual forma, lo cual es lógico teniendo en cuenta la co-secreción de ambas por las células beta pancreáticas [200]. Además, la proporción AMY/INS en los grupos experimentales es similar a la que estos mismos grupos mostraron en el experimento a corto plazo (I), no siendo así en el caso del grupo control, donde la relación está aumentada en este experimento (largo plazo, 0.08) en comparación al anterior (corto plazo, 0.05). En principio, la única variable a la que esto se puede atribuir es a la diferencia de edad entre los animales, aunque no tenemos datos de otros autores que hayan descrito este hecho.

La concentración plasmática de CCK en ayunas para el grupo control fue de  $75 \pm 13$  pg/ml, similar a la descrita por Katanyutanon *et al.* [272]. Los cambios producidos en este grupo tras la ingestión de alimento únicamente se pueden cotejar con los datos aportados por Forssten *et al.* [764], que miden las concentraciones plasmáticas de este péptido gastrointestinal a los 180, 300 y 480 minutos tras la administración de un producto lácteo. En dicho estudio observan una respuesta a los 180 minutos de aproximadamente 75 pg/ml, la cual contrasta con la de nuestro estudio que fue de  $106 \pm 5$  pg/ml. Esta discordancia se puede deber al patrón temporal de toma de muestras.

En comparación con el grupo control, los animales que ingieren la emulsión E1 presentan mayores concentraciones plasmáticas basales de esta hormona y no muestran respuesta a la comida. Por otra parte, en el grupo que recibió la emulsión E2 se observan mayores valores de ayunas, igual que en E1, junto con una respuesta postprandial transitoria.

Ambas emulsiones modifican tanto las concentraciones basales con la respuesta postprandial. Esto podría deberse a factores relacionados con la naturaleza de la emulsión como el tamaño de partícula o la accesibilidad de la lipasa para ejercer su actividad, que pueden hacer que se liberen los FFA en distintas porciones del intestino, lo que influye en la secreción de este péptido tal y como muestran los estudios de Seimon *et al.* [142] y Maljaars *et al.* [143]. Además, Elrichmann *et al.* [765] observan que la presencia de un inhibidor de la lipasa disminuye la secreción de CCK.

El comportamiento de este péptido se relaciona con la cantidad de alimento ingerida por los respectivos grupos, de forma que las dos emulsiones inducen aumentos en la ingesta de alimento en comparación con el grupo control. Es decir, la no respuesta (o la respuesta transitoria) postprandial de CCK en ambos grupos experimentales podría justificar en parte la mayor ingesta de estos grupos, mientras que la respuesta postprandial más marcada (y significativa) observada en el grupo control estaría asociada con una mayor saciación y, en consecuencia, una menor ingesta en este grupo. No obstante, habrá que considerar otros factores en lo que se refiere a la evolución del BW, ya que la emulsión E1 incrementa el BW de forma paralela a la mayor ingesta, mientras que esto no ocurre en el grupo E2.

La concentración plasmática basal de GIP en el grupo control mostró un valor de  $39 \pm 5.1$  pg/ml, el cual se asemeja a la que figura en el estudio de Kindel *et al.* [335], siendo inferior al valor comunicado por Gniuli *et al.* [766] (100 pg/ml). En cuanto a la respuesta a la ingesta de alimento del grupo control, fue comparable a la descrita por Shin *et al.* [218] y más marcada que la que encuentran Gniuli *et al.* [766], aunque esto último es lógico si tenemos en cuenta que la respuesta de este péptido a una dieta que contiene grasa y carbohidratos es mayor que cuando solo se ingieren carbohidratos [327], como es el caso del citado trabajo [766].

Nuestros datos ponen de manifiesto que la administración a largo plazo de las dietas E1 y E2 tiene un profundo impacto sobre la secreción postprandial de GIP. Podemos ver en la Fig. 24 que la respuesta de los grupos experimentales E1 y E2 es sensiblemente menor o no existe si comparamos con el grupo control. Según nuestra información, no se ha examinado hasta la fecha la influencia de distintos tipos de emulsiones sobre la secreción de GIP y sus concentraciones circulantes. Es posible que nuestros resultados se puedan explicar en base al diferente patrón de liberación de FFA en los distintos segmentos intestinales con ambas emulsiones utilizadas.

La concentración plasmática en ayunas de GLP-1 fue de  $63.6 \pm 5.9$  pg/ml en el grupo control, semejante a la que dan Le Roux *et al.* [376]. Respecto al periodo postprandial, si comparamos con un estudio similar (Gniuli *et al.* [766]), se observa que como en nuestro caso, no existe una respuesta significativa, lo que también se ha confirmado

en otros estudios realizados en ratas [730,767]. Cabría resaltar que las concentraciones de GLP-1 en el trabajo de Gniuli *et al.* [766] se mueven dentro de un rango bastante inferior al nuestro (una tercera parte, aproximadamente), siendo en principio la única diferencia destacable la cantidad y calidad de la grasa utilizada (3.2% de grasa (p/p), de la cual 1.3% es tripalmitina frente a la nuestra, que fue 4% de girasol alto oleico). El tipo de grasa puede quizás explicar las diferencias, ya que los ácidos grasos monoinsaturados (mayoritarios en la grasa de nuestro estudio) [362] estimulan la secreción de GLP-1 de forma más potente que los saturados y poliinsaturados. Es posible que, aunque no haya una clara respuesta postprandial, la administración a largo plazo de una dieta conteniendo ácido oleico (nuestra dieta control) haya hecho que las concentraciones circulantes de GLP-1 en este grupo estén elevadas con respecto a las descritas por autores como Gniuli *et al.* [766].

Cabe resaltar que, a largo plazo, la emulsión E1 claramente provoca la aparición de mayores concentraciones plasmáticas de GLP-1, basales como postprandiales, sin que se aprecie una respuesta significativa tras la ingesta de alimento. Las mayores concentraciones de este péptido en plasma respecto al control se pueden deber a la llegada de una mayor cantidad de ácidos grasos a los últimos segmentos del intestino delgado, donde se libera este péptido [768]; a este efecto, además, contribuiría el largo periodo de tiempo (10 semanas) que los animales están ingiriendo la emulsión E1, puesto que no observamos nada similar en el experimento I (corto plazo).

Por el contrario, la emulsión E2 no modifica de forma ostensible las concentraciones de esta hormona en sangre respecto al grupo control.

La concentración de GRN basal en el grupo control osciló alrededor de 80 pg/ml (concretamente  $79.5 \pm 16$  pg/ml), siendo superior a la encontrada por Reimer *et al.* ( $\approx 50$  pg/ml) en animales de más edad y BW. Por el contrario, Englander *et al.* [426] encuentran en ratas jóvenes concentraciones plasmáticas muy superiores a las nuestras, aunque estos autores no especifican el tipo de GRN medida, con lo que suponemos que debe de ser GRN total, mientras que nosotros medimos únicamente la forma activa. En el estudio de Reimer *et al.* [730], la respuesta a una carga oral de glucosa da lugar a una disminución significativa y acusada de la GRN en plasma hasta

los 30 minutos, momento en el cual se estabilizan los valores. En nuestro caso no observamos una disminución tras la comida, permaneciendo las concentraciones similares a las basales hasta el final del ensayo. Sin embargo, debemos tener en cuenta que Reimer *et al.* [730] estudian la respuesta a glucosa oral, monosacárido que produce una importante respuesta supresora de esta hormona (en humanos) [420], mientras que nosotros examinamos la respuesta a una dieta mixta.

Para este GP orexigénico, se ha observado una influencia en la secreción debido a factores como el tipo de alimento [769], la osmolaridad de la dieta [770] o el hecho de si la alimentación es *ad limitum* o con un periodo prefijado de acceso a la comida [771]. En definitiva hay numerosas variables que pueden influir sobre la interpretación de los resultados obtenidos.

Es de destacar que las concentraciones basales de GRN en ambos grupos experimentales (E1 y E2) fueron significativamente superiores a las obtenidas en el grupo control, lo que se puede relacionar de forma directa con la mayor ingesta observada en dichos grupos.

Nuestro grupo control mostró una insulinemia en situación de ayunas de  $1047 \pm 152$  pg/ml, similar a la observada en otros estudios con condiciones parecidas (Kindel *et al.* [335] y Reimer *et al.* [730]). La respuesta a la comida en el citado grupo es, no obstante, más marcada que la referida por Kindel *et al.* [335] (a pesar de que estos autores realizan un test de glucosa) y similar a la descrita por Reimer *et al.* [730].

La respuesta postprandial observada en el grupo E1 fue similar a la del grupo control, en tanto que en el grupo E2 encontramos una disminución de la respuesta global a la ingesta de alimento (únicamente significativa en el minuto 15). Dicha disminución queda reflejada de forma clara en la secreción total de INS (AUC). Estudios con infusión de lípidos en distintos segmentos intestinales han mostrado que estos pueden interferir con la absorción de glucosa [772]. Así, cabe sugerir que diferencias en la liberación de FFA desde las emulsiones o en la cantidad de estos que alcanzan el intestino distal podrían ser responsables de la menor respuesta insulínica a la comida en los grupos experimentales, especialmente E2.

El patrón de secreción de esta hormona en este experimento (II, largo plazo) se relaciona de forma directa con el de AMY y GIP, hecho que es lógico debido a la relación funcional entre ellos mencionada en secciones previas de esta Memoria.

Al comienzo del ensayo, en ayunas, la concentración plasmática de LEP alcanzó valores en torno a  $5635 \pm 714$  pg/ml en el grupo control, coincidiendo con lo observado en el trabajo de Benatti *et al.* [773] (ratas alimentadas con un pienso comercial y utilizando RIA como método de análisis) y con el de Reimer *et al.* [730] (a pesar de la comentada diferencia de edad y BW). Los últimos autores [730] encontraron un aumento acusado a los 30 minutos tras la ingestión de alimento, cuando en nuestro ensayo, el aumento se produce al final del periodo postprandial (120 minutos).

Curiosamente, esta respuesta de la LEP al alimento que encontramos en el grupo control desaparece en los grupos experimentales, hecho que no se ha descrito en la bibliografía en el caso de ratas. En humanos existe gran controversia sobre la existencia, o no, de aumentos postprandiales de LEP tras la ingestión de dietas mixtas [573,774].

Además, se sigue mantenido la correlación entre las concentraciones sanguíneas de INS y LEP, como ocurría en el experimento a corto plazo, quedando más patente si observamos las AUC de ambas hormonas. También se ha postulado que la secreción postprandial de LEP se ve favorecida por la respuesta insulínica, especialmente tras comidas ricas en sacarosa [775,776].

La concentración basal de PP en el grupo control fue de  $37 \pm 3.2$  pg/ml, similar a la observada en los estudios de Havel *et al.* [777] y Akpan *et al.* [527]. Como se comentó anteriormente, no hemos encontrado en la literatura científica referencia alguna sobre estudios en ratas que examinen la respuesta del PP a la ingesta oral de alimento, aunque los datos en otros roedores y en humanos revelan un comportamiento bifásico con un pico a los 15-30 minutos el cual se normaliza para volver a elevarse de forma menos pronunciada y sostenida en las siguientes 4 a 6 horas [514,515]. En nuestro grupo control solo hemos detectado un ligero aumento (no significativo) en el tiempo 15 minutos, aunque como dijimos en páginas anteriores (ver discusión del



Experimento I) nuestro patrón temporal de recogida de muestras de sangre podría haber enmascarado una posible respuesta al alimento

La ingesta a largo plazo de dietas conteniendo las emulsiones E1 y E2 se asocia a menores concentraciones de PP tanto basales como postprandiales, aunque sin respuesta a la comida en ningún caso. Como dijimos en páginas anteriores (ver discusión del Experimento I), nuestro patrón temporal de recogida de muestras de sangre podría haber enmascarado una posible respuesta al alimento. Probablemente la modificación de las propiedades fisicoquímicas de la grasa en las dietas E1 y E2 (emulsionada) pueda también explicar las diferencias entre las concentraciones plasmáticas del péptido en los dos grupos experimentales respecto al control.

En condiciones basales, la concentración de PYY se situó en valores de  $49.6 \pm 3.1$  pg/ml en el grupo control, algo inferior a la encontrada por Le Roux *et al.* [376], lo que puede deberse a su utilización de RIA para la determinación de este péptido. No se observa, en nuestro caso ni en el estudio de Reimer *et al.* [730], una respuesta postprandial evidente, al igual que se ha indicado en humanos, en los que se produce un aumento gradual de la concentración plasmática, alcanzando un máximo a las 2 horas de la ingestión de alimento [547]. Además, la respuesta postprandial de PYY parece ser proporcional a la ingesta calórica [778], y en nuestros estudios de ayunas-postprandial la ingesta era pequeña, ya que se retiraba la comida a los animales a los 15 minutos.

En cualquier caso, las concentraciones (tanto basales como en respuesta al alimento) son superiores en el grupo E1 respecto al control y E2. Este comportamiento en el grupo E1 puede deberse a la llegada, de forma continua a lo largo de 10 semanas, de mayores cantidades de ácidos grasos a porciones distales del intestino delgado, lo que produciría mayores tasas de secreción de PYY [111], hecho que coincide con lo dicho anteriormente para el GLP-1 [116,750,751] y que es totalmente razonable debido a que ambos péptidos se liberan en el mismo segmento intestinal y se ha descrito que en parte se co-secretan [314] por la misma célula.

### **3. EXPERIMENTOS EN RATAS OBESAS**

#### **3.1. Modelo de obesidad**

Basándonos en la revisión de Buettner *et al.* [165], no existe un consenso sobre el periodo y dieta más adecuada para la inducción de obesidad en ratas. En dicha revisión se concluye que existen cambios significativos en parámetros cruciales como el BW, insulinemia y leptinemia desde la tercera semana con una dieta que contiene como mínimo un 45% de las kilocalorías en forma de grasa. Teniendo en cuenta esta recomendación, se estimó un tiempo de 9 semanas y una dieta con un 60% de las kcal en forma de grasa como adecuados para inducir obesidad en nuestros animales.

La ingesta de las ratas durante el periodo de inducción de obesidad fue ligeramente superior a la observada en el estudio de Xu *et al.* [756] y algo inferior en comparación al estudio de So *et al.* [779], utilizándose en estos dos últimos la misma dieta que la empleada por nosotros. La evolución ponderal en nuestros animales es similar a la que se recoge en los estudios antes citados [756,779], por lo que las ligeras diferencias observadas en la ingesta no parecen influir en la ganancia de peso de los animales.

En base a estos dos parámetros, consideramos que nuestro modelo de inducción de obesidad es correcto y se encuentra dentro de la normalidad observada en la bibliografía [756,779].

#### **3.2. Experimento con ratas obesas**

##### **3.2.1. Ingesta**

Tras el periodo de inducción de obesidad, nuestros datos muestran que existe un periodo de adaptación de 2 semanas a las dietas AIN-93M, durante el cual las ratas adecúan su ingesta a la nueva densidad calórica de la dieta, que es mucho menor que la anterior. No se han encontrado estudios anteriores que tengan un diseño experimental parecido al nuestro. Si comparamos la ingesta energética a partir de nuestra 3ª semana experimental con la descrita por Reimer *et al.* [596], que alimentan ratas normopeso con AIN-93, y nos fijamos en el mismo periodo de edad que tienen

nuestros animales, los valores están en un rango de 80-100 kcal/día y el nuestro en 65-73 kcal/día, diferencias que creemos poco relevantes.

La presencia en la dieta de las emulsiones E1 y E3 no modificó el patrón de ingesta de alimento en estos animales, aunque hubo diferencias puntuales en las 2 últimas semanas. Esta situación contrasta con la observada para el grupo E1 normopeso en el experimento a largo plazo (II), el cual presenta una ingesta de alimento superior al grupo control durante la mayor parte del periodo experimental.

### **3.2.2. Evolución ponderal**

La evolución ponderal del periodo de inducción de obesidad como hemos visto fue la normal para este modelo [756,779], existiendo posteriormente tras el paso a la dieta experimental una pequeña disminución de peso relacionado con la adaptación a la dieta. No existe bibliografía que muestre la evolución ponderal después de la inducción de obesidad de forma exacta a nuestro modelo, aunque si comparamos con las curvas de peso de ratas Wistar alimentadas con dieta estándar se puede observar que los pesos mostrados en nuestro experimento se sitúan ligeramente por encima y se van acercando hasta que se igualan [746].

### **3.3. Parámetros e índices de utilización nutricional de proteína y grasa**

No se han encontrado estudios que nos permitan comparar parámetros de utilización digestiva y metabólica en este modelo de rata obesa. Nuestros datos no revelan ningún efecto destacable de la emulsión E1, con la excepción del CDA de proteína y grasa, aunque no consideramos esto como algo especialmente resaltante ya que en ambos casos se supera el 90%, encontrándose en el rango normal para este tipo de roedores.

Más adelante se analizarán las diferencias con el experimento a largo plazo realizado en animales normopeso (II).

### 3.4. Parámetros hematológicos y bioquímicos

Si comparamos nuestros resultados con los del artículo de Artiss *et al.* [780], en el cual se utilizó para inducir obesidad una dieta con el 40% de kcal en forma de grasa durante 6 semanas, observamos que los valores de triglicéridos y colesterol total en plasma son semejantes a los de nuestro estudio. En comparación con el estudio de Reimer *et al.* [781], ambos parámetros son superiores en nuestro caso (probablemente de forma significativa), aunque quizás la diferencia se justifica en parte en que estos autores [781] emplean ratas con obesidad genética. De cualquier forma, los parámetros bioquímicos determinados en nuestro muestran valores significativamente superiores en los animales del experimento III (obesas) que II (normopeso), lo cual indica que a pesar de haber estado durante 10 semanas ingiriendo dietas AIN-93M, las ratas obesas todavía no han vuelto a la normalidad al final del estudio.

### 3.5. Concentración plasmática de hormonas gastrointestinales

Refiriéndonos a los GP y hormonas estudiadas, hay que comentar que la mayoría de la bibliografía encontrada, que se irá citando en lo sucesivo, se centra en los cambios que ocurren en los animales durante o inmediatamente después de la inducción de obesidad, siempre en comparación con sus respectivos controles con dietas estándar. Nuestros resultados solo pueden ser comparables con los de dichos artículos en el sentido examinar si la administración durante 10 semanas de dietas estándar (AIN-93M) modifican las concentraciones de péptidos y hormonas con respecto al estado de obesidad. En definitiva, la existencia de diferencias entre nuestros resultados y los encontrados en la bibliografía podría achacarse a nuestro modelo de intervención, puesto que la determinación de las concentraciones plasmáticas de las hormonas y péptidos tuvo lugar al final de las 10 semanas de periodo experimental.

A lo anterior hay que añadir que se han encontrado escasos trabajos con un modelo de inducción de obesidad similar al utilizado por nosotros, en los que además se estudien los perfiles de estas hormonas y péptidos tanto en ayunas como, especialmente, en respuesta a la comida. En definitiva, estamos convencidos de que los estudios realizados en los próximos años se asemejarán a nuestro modelo, ya que

éste refleja la realidad de una típica intervención nutricional llevada a cabo en un individuo obeso y coadyuvada con un producto funcional que maximice la eficacia de la dieta. Todo esto hace que consideremos nuestros resultados como bastante novedosos.

La concentración basal de AMY en el grupo control fue de  $266.4 \pm 32.1$  pg/ml, valor semejante al observado en ratas obesas genéticas (Zucker) alimentadas durante 12 semanas con una dieta que contiene el 60% de Kcal en forma de grasa [782], por lo que parece que para esta hormona no ha habido un cambio en los valores observados en la obesidad tras las 10 semanas del periodo experimental. Hay que añadir que Boyle *et al.* [242], observan una correlación entre el peso del animal y la concentración circulante de esta hormona, aunque otros autores como Shin *et al.* [218] no encuentran diferencias en entre ratas obesas y normopeso [218]. En niños obesos se observan incrementos en la AMY plasmática de hasta tres veces en comparación con los delgados [783]. Además en este estudio se observa que la pérdida de peso se relaciona con una recuperación de las concentraciones de este péptido observadas en sujetos normopeso [783]. Nuestros resultados en ratas normopeso y obesas sugieren que la inducción de obesidad por una dieta rica en grasa causó una elevación en la AMY circulante que no disminuyó tras la ingesta durante 10 semanas de una dieta estándar, probablemente porque no se produjo en nuestro caso una reducción en el BW de los animales (Figura 31). En relación con la respuesta al alimento, Shin *et al.* [218] refieren una respuesta a los 10 minutos, lo que contrasta con nuestro estudio donde no se observa respuesta postprandial significativa. Además, comparado con lo que ocurre en nuestros animales normopeso tratados a largo plazo (experimento II), en los obesos se produce una pérdida de respuesta al alimento, lo que contrasta con el estudio de Shin *et al.* [218], en el cual la respuesta fue similar en ratas delgadas y obesas.

En el caso de los grupos E1 y E3, no se ve una influencia de las correspondientes dietas experimentales sobre la concentración basal de AMY. Tampoco aparecen, en ninguno de estos dos grupos, aumentos significativos tras la comida. Ligeros cambios durante el periodo postprandial en los grupos hacen que, durante esta parte del ensayo, los valores sean significativamente mayores en los animales del grupo E3 frente a los E1 a

lo largo de la primera hora. Aunque tiene difícil explicación este hecho, puede especularse con un posible papel de las diferencias en el proceso tecnológico utilizado para obtener ambas emulsiones.

La proporción AMY/INS en este caso es de 0.19 en el grupo E1, 0.17 en el grupo E3 y 0.16 en el grupo control, las cuales difieren del experimento a corto y largo plazo, lo que indica que las emulsiones han tenido un efecto sobre ambas hormonas, haciendo que aumente la AMY en relación a la INS. Por otra parte, nuestros resultados sugieren que la obesidad hace que aumente la proporción AMY/INS (debido al aumento de AMY respecto a INS), lo cual no se ha descrito hasta el momento en ratas, observándose por el contrario en humanos que esta proporción disminuye ligeramente [784].

La concentración basal de CCK fue de  $89 \pm 10$  pg/ml en el grupo control. Las investigaciones de Li *et al.* [785] dan como resultado una concentración de  $180 \pm 30$  pg/ml en ratas con obesidad inducida por una dieta alta en grasa y 86.30 pg/ml en el grupo control, valor que es similar al nuestro. Esto nos lleva a pensar que los valores de CCK en ayunas se ven más influenciados por los niveles de grasa en la dieta que por el estado obeso, lo que coincide con otros autores [786]. Además, el que nuestros valores de CCK en plasma se asemejen más al grupo control normopeso cordel estudio de Li *et al.* [785], nos da indicios de que ha habido una recuperación de los valores normales de CCK tras alimentadas nuestras ratas obesas con una dieta estándar. Por otra parte, en nuestras condiciones experimentales no se aprecia en el grupo control una respuesta significativa al alimento, la cual si aparece en el estudio de Guilmeau *et al.* [787] en ratas Zucker obesas genéticas. De nuevo, las diferencias en los diseños experimentales podrían explicar la ausencia de respuesta a la comida en nuestras ratas obesas tras 10 semanas de periodo experimental.

Ni las concentraciones de CCK basales ni las postprandiales muestran diferencias significativas entre los tres grupos (E1, E3 y control), lo cual parece apuntar que las emulsiones no tienen ninguna influencia sobre la secreción de dicho péptido en ratas obesas.

Las concentración plasmática basal de GIP en el grupo control fue de  $40.1 \pm 5.7$  pg/ml, en consonancia con la que dan Gniuli *et al.* ( $\approx 51$  pg/ml) [766] y Shin *et al.* [218] (50-100 pg/ml), siendo en ambos casos ratas con obesidad inducida por la dieta. La respuesta al alimento en ambos estudios ([766], [218]) en las ratas obesas es más acusada pero menos mantenida en el tiempo que en nuestro ensayo, Esto puede estar relacionado con el hecho de que ambos estudios emplean ratas obesas y en el nuestro las ratas obesas llevan 10 semanas con dieta estándar, lo que puede haber influido en la secreción de este péptido. No obstante, nuestra respuesta tampoco es como la de sus ratas normopeso ([766], [218]), en las cuales la magnitud de la respuesta postprandial es similar a la de sus ratas obesas pero moviéndose en un rango menor de concentraciones plasmáticas.

Como ocurriera con la CCK, la obesidad (experimento III) hace desaparecer los efectos diferenciales de las emulsiones sobre la secreción de GIP que sí vimos en ratas normopeso (experimento II).

Respecto al GLP-1, la concentración basal en el grupo control fue de  $143.8 \pm 22.6$  pg/ml. En ratas con inducción dietética de obesidad se observaron valores basales alrededor de 50 pg/ml en el estudio de Shin *et al.* [218] y 16 pg/ml en el Pyra *et al.* [788]. Por otro lado, en ratas Wistar obesas genéticas [789] y Zucker [790] se han referido concentraciones basales de este péptido similares a nuestras ratas obesas (tras el periodo de normalización de la dieta sin cambios en el BW). Estas últimas observaciones, junto con los valores (más bajos) que encontramos en el grupo control de ratas normopeso (experimento II) sugieren la ausencia de una recuperación de los niveles de este péptido en nuestras ratas.

Los tratamientos experimentales (E1 y E3) no afectan a las concentraciones de GLP-1, que son en todo momento similares a las del grupo control. De hecho, el efecto de la emulsión E1 que pudimos observar en el experimento anterior (II), consistente en mayores concentraciones de GLP-1 en comparación con los otros dos grupos, desaparece en los animales obesos.

En condiciones de ayunas, la concentración de GRN en plasma fue de  $81.1 \pm 16.8$  pg/ml en el control, sensiblemente menores que los que encuentran Pyra *et al.* [788] y Shin *et al.* [218], que se sitúan en torno a 226pg/ml y 250 pg/ml, respectivamente. La no concordancia entre nuestro estudio y el primero [788] podemos atribuirla quizás a diferencias en el modelo de inducción de obesidad, puesto que ellos utilizan una dieta alta en grasa y sacarosa (HF/HS) durante 13 semanas, aunque autores como Lindqvist *et al.* [791] encuentran menores concentraciones de GRN en ayunas tras una dieta HF/HS al comparar con su correspondiente control. Respecto al estudio de Shin *et al.* [218], sus ratas reciben la misma dieta que nosotros para inducir la obesidad, pero ellos la administran durante aproximadamente 28 semanas. No obstante, estos autores [218], al igual que otros [792] no ven diferencias entre las ratas normopeso y las obesas. Es conveniente apuntar que las investigaciones realizadas en humanos muestran, en términos generales, una disminución de la GRN plasmática en individuos obesos [448]. En nuestro caso, los valores obtenidos en ratas control normopeso (Experimento II) y ratas control obesas (Experimento III) están dentro del mismo rango (en torno a 75-80 pg/ml), aunque es difícil con nuestros datos precisar si se debe a que no ha habido cambios o a que los valores han vuelto a la normalidad tras las 10 semanas consumiendo la dieta estándar. En cualquier caso, habría que puntualizar que la metodología empleada en los últimos años para cuantificar la GRN en plasma complica enormemente la comparación entre estudios, especialmente debido a que algunos autores miden GRN total y otros GRN activa [218,730,793].

En nuestras condiciones experimentales, la inducción de la obesidad y posterior alimentación durante 10 semanas con la dieta AIN-93M conteniendo emulsión E1 hace que los valores basales de GRN se asemejen a los del grupo control, desapareciendo las diferencias existentes entre estos dos grupos en las ratas normopeso (experimento II). Por lo tanto, se observa que la obesidad hace que el efecto de la emulsión se modifique.

La concentración plasmática basal de INS alcanzó valores de  $1695 \pm 283$  pg/ml en el grupo control. La insulinemia en ratas con DIO varía desde 1000 pg/ml en el trabajo de Shin *et al.* [218] a 1800 pg/ml en el estudio de Gniuli *et al.* [766], encontrándose por tanto nuestros valores dentro de ese margen. No podemos asegurar si en nuestras



ratas la insulinemia se encontraba más alta justo al terminar el periodo de inducción de obesidad que al final de la experiencia (después de 10 semanas), tal y como han confirmado Guo *et al.* [794] en ratones, aunque sí es probable, ya que los valores de ayunas del grupo control en este experimento III (Figura 35) son superiores en comparación con los correspondientes de nuestras ratas normopeso (Figura 25).

Es interesante resaltar que en el grupo control (ratas obesas que posteriormente reciben durante 10 semanas la dieta estándar control) no hay respuesta en INS al alimento, lo que quizás esté relacionado con el estado metabólico de estos animales. De hecho, el test de tolerancia a glucosa oral (OGTT) realizado durante el periodo experimental (Figura 33) muestra unas curvas que, junto con los elevados valores de INS basales, indican una situación compatible con una resistencia a la INS y un cierto grado de disfunción de la célula beta-pancreática [795,796]. Aun así, otros autores sí observan respuesta insulínica a la comida y a glucosa oral (OGTT) en condiciones de obesidad [797,798].

No aparecen diferencias significativas entre los tres grupos de estudio en ningún momento a lo largo del periodo postprandial. Al igual que observamos en ratas normopeso (exp. II), la concentración de INS durante el periodo postprandial fue ligeramente superior en el grupo control que en el E1, sin alcanzarse tampoco significación estadística.

La LEP presentó una concentración basal de  $8982 \pm 540$  pg/ml en el grupo control. En el estudio de Li *et al.* [785], en el que la duración del periodo de inducción de obesidad fue de 10 semanas con una dieta con un 45% de la energía en forma de grasa, se observó una concentración basal de  $5660 \pm 660$  pg/ml en las ratas con predisposición a la obesidad (DIO), de  $3170 \pm 520$  pg/ml en las resistentes a la inducción (DR) y de  $2430 \pm 420$  pg/ml en las control. Las diferencias con nuestros datos se deben, en el caso de las resistentes y controles, a las diferencias en el BW existente entre los animales (384 g en las DR y 410 g en el control frente a los 468 g de nuestras ratas obesas control). Sin embargo, los valores plasmáticos de LEP en las DIO [785] son inferiores a los obtenidos por nosotros para pesos muy similares (467 g frente a 468 g), lo que quizás podría justificarse en base a diferencias en la composición corporal de las ratas

por el mayor contenido en grasa de nuestra dieta obesogénica (60% de las kcal), en el periodo de tiempo con la dieta estándar tras la inducción de la obesidad, en la edad de los animales o en el método utilizado para medir la LEP en los estudios mencionados. Guo *et al.* [794] observaron en ratones DIO con un posterior cambio a una dieta estándar que la concentración plasmática de LEP no volvió a niveles considerados “normales”, al menos a lo largo del periodo estudiado (19 semanas), lo que probablemente coincide con la situación que ocurre en nuestras ratas.

Las emulsiones no afectaron a las concentraciones basales de esta hormona, al igual que ocurría en las ratas normopeso en el experimento a largo plazo (II).

La emulsión E1 se asocia a una ausencia de respuesta a la comida (que sí se observa en el grupo control), lo mismo que ocurría en nuestras ratas normopeso (experimento II), hecho del que no existe bibliografía relacionada. Existen algunas diferencias significativas puntuales (a los 30 y 120 minutos) entre los grupos control y E1, que posiblemente no tengan especial relevancia.

En general hemos encontrado concentraciones superiores de esta hormona en ratas obesas en comparación a las normopeso, lo cual es lógico teniendo en cuenta la diferencia en la cantidad de grasa corporal debido tanto a la inducción previa de la obesidad como a la edad de los animales.

La concentración basal de PP osciló en torno a los 37 pg/ml ( $37.6 \pm 5.1$  pg/ml) en el grupo control. En relación a la bibliografía disponible, no se han encontrado trabajos que midan concentraciones basales o postprandiales de PP en ratas con obesidad inducida por la dieta. Se puede comparar con los valores observados en ratas normopeso [527,777] y con nuestras propias ratas del segundo experimento, lo que pone de manifiesto la existencia de concentraciones semejantes, tanto en ayunas como en respuesta al alimento. En principio el comportamiento observado parece no coincidir con lo descrito en humanos (ver sección de Antecedentes).

En cualquier caso, parece que la obesidad hace que desaparezca la ligera respuesta a la comida observada en el grupo control, así como las diferencias entre los grupos de estudio.

En situación de ayunas, la concentración plasmática de PYY alcanzó valores de  $65.1 \pm 10.2$  pg/ml en el grupo control, semejante a la observada en las ratas obesas de los estudios de Shin *et al.* [218] y Li *et al.* [785]. Además, coincidimos con ambos autores en la ausencia de diferencias significativas en las concentraciones basales de este péptido entre animales obesos y normopeso. Por ello creemos que, tal y como han descrito otros autores, la secreción de este péptido depende más de la cantidad de grasa presente en la dieta que del BW. Además, aunque los modelos experimentales no son iguales, nuestros resultados coinciden con los de Shin *et al.* [218] en que no hay en ningún caso respuesta al alimento. Esto parece indicar que las concentraciones de este péptido en ratas no se modifican de forma significativa con la obesidad.

En general, tanto los valores basales como los obtenidos en respuesta a la comida no se ven afectados por las emulsiones (E1 y E3) respecto al grupo control, aunque las concentraciones tienden a ser ligeramente mayores en el grupo E3.

#### **4. COMPARACIÓN ENTRE RATAS NORMOPESO DE LA EXPERIMENTO A CORTO PLAZO Y A LARGO PLAZO**

Si comparamos la ingesta del grupo control en el periodo equivalente entre el experimento a corto plazo y el de largo plazo, se observa que en el primero los animales ingieren una cantidad mayor de alimento en comparación con el segundo, tendiéndose a igualar al final de esa semana, y ocurriendo algo similar con la evolución ponderal, lo cual no tiene gran relevancia debido a que ambos se encuentran en los rangos normales para esta cepa según la bibliografía anteriormente comentada [730,735,736,755].

Los índices de digestibilidad de la proteína se sitúan en un rango de 93-94%, siendo las diferencias entre los dos experimentos (I y II) muy pequeñas para ser consideradas de importancia. Por otro lado, el índice R/A revela una mayor retención de nitrógeno en las ratas de la experiencia a corto plazo (I), lo que *a priori* coincide con lo observado en este animal por otros autores [799], que han mostrado una disminución del balance

de nitrógeno con la edad (aunque son ratas mayores que las nuestras). Observaciones en el mismo sentido se han hecho en otras especies, como el ternero [800].

Analizando de forma global las concentraciones plasmáticas de péptidos gastrointestinales y hormonas encontradas en el grupo control en las dos experiencias realizadas a corto (I) y largo (II) plazo observamos que:

- Las concentraciones en ayunas en las ratas del grupo control fueron semejantes en el caso de la AMY, GIP, GLP-1, GRN e INS. Las concentraciones de LEP fueron, sin embargo, superiores en los animales de la experiencia a largo plazo (II), lo que está relacionado con la mayor masa grasa corporal que por razones de edad deben de poseer los animales de dicha experiencia en comparación con la primera [570,801]. Por otro lado, también encontramos concentraciones plasmáticas basales superiores de PP y PYY en la experiencia a largo plazo (II). Respecto al PYY, no se ha visto en humanos un aumento de la secreción con la edad [545], aunque en ratas sí se ha descrito un aumento del número de células productoras de dicho péptido [802]; respecto al PP, sí hay estudios, al menos en humanos, que confirman la existencia de aumentos de su concentración en plasma con la edad [517,518].
- Comparando la respuesta postprandial entre el grupo control a corto y largo plazo, encontramos que en el segundo caso (II) existe una mayor respuesta al alimento para INS, GIP, y AMY, estando las dos últimas relacionadas en roedores con la cantidad de energía ingerida [204,315,316,803], y también en humanos en el caso de la INS [804,805]. Estos cambios pueden estar relacionados con diferencias en la cantidad de alimento ingerido durante el tiempo que se les facilita comida en los ensayos de ayunas/postprandial. Además, también puede haber una influencia de la edad sobre GIP e INS, puesto que se ha visto una mayor respuesta con la edad en humanos [369,749] en el caso del primero, y en ratones, en el caso de la segunda [806,807]. Respecto a la AMY, sólo se ha observado una disminución en los individuos de mediana edad comparado con los jóvenes. Además, como se ha mencionado en secciones previas, INS, AMY y GIP se relacionan entre sí [201,315], por lo que unos pueden influir en el aumento de otros. Por último,

el típico descenso postprandial de la GRN plasmática, muy obvio en el grupo control de la experiencia I, no se observa en los animales de mayor edad, lo que concuerda con lo que ocurre en humanos [591], existiendo gran controversia sobre este aspecto en los roedores [426,808].

Cuando analizamos las concentraciones de péptidos y hormonas en los animales del grupo E1 de ambas experiencias, encontramos lo siguiente:

- En el caso de AMY, GLP-1, GRN, LEP y PP, se observan diferencias significativas en las concentraciones basales entre la experiencia a corto (I) y largo (II) plazo, con mayores valores en la segunda. Para la LEP podemos argumentar que el incremento se debe al aumento en la masa grasa de los animales por la mayor edad [809]. En el caso del PP se desconoce la causa, pudiendo deberse al propio aumento observado con la edad, como se ha visto en humanos [517,518]. En el resto de péptidos (AMY, GLP-1 y GRN) los cambios observados podemos únicamente atribuirlos al efecto acumulativo que habría tenido la ingesta de la dieta con emulsión E1 de forma continuada durante 10 semanas (largo plazo).
- En el experimento II, la respuesta a la comida se atenúa en el caso del GIP y desaparece en la GRN y LEP. En el GIP, este efecto podría relacionarse con el hecho de que las emulsiones lipídicas pueden interferir con la absorción intestinal de carbohidratos, que son el principal estímulo para la liberación de este péptido [327], aunque es sólo una hipótesis que no se ha estudiado. En el caso de la GRN, el comportamiento del grupo E1 en el experimento II se podría explicar de la misma forma que lo hemos hecho para el grupo control. Respecto a la LEP, Respecto a la LEP, la desaparición de su respuesta postprandial en los grupos experimentales (E1 y E2) en el experimento II es difícil de explicar. Aunque en el grupo control se observa cierta atenuación, en los grupos experimentales (E1 y E2) el efecto es mucho más drástico, por lo que es posible que pueda ser más aún si tenemos en cuenta la consecuencia de la administración a largo plazo de las emulsiones. Sin embargo, no podemos ofrecer un mecanismo plausible, más aun teniendo en cuenta el poco consenso existente en la bibliografía acerca de la respuesta al alimento

de esta hormona, habiendo autores que la encuentran y otros que no (humanos) [584,730,810,811].

En cuanto al grupo E2:

- Al igual que en el E1 y el control se observan concentraciones basales superiores en la LEP y PP. Este hecho parece apoyar nuestra interpretación previa acerca del efecto de la edad sobre estos péptidos.
- Solo aparecen diferencias entre las experiencias a corto y largo plazo en la respuesta postprandial del grupo E2 en el GIP y GRN. En ambos casos la respuesta al alimento está atenuada en la experiencia a largo plazo (II), lo cual se puede explicar de acuerdo con lo dicho para la emulsión E1, ya que en esta última el comportamiento es similar.

El análisis de los resultados obtenidos en los experimentos en animales normopeso a corto y largo plazo nos conduce a los siguientes comentarios generales:

En los experimentos a corto plazo no se observa diferencias significativas entre el grupo control y los dos grupos que ingieren las emulsiones E1 y E2 en los parámetros estudiados. No aparecen diferencias relevantes en la ingesta de alimento, energía y macronutrientes, BW, utilización digestiva y metabólica ni en las concentraciones plasmáticas de distintos péptidos gastrointestinales, INS o LEP y, si aparecen, no pueden atribuirse, en principio, a la presencia de las emulsiones de grasa en la dieta.

En los experimentos a largo plazo, la presencia de las emulsiones grasas en la dieta (E1 y E2) si tiene efectos sobre distintos parámetros al compararlos con los obtenidos en el grupo control. Así, ambas emulsiones inducen un aumento significativo en la ingesta de alimento, energía y macronutrientes, siendo dicho aumento mayor en el caso de la emulsión E1. Del mismo modo se comporta el BW, siendo significativamente mayor frente al control y E2 el peso alcanzado por los animales que ingerían la dieta con la emulsión E1. Esto ocurre aunque la ingesta en E1 y E2 es mayor que la del control. Por

tanto, a pesar de una ingesta de alimento y energía mayor, los animales del grupo E2 no incrementan su BW.

Es de destacar, asimismo, que la utilización metabólica de la proteína estimada por la relación de nitrógeno retenido frente al absorbido es inferior en ambos grupos experimentales, E1 y E2 que la obtenida en el grupo control, siendo las diferencias significativas para el E2.

Por último, aparecen diferencias en las concentraciones plasmáticas de los distintos péptidos y hormonas estudiados, tanto en ayunas como postprandiales. Respecto a la GRN, péptido orexígeno, las mayores concentraciones plasmáticas las presenta el grupo E1, siendo estas diferencias significativas en los valores obtenidos en ayunas. Este hecho habla a favor de una mayor ingesta en los animales que tienen valores preprandiales elevados de este péptido gástrico.

En relación a las concentraciones plasmáticas de INS y LEP, dos hormonas relacionadas con las señales metabólicas que a largo plazo regulan la ingesta de alimentos, nuestros resultados muestran una menor respuesta postprandial en ambos grupos experimentales, E1 y E2, frente al control, lo que es compatible con la mayor ingesta observada en ellos.

Los dos péptidos que se liberan en el intestino distal, el PYY y el GLP-1, con acción anorexígena (“freno ileal”) y cuyo principal estímulo es la presencia de productos de la digestión de la grasa en el lumen de esos segmentos, presentan concentraciones plasmáticas mayores en el grupo E1, lo que sin embargo no concuerda con la mayor ingesta de alimento observada en este grupo.

De igual forma, las concentraciones plasmáticas de CCK, péptido anorexígeno que se secreta por la presencia de productos de la digestión de la grasa en segmentos proximales del intestino delgado, presenta mayores concentraciones basales en los grupos E1 y E2, que a su vez tienen mayor ingesta, aunque bien es cierto que la respuesta a la comida (marcada y significativa en el grupo control durante todo el periodo postprandial) en esos grupos o no existe (E1) o es muy efímera (E2). Esta ausencia de incrementos postprandiales impediría que la CCK ejerciera su efecto de

saciación (inhibición de la ingesta). Por otro lado, las menores concentraciones plasmáticas de AMY en los dos grupos experimentales, junto con la ausencia de respuesta al alimento, si está de acuerdo con las mayores ingestas que se aprecian en ambos grupos, ya que este péptido co-secretado con la INS, tiene un efecto anorexígeno a corto plazo.

En conjunto los resultados obtenidos en ratas normopeso nos hablan de que la posible acción de las emulsiones lipídicas (E1 y E2) sobre la ingesta de alimentos, la utilización digestiva y metabólica de la grasa y la proteína, las concentraciones plasmáticas de péptidos y hormona relacionadas con la ingesta de alimentos y, en último término, sobre el BW, no se produce por su administración a corto plazo. Para observar estos efectos las emulsiones deben administrarse durante varias semanas. Sin embargo, el pretendido efecto anorexígeno o un efecto encaminado a disminuir la eficiencia digestiva de energía y nutrientes de la dieta, no se observa en nuestro estudio, ya que de hecho, la ingesta de alimento en los animales con las dietas que incluyen las emulsiones (E1 y E2) es mayor, y la digestibilidad de la grasa y la proteína es muy similar, y con valores muy altos, a la observada en el grupo control. El comportamiento de las concentraciones plasmáticas (basales y postprandiales) de los péptidos y hormonas estudiadas tampoco nos permite concluir si globalmente predomina una estimulación de la ingesta o un efecto anorexígeno. Solo podemos destacar un hecho que debe ser estudiado más a fondo, y es la menor utilización metabólica de la proteína que presentan los animales del grupo E2 que, al mismo tiempo y teniendo una mayor ingesta que el grupo control, no difieren de este en el BW.

Creemos, a la vista de estos resultados, que los pretendidos mecanismos de acción de las emulsiones ensayadas, que eran la obstaculización del acceso de la lipasa pancreática a la grasa y la llegada a los últimos segmentos del intestino delgado de una mayor cantidad de productos de digestión de la grasa no absorbidos para así disminuir por un lado la absorción de grasa (y en consecuencia de calorías) y por otro estimular la liberación de péptidos gastrointestinales relacionados con la ingesta de alimentos y con el “freno ileal”, no han conseguido tener, en nuestras condiciones experimentales y en este modelo animal, el efecto deseado.



## 5. COMPARACIÓN ENTRE RATAS NORMOPESO Y OBESAS

Tanto la ingesta como el BW del grupo control son similares a lo descrito en la bibliografía.

En ambos experimentos (II y III) se observa que el CDA de proteína y grasa se sitúa por encima del 90%; por otra parte, el porcentaje R/A de nitrógeno en el experimento III alcanza un valor de casi el doble con respecto al observado en el experimento II. No existe bibliografía disponible que muestre una mejora de la eficacia metabólica (utilizando los mismos índices que nosotros) tras la inducción de obesidad, aunque sí se observa en otros trabajos una adaptación del intestino dirigida a la mejora de la absorción de grasa en situación de obesidad [812,813].

Comparando las concentraciones plasmáticas del grupo control en los experimentos a largo plazo sin (II) y con (III) inducción de obesidad, se observa:

- AMY, GLP-1 Y LEP del grupo obeso poseen una mayor concentración basal, permaneciendo el resto sin variaciones significativas. Se ha observado una elevación de las concentraciones plasmáticas de AMY en individuos obesos aunque parece que está asociada a hiperinsulinemia [232,233], hecho que aquí no se observa, por lo que este efecto tiene difícil explicación debido a la escasa bibliografía. Si cabe destacar que estas concentraciones elevadas de AMY se asocian a un estado de insensibilidad al efecto de la AMY aguda [242]. En relación al GLP-1, en humanos no parece haber cambios asociados con la obesidad [814], o bien se produce una disminución [399], hecho que contrasta con lo observado en nuestra experiencia, aunque tampoco se conoce con seguridad la causa. Las concentraciones plasmáticas de LEP están en las ratas obesas control (experimento III) dentro del rango esperado, y parecen reflejar el aumento de la masa grasa corporal, aunque el BW sea similar al del experimento II. De hecho, nuestras ratas obesas experimento III tienen más grasa corporal (ver Tabla 13) que las ratas normopeso con peso y edad similar del estudio de DiGirolamo *et al.* [809].

Respecto E1 se puede comentar:

- Concentraciones basales superiores en el grupo E1 normopeso (experimento II) para la CCK y GRN. Estas diferencias se deben probablemente a la obesidad, que anula el efecto que provocaba la emulsión E1 en el experimento a largo plazo en normopeso (II).
- Para AMY, GLP-1, LEP y PYY, las concentraciones basales son significativamente más elevadas en el grupo obeso (III), lo que en el caso de la AMY [232,240,241] y LEP [572,815,816] se puede relacionar directamente con el aumento descrito en sus concentraciones circulantes en situación de obesidad. En ratas, el GLP-1 aparentemente no modifica sus concentraciones en la obesidad [218], y las de PYY disminuyen [561,562] al menos humanos. En relación a los dos últimos péptidos, no se descarta un efecto de la emulsión, aunque se desconoce el mecanismo por el cual actuaría.
- Las concentraciones circulantes de AMY y LEP en el grupo E1 obeso (III) son significativamente superiores que las que muestra el grupo E1 normopeso (II), y eso se mantiene a lo largo de todo el periodo postprandial. En el caso de la AMY, no serían atribuibles a la obesidad ya que como se observa en el estudio de Shin *et al.* [218] no existen diferencias entre normopeso y obesas, aunque las condiciones experimentales no son exactamente las mismas que las nuestras. En el caso de la LEP, resulta lógica la correlación positiva entre sus concentraciones plasmáticas y la cantidad de tejido adiposo [570,571].

En conjunto, los resultados obtenidos en el experimento III, realizado en ratas con obesidad inducida por una dieta rica en grasa (60% de las calorías totales), nos permiten hacer las siguientes consideraciones:

No vamos a incluir en estos comentarios a los animales que han ingerido la dieta con la emulsión E3, ya que esta emulsión no está incluida en el diseño experimental de los

ensayos realizados en ratas normopeso. Por ello las comparaciones se harán entre el grupo control y el que ingería la dieta con la emulsión E1.

Las diferencias en la ingesta de alimento y de energía entre los grupos C y E1 son mínimas, se circunscriben a las últimas semanas del experimento y, además, son aparentemente transitorias. Sí se observan en el grupo E1 ingestas mayores de grasa y proteína a partir de la tercera semana de iniciado el experimento III.

Las pequeñas diferencias en la ingesta de alimento, energía y macronutrientes no se reflejan en el BW de los animales ni en su evolución a lo largo del experimento, no apreciándose diferencias significativas entre los grupos C y E1.

Si examinamos los resultados de utilización digestiva de la grasa y la proteína observamos que la emulsión E1 disminuye de forma significativa, respecto al control, los coeficientes de digestibilidad aparente (ADC) de ambos macronutrientes, aunque aun así los valores se mantienen dentro del rango de normalidad para este parámetro (mayores del 90%). Sin embargo, la utilización metabólica de la proteína, estimada por el porcentaje de nitrógeno retenido frente al absorbido, no muestra diferencias entre grupos (Control vs. E1).

En ratas obesas no existen, en ningún caso, diferencias entre los grupos control y el E1 en las concentraciones plasmáticas en ayunas de ninguno de los péptidos y hormonas estudiados. Si exceptuamos al GIP, ninguno de los otros péptidos y hormonas presenta una respuesta clara y significativa a la ingestión de alimento. En la que sí existe esta respuesta, GIP, no aparecen diferencias significativas entre los dos grupos, control y E1.

Todo ellos nos lleva a poder afirmar que, en animales en los que se ha establecido una obesidad inducida por la dieta, la emulsión E1 no parece afectar a los patrones de secreción de ningunos de los péptidos y hormonas relacionados con la ingesta de alimento, lo que a su vez se ve reflejado en los patrones de ingesta de alimento y energía y en la evolución ponderal de los animales, siempre teniendo en cuenta la utilización digestiva de grasa y proteína (mayor ingesta, menor CDA de grasa y proteína, igual peso).

La obesidad incrementa los valores de AMY en plasma de forma significativa en todos los grupos. No existe respuesta a la ingestión de alimento en ningún grupo obeso, a diferencia de lo observado en animales normopeso. Podemos apuntar que en animales obesos la emulsión E1 no afecta, como si ocurría en los normopeso, a la respuesta postprandial.

Las concentraciones plasmáticas basales y postprandiales de CCK de los grupos control y E1 en los animales obesos y del grupo control en los normopeso son semejantes. Existe respuesta a la comida en las ratas normopeso del grupo control que desaparece con las emulsiones.

En el caso del GIP, en los experimentos a largo plazo con animales normopeso si se detecta una clara influencia de las emulsiones frente al grupo control. La respuesta es máxima en este último, mientras que las concentraciones postprandiales en E1 aumentan significativamente con respecto al basal pero con una respuesta marcadamente inferior a la del grupo control, y finalmente en E2 no existe respuesta. En obesos, no cambian los niveles basales y en todas existe una respuesta a la comida similar que se mantiene durante todo el periodo postprandial estudiado (120 min).

Respecto a los péptidos ileales (GLP-1 y PYY), sus concentraciones plasmáticas no presentan en ratas obesas el mismo comportamiento observado en ratas normopeso; en estas, la emulsión E1 tuvo un efecto similar sobre las concentraciones de ambos péptidos, elevándolas. En ratas obesas, las concentraciones plasmáticas basales de ambos péptidos son superiores a las de normopeso, aunque tampoco existe respuesta a la comida. La emulsión E1, sin embargo, no ejerce ningún efecto a diferencia del observado en ratas normopeso a largo plazo (II).

El péptido orexígeno GRN presenta en los dos grupos de ratas obesas, C y E1, valores similares a los correspondientes del grupo control normopeso. De nuevo, la obesidad hace desaparecer el efecto (aumento) que tenía la emulsión E1 sobre las concentraciones plasmáticas de esta hormona en animales no obesos.

El comportamiento diferencial de la INS es la desaparición de la respuesta postprandial en los animales obesos, sin haber diferencias entre controles y E1 como tampoco las

había en ratas normopeso. La INS, como era de esperar, presenta concentraciones plasmáticas más elevadas en los animales obesos en ayunas y durante todo el periodo experimental. En el caso de la emulsión E1, parece producirse un efecto contrario en ambos modelos (disminución de la concentración de LEP en normopeso y aumento en obesas), aunque se trata de cambios puntuales. .

En conjunto, los resultados obtenidos en ratas obesas (experimento III) muestran una ausencia de efecto de la emulsión sobre las concentraciones plasmáticas de los distintos péptidos y hormonas estudiadas (anorexígenos y orexígenos), a diferencia de lo descrito en animales normopeso a largo plazo (experimento II). Las diferencias más destacables respecto a las ratas no obesas se circunscriben a concentraciones basales superiores de AMY, GLP-1 y PYY, tres péptidos anorexígenos, y de INS, relacionada con la mayor masa grasa de los animales obesos.

## 6. ESTUDIO EN HUMANOS

### 6.1. CONCENTRACIONES DE GP

La concentración basal de GIP en el grupo control fue de  $15.4 \pm 1.8$  pg/ml, ligeramente inferior a lo observado en diferentes estudios [336,362,817]. En cuanto a la respuesta a la ingesta de alimento, los incrementos sobre el valor basal son similares a los del estudio de Thomsen *et al.* [362] y Cani *et al.* [336], por lo que se puede considerar que nuestro grupo control se encuentra dentro del rango normal en el patrón de secreción de este péptido en respuesta a la comida.

La concentración este péptido en ambos grupos (control y E1) se diferencia de forma significativa en las horas 3 y 4 postprandial. La emulsión da lugar a una menor secreción total de GIP, como muestra el AUC. La causa puede estar en un impedimento en la liberación de FFA en el intestino proximal debido a la estructura de la emulsión, lo que pone de manifiesto la necesidad de la absorción de estos FFA para que se secrete dicho péptido [319].

Si lo comparamos con los experimentos realizados en ratas, la tendencia es similar a la observada en la experimento a largo plazo en ratas normopeso, lo que contrasta con

el hecho de que en humanos se trata de una experiencia en agudo y en ratas en crónico. Esto realza la importancia de realizar estudios a más largo plazo en humanos.

La concentración de GRN basal alcanzó valores en torno a  $97.9 \pm 19.9$  pg/ml en el grupo control, valor ligeramente inferior al referido por Korner *et al.* [436], y similar al registrado por Jacobsen *et al.* [817]. La respuesta al alimento de este péptido es muy variable en humanos dependiendo de distintos factores [818], lo que la hace difícil de comparar los resultados con los de otros estudios.

Existe una diferencia altamente significativa en las concentraciones basales de esta hormona entre los grupos C y E1, siendo menor en los individuos del último grupo. Teniendo en cuenta el carácter orexígeno del péptido, cabría esperar que en los individuos del grupo experimental (E1) la sensación de hambre al principio del experimento fuera menor, sin embargo no se observan estas diferencias cuando estudiamos dicha sensación a través de un test subjetivo (Figura 39). Por otro lado, la presencia de la emulsión en la dieta parece provocar una menor respuesta postprandial para dicho péptido en este grupo experimental (E1), cuya magnitud es proporcional a las concentraciones en ayunas. Debido a que aparentemente no se modifica la ingesta a corto plazo, sería interesante administrar dicha emulsión a largo plazo, como se realizó en las ratas, para ver posibles cambios en las concentraciones plasmáticas de este péptido y en la sensación de saciedad.

La INS mostró una concentración basal de  $256 \pm 19.2$  pg/ml en el grupo control, la cual se encuentra en consonancia con la encontrada por Korner *et al.* [436] y Juntunen *et al.* [819]. En cuanto a la respuesta a la comida, es superior en ambos estudios ([436], [819]) respecto a la observada por nosotros, debido seguramente a diferencias en el diseño experimental y en los métodos empleados, como que ellos miden la hormona por RIA, y el tipo de alimento administrado es Optifast® (474 ml) en el primer artículo y pasta (179 g) en el segundo. Salvo esos detalles, se puede considerar normal la respuesta de nuestro grupo control.

A pesar de que en el grupo control se observa una secreción total superior de péptido, no existe una respuesta significativa al alimento. En el grupo E1, al contrario, se

observa una menor secreción total y una repuesta significativa a alimento en las primeras 4 horas postprandiales. No podemos explicar estas diferencias en base a la presencia de la emulsión en la dieta.

Si tenemos en cuenta el papel anorexigénico de esta hormona a largo plazo, los resultados de insulinemia podrían relacionarse con un aumento de la ingesta en el grupo E1, hecho que no puede comprobarse debido al carácter agudo del experimento.

En condiciones de ayunas, la concentración de LEP en el grupo control fue de  $8937 \pm 1472$  pg/ml, la cual junto con la respuesta al alimento, es similar a la que muestra el estudio de Karl *et al.* [378]. En general, la posibilidad de comparación con otros estudios es muy limitada debido a la variabilidad en la masa grasa en los individuos. En humanos, no existe en general respuesta significativa de la LEP plasmática al alimento a corto plazo [817,820], aunque sí se observa a más largo plazo [821].

La emulsión no provocó ningún cambio significativo en los niveles basales, la respuesta al alimento ni en la secreción total.

En nuestro estudio en humanos, el PP mostró una concentración plasmática basal de  $45.6 \pm 10.8$  pg/ml, coincidiendo este valor con el referido por Kanaley *et al.* [822] y Jacobsen *et al.* [817]. En cuanto a la respuesta a la comida, y en comparación con ambos estudios ([822], [817]) la mayor diferencia radica en que nosotros no encontramos un pico máximo tan pronunciado como en esos estudios, aunque después de dicha respuesta máxima las concentraciones sí son similares.

La respuesta postprandial de este péptido es cuantitativamente similar en ambos grupos, aunque se aprecian diferencias en la evolución temporal. Hemos encontrado diferencias significativas (con valores mayores en el grupo control) tanto en la concentración basal como en la 3ª hora tras la comida, aunque creemos que poseen poca relevancia, a tenor de los valores obtenidos en los parámetros de saciedad.

En el grupo control, la concentración basal de PYY fue de  $48.8 \pm 4.4$  pg/ml, similar a la que dan Cani *et al.* [336] y Batterham *et al.* [555]. La respuesta al alimento fue mayor en nuestro caso si lo comparamos con el primer trabajo [336], en el cual no se produce una respuesta significativa; la discordancia de resultados probablemente se debe a diferencias en el tipo y cantidad de alimento ingerido, que en su caso fue un desayuno de libre elección. Por otro lado, en el estudio de Keogh *et al.* [154] sí se observa una respuesta similar a la nuestra.

Tanto las concentraciones basales como postprandiales son similares en nuestros dos grupos, aunque los valores del grupo control tienden a mantenerse ligeramente por encima, pero en cualquier caso solo se alcanza significación estadística en las horas 2 y 8. Por otro lado, la secreción total fue superior en el grupo control comparado con el E1.

Si tenemos en cuenta la secreción total de dicho péptido, la señal anorexigénica asociada a éste sería menor en el grupo E1, hecho que como ocurre con el resto de GP y hormonas medidos, no se refleja en los niveles de saciedad estimados en los individuos que participan en este estudio.

## **6.2. SACIEDAD Y HAMBRE**

En general, los cambios observados en la concentración de los diferentes péptidos relacionados con la ingesta no contribuyeron a cambios en los niveles de saciedad y hambre en ambos grupos. Esto se relaciona con lo observado en otros estudios en los que se administra grasa directamente en el intestino, hecho que modificó las concentraciones de algunos péptidos pero no produjo un cambio en la saciedad de los individuos [142,143]. Todo ello nos vuelve a mostrar la complejidad de la regulación de la ingestión de alimentos y la importancia de analizar cada uno de los factores implicados en ella.





# CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS

*“Un viaje de mil millas comienza con el primer paso”*

*(Lao-Tse)*



El posible efecto de los ingredientes funcionales utilizados (E1 y E2) sobre la ingesta de alimento y el peso corporal en ratas normopeso solo se observa a largo plazo, pero no a corto.

A potential effect of functional ingredients E1 y E2 on food intake and body weight in normal-weight rats becomes evident only in the long term, but not in the short term.

En general, en las ratas normopeso del estudio a largo plazo, el comportamiento de las concentraciones plasmáticas basales y postprandiales de la mayoría de los péptidos y hormonas estudiados, si exceptuamos el PYY y el GLP-1, nos permiten explicar las mayores ingestas observadas en los grupos experimentales (E1 y E2) pero no así las diferencias en la evolución ponderal, que únicamente podrían atribuirse a la menor utilización metabólica de la proteína en el grupo que ingiere el ingrediente funcional E2.

In normal-weight rats of the long-term study, changes in fasting and postprandial plasma concentrations of most hormones and peptides studied, except for PYY and GLP-1, explain in general terms the higher food intake observed in the experimental groups (E1 and E2), but not the differential effects on body weight evolution, which could only be attributable to the reduced metabolic utilization of protein observed in rats given the E2 ingredient.

En nuestras condiciones experimentales, las ratas con obesidad inducida por la dieta que posteriormente ingieren a largo plazo el ingrediente funcional E1, no presentan diferencias que merezcan destacarse con respecto a las controles en la ingesta alimento y energía, evolución ponderal, ni utilización nutritiva de la grasa y la proteína. Además, la obesidad hace que se modifiquen los perfiles plasmáticos observados en las ratas normopeso para la mayoría de los péptidos y hormonas estudiados, tanto en el grupo control como en el E1, no apareciendo respuesta a la comida.

In our experimental conditions, the dietary obese rats that were subsequently long-term fed with the diet containing the E1 ingredient did not show remarkable differences in food intake, body weight, and nutritive utilization of protein and fat compared with the control group. Furthermore, related to normal-weight rats, the

obese state modified the plasma profile of almost all the hormones and peptides examined, both in the control and E1 groups, abolishing the response to food.

En humanos, la administración aguda del ingrediente E1 solo produce ligeros cambios en la concentración plasmática de algunos de los péptidos estudiados, pero no en la sensación de hambre/saciedad, por lo que en principio no cabe esperar un claro efecto sobre la ingesta de alimento. Esto coincide en cierto modo con lo mostrado en ratas a corto plazo, lo que hace necesario el planteamiento, en un futuro cercano, de estudios en los que los ingredientes funcionales sean consumidos a largo plazo, tanto por individuos normopeso como obesos.

In humans, the acute administration of ingredient E1 evoked only slight changes in the plasma concentration of some of the peptides studied, but not in the sensation of hunger/satiety; therefore, a clear effect on food intake is not expected. This agrees in part with the observations in the rats of our short-term study, and makes necessary to consider, for the near future, an approach where the functional ingredients are long-term administered, both to obese and nonobese subjects.

A la vista de estos resultados, los pretendidos mecanismos de acción de los ingredientes ensayados, que eran la obstaculización del acceso de la lipasa pancreática a los triglicéridos lumbales y la llegada a los últimos segmentos del intestino delgado de una mayor cantidad de productos de digestión de la grasa, para así disminuir las calorías absorbidas y/o favorecer la secreción de péptidos gastrointestinales con efecto anorexígeno, parecen no tener, en nuestras condiciones experimentales con nuestros modelos, el efecto deseado sobre la ingesta y consecuentemente sobre el peso corporal.

In view of our findings, the alleged mechanism of action of the functional ingredients, that is, restricting the access of pancreatic lipase to luminal triglyceride and arrival of a higher amount of fat digestion products to distal gut (so less calories are absorbed and/or more anorexigenic gut peptides are secreted), is not producing, in our experimental conditions, the sought effect on food intake and, consequently, on body weight.

Es la primera vez que se describe en ratas el efecto de este tipo de ingrediente funcional sobre los diferentes parámetros estudiados, hecho que recalca lo novedoso de nuestro estudio. Además, la falta de estudios similares y la amplia variedad de diseños experimentales descritos en la literatura científica, dificultan la comparación y por tanto la posibilidad de profundizar en las causas que expliquen los resultados obtenidos. En definitiva, sería importante armonizar la metodología y el diseño experimental de este tipo de estudios para así comprender mejor esta compleja red que supone el control de la ingesta y la regulación del peso corporal.

To our knowledge, this is the first time that the effect of this type of functional ingredient on all the parameters studied has been described in the rat, which emphasizes the novelty of this study. Moreover, the lack of similar studies and the wide variety of experimental designs in the scientific literature render the comparison more difficult and reduce the possibility to study in depth the causes for the observed results. In essence, it should be an important issue to harmonize the methodology and experimental designs used in these studies in order to improve our understanding of this complex network that is the regulation of food intake and body weight.



# SUMMARY





## 1. INTRODUCTION

“Globesity” is the term that the World Health Organization (WHO) employs to define the growth of obesity in the world from 80’s onwards [823]. The current situation has been driven by the interaction of different factors that are linked to the development of a country, such as global trade liberalization, economic growth, or urbanization, which have created an obesogenic environment where the caloric intake tend to increase and the physical activity goes in the opposite way, resulting in a positive balance of energy that leads to fat accumulation [8]. Giving a picture of the more recent situation, the International Obesity Task Force estimated that in 2010, there were 1 billion of overweight adults, of which 457 millions were obese [824]. The progression of this epidemic, in tandem with cardiovascular disease and other morbidities associated with obesity, is expected to slow or reverse the decline in mortality that has been noted in most of the developed countries over the past 40 years [825].

Governments and international organizations are aware of the problem and are now trying to implement measures to fight it. One example is the NAOS strategy, which has been developed by the Ministry of Health and Consumer Affairs of Spain following the guidelines of the WHO. The main objective of the NAOS strategy is to promote a healthy diet and physical activity to reverse the upward trend in the prevalence of obesity and, consequently, reduce the morbidity and mortality associated to chronic diseases [826]. Within the NAOS strategy, the PRONAOS project (which in turn comprises the current work) aims to develop novel functional foods intended for weight management. There are few food products on the market that have proved to be effective in promoting satiety and weight maintenance and many others are currently under development, most of them based on plant and animal-derived ingredients [100,101] and innovative emulsions [827].

Obesity is a complex trait that emerges from a complicated network of contributory components including genomic and environmental factors. With this knowledge, the need to unravel the mechanisms regulating appetite control has received significant attention. This disease is characterized by an excessive accumulation of fat in adipose

tissue, which is accompanied by low-grade inflammation, adipokine secretion dysregulation, hypoxia, oxidative stress and an alteration of the secretion of gut hormones and food intake-related peptides [828]. At present, among approved anti-obesity therapies, only bariatric surgery can effectively lead to considerable weight loss sustained over the long term [689]. However, it has largely been rendered impractical as a useful anti-obesity approach, in large part due to its high cost and rate of mortality. However, there has been growing evidence that the resulting weight loss following surgery is due, at least in part, to an alteration in the circulating concentrations and physiology of certain gut hormones such as CCK, PP, PYY, GLP-1, and diminished release of the orexigenic peptide GRN [750]. Also, there are convincing proofs that the obese state leads to different alterations in the circulating concentration of AMY [240,241], GIP [347,348], GLP-1 [398,399,829], GRN [449], INS [495,496] and LEP [619].

Gut hormones, as we see, play an important role in the homeostatic control of food intake and offer an alternative to centrally acting drugs [830]. The gut-brain axis and a variety of hormone signaling pathways have been emerging as potentially powerful anti-obesity tools. A wide new field of research is open to determine the influence of nutrients and bioactive compounds on the secretion of gut hormones. The literature is sparse and still focused on human studies, most of them related to the form in which fat is present. Novel fat emulsions produced by the use of modern food technology are currently in full development and aim at promoting the anorexigenic signals and/or decreasing orexigenic ones [141-143]. We know the effect of certain nutrients on gut peptide release [634,831] and, also, what happens when these peptides are administered separately (exogenously, either peripherally or centrally), but the whole picture of food intake regulation is certainly unknown, mostly because of the complexity of the interactions among the different factors and mechanisms involved.

Continued research into the potential to exploit endogenously occurring appetite-regulating gut hormones in an effort to regulate energy homeostasis is required, but certainly holds great promise to lead to the development of safe and effective anti-obesity treatments, and to contribute to combating the unbridled global rise in obesity.

## 2. RATIONALE AND AIMS OF THE STUDY

As mentioned above, work performed for this PhD Thesis has been fulfilled in the Department of Physiology and Institute of Nutrition and Food Technology of the University of Granada, in collaboration with Biosearch Life®, a biotechnology company present in international markets within the pharmaceutical, nutraceutical and functional food sectors.

The main objective of this PhD Thesis was to assess the effect of three functional ingredients, provided by Biosearch Life®, initially in Wistar rats (both normal-weight and dietary obese rats) and later in normal-weight humans (one of the ingredients).

Specific objectives were to assess the effects on:

- Food intake.
- Body weight evolution.
- Protein digestibility and metabolism.
- Fat digestibility.
- Fasting and postprandial plasma concentrations of AMY, CCK, GIP, GLP-1, GRN, INS, LEP, PP and PYY (in rats) and GIP, GRN, INS, LEP, PP and PYY (in humans).
- Satiety and hunger parameters in humans.

## 3. METHODOLOGY

### 3.1. STUDIES IN RATS

Ninety male Wistar rats (initial body weight  $150 \pm 5$  g) were used. We conducted three experiments in the following time sequence:

- Experiment I (short term, normal-weight rats): Rats were divided into three groups (n=10 each) named as control, E1 and E2 and fed *ad libitum* for 6 days (experimental period) with AIN-93M rodent diet with 4% high-oleic sunflower oil (control group) or the same diet where the fat component was emulsified (E1 and E2) (Figure 6).

- Experiment II (long term, normal-weight-rats): Rats were divided into three groups (n=10 each) named as control, E1 and E2 and fed *ad libitum* for 10 weeks (experimental period) with the same diets employed in the short term study (Fig. 7).
- Experiment III (long-term, dietary obese rats): Rats (n=30) were fed with a high-fat obesogenic diet (D12492, Research Diets®) for 9 weeks (obesity induction period). Then, they were divided into three groups (10 rats each: control, E1 and E3) and received for 10 weeks (experimental period) the same diets of the short and long term studies (except that E2 emulsion was replaced by a modification of E2 emulsion, now called E3) (Fig. 8).

Formulated diets were chemically analyzed by standard methods: protein (Kjeldahl, N × 6.25), fat (Soxhlet), water (by drying until a constant weight), ash (incineration in a muffle furnace) and total carbohydrates (by difference).

During the experimental period of the short term study (Experiment I), food intake was recorded daily and body weight every 3 days. Feces and urinary output were also collected daily for digestibility and balance studies (Fig. 6).

In Experiments II and III, rats had daily food intake and weekly body weight monitored throughout the whole 10-wk experimental period. Feces and urine were collected during the 5<sup>th</sup> week of the experimental period (Fig. 7-8).

Feces and urine samples were analyzed for protein (N × 6.25) and/or fat by the Kjeldahl and Soxhlet methods, respectively. The following coefficients were calculated: apparent digestibility coefficient (CDA, fat and protein), nitrogen retention (balance), and percent nitrogen retention/absorption (%R/A).

For the peptide and hormone study (performed at the end of the experimental period in Experiments I, II and III), blood samples were taken in fasting conditions by cutting tail tip. The animals were then given free access to their respective diets during 15 minutes (setting time 0 when the food was withdrawn) and repeated tail blood samples were subsequently collected at 15, 30, 60, and 120 minutes (Fig. 9). Plasma

was analyzed for hormones and gut peptide by ELISA (CCK only) and Luminex X-MAP™ technology (AMY, GIP, GLP-1, GRN, INS, LEP, PP and PYY).

### **3.2. STUDIES IN HUMANS**

Subsequent to the rat studies, an acute experiment was completed in humans. A total of 15 healthy participants were selected. After collection of a fasting blood sample, volunteers were given a standard breakfast that included sunflower oil (50 g/sq m body surface). The meal was ingested within 10 minutes and, then, additional samples were drawn at 1, 2, 3, 4, 5 and 8 hour postprandially (Fig. 12). The same test was repeated in the next day, but fat was replaced by the E1 emulsion that had been assayed in rats. Luminex X-MAP™ technology was used to determine, in plasma, the concentration of GIP, GRN, INS, LEP, PP and PYY.

All data were checked for normality and homogeneity of variances, and, accordingly means were compared by either non-parametric or parametric tests (Student's t-test or one-way ANOVA with post-hoc Duncan's multiple range test). Means were considered to be significantly different when  $P < 0.05$ . Areas under the curve (AUC) in the hormone assays were calculated by the trapezoidal method.

## **4. RESULTS AND DISCUSSION**

### **4.1. SHORT TERM RAT STUDY (Experiment I)**

In general, there were no relevant differences between control and experimental (E1 and E2) groups in almost any of the different parameters determined (food and energy intake, body weight, metabolic and/or digestive utilization of protein and fat, and the concentration of hormones and gut peptides (Fig. 13 to 18). In case differences existed, they cannot be ascribed, in principle, to the effect of functional ingredients (emulsions E1 and E2).

## **4.2. LONG TERM STUDY IN NORMAL WEIGHT RATS (Experiment II)**

Long term (10 weeks) administration of diets containing the functional ingredients (emulsions E1 and E2) had marked effects on many parameters. To start with, both emulsions evoked, compared with the control group, a significant enhancement of food, energy and macronutrient intake (Fig. 19). However, while body weight in group E1 increased accordingly, value in group E2 did not (Fig. 22), keeping similar to control, and this occurred despite a higher energy intake compared with the latter.

As for nutritional management, the metabolic utilization of protein, estimated by the percent N retention/N absorption, was lower experimental groups (E1 and E2) as compared to control, with the difference reaching statistical significance in group E2 (Fig. 23).

It has to be noted that the highest plasma concentrations of ghrelin were found in group E1, though this difference achieved significance only in fasting conditions. This may be related to the greater intake mentioned above, considering the orexigenic role of this peptide [439] (Fig. 25). In referring to leptin and insulin (two hormones with anorexigenic action that are involved in the long-term, metabolic, regulation of food intake [483,602]), our data showed a lower postprandial response in both experimental groups (E1 and E2) compared to control, in good agreement with the food intake results (Fig. 25 and 26). In contrast, the two peptides released mainly by unabsorbed fatty acids reaching the distal intestine (GLP-1 and PYY) were, in Experiment I, significantly elevated in group E1, which is not in accordance with the food intake recorded in this group, in view of their anorexigenic effect (Fig. 25 and 26).

CCK, an anorexigenic peptide that is secreted in response to protein and fat digestion products in the proximal intestine, showed in our experimental conditions a significant and prolonged postprandial response in the control group while this was absent in E1 and E2 (Fig.24). This lack of response to food ingestion could result in insufficiency of this peptide to effectively trigger its anorexigenic signal [281,284-286] thus leading to bigger meals and a higher intake. Concerning amylin (AMY), an anorexigenic peptide

co-secreted with insulin from pancreatic  $\beta$  cells [223-225], the observation in experimental groups (E1 and E2) of lower plasma concentrations together with no clear postprandial increases (Fig. 24), is again compatible with the higher intake recorded in those groups.

Overall, our findings in normal weight rats indicate that food intake, digestive and metabolic utilization, circulating concentration of hormones and gut peptides involved with food intake regulation and, at last, body weight, are not affected by our two functional ingredients (emulsions E1 and E2) in the short term. For the effects to occur, E1 and E2 diets must be fed over several weeks. Even though, we have been unable to find the effects we were seeking, i.e. reduced food intake or diminished digestive efficiency of macronutrients and energy. Indeed, on the basis of a nutrient digestibility similar to that of the control group (and showing very high values), food intake in groups E1 and E2 was higher compared with the latter. In addition, analysis of hormone and peptide profiles, both in the fasting and postprandial situations, did not show a clear predominance of anorexigenic over orexigenic factors (or *vice versa*), which, on the other hand, was somehow expected given the complexity of food intake regulation and the many factors involved. Still, we have to emphasize a fact that should be studied further. That is, the reduced metabolic utilization of protein shown in group E2 rats, which also displayed a higher intake than control group without the corresponding increase in body weight.

### **4.3. LONG TERM STUDY IN DIETARY OBESE RATS (Experiment III)**

For comparative purposes with previous Experiments, we will focus in this section on groups control and E1.

Long term (10 weeks) administration of either control or E1 diet to rats previously fed with an obesogenic high-fat diet (dietary obese or DIO rats) produced minor, transient, differences in food and energy intake, limited to the last weeks of the experimental period (Fig. 29). As for protein and fat intake, values in group E1 were higher from the third week onwards. In any case, the above differences in food, energy and



macronutrient intake were not paralleled by differential body weight gain throughout the Experiment.

Concerning the digestive utilization of protein and fat, we found that emulsion E1 decreased the apparent digestibility coefficient (ADC) for both nutrients compared to control, although all values were very high (more than 90%) and within normal range for this strain (Fig. 32). On the other hand, the metabolic utilization of protein, as estimated by the percent N retention/N absorption, was similar in control and E1 groups (Fig. 32).

In dietary obese rats, E1 ingredient did not affect fasting plasma concentrations of the different hormones and gut peptides studied (Fig. 34 to 36). Furthermore, none of them exhibited a clear and significant response to food intake, except for GIP, which showed similar values in groups E1 and control throughout the postprandial period (Fig. 34).

Overall comparison between normal-weight and obese rats fed over 10 weeks with the study diets (Experiments II and III) revealed the following:

- Digestive utilization of protein and fat, expressed as apparent digestibility coefficient (ADC), was high and similar in all the groups studied. In contrast, nitrogen retention (balance) and percent nitrogen retention/nitrogen absorption (%R/A) were significantly higher in obese than in lean rats, with no effect of fat emulsification (E1) in any case.
- In contrast with the observations in normal-weight rats (Experiment II), long-term administration of the functional ingredient (emulsion E1) to obese rats (Experiment III) failed to influence the circulating concentrations of hormone and gastrointestinal peptides, both the orexigenic and the anorexigenic ones. Other noticeable differences induced by obesity are related to: i) the higher concentration of plasma AMY, GLP-1, LEP and PYY, in line with the literature on rodents [240,241,618,766] except for PYY [218], and ii) the loss of the postprandial response of AMY and INS.

#### **4.4. ACUTE STUDY IN HUMANS**

Our data in humans showed a modest effect of acute administration of emulsion E1 on plasma concentrations of hormones and peptides (Fig. 37 and 38). In general, the breakfast containing E1 tended to evoke lower postprandial concentrations compared with the standard breakfast, although statistical significance was reached only at specific time points. The integrated response to the meal, estimated as the AUC, was lower ( $P < 0.05$ ), in group E1 for GIP, INS and PYY (Fig. 37 and 38). Given that GIP is not considered to be involved in the regulation of food intake in normal conditions [342-345] and taking into account the anorexigenic action of INS and PYY, a higher satiety feeling could have been expected in the control group. However, satiety/hunger parameters were comparable in both groups (Fig. 39), probably in part because of the acute nature of the experiment.

### **5. CONCLUSIONS**

A potential effect of functional ingredients E1 y E2 on food intake and body weight in normal-weight rats becomes evident only in the long term, but not in the short term.

In normal-weight rats of the long-term study, changes in fasting and postprandial plasma concentrations of most hormones and peptides studied, except for PYY and GLP-1, explain in general terms the higher food intake observed in the experimental groups (E1 and E2), but not the differential effects on body weight evolution, which could only be attributable to the reduced metabolic utilization of protein observed in rats given the E2 ingredient.

In our experimental conditions, the dietary obese rats that were subsequently long-term fed with the diet containing the E1 ingredient did not show remarkable differences in food intake, body weight, and nutritive utilization of protein and fat compared with the control group. Furthermore, related to normal-weight rats, the obese state modified the plasma profile of almost all the hormones and peptides examined, both in the control and E1 groups, abolishing the response to food.

In humans, the acute administration of ingredient E1 evoked only slight changes in the plasma concentration of some of the peptides studied, but not in the sensation of hunger/satiety; therefore, a clear effect on food intake is not expected. This agrees in part with the observations in the rats of our short-term study, and makes necessary to consider, for the near future, an approach where the functional ingredients are long-term administered, both to obese and nonobese subjects.

In view of our findings, the alleged mechanism of action of the functional ingredients, that is, restricting the access of pancreatic lipase to luminal triglyceride and arrival of a higher amount of fat digestion products to distal gut (so less calories are absorbed and/or more anorexigenic gut peptides are secreted), is not producing, in our experimental conditions, the sought effect on food intake and, consequently, on body weight.

To our knowledge, this is the first time that the effect of this type of functional ingredient on all the parameters studied has been described in the rat, which emphasizes the novelty of this study. Moreover, the lack of similar studies and the wide variety of experimental designs in the scientific literature render the comparison more difficult and reduce the possibility to study in depth the causes for the observed results. In essence, it should be an important issue to harmonize the methodology and experimental designs used in these studies in order to improve our understanding of this complex network that is the regulation of food intake and body weight.

# REFERENCIAS



1. Vague J (1956) The degree of masculine differentiation of obesities: a factor determining predisposition to diabetes, atherosclerosis, gout, and uric calculous disease. *Am J Clin Nutr* 4: 20-34.
2. Dulloo AG, Montani JP (2012) Body composition, inflammation and thermogenesis in pathways to obesity and the metabolic syndrome: an overview. *Obesity Reviews* 13: 1-5.
3. WHO/OMS (1995) Physical status: the use and interpretation of anthropometry WHO Technical Report Series 854.
4. Guglielmi G (2013) Dual-Energy X-Ray Absorptiometry. *Osteoporosis and Bone Densitometry Measurements*. Berlin: Springer pp. 101-122.
5. WHO/OMS BMI Classification  
<[http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro\\_3.html](http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html)>  
[Accesed 23/10/14].
6. Bouchard C (1991) Current understanding of the etiology of obesity: genetic and nongenetic factors. *Am J Clin Nutr* 53: 1561S-1565S.
7. Matsuzawa Y, Fujioka S, Tokunaga K, Tarui S (1992) Classification of obesity with respect to morbidity. *Proc Soc Exp Biol Med* 200: 197-201.
8. Malik VS, Willett WC, Hu FB (2013) Global obesity: trends, risk factors and policy implications. *Nat Rev Endocrinol* 9: 13-27.
9. WHO/OMS (2013) Action Plan for the Global Strategy for the Prevention and Control of Noncommunicable Diseases.
10. WHO/OMS (2012) Obesity and Overweight.
11. Silventoinen KS, S. Tolonen, H. Monterde, D. Kuulasmaa, K. Kesteloot, H. Tuomilehto, J. (2004) Trends in obesity and energy supply in the WHO MONICA Project. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28: 710-718.
12. Martinez JA, Kearney JM, Kafatos A, Paquet S, Martinez-Gonzalez MA (1999) Variables independently associated with self-reported obesity in the European Union. *Public Health Nutrition* 2: 125-133.
13. Varo JJ, Martinez-Gonzalez MA, Martinez JA (2002) Obesity prevalence in Europe. *An Sist Sanit Navar* 25 Suppl 1: 103-108.
14. Riboli E, Hunt KJ, Slimani N, Ferrari P, Norat T, et al. (2002) European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): study populations and data collection. *Public Health Nutr* 5: 1113-1124.
15. von Ruesten A, Steffen A, Floegel A, van der A DL, Masala G, et al. (2011) Trend in Obesity Prevalence in European Adult Cohort Populations during Follow-up since 1996 and Their Predictions to 2015. *Plos One* 6.
16. Berghofer A, Pischon T, Reinhold T, Apovian CM, Sharma AM, et al. (2008) Obesity prevalence from a European perspective: a systematic review. *BMC Public Health* 8: 200.

17. Flegal KM, Carroll MD, Kuczmarski RJ, Johnson CL (1998) Overweight and obesity in the United States: prevalence and trends, 1960-1994. *Int J Obes Relat Metab Disord* 22: 39-47.
18. Flegal KM, Carroll MD, Kit BK, Ogden CL (2012) Prevalence of obesity and trends in the distribution of body mass index among US adults, 1999-2010. *JAMA* 307: 491-497.
19. OECD (2012) Obesity and the economics of prevention: Fit not fat.
20. Peeters A, Backholer K (2012) Is the health burden associated with obesity changing? *Am J Epidemiol* 176: 840-845.
21. Gupta N, Goel K, Shah P, Misra A (2012) Childhood obesity in developing countries: epidemiology, determinants, and prevention. *Endocr Rev* 33: 48-70.
22. de Onis M, Blossner M, Borghi E (2010) Global prevalence and trends of overweight and obesity among preschool children. *Am J Clin Nutr* 92: 1257-1264.
23. Larnkjaer A, Schack-Nielsen L, Molgaard C, Ingstrup HK, Holst JJ, et al. (2010) Effect of growth in infancy on body composition, insulin resistance, and concentration of appetite hormones in adolescence. *Am J Clin Nutr* 91: 1675-1683.
24. Magarey AM, Daniels LA, Boulton TJ, Cockington RA (2003) Predicting obesity in early adulthood from childhood and parental obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27: 505-513.
25. Yang X, Telama R, Leskinen E, Mansikkaniemi K, Viikari J, et al. (2007) Testing a model of physical activity and obesity tracking from youth to adulthood: the cardiovascular risk in young Finns study. *Int J Obes (Lond)* 31: 521-527.
26. Togashi K, Masuda H, Rankinen T, Tanaka S, Bouchard C, et al. (2002) A 12-year follow-up study of treated obese children in Japan. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26: 770-777.
27. Singh AS, Mulder C, Twisk JW, van Mechelen W, Chinapaw MJ (2008) Tracking of childhood overweight into adulthood: a systematic review of the literature. *Obes Rev* 9: 474-488.
28. Janssen I, Katzmarzyk PT, Srinivasan SR, Chen W, Malina RM, et al. (2005) Utility of childhood BMI in the prediction of adulthood disease: comparison of national and international references. *Obes Res* 13: 1106-1115.
29. de Onis M, Onyango AW, Borghi E, Siyam A, Nishida C, et al. (2007) Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. *Bull World Health Organ* 85: 660-667.
30. WHO/OMS (2006) World Health Organization Child Growth Standards.
31. Grummer-Strawn LM, Reinold C, Krebs NF, Centers for Disease C, Prevention (2010) Use of World Health Organization and CDC growth charts for children aged 0-59 months in the United States. *MMWR Recomm Rep* 59: 1-15.

32. Kuczmarski RJ, Ogden CL, Grummer-Strawn LM, Flegal KM, Guo SS, et al. (2000) CDC growth charts: United States. *Adv Data*: 1-27.
33. Cole TJ, Bellizzi MC, Flegal KM, Dietz WH (2000) Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *BMJ* 320: 1240-1243.
34. Serra LR, L.; Aranceta, J. (2003) Obesidad infantil y juvenil en España. Resultados del Estudio enKid (1998-2000). *Medica Clínica* 121: 725-732.
35. Hernández M, Castellet J, Narvaiza J, Rincón J, Ruiz I, et al. (1988) Curvas y tablas de crecimiento. Instituto sobre Crecimiento y Desarrollo. Madrid: Editorial Garsi.
36. Ballesteros J, Pérez N, Dal-Re M, Villar C, Labrado E, et al. (2011) Estudio de vigilancia del crecimiento "ALADINO". *Estrategia NAOS*.
37. Finkelstein EA, Trogdon JG, Cohen JW, Dietz W (2009) Annual medical spending attributable to obesity: payer-and service-specific estimates. *Health Aff (Millwood)* 28: 822-831.
38. Wang YC, McPherson K, Marsh T, Gortmaker SL, Brown M (2011) Health and economic burden of the projected obesity trends in the USA and the UK. *Lancet* 378: 815-825.
39. Withrow D, Alter DA (2011) The economic burden of obesity worldwide: a systematic review of the direct costs of obesity. *Obes Rev* 12: 131-141.
40. Bouchard C, Perusse L (1996) Current status of the human obesity gene map. *Obes Res* 4: 81-90.
41. Rankinen T, Bray MS, Hagberg JM, Perusse L, Roth SM, et al. (2006) The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes: the 2005 update. *Med Sci Sports Exerc* 38: 1863-1888.
42. Herbert A, Gerry NP, McQueen MB, Heid IM, Pfeufer A, et al. (2006) A common genetic variant is associated with adult and childhood obesity. *Science* 312: 279-283.
43. Sandholt CH, Hansen T, Pedersen O (2012) Beyond the fourth wave of genome-wide obesity association studies. *Nutr Diabetes* 2: e37.
44. Loos RJF (2012) Genetic determinants of common obesity and their value in prediction. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 26: 211-226.
45. Bouchard C (2010) Defining the genetic architecture of the predisposition to obesity: a challenging but not insurmountable task. *American Journal of Clinical Nutrition* 91: 5-6.
46. Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Argyropoulos G, et al. (2006) The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity (Silver Spring)* 14: 529-644.
47. Bouchard C (2007) The biological predisposition to obesity: beyond the thrifty genotype scenario. *Int J Obes (Lond)* 31: 1337-1339.



48. Bouchard C, Tremblay A, Despres JP, Nadeau A, Lupien PJ, et al. (1990) The response to long-term overfeeding in identical twins. *N Engl J Med* 322: 1477-1482.
49. Naish KR, Harris G (2012) Food intake is influenced by sensory sensitivity. *PLoS One* 7: e43622.
50. Block JP, He Y, Zaslavsky AM, Ding L, Ayanian JZ (2009) Psychosocial stress and change in weight among US adults. *Am J Epidemiol* 170: 181-192.
51. Serlachius A, Hamer M, Wardle J (2007) Stress and weight change in university students in the United Kingdom. *Physiol Behav* 92: 548-553.
52. Torres JB, Kittles RA (2007) The relationship between "race" and genetics in biomedical research. *Curr Hypertens Rep* 9: 196-201.
53. Dallman MF, Pecoraro NC, la Fleur SE (2005) Chronic stress and comfort foods: self-medication and abdominal obesity. *Brain Behav Immun* 19: 275-280.
54. Kokkorus P, Pi-Sunyer FX (2003) Obesity and endocrine disease. *Endocrinol Metab Clin North Am* 32: 895-914.
55. Del Prete A, Iadevaia M, Loguercio C (2012) The role of gut hormones in controlling the food intake: what is their role in emerging diseases? *Endocrinol Nutr* 59: 197-206.
56. Atlantis E, Baker M (2008) Obesity effects on depression: systematic review of epidemiological studies. *Int J Obes (Lond)* 32: 881-891.
57. Luppino FS, de Wit LM, Bouvy PF, Stijnen T, Cuijpers P, et al. (2010) Overweight, obesity, and depression: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *Arch Gen Psychiatry* 67: 220-229.
58. Hetherington MM (2007) Cues to overeat: psychological factors influencing overconsumption. *Proc Nutr Soc* 66: 113-123.
59. de Castro JM, Lilenfeld LR (2005) Influence of heredity on dietary restraint, disinhibition, and perceived hunger in humans. *Nutrition* 21: 446-455.
60. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, et al. (2006) An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444: 1027-1031.
61. Zhao L (2013) The gut microbiota and obesity: from correlation to causality. *Nat Rev Microbiol* 11: 639-647.
62. Bouchard C, Katzmarzyk PT (2010) Physical activity and obesity: Human Kinetics.
63. ACSM (2013) Issues New Recommendations on Quantity and Quality of Exercise [Accessed 10/08/2013].
64. Spiegelman BM, Flier JS (2001) Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 104: 531-543.
65. Wu J, Cohen P, Spiegelman BM (2013) Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown? *Genes Dev* 27: 234-250.
66. van Marken Lichtenbelt W (2012) Brown adipose tissue and the regulation of nonshivering thermogenesis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 15: 547-552.

67. Wozniak SE, Gee LL, Wachtel MS, Frezza EE (2009) Adipose tissue: the new endocrine organ? A review article. *Dig Dis Sci* 54: 1847-1856.
68. Kersten S (2001) Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Rep* 2: 282-286.
69. Kolditz CI, Langin D (2010) Adipose tissue lipolysis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 13: 377-381.
70. Langin D, Dicker A, Tavernier G, Hoffstedt J, Mairal A, et al. (2005) Adipocyte lipases and defect of lipolysis in human obesity. *Diabetes* 54: 3190-3197.
71. Lass A, Zimmermann R, Oberer M, Zechner R (2011) Lipolysis - a highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores. *Prog Lipid Res* 50: 14-27.
72. Iyer A, Fairlie DP, Prins JB, Hammock BD, Brown L (2010) Inflammatory lipid mediators in adipocyte function and obesity. *Nat Rev Endocrinol* 6: 71-82.
73. Kershaw EE, Flier JS (2004) Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 2548-2556.
74. Halberg N, Wernstedt-Asterholm I, Scherer PE (2008) The adipocyte as an endocrine cell. *Endocrinol Metab Clin North Am* 37: 753-768.
75. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB (2006) Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 116: 1793-1801.
76. Albu J, Pi-Sunyer FX (2005) *Handbook of Obesity*.
77. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM (2006) Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 444: 840-846.
78. Capurso C, Capurso A (2012) From excess adiposity to insulin resistance: the role of free fatty acids. *Vascul Pharmacol* 57: 91-97.
79. Kopelman PG (2000) Obesity as a medical problem. *Nature* 404: 635-643.
80. Ye J (2013) Mechanisms of insulin resistance in obesity. *Front Med* 7: 14-24.
81. de Divitiis O, Fazio S, Petitto M, Maddalena G, Contaldo F, et al. (1981) Obesity and cardiac function. *Circulation* 64: 477-482.
82. Lauer MS, Anderson KM, Kannel WB, Levy D (1991) The impact of obesity on left ventricular mass and geometry. The Framingham Heart Study. *JAMA* 266: 231-236.
83. Scott M, Bilheimer D, Chait A, ; , Luther T, Margo D, et al. (1993) Summary of the second report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) *JAMA* 269: 3015-3023.
84. Kalupahana NS, Massiera F, Quignard-Boulange A, Ailhaud G, Voy BH, et al. (2012) Overproduction of angiotensinogen from adipose tissue induces adipose inflammation, glucose intolerance, and insulin resistance. *Obesity (Silver Spring)* 20: 48-56.
85. Kopelman PG (1992) Sleep apnoea and hypoventilation in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 16: S37-42.

86. Zimmet P, Magliano D, Matsuzawa Y, Alberti G, Shaw J (2005) The metabolic syndrome: a global public health problem and a new definition. *J Atheroscler Thromb* 12: 295-300.
87. Phillips LK, Prins JB (2008) The link between abdominal obesity and the metabolic syndrome. *Curr Hypertens Rep* 10: 156-164.
88. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ (2003) Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 348: 1625-1638.
89. Kang JG, Park CY (2012) Anti-Obesity Drugs: A Review about Their Effects and Safety. *Diabetes Metab J* 36: 13-25.
90. McGavigan AK, Murphy KG (2012) Gut hormones: the future of obesity treatment? *Br J Clin Pharmacol* 74: 911-919.
91. Delporte C (2012) Recent advances in potential clinical application of ghrelin in obesity. *J Obes* 2012.
92. Westerink J, Visseren FL (2011) Pharmacological and non-pharmacological interventions to influence adipose tissue function. *Cardiovasc Diabetol* 10: 13.
93. Borg CM, le Roux CW, Ghatti MA, Bloom SR, Patel AG, et al. (2006) Progressive rise in gut hormone levels after Roux-en-Y gastric bypass suggests gut adaptation and explains altered satiety. *Br J Surg* 93: 210-215.
94. Pournaras DJ, Osborne A, Hawkins SC, Mahon D, Ghatti MA, et al. (2010) The gut hormone response following Roux-en-Y gastric bypass: cross-sectional and prospective study. *Obes Surg* 20: 56-60.
95. Werling M, Olbers T, Fandriks L, Bueter M, Lonroth H, et al. (2013) Increased postprandial energy expenditure may explain superior long term weight loss after Roux-en-Y gastric bypass compared to vertical banded gastroplasty. *PLoS One* 8.
96. Milner JA (2000) Functional foods: the US perspective. *Am J Clin Nutr* 71: 1654S-1659S.
97. Diplock AT, Aggett PJ, Ashwell M, Bornet F, Fern EB, et al. (1999) Scientific concepts of functional foods in Europe. Consensus document. *Br J Nutr* 81: S1-27.
98. Gerstein DE, Woodward-Lopez G, Evans AE, Kelsey K, Drewnowski A (2004) Clarifying concepts about macronutrients effects on satiation and satiety. *J Am Diet Assoc* 104: 1151-1153.
99. Roberfroid MB (2002) Functional foods: concepts and application to inulin and oligofructose. *Br J Nutr* 87 Suppl 2: S139-143.
100. Riccardi G, Capaldo B, Vaccaro O (2005) Functional foods in the management of obesity and type 2 diabetes. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 8: 630-635.
101. Martinez-Augustin O, Aguilera CM, Gil-Campos M, Sanchez de Medina F, Gil A (2012) Bioactive anti-obesity food components. *Int J Vitam Nutr Res* 82: 148-156.

102. Feinle C, Christen M, Grundy D, Faas H, Meier O, et al. (2002) Effects of duodenal fat, protein or mixed-nutrient infusions on epigastric sensations during sustained gastric distension in healthy humans. *Neurogastroenterology and Motility* 14: 205-213.
103. Mattes RD (2007) The role of macronutrients in appetite regulation. *Canadian Journal of Dietetic Practice and Research* 68.
104. McFadden DW, Rudnicki M, Kuvshinoff B, Fischer JE (1992) Postprandial peptide YY release is mediated by cholecystokinin. *Surg Gynecol Obstet* 175: 145-150.
105. Mackie AR, Rafiee H, Malcolm P, Salt L, van Aken G (2013) Specific food structures suppress appetite through reduced gastric emptying rate. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 304: G1038-1043.
106. Little TJ, Russo A, Meyer JH, Horowitz M, Smyth DR, et al. (2007) Free fatty acids have more potent effects on gastric emptying, gut hormones, and appetite than triacylglycerides. *Gastroenterology* 133: 1124-1131.
107. Van Citters GW, Lin HC (2006) Ileal brake: neuropeptidergic control of intestinal transit. *Curr Gastroenterol Rep* 8: 367-373.
108. Meyer JH, Hlinka M, Khatibi A, Raybould HE, Tso P (1998) Role of small intestine in caloric compensations to oil premeals in rats. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 275: R1320-R1333.
109. Lin TM, Karvinen E, Ivy AC (1955) Relation of dietary fat to the absorption and elimination of exogenous and endogenous cholesterol. *Am J Physiol* 183: 86-90.
110. Lin HC, Zhao XT, Wang L, Wong H (1996) Fat-induced ileal brake in the dog depends on peptide YY. *Gastroenterology* 110: 1491-1495.
111. Maljaars PWJ, Symersky T, Kee BC, Haddeman E, Peters HPF, et al. (2008) Effect of ileal fat perfusion on satiety and hormone release in healthy volunteers. *International Journal of Obesity* 32: 1633-1639.
112. Maljaars PWJ, Peters HPF, Mela DJ, Masclee AAM (2008) Ileal brake: A sensible food target for appetite control. A review. *Physiology & Behavior* 95: 271-281.
113. Spiller RC, Trotman IF, Higgins BE, Ghatei MA, Grimble GK, et al. (1984) The Ileal Brake - Inhibition of Jejunal Motility after Ileal Fat Perfusion in Man. *Gut* 25: 365-374.
114. Qi D, Cai K, Wang O, Li Z, Chen J, et al. (2010) Fatty acids induce amylin expression and secretion by pancreatic beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298: E99-E107.
115. Falko JM, Crockett SE, Cataland S, Mazzaferri EL (1975) Gastric inhibitory polypeptide (GIP) stimulated by fat ingestion in man. *J Clin Endocrinol Metab* 41: 260-265.
116. Roberge JN, Brubaker PL (1991) Secretion of proglucagon-derived peptides in response to intestinal luminal nutrients. *Endocrinology* 128: 3169-3174.

117. Newgard CB, Matschinsky FM (2001) Substrate control of insulin release. In: Jefferson LS, Cherrington AD, Goodman HM, editors. The endocrine pancreas and regulation of metabolism. New York: Oxford University Press. pp. 125-152.
118. Essah PA, Levy JR, Sistrun SN, Kelly SM, Nestler JE (2007) Effect of macronutrient composition on postprandial peptide YY levels. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 4052-4055.
119. Feltrin KL, Patterson M, Ghatel MA, Bloom SR, Meyer JH, et al. (2006) Effect of fatty acid chain length on suppression of ghrelin and stimulation of PYY, GLP-2 and PP secretion in healthy men. *Peptides* 27: 1638-1643.
120. Hildebrand P, Petrig C, Burckhardt B, Ketterer S, Lengsfeld H, et al. (1998) Hydrolysis of dietary fat by pancreatic lipase stimulates cholecystokinin release. *Gastroenterology* 114: 123-129.
121. Meyer JH, Elashoff JD, Lake R (1999) Gastric emptying of indigestible versus digestible oils and solid fats in normal humans. *Dig Dis Sci* 44: 1076-1082.
122. Meyer JH, Tabrizi Y, DiMaso N, Hlinka M, Raybould HE (1998) Length of intestinal contact on nutrient-driven satiety. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 275: R1308-R1319.
123. Lin HC, Doty JE, Reedy TJ, Meyer JH (1990) Inhibition of Gastric-Emptying by Sodium Oleate Depends on Length of Intestine Exposed to Nutrient. *American Journal of Physiology* 259: G1031-G1036.
124. Borovicka J, Schwizer W, Guttman G, Hartmann D, Kosinski M, et al. (2000) Role of lipase in the regulation of postprandial gastric acid secretion and emptying of fat in humans: a study with orlistat, a highly specific lipase inhibitor. *Gut* 46: 774-781.
125. Lowe MR, Levine AS (2005) Eating motives and the controversy over dieting: eating less than needed versus less than wanted. *Obesity Research* 13: 797-806.
126. Blundell JE, Stubbs RJ, Golding C, Croden F, Alam R, et al. (2005) Resistance and susceptibility to weight gain: Individual variability in response to a high-fat diet. *Physiology & Behavior* 86: 614-622.
127. Blundell JE, MacDiarmid JI (1997) Fat as a risk factor for overconsumption: satiation, satiety, and patterns of eating. *J Am Diet Assoc* 97: S63-69.
128. Burns AA, Livingstone MB, Welch RW, Dunne A, Reid CA, et al. (2001) The effects of yoghurt containing a novel fat emulsion on energy and macronutrient intakes in non-overweight, overweight and obese subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25: 1487-1496.
129. Westerterp-Plantenga MS, Rolland V, Wilson SA, Westerterp KR (1999) Satiety related to 24 h diet-induced thermogenesis during high protein/carbohydrate vs high fat diets measured in a respiration chamber. *Eur J Clin Nutr* 53: 495-502.

130. Boyd KA, O'Donovan DG, Doran S, Wishart J, Chapman IM, et al. (2003) High-fat diet effects on gut motility, hormone, and appetite responses to duodenal lipid in healthy men. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284: G188-196.
131. Cunningham KM, Daly J, Horowitz M, Read NW (1991) Gastrointestinal adaptation to diets of differing fat composition in human volunteers. *Gut* 32: 483-486.
132. French SJ, Murray B, Rumsey RD, Fadzlin R, Read NW (1995) Adaptation to high-fat diets: effects on eating behaviour and plasma cholecystokinin. *Br J Nutr* 73: 179-189.
133. Willett WC (2002) Dietary fat plays a major role in obesity: no. *Obes Rev* 3: 59-68.
134. Welch IM, Sepple CP, Read NW (1988) Comparisons of the effects on satiety and eating behaviour of infusion of lipid into the different regions of the small intestine. *Gut* 29: 306-311.
135. Welch I, Saunders K, Read NW (1985) Effect of ileal and intravenous infusions of fat emulsions on feeding and satiety in human volunteers. *Gastroenterology* 89: 1293-1297.
136. Meyer JH, Hlinka M, Tabrizi Y, DiMaso N, Raybould HE (1998) Chemical specificities and intestinal distributions of nutrient-driven satiety. *Am J Physiol* 275: R1293-1307.
137. McClements DJ, Decker EA, Park Y, Weiss J (2009) Structural design principles for delivery of bioactive components in nutraceuticals and functional foods. *Crit Rev Food Sci Nutr* 49: 577-606.
138. Li Y, Kim J, Park Y, McClements DJ (2012) Modulation of lipid digestibility using structured emulsion-based delivery systems: comparison of in vivo and in vitro measurements. *Food Funct* 3: 528-536.
139. Hunt JN, Knox MT (1968) A Relation between Chain Length of Fatty Acids and Slowing of Gastric Emptying. *Journal of Physiology-London* 194: 327-&.
140. Maljaars J, Romeyn EA, Haddeman E, Peters HP, Masclee AA (2009) Effect of fat saturation on satiety, hormone release, and food intake. *Am J Clin Nutr* 89: 1019-1024.
141. Armand M, Pasquier B, Andre M, Borel P, Senft M, et al. (1999) Digestion and absorption of 2 fat emulsions with different droplet sizes in the human digestive tract. *Am J Clin Nutr* 70: 1096-1106.
142. Seimon RV, Wooster T, Otto B, Golding M, Day L, et al. (2009) The droplet size of intraduodenal fat emulsions influences antropyloroduodenal motility, hormone release, and appetite in healthy males. *Am J Clin Nutr* 89: 1729-1736.
143. Maljaars PW, van der Wal RJ, Wiersma T, Peters HP, Haddeman E, et al. (2012) The effect of lipid droplet size on satiety and peptide secretion is intestinal site-specific. *Clin Nutr* 31: 535-542.
144. Wang Y, Wilt DC, Wojnicki FH, Babbs RK, Coupland JN, et al. (2011) Fat emulsion composition alters intake and the effects of baclofen. *Appetite* 57: 628-634.

145. Burns AA, Livingstone MB, Welch RW, Dunne A, Rowland IR (2002) Dose-response effects of a novel fat emulsion (Olibra) on energy and macronutrient intakes up to 36 h post-consumption. *Eur J Clin Nutr* 56: 368-377.
146. Burns AA, Livingstone MB, Welch RW, Dunne A, Robson PJ, et al. (2000) Short-term effects of yoghurt containing a novel fat emulsion on energy and macronutrient intakes in non-obese subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24: 1419-1425.
147. Diepvens K, Steijns J, Zuurendonk P, Westerterp-Plantenga MS (2008) Short-term effects of a novel fat emulsion on appetite and food intake. *Physiol Behav* 95: 114-117.
148. Diepvens K, Soenen S, Steijns J, Arnold M, Westerterp-Plantenga M (2007) Long-term effects of consumption of a novel fat emulsion in relation to body-weight management. *Int J Obes (Lond)* 31: 942-949.
149. Smit HJ, Keenan E, Kovacs EM, Wiseman SA, Peters HP, et al. (2011) No efficacy of processed Fabuless (Olibra) in suppressing appetite or food intake. *Eur J Clin Nutr* 65: 81-86.
150. Logan CM, McCaffrey TA, Wallace JM, Robson PJ, Welch RW, et al. (2006) Investigation of the medium-term effects of Olibratrade mark fat emulsion on food intake in non-obese subjects. *Eur J Clin Nutr* 60: 1081-1091.
151. Rebello CJ, Martin CK, Johnson WD, O'Neil CE, Greenway FL (2012) Efficacy of Olibra: a 12-week randomized controlled trial and a review of earlier studies. *J Diabetes Sci Technol* 6: 695-708.
152. Chan YK, Strik CM, Budgett SC, McGill AT, Proctor J, et al. (2012) The emulsified lipid Fabuless (Olibra) does not decrease food intake but suppresses appetite when consumed with yoghurt but not alone or with solid foods: a food effect study. *Physiol Behav* 105: 742-748.
153. Appleton KM, Smit HJ, Rogers PJ (2011) Review and meta-analysis of the short-term effects of a vegetable oil emulsion on food intake. *Obes Rev* 12: e560-572.
154. Keogh JB, Wooster TJ, Golding M, Day L, Otto B, et al. (2011) Slowly and rapidly digested fat emulsions are equally satiating but their triglycerides are differentially absorbed and metabolized in humans. *J Nutr* 141: 809-815.
155. Sein A, Koenders C, Viberg A, Smolders F, Burg A (2013) Satiety-Inducing Composition. United States.
156. Yun JW (2010) Possible anti-obesity therapeutics from nature. *Phytochemistry* 71: 1625-1641.
157. de la Garza AL, Milagro FI, Boque N, Campion J, Martinez JA (2011) Natural inhibitors of pancreatic lipase as new players in obesity treatment. *Planta Med* 77: 773-785.
158. Kim HY, Kang MH (2005) Screening of Korean medicinal plants for lipase inhibitory activity. *Phytother Res* 19: 359-361.

159. Hasani-Ranjbar S, Nayebi N, Larijani B, Abdollahi M (2009) A systematic review of the efficacy and safety of herbal medicines used in the treatment of obesity. *World J Gastroenterol* 15: 3073-3085.
160. Wadden TA (1993) Treatment of obesity by moderate and severe caloric restriction. Results of clinical research trials. *Ann Intern Med* 119: 688-693.
161. Armani A, Mammi C, Marzolla V, Calanchini M, Antelmi A, et al. (2010) Cellular models for understanding adipogenesis, adipose dysfunction, and obesity. *J Cell Biochem* 110: 564-572.
162. Speakman J, Hambly C, Mitchell S, Krol E (2008) The contribution of animal models to the study of obesity. *Lab Anim* 42: 413-432.
163. Lutz TA, Woods SC (2012) Overview of animal models of obesity. *Curr Protoc Pharmacol* Chapter 5: Unit5 61.
164. Nilsson C, Raun K, Yan FF, Larsen MO, Tang-Christensen M (2012) Laboratory animals as surrogate models of human obesity. *Acta Pharmacol Sin* 33: 173-181.
165. Buettner R, Scholmerich J, Bollheimer LC (2007) High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)* 15: 798-808.
166. Buettner R, Parhofer KG, Woenckhaus M, Wrede CE, Kunz-Schughart LA, et al. (2006) Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *J Mol Endocrinol* 36: 485-501.
167. Reed DR, Tordoff MG, Friedman MI (1991) Enhanced acceptance and metabolism of fats by rats fed a high-fat diet. *Am J Physiol* 261: R1084-1088.
168. Singh A, Balint JA, Edmonds RH, Rodgers JB (1972) Adaptive changes of the rat small intestine in response to a high fat diet. *Biochim Biophys Acta* 260: 708-715.
169. Spannagel AW, Nakano I, Tawil T, Chey WY, Liddle RA, et al. (1996) Adaptation to fat markedly increases pancreatic secretory response to intraduodenal fat in rats. *Am J Physiol* 270: G128-135.
170. Sabb JE, Godfrey PM, Brannon PM (1986) Adaptive response of rat pancreatic lipase to dietary fat: effects of amount and type of fat. *J Nutr* 116: 892-899.
171. Takaori K, Blevins GT, Jr., Nishikawa M, Chowdhury P, Rayford PL (1995) Effects of diet on cholecystokinin-stimulated amylase secretion by pancreatic Acini and amylase mRNA levels in rat pancreas. *Pancreas* 11: 402-407.
172. Brown NJ, Rumsey RD, Read NW (1994) Gastrointestinal adaptation to enhanced small intestinal lipid exposure. *Gut* 35: 1409-1412.
173. Lin HC, Doty JE, Reedy TJ, Meyer JH (1990) Inhibition of gastric emptying by sodium oleate depends on length of intestine exposed to nutrient. *Am J Physiol* 259: G1031-1036.



174. Yoshioka M, Bolduc C, Raymond V, St-Amand J (2008) High-fat meal-induced changes in the duodenum mucosa transcriptome. *Obesity (Silver Spring)* 16: 2302-2307.
175. de Wit NJ, Bosch-Vermeulen H, de Groot PJ, Hooiveld GJ, Bromhaar MM, et al. (2008) The role of the small intestine in the development of dietary fat-induced obesity and insulin resistance in C57BL/6J mice. *BMC Med Genomics* 1: 14.
176. Paulino G, Darcel N, Tome D, Raybould H (2008) Adaptation of lipid-induced satiation is not dependent on caloric density in rats. *Physiol Behav* 93: 930-936.
177. McNay DE, Briancon N, Kokoeva MV, Maratos-Flier E, Flier JS (2012) Remodeling of the arcuate nucleus energy-balance circuit is inhibited in obese mice. *J Clin Invest* 122: 142-152.
178. Kanasaki K, Koya D (2011) Biology of obesity: lessons from animal models of obesity. *J Biomed Biotechnol* 2011: 197636.
179. Stanfield CL (2011) *Principios de la fisiología humana (4ª Edición)*: Pearson.
180. De Silva A, Bloom SR (2012) Gut Hormones and Appetite Control: A Focus on PYY and GLP-1 as Therapeutic Targets in Obesity. *Gut Liver* 6: 10-20.
181. Bellisle F, Drewnowski A, Anderson GH, Westerterp-Plantenga M, Martin CK (2012) Sweetness, satiation, and satiety. *J Nutr* 142: 1149S-1154S.
182. Berthoud HR (2006) Homeostatic and non-homeostatic pathways involved in the control of food intake and energy balance. *Obesity (Silver Spring)* 14 Suppl 5: 197S-200S.
183. Sugita M (2006) Taste perception and coding in the periphery. *Cell Mol Life Sci* 63: 2000-2015.
184. Gaillard D, Laugerette F, Darcel N, El-Yassimi A, Passilly-Degrace P, et al. (2008) The gustatory pathway is involved in CD36-mediated orosensory perception of long-chain fatty acids in the mouse. *Faseb Journal* 22: 1458-1468.
185. Nelson G, Chandrashekar J, Hoon MA, Feng L, Zhao G, et al. (2002) An amino-acid taste receptor. *Nature* 416: 199-202.
186. Rolls ET (2005) Taste, olfactory, and food texture processing in the brain, and the control of food intake. *Physiol Behav* 85: 45-56.
187. Berthoud HR, Blackshaw LA, Brookes SJ, Grundy D (2004) Neuroanatomy of extrinsic afferents supplying the gastrointestinal tract. *Neurogastroenterol Motil*: 28-33.
188. Phillips RJ, Powley TL (2000) Tension and stretch receptors in gastrointestinal smooth muscle: re-evaluating vagal mechanoreceptor electrophysiology. *Brain Res Brain Res Rev* 34: 1-26.
189. Berthoud HR (2008) The vagus nerve, food intake and obesity. *Regul Pept* 149: 15-25.

190. Ramshur EB, Rull TR, Wice BM (2002) Novel insulin/GIP co-producing cell lines provide unexpected insights into Gut K-cell function in vivo. *J Cell Physiol* 192: 339-350.
191. Wang S, Liu J, Li L, Wice BM (2004) Individual subtypes of enteroendocrine cells in the mouse small intestine exhibit unique patterns of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor expression. *J Histochem Cytochem* 52: 53-63.
192. Mataix VJ (2009) *Nutrición y Alimentación Humana*. Madrid: Ergon.
193. Opie EL (1901) On the Relation of Chronic Interstitial Pancreatitis to the Islands of Langerhans and to Diabetes Melitus. *J Exp Med* 5: 397-428.
194. Cooper GJ, Willis AC, Clark A, Turner RC, Sim RB, et al. (1987) Purification and characterization of a peptide from amyloid-rich pancreases of type 2 diabetic patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 8628-8632.
195. Westermark P, Wernstedt C, O'Brien TD, Hayden DW, Johnson KH (1987) Islet amyloid in type 2 human diabetes mellitus and adult diabetic cats contains a novel putative polypeptide hormone. *Am J Pathol* 127: 414-417.
196. Nishi M, Chan SJ, Nagamatsu S, Bell GI, Steiner DF (1989) Conservation of the sequence of islet amyloid polypeptide in five mammals is consistent with its putative role as an islet hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 5738-5742.
197. Cooper GJ, Day AJ, Willis AC, Roberts AN, Reid KB, et al. (1989) Amylin and the amylin gene: structure, function and relationship to islet amyloid and to diabetes mellitus. *Biochim Biophys Acta* 1014: 247-258.
198. Cooper GJ (1994) Amylin compared with calcitonin gene-related peptide: structure, biology, and relevance to metabolic disease. *Endocr Rev* 15: 163-201.
199. Westermark P, Andersson A, Westermark GT (2011) Islet amyloid polypeptide, islet amyloid, and diabetes mellitus. *Physiol Rev* 91: 795-826.
200. Johnson KH, O'Brien TD, Hayden DW, Jordan K, Ghobrial HK, et al. (1988) Immunolocalization of islet amyloid polypeptide (IAPP) in pancreatic beta cells by means of peroxidase-antiperoxidase (PAP) and protein A-gold techniques. *Am J Pathol* 130: 1-8.
201. Moore CX, Cooper GJ (1991) Co-secretion of amylin and insulin from cultured islet beta-cells: modulation by nutrient secretagogues, islet hormones and hypoglycemic agents. *Biochem Biophys Res Commun* 179: 1-9.
202. Gedulin BR, Rink TJ, Young AA (1997) Dose-response for glucagonostatic effect of amylin in rats. *Metabolism* 46: 67-70.
203. Hull RL, Westermark GT, Westermark P, Kahn SE (2004) Islet amyloid: a critical entity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 3629-3643.
204. Lutz TA (2006) Amylinergic control of food intake. *Physiol Behav* 89: 465-471.

205. Butler PC, Chou J, Carter WB, Wang YN, Bu BH, et al. (1990) Effects of meal ingestion on plasma amylin concentration in NIDDM and nondiabetic humans. *Diabetes* 39: 752-756.
206. van Hulst KL, Nieuwenhuis MG, Hoppener JW, Lips CJ, Blankenstein MA (1996) Lack of islet amyloid polypeptide/amylin-immunoreactivity in urine collected from healthy volunteers after ingestion of a carbohydrate-rich meal. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 104: 177-179.
207. Morfis M, Tilakaratne N, Furness SG, Christopoulos G, Werry TD, et al. (2008) Receptor activity-modifying proteins differentially modulate the G protein-coupling efficiency of amylin receptors. *Endocrinology* 149: 5423-5431.
208. Hay DL, Christopoulos G, Christopoulos A, Sexton PM (2004) Amylin receptors: molecular composition and pharmacology. *Biochem Soc Trans* 32: 865-867.
209. Barth SW, Riediger T, Lutz TA, Reckemmer G (2004) Peripheral amylin activates circumventricular organs expressing calcitonin receptor a/b subtypes and receptor-activity modifying proteins in the rat. *Brain Res* 997: 97-102.
210. Rowland NE, Richmond RM (1999) Area postrema and the anorectic actions of dexfenfluramine and amylin. *Brain Res* 820: 86-91.
211. Rowland NE, Crews EC, Gentry RM (1997) Comparison of Fos induced in rat brain by GLP-1 and amylin. *Regul Pept* 71: 171-174.
212. Becskei C, Grabler V, Edwards GL, Riediger T, Lutz TA (2007) Lesion of the lateral parabrachial nucleus attenuates the anorectic effect of peripheral amylin and CCK. *Brain Res* 1162: 76-84.
213. Lutz TA, Senn M, Althaus J, Del Prete E, Ehrensperger F, et al. (1998) Lesion of the area postrema/nucleus of the solitary tract (AP/NTS) attenuates the anorectic effects of amylin and calcitonin gene-related peptide (CGRP) in rats. *Peptides* 19: 309-317.
214. Davidowa H (2007) Histamine H1-receptors differentially mediate the action of amylin on hypothalamic neurons in control and in overweight rats. *Behav Brain Res* 182: 28-35.
215. Mollet A, Meier S, Riediger T, Lutz TA (2003) Histamine H1 receptors in the ventromedial hypothalamus mediate the anorectic action of the pancreatic hormone amylin. *Peptides* 24: 155-158.
216. Lutz TA, Del Prete E, Walzer B, Scharrer E (1996) The histaminergic, but not the serotonergic, system mediates amylin's anorectic effect. *Peptides* 17: 1317-1322.
217. Kelley AE, Baldo BA, Pratt WE, Will MJ (2005) Corticostriatal-hypothalamic circuitry and food motivation: integration of energy, action and reward. *Physiol Behav* 86: 773-795.
218. Shin AC, Zheng H, Townsend RL, Sigalet DL, Berthoud HR (2010) Meal-induced hormone responses in a rat model of Roux-en-Y gastric bypass surgery. *Endocrinology* 151: 1588-1597.

219. Phillips AR, Abu-Zidan FM, Farrant GJ, Zwi JL, Cooper GJ, et al. (2001) Plasma amylin concentration is related to the severity of intestinal ischemic injury in rats. *Surgery* 129: 730-735.
220. Ludvik B, Kautzky-Willer A, Prager R, Thomaseth K, Pacini G (1997) Amylin: history and overview. *Diabet Med* 14 Suppl 2: S9-13.
221. Bennett RG, Hamel FG, Duckworth WC (2003) An insulin-degrading enzyme inhibitor decreases amylin degradation, increases amylin-induced cytotoxicity, and increases amyloid formation in insulinoma cell cultures. *Diabetes* 52: 2315-2320.
222. Vine W, Smith P, LaChappell R, Blase E, Lumpkin R, et al. (1998) Nephrectomy decreases amylin and pramlintide clearance in rats. *Horm Metab Res* 30: 514-517.
223. Arnelo U, Permert J, Adrian TE, Larsson J, Westermark P, et al. (1996) Chronic infusion of islet amyloid polypeptide causes anorexia in rats. *Am J Physiol* 271: R1654-1659.
224. Lutz TA, Del Prete E, Scharrer E (1994) Reduction of food intake in rats by intraperitoneal injection of low doses of amylin. *Physiol Behav* 55: 891-895.
225. Roth JD, Trevaskis JL, Wilson J, Lei C, Athanacio J, et al. (2008) Antiobesity effects of the beta-cell hormone amylin in combination with phentermine or sibutramine in diet-induced obese rats. *Int J Obes (Lond)* 32: 1201-1210.
226. Arnelo U, Reidelberger R, Adrian TE, Larsson J, Permert J (1998) Sufficiency of postprandial plasma levels of islet amyloid polypeptide for suppression of feeding in rats. *Am J Physiol* 275: R1537-1542.
227. Young AA, Gedulin B, Vine W, Percy A, Rink TJ (1995) Gastric emptying is accelerated in diabetic BB rats and is slowed by subcutaneous injections of amylin. *Diabetologia* 38: 642-648.
228. Reidelberger RD, Kelsey L, Heimann D (2002) Effects of amylin-related peptides on food intake, meal patterns, and gastric emptying in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282: R1395-1404.
229. Kong MF, King P, Macdonald IA, Stubbs TA, Perkins AC, et al. (1997) Infusion of pramlintide, a human amylin analogue, delays gastric emptying in men with IDDM. *Diabetologia* 40: 82-88.
230. Olsson M, Herrington MK, Reidelberger RD, Permert J, Arnelo U (2007) Comparison of the effects of chronic central administration and chronic peripheral administration of islet amyloid polypeptide on food intake and meal pattern in the rat. *Peptides* 28: 1416-1423.
231. Rushing PA, Seeley RJ, Air EL, Lutz TA, Woods SC (2002) Acute 3rd-ventricular amylin infusion potently reduces food intake but does not produce aversive consequences. *Peptides* 23: 985-988.

232. Pieber TR, Roitelman J, Lee Y, Luskey KL, Stein DT (1994) Direct plasma radioimmunoassay for rat amylin-(1-37): concentrations with acquired and genetic obesity. *Am J Physiol* 267: E156-164.
233. Pieber TR, Stein DT, Ogawa A, Alam T, Ohneda M, et al. (1993) Amylin-insulin relationships in insulin resistance with and without diabetic hyperglycemia. *Am J Physiol* 265: E446-453.
234. Grabler V, Lutz TA (2004) Chronic infusion of the amylin antagonist AC 187 increases feeding in Zucker fa/fa rats but not in lean controls. *Physiol Behav* 81: 481-488.
235. Isaksson B, Wang F, Permert J, Olsson M, Fruin B, et al. (2005) Chronically administered islet amyloid polypeptide in rats serves as an adiposity inhibitor and regulates energy homeostasis. *Pancreatology* 5: 29-36.
236. Rushing PA, Hagan MM, Seeley RJ, Lutz TA, D'Alessio DA, et al. (2001) Inhibition of central amylin signaling increases food intake and body adiposity in rats. *Endocrinology* 142: 5035.
237. Rucker D, Padwal R, Li SK, Curioni C, Lau DC (2007) Long term pharmacotherapy for obesity and overweight: updated meta-analysis. *BMJ* 335: 1194-1199.
238. Gadde KM, Allison DB (2009) Combination therapy for obesity and metabolic disease. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 16: 353-358.
239. Trevaskis JL, Lei C, Koda JE, Weyer C, Parkes DG, et al. (2010) Interaction of leptin and amylin in the long-term maintenance of weight loss in diet-induced obese rats. *Obesity (Silver Spring)* 18: 21-26.
240. Inoue K, Hiramatsu S, Hisatomi A, Umeda F, Nawata H (1993) Hypersecretion of amylin from the perfused pancreas of genetically obese (fa/fa) rats and its alteration with aging. *Metabolism* 42: 654-658.
241. Despa S, Margulies KB, Chen L, Knowlton AA, Havel PJ, et al. (2012) Hyperamylinemia contributes to cardiac dysfunction in obesity and diabetes: a study in humans and rats. *Circ Res* 110: 598-608.
242. Boyle CN, Rossier MM, Lutz TA (2011) Influence of high-fat feeding, diet-induced obesity, and hyperamylinemia on the sensitivity to acute amylin. *Physiol Behav* 104: 20-28.
243. Wielinga PY, Lowenstein C, Muff S, Munz M, Woods SC, et al. (2010) Central amylin acts as an adiposity signal to control body weight and energy expenditure. *Physiol Behav* 101: 45-52.
244. Bhavsar S, Watkins J, Young A (1998) Synergy between amylin and cholecystokinin for inhibition of food intake in mice. *Physiology & Behavior* 64: 557-561.
245. Mollet A, Meier S, Grabler V, Gilg S, Scharrer E, et al. (2003) Endogenous amylin contributes to the anorectic effects of cholecystokinin and bombesin. *Peptides* 24: 91-98.

246. Trevaskis JL, Coffey T, Cole R, Lei C, Wittmer C, et al. (2008) Amylin-mediated restoration of leptin responsiveness in diet-induced obesity: magnitude and mechanisms. *Endocrinology* 149: 5679-5687.
247. Seth R, Knight WD, Overton JM (2011) Combined amylin-leptin treatment lowers blood pressure and adiposity in lean and obese rats. *Int J Obes (Lond)* 35: 1183-1192.
248. Roth JD, Roland BL, Cole RL, Trevaskis JL, Weyer C, et al. (2008) Leptin responsiveness restored by amylin agonism in diet-induced obesity: evidence from nonclinical and clinical studies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 7257-7262.
249. Trevaskis JL, Parkes DG, Roth JD (2010) Insights into amylin-leptin synergy. *Trends Endocrinol Metab* 21: 473-479.
250. Hwang JJ, Chan JL, Ntali G, Malkova D, Mantzoros CS (2008) Leptin does not directly regulate the pancreatic hormones amylin and pancreatic polypeptide: interventional studies in humans. *Diabetes Care* 31: 945-951.
251. Zuger D, Forster K, Lutz TA, Riediger T (2013) Amylin and GLP-1 target different populations of area postrema neurons that are both modulated by nutrient stimuli. *Physiol Behav* 112-113: 61-69.
252. Rushing PA, Lutz TA, Seeley RJ, Woods SC (2000) Amylin and insulin interact to reduce food intake in rats. *Horm Metab Res* 32: 62-65.
253. Roth JD, Coffey T, Jodka CM, Maier H, Athanacio JR, et al. (2007) Combination therapy with amylin and peptide YY[3-36] in obese rodents: anorexigenic synergy and weight loss additivity. *Endocrinology* 148: 6054-6061.
254. Michel S, Becskei C, Erguven E, Lutz TA, Riediger T (2007) Diet-derived nutrients modulate the effects of amylin on c-Fos expression in the area postrema and on food intake. *Neuroendocrinology* 86: 124-135.
255. Ivy AC, Oldberg E (1928) Contraction and evacuation of the gallbladder by a purified "secretin" preparation - Preliminary report of an experimental study. *Journal of the American Medical Association* 90: 445-446.
256. Harper AA, Raper HS (1943) Pancreozymin, a stimulant of the secretion of pancreatic enzymes in extracts of the small intestine. *J Physiol* 102: 115-125.
257. Mutt V, Jorpes JE (1968) Structure of porcine cholecystokinin-pancreozymin. 1. Cleavage with thrombin and with trypsin. *Eur J Biochem* 6: 156-162.
258. Rehfeld JF (1998) Accurate measurement of cholecystokinin in plasma. *Clinical Chemistry* 44: 991-1001.
259. Buchan AM, Polak JM, Capella C, Solcia E, Pearse AG (1978) Electronimmunocytochemical evidence for the K cell localization of gastric inhibitory polypeptide (GIP) in man. *Histochemistry* 56: 37-44.
260. Chandra R, Samsa LA, Vigna SR, Liddle RA (2010) Pseudopod-like basal cell processes in intestinal cholecystokinin cells. *Cell Tissue Res* 341: 289-297.

261. Hopman WP, Jansen JB, Lamers CB (1985) Comparative study of the effects of equal amounts of fat, protein, and starch on plasma cholecystokinin in man. *Scand J Gastroenterol* 20: 843-847.
262. Pilichiewicz AN, Little TJ, Brennan IM, Meyer JH, Wishart JM, et al. (2006) Effects of load, and duration, of duodenal lipid on antropyloroduodenal motility, plasma CCK and PYY, and energy intake in healthy men. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290: R668-677.
263. Brennan IM, Luscombe-Marsh ND, Seimon RV, Otto B, Horowitz M, et al. (2012) Effects of fat, protein, and carbohydrate and protein load on appetite, plasma cholecystokinin, peptide YY, and ghrelin, and energy intake in lean and obese men. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 303: 129-140.
264. McLaughlin JT, Lomax RB, Hall L, Dockray GJ, Thompson DG, et al. (1998) Fatty acids stimulate cholecystokinin secretion via an acyl chain length-specific, Ca<sup>2+</sup>-dependent mechanism in the enteroendocrine cell line STC-1. *J Physiol* 513 ( Pt 1): 11-18.
265. Lal S, Kirkup AJ, Brunsden AM, Thompson DG, Grundy D (2001) Vagal afferent responses to fatty acids of different chain length in the rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281: G907-915.
266. DeNigris SJ, Hamosh M, Kasbekar DK, Fink CS, Lee TC, et al. (1985) Secretion of human gastric lipase from dispersed gastric glands. *Biochim Biophys Acta* 836: 67-72.
267. Chapman IM (2007) The anorexia of aging. *Clin Geriatr Med* 23: 735-756.
268. Reeve JR, Jr., Green GM, Chew P, Eysselein VE, Keire DA (2003) CCK-58 is the only detectable endocrine form of cholecystokinin in rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285: G255-265.
269. Miller LJ, Gao F (2008) Structural basis of cholecystokinin receptor binding and regulation. *Pharmacol Ther* 119: 83-95.
270. Baldwin BA, Parrott RF, Ebenezer IS (1998) Food for thought: a critique on the hypothesis that endogenous cholecystokinin acts as a physiological satiety factor. *Prog Neurobiol* 55: 477-507.
271. Suzuki S, Ramos EJ, Goncalves CG, Chen C, Meguid MM (2005) Changes in GI hormones and their effect on gastric emptying and transit times after Roux-en-Y gastric bypass in rat model. *Surgery* 138: 283-290.
272. Katanyutanon S, Wu R, Wang P (2008) The effect of whole-body radiation on blood levels of gastrointestinal peptides in the rat. *Int J Clin Exp Med* 1: 332-337.
273. Pilichiewicz AN, Feltrin KL, Horowitz M, Holtmann G, Wishart JM, et al. (2008) Functional dyspepsia is associated with a greater symptomatic response to fat but not carbohydrate, increased fasting and postprandial CCK, and diminished PYY. *Am J Gastroenterol* 103: 2613-2623.

274. Liddle RA, Goldfine ID, Rosen MS, Taplitz RA, Williams JA (1985) Cholecystokinin bioactivity in human plasma. Molecular forms, responses to feeding, and relationship to gallbladder contraction. *J Clin Invest* 75: 1144-1152.
275. Alen F, Ramirez-Lopez MT, Gomez de Heras R, Rodriguez de Fonseca F, Orio L (2013) Cannabinoid receptors and cholecystokinin in feeding inhibition. *Vitam Horm* 92: 165-196.
276. Burdyga G, Varro A, Dimaline R, Thompson DG, Dockray GJ (2006) Feeding-dependent depression of melanin-concentrating hormone and melanin-concentrating hormone receptor-1 expression in vagal afferent neurones. *Neuroscience* 137: 1405-1415.
277. de Lartigue G, Dimaline R, Varro A, Dockray GJ (2007) Cocaine- and amphetamine-regulated transcript: stimulation of expression in rat vagal afferent neurons by cholecystokinin and suppression by ghrelin. *J Neurosci* 27: 2876-2882.
278. Blackshaw LA, Grundy D (1991) Locally and reflexly mediated effects of cholecystokinin-octapeptide on the ferret stomach. *J Auton Nerv Syst* 36: 129-137.
279. Liu S, Tang M, Tao S, Chen JD (2008) Central expressions of ghrelin and cholecystokinin in rats with gastric electrical stimulation. *Obes Surg* 18: 109-114.
280. Myers EA, Rinaman L (2002) Viscerosensory activation of noradrenergic inputs to the amygdala in rats. *Physiol Behav* 77: 723-729.
281. Moran TH, Kinzig KP (2004) Gastrointestinal satiety signals II. Cholecystokinin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286: G183-188.
282. Hanyu N, Dodds WJ, Layman RD, Hogan WJ, Chey WY, et al. (1990) Mechanism of cholecystokinin-induced contraction of the opossum gallbladder. *Gastroenterology* 98: 1299-1306.
283. Louie DS, May D, Miller P, Owyang C (1986) Cholecystokinin mediates feedback regulation of pancreatic enzyme secretion in rats. *Am J Physiol* 250: G252-259.
284. Gibbs J, Young RC, Smith GP (1973) Cholecystokinin decreases food intake in rats. *J Comp Physiol Psychol* 84: 488-495.
285. Lieverse RJ, Jansen JB, Masclee AA, Lamers CB (1995) Satiety effects of a physiological dose of cholecystokinin in humans. *Gut* 36: 176-179.
286. Blundell JE, Hill A, J. RP (1988) Hunger and the satiety cascade - their importance for food acceptance in the late 20th century; T D, editor. *Food Acceptability*.
287. Moran TH, Katz LF, Plata-Salaman CR, Schwartz GJ (1998) Disordered food intake and obesity in rats lacking cholecystokinin A receptors. *Am J Physiol* 274: R618-625.
288. Moran TH (2008) Unraveling the obesity of OLETF rats. *Physiol Behav* 94: 71-78.



289. Kopin AS, Mathes WF, McBride EW, Nguyen M, Al-Haider W, et al. (1999) The cholecystokinin-A receptor mediates inhibition of food intake yet is not essential for the maintenance of body weight. *J Clin Invest* 103: 383-391.
290. Bi S, Scott KA, Kopin AS, Moran TH (2004) Differential roles for cholecystokinin receptors in energy balance in rats and mice. *Endocrinology* 145: 3873-3880.
291. McLaughlin CL, Baile CA (1981) Obese mice and the satiety effects of cholecystokinin, bombesin and pancreatic polypeptide. *Physiol Behav* 26: 433-437.
292. Swartz TD, Duca FA, Covasa M (2010) Differential feeding behavior and neuronal responses to CCK in obesity-prone and -resistant rats. *Brain Res* 1308: 79-86.
293. Wisen O, Rossner S, Johansson C (1988) Impaired pancreatico-biliary response to vagal stimulation and to cholecystokinin in human obesity. *Metabolism* 37: 436-441.
294. Lieveise RJ, Jansen JB, Masclee AM, Lamers CB (1994) Satiety effects of cholecystokinin in humans. *Gastroenterology* 106: 1451-1454.
295. Lieveise RJ, Masclee AA, Jansen JB, Lamers CB (1994) Plasma cholecystokinin and pancreatic polypeptide secretion in response to bombesin, meal ingestion and modified sham feeding in lean and obese persons. *Int J Obes Relat Metab Disord* 18: 123-127.
296. Baranowska B, Radzikowska M, Wasilewska-Dziubinska E, Roguski K, Borowiec M (2000) Disturbed release of gastrointestinal peptides in anorexia nervosa and in obesity. *Diabetes Obes Metab* 2: 99-103.
297. Kobelt P, Tebbe JJ, Tjandra I, Stengel A, Bae HG, et al. (2005) CCK inhibits the orexigenic effect of peripheral ghrelin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288: R751-758.
298. Rushakoff RJ, Goldfine ID, Carter JD, Liddle RA (1987) Physiological concentrations of cholecystokinin stimulate amino acid-induced insulin release in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 65: 395-401.
299. Gallmann E, Arsenijevic D, Spengler M, Williams G, Langhans W (2005) Effect of CCK-8 on insulin-induced hyperphagia and hypothalamic orexigenic neuropeptide expression in the rat. *Peptides* 26: 437-445.
300. Barrachina MD, Martinez V, Wang L, Wei JY, Tache Y (1997) Synergistic interaction between leptin and cholecystokinin to reduce short-term food intake in lean mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 10455-10460.
301. Matson CA, Reid DF, Cannon TA, Ritter RC (2000) Cholecystokinin and leptin act synergistically to reduce body weight. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278: R882-890.
302. Merino B, Cano V, Guzman R, Somoza B, Ruiz-Gayo M (2008) Leptin-mediated hypothalamic pathway of cholecystokinin (CCK-8) to regulate body weight in free-feeding rats. *Endocrinology* 149: 1994-2000.

303. Peters JH, Simasko SM, Ritter RC (2006) Modulation of vagal afferent excitation and reduction of food intake by leptin and cholecystokinin. *Physiol Behav* 89: 477-485.
304. Schmid R, Schusdziarra V, Schulte-Frohlinde E, Maier V, Classen M (1989) Effect of CCK on insulin, glucagon, and pancreatic polypeptide levels in humans. *Pancreas* 4: 653-661.
305. Konturek SJ, Konturek P, Bielanski W, Szewczyk K (1989) CCK receptors in release of pancreatic polypeptide (PP) in dogs. *Dig Dis Sci* 34: 849-856.
306. Brown JC, Dryburgh JR (1971) A gastric inhibitory polypeptide. II. The complete amino acid sequence. *Can J Biochem* 49: 867-872.
307. Zhang JV, Ren PG, Avsian-Kretschmer O, Luo CW, Rauch R, et al. (2005) Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. *Science* 310: 996-999.
308. McIntosh CH, Widenmaier S, Kim SJ (2009) Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (Gastric Inhibitory Polypeptide; GIP). *Vitam Horm* 80: 409-471.
309. Meier JJ (2009) The contribution of incretin hormones to the pathogenesis of type 2 diabetes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 23: 433-441.
310. Bayliss WM, Starling EH (1902) The mechanism of pancreatic secretion. *J Physiol* 28: 325-353.
311. Creutzfeldt W (1979) The incretin concept today. *Diabetologia* 16: 75-85.
312. Vilsboll T, Krarup T, Madsbad S, Holst JJ (2003) Both GLP-1 and GIP are insulinotropic at basal and postprandial glucose levels and contribute nearly equally to the incretin effect of a meal in healthy subjects. *Regul Pept* 114: 115-121.
313. Ugleholdt R (2011) Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide (GIP): From prohormone to actions in endocrine pancreas and adipose tissue. *Dan Med Bull* 58.
314. Mortensen K, Christensen LL, Holst JJ, Orskov C (2003) GLP-1 and GIP are colocalized in a subset of endocrine cells in the small intestine. *Regul Pept* 114: 189-196.
315. Andersen DK, Elahi D, Brown JC, Tobin JD, Andres R (1978) Oral Glucose Augmentation of Insulin-Secretion - Interactions of Gastric Inhibitory Polypeptide with Ambient Glucose and Insulin Levels. *Journal of Clinical Investigation* 62: 152-161.
316. Falko JM, Crockett SE, Cataland S, Mazzaferri EL (1975) Gastric Inhibitory Polypeptide (Gip) Stimulated by Fat Ingestion in Man. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 41: 260-265.
317. Deacon CF, Nauck MA, Meier J, Hucking K, Holst JJ (2000) Degradation of endogenous and exogenous gastric inhibitory polypeptide in healthy and in type 2 diabetic subjects as revealed using a new assay for the intact peptide. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 85: 3575-3581.

318. Yavropoulou MP, Yovos JG (2010) Central regulation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide secretion. *Vitam Horm* 84.
319. Lu WJ, Yang Q, Yang L, Lee D, D'Alessio D, et al. (2012) Chylomicron formation and secretion is required for lipid-stimulated release of incretins GLP-1 and GIP. *Lipids* 47: 571-580.
320. D'Alessio D, Lu W, Sun W, Zheng S, Yang Q, et al. (2007) Fasting and postprandial concentrations of GLP-1 in intestinal lymph and portal plasma: evidence for selective release of GLP-1 in the lymph system. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293: R2163-2169.
321. Lu WJ, Yang Q, Sun W, Woods SC, D'Alessio D, et al. (2007) The regulation of the lymphatic secretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) by intestinal absorption of fat and carbohydrate. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293: G963-971.
322. Lu WJ, Yang Q, Sun W, Woods SC, D'Alessio D, et al. (2008) Using the lymph fistula rat model to study the potentiation of GIP secretion by the ingestion of fat and glucose. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 294: G1130-G1138.
323. Elliott RM, Morgan LM, Tredger JA, Deacon S, Wright J, et al. (1993) Glucagon-like peptide-1 (7-36)amide and glucose-dependent insulinotropic polypeptide secretion in response to nutrient ingestion in man: acute post-prandial and 24-h secretion patterns. *J Endocrinol* 138: 159-166.
324. Enc FY, Ones T, Akin HL, Dede F, Turoglu HT, et al. (2009) Orlistat accelerates gastric emptying and attenuates GIP release in healthy subjects. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 296: G482-489.
325. Filippou A, Berry SE, Baumgartner S, Mensink RP, Sanders TA (2014) Palmitic acid in the sn-2 position decreases glucose-dependent insulinotropic polypeptide secretion in healthy adults. *Eur J Clin Nutr* 68: 549-554.
326. Thomas FB, Mazzaferri EL, Crockett SE, Mekhjian HS, Gruemer HD, et al. (1976) Stimulation of secretion of gastric inhibitory polypeptide and insulin by intraduodenal amino acid perfusion. *Gastroenterology* 70: 523-527.
327. Lu WJ, Yang Q, Sun W, Woods SC, D'Alessio D, et al. (2008) Using the lymph fistula rat model to study the potentiation of GIP secretion by the ingestion of fat and glucose. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294: G1130-1138.
328. Knapper JM, Morgan LM, Fletcher JM (1996) Nutrient-induced secretion and metabolic effects of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and glucagon-like peptide-1. *Proc Nutr Soc* 55: 291-305.
329. Moriya R, Shirakura T, Ito J, Mashiko S, Seo T (2009) Activation of sodium-glucose cotransporter 1 ameliorates hyperglycemia by mediating incretin secretion in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297: E1358-1365.

330. Gorboulev V, Schurmann A, Vallon V, Kipp H, Jaschke A, et al. (2012) Na(+)-D-glucose cotransporter SGLT1 is pivotal for intestinal glucose absorption and glucose-dependent incretin secretion. *Diabetes* 61: 187-196.
331. Shimotoyodome A, Osaki N, Onizawa K, Mizuno T, Suzukamo C, et al. (2012) Dietary 1-monoolein decreases postprandial GIP release by reducing jejunal transport of glucose and fatty acid in rodents. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 303: G298-310.
332. Wolfe MM, Zhao KB, Glazier KD, Jarboe LA, Tseng CC (2000) Regulation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide release by protein in the rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279: G561-566.
333. Wolfe MM, McGuigan JE (1982) Release of gastric inhibitory peptide following a peptone meal in the dog. *Gastroenterology* 83: 864-872.
334. Usdin TB, Mezey E, Button DC, Brownstein MJ, Bonner TI (1993) Gastric inhibitory polypeptide receptor, a member of the secretin-vasoactive intestinal peptide receptor family, is widely distributed in peripheral organs and the brain. *Endocrinology* 133: 2861-2870.
335. Kindel TL, Yoder SM, D'Alessio DA, Tso P (2010) The effect of duodenal-jejunal bypass on glucose-dependent insulinotropic polypeptide secretion in Wistar rats. *Obes Surg* 20: 768-775.
336. Cani PD, Lecourt E, Dewulf EM, Sohet FM, Pachikian BD, et al. (2009) Gut microbiota fermentation of prebiotics increases satietogenic and incretin gut peptide production with consequences for appetite sensation and glucose response after a meal. *Am J Clin Nutr* 90: 1236-1243.
337. Drucker DJ (2006) The biology of incretin hormones. *Cell Metab* 3: 153-165.
338. Holst JJ, Orskov C (2001) Incretin hormones - an update. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 234: 75-85.
339. Faivre E, Hamilton A, Holscher C (2012) Effects of acute and chronic administration of GIP analogues on cognition, synaptic plasticity and neurogenesis in mice. *Eur J Pharmacol* 674: 294-306.
340. Paratore S, Ciotti MT, Basille M, Vaudry D, Gentile A, et al. (2011) Gastric inhibitory polypeptide and its receptor are expressed in the central nervous system and support neuronal survival. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* 11: 210-222.
341. Faivre E, Gault VA, Thorens B, Holscher C (2011) Glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor knockout mice are impaired in learning, synaptic plasticity, and neurogenesis. *J Neurophysiol* 105: 1574-1580.
342. McClean PL, Irwin N, Cassidy RS, Holst JJ, Gault VA, et al. (2007) GIP receptor antagonism reverses obesity, insulin resistance, and associated metabolic disturbances induced in mice by prolonged consumption of high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293: E1746-1755.

343. Gault VA, Porter DW, Irwin N, Flatt PR (2011) Comparison of sub-chronic metabolic effects of stable forms of naturally occurring GIP(1-30) and GIP(1-42) in high-fat fed mice. *J Endocrinol* 208: 265-271.
344. Asmar M, Tangaa W, Madsbad S, Hare K, Astrup A, et al. (2010) On the role of glucose-dependent insulintropic polypeptide in postprandial metabolism in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298.
345. Edholm T, Degerblad M, Gryback P, Hilsted L, Holst JJ, et al. (2010) Differential incretin effects of GIP and GLP-1 on gastric emptying, appetite, and insulin-glucose homeostasis. *Neurogastroenterol Motil* 22: 1191-1200, e1315.
346. Kim SJ, Nian C, Karunakaran S, Clee SM, Isales CM, et al. (2012) GIP-overexpressing mice demonstrate reduced diet-induced obesity and steatosis, and improved glucose homeostasis. *PLoS One* 7(7): e40156.
347. Vilsboll T, Krarup T, Sonne J, Madsbad S, Volund A, et al. (2003) Incretin secretion in relation to meal size and body weight in healthy subjects and people with type 1 and type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 2706-2713.
348. Creutzfeldt W, Ebert R (1985) New developments in the incretin concept. *Diabetologia* 28: 565-573.
349. Eckel RH, Fujimoto WY, Brunzell JD (1979) Gastric-Inhibitory Polypeptide Enhanced Lipoprotein-Lipase Activity in Cultured Preadipocytes. *Diabetes* 28: 1141-1142.
350. Asmar M, Simonsen L, Madsbad S, Stallknecht B, Holst JJ, et al. (2010) Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide May Enhance Fatty Acid Re-esterification in Subcutaneous Abdominal Adipose Tissue in Lean Humans. *Diabetes* 59: 2160-2163.
351. Miyawaki K, Yamada Y, Ban N, Ihara Y, Tsukiyama K, et al. (2002) Inhibition of gastric inhibitory polypeptide signaling prevents obesity. *Nature Medicine* 8: 738-742.
352. Lund PK (2005) The discovery of glucagon-like peptide 1. *Regul Pept* 128: 93-96.
353. Orskov C, Rabenhøj L, Wettergren A, Kofod H, Holst JJ (1994) Tissue and plasma concentrations of amidated and glycine-extended glucagon-like peptide I in humans. *Diabetes* 43: 535-539.
354. Bell GI, Santerre RF, Mullenbach GT (1983) Hamster proglucagon contains the sequence of glucagon and two related peptides. *Nature* 302: 716-718.
355. Holst JJ, Bersani M, Johnsen AH, Kofod H, Hartmann B, et al. (1994) Proglucagon processing in porcine and human pancreas. *J Biol Chem* 269: 18827-18833.
356. Drucker DJ, Asa S (1988) Glucagon gene expression in vertebrate brain. *J Biol Chem* 263: 13475-13478.
357. Jin SL, Han VK, Simmons JG, Towle AC, Lauder JM, et al. (1988) Distribution of glucagonlike peptide I (GLP-I), glucagon, and glicentin in the rat brain: an immunocytochemical study. *J Comp Neurol* 271: 519-532.

358. Eissele R, Goke R, Willemer S, Harthus HP, Vermeer H, et al. (1992) Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man. *Eur J Clin Invest* 22: 283-291.
359. Diakogiannaki E, Gribble FM, Reimann F (2012) Nutrient detection by incretin hormone secreting cells. *Physiol Behav* 106: 387-393.
360. Ritzel U, Fromme A, Ottleben M, Leonhardt U, Ramadori G (1997) Release of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) by carbohydrates in the perfused rat ileum. *Acta Diabetol* 34: 18-21.
361. Feltrin KL, Little TJ, Meyer JH, Horowitz M, Smout AJ, et al. (2004) Effects of intraduodenal fatty acids on appetite, antropyloroduodenal motility, and plasma CCK and GLP-1 in humans vary with their chain length. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287: R524-533.
362. Thomsen C, Rasmussen O, Lousen T, Holst JJ, Fenselau S, et al. (1999) Differential effects of saturated and monounsaturated fatty acids on postprandial lipemia and incretin responses in healthy subjects. *Am J Clin Nutr* 69: 1135-1143.
363. Brynes AE, Frost GS, Edwards CM, Ghatei MA, Bloom SR (1998) Plasma glucagon-like peptide-1 (7-36) amide (GLP-1) response to liquid phase, solid phase, and meals of differing lipid composition. *Nutrition* 14: 433-436.
364. Herrmann C, Goke R, Richter G, Fehmann HC, Arnold R, et al. (1995) Glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulin-releasing polypeptide plasma levels in response to nutrients. *Digestion* 56: 117-126.
365. Hansen L, Holst JJ (2002) The effects of duodenal peptides on glucagon-like peptide-1 secretion from the ileum. A duodeno-ileal loop? *Regul Pept* 110: 39-45.
366. Hansen L, Lampert S, Mineo H, Holst JJ (2004) Neural regulation of glucagon-like peptide-1 secretion in pigs. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287: E939-947.
367. Holst JJ (2007) The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol Rev* 87: 1409-1439.
368. Anini Y, Fu-Cheng X, Cuber JC, Kervran A, Chariot J, et al. (1999) Comparison of the postprandial release of peptide YY and proglucagon-derived peptides in the rat. *Pflugers Arch* 438: 299-306.
369. Ranganath L, Sedgwick I, Morgan L, Wright J, Marks V (1998) The ageing entero-insular axis. *Diabetologia* 41: 1309-1313.
370. Geloneze B, da Saude de Oliveira M, Vasques ACJ, Novaes FS, Pareja JC, et al. (2014) Impaired incretin secretion and pancreatic dysfunction with older age and diabetes. *Metabolism*.
371. Dillon JS, Wheeler MB, Leng XH, Ligon BB, Boyd AE, 3rd (1997) The human glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor. Cloning and functional expression. *Adv Exp Med Biol* 426: 113-119.

372. Thorens B (1992) Expression cloning of the pancreatic beta cell receptor for the gluco-incretin hormone glucagon-like peptide 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 8641-8645.
373. Vilsboll T, Agerso H, Krarup T, Holst JJ (2003) Similar elimination rates of glucagon-like peptide-1 in obese type 2 diabetic patients and healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 220-224.
374. Ruiz-Grande C, Alarcon C, Alcantara A, Castilla C, Lopez Novoa JM, et al. (1993) Renal catabolism of truncated glucagon-like peptide 1. *Horm Metab Res* 25: 612-616.
375. Hansen L, Deacon CF, Orskov C, Holst JJ (1999) Glucagon-like peptide-1-(7-36)amide is transformed to glucagon-like peptide-1-(9-36)amide by dipeptidyl peptidase IV in the capillaries supplying the L cells of the porcine intestine. *Endocrinology* 140: 5356-5363.
376. le Roux CW, Aylwin SJ, Batterham RL, Borg CM, Coyle F, et al. (2006) Gut hormone profiles following bariatric surgery favor an anorectic state, facilitate weight loss, and improve metabolic parameters. *Ann Surg* 243: 108-114.
377. Gee JM, Johnson IT (2005) Dietary lactitol fermentation increases circulating peptide YY and glucagon-like peptide-1 in rats and humans. *Nutrition* 21: 1036-1043.
378. Karl JP, Young AJ, Montain SJ (2011) Eating rate during a fixed-portion meal does not affect postprandial appetite and gut peptides or energy intake during a subsequent meal. *Physiol Behav* 102: 524-531.
379. Schirra J, Wank U, Arnold R, Goke B, Katschinski M (2002) Effects of glucagon-like peptide-1(7-36)amide on motility and sensation of the proximal stomach in humans. *Gut* 50: 341-348.
380. Nagell CF, Wettergren A, Orskov C, Holst JJ (2006) Inhibitory effect of GLP-1 on gastric motility persists after vagal deafferentation in pigs. *Scand J Gastroenterol* 41: 667-672.
381. Abbott CR, Monteiro M, Small CJ, Sajedi A, Smith KL, et al. (2005) The inhibitory effects of peripheral administration of peptide YY(3-36) and glucagon-like peptide-1 on food intake are attenuated by ablation of the vagal-brainstem-hypothalamic pathway. *Brain Res* 1044: 127-131.
382. Gautier JF, Choukem SP, Girard J (2008) Physiology of incretins (GIP and GLP-1) and abnormalities in type 2 diabetes. *Diabetes Metab* 34 Suppl 2: S65-72.
383. Davis HR, Jr., Mullins DE, Pines JM, Hoos LM, France CF, et al. (1998) Effect of chronic central administration of glucagon-like peptide-1 (7-36) amide on food consumption and body weight in normal and obese rats. *Obes Res* 6: 147-156.
384. Meeran K, O'Shea D, Edwards CM, Turton MD, Heath MM, et al. (1999) Repeated intracerebroventricular administration of glucagon-like peptide-1-(7-36) amide or exendin-(9-39) alters body weight in the rat. *Endocrinology* 140: 244-250.

385. Rodriguez de Fonseca F, Navarro M, Alvarez E, Roncero I, Chowen JA, et al. (2000) Peripheral versus central effects of glucagon-like peptide-1 receptor agonists on satiety and body weight loss in Zucker obese rats. *Metabolism* 49: 709-717.
386. Williams DL, Baskin DG, Schwartz MW (2006) Leptin regulation of the anorexic response to glucagon-like peptide-1 receptor stimulation. *Diabetes* 55: 3387-3393.
387. Chelikani PK, Haver AC, Reidelberger RD (2005) Intravenous infusion of glucagon-like peptide-1 potently inhibits food intake, sham feeding, and gastric emptying in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288: R1695-1706.
388. Hayes MR, Kanoski SE, Alhadeff AL, Grill HJ (2011) Comparative effects of the long-acting GLP-1 receptor ligands, liraglutide and exendin-4, on food intake and body weight suppression in rats. *Obesity (Silver Spring)* 19: 1342-1349.
389. Williams DL, Baskin DG, Schwartz MW (2009) Evidence that intestinal glucagon-like peptide-1 plays a physiological role in satiety. *Endocrinology* 150: 1680-1687.
390. Baggio LL, Huang Q, Brown TJ, Drucker DJ (2004) A recombinant human glucagon-like peptide (GLP)-1-albumin protein (albugon) mimics peptidergic activation of GLP-1 receptor-dependent pathways coupled with satiety, gastrointestinal motility, and glucose homeostasis. *Diabetes* 53: 2492-2500.
391. Ruttimann EB, Arnold M, Hillebrand JJ, Geary N, Langhans W (2009) Intrameal hepatic portal and intraperitoneal infusions of glucagon-like peptide-1 reduce spontaneous meal size in the rat via different mechanisms. *Endocrinology* 150: 1174-1181.
392. Plamboeck A, Veedefald S, Deacon CF, Hartmann B, Wettergren A, et al. (2013) The effect of exogenous GLP-1 on food intake is lost in male truncally vagotomized subjects with pyloroplasty. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 304: 1117-1127.
393. Parkinson JR, Chaudhri OB, Kuo YT, Field BC, Herlihy AH, et al. (2009) Differential patterns of neuronal activation in the brainstem and hypothalamus following peripheral injection of GLP-1, oxyntomodulin and lithium chloride in mice detected by manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI). *Neuroimage* 44: 1022-1031.
394. Schick RR, Zimmermann JP, vom Walde T, Schusdziarra V (2003) Peptides that regulate food intake: glucagon-like peptide 1-(7-36) amide acts at lateral and medial hypothalamic sites to suppress feeding in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284: R1427-1435.
395. Sandoval DA, Bagnol D, Woods SC, D'Alessio DA, Seeley RJ (2008) Arcuate glucagon-like peptide 1 receptors regulate glucose homeostasis but not food intake. *Diabetes* 57: 2046-2054.
396. Sandoval D, Barrera JG, Stefater MA, Sisley S, Woods SC, et al. (2012) The anorectic effect of GLP-1 in rats is nutrient dependent. *PLoS One* 7: e51870.



397. Dailey MJ, Moran TH (2013) Glucagon-like peptide 1 and appetite. *Trends Endocrinol Metab* 24: 85-91.
398. Naslund E, Gryback P, Backman L, Jacobsson H, Holst JJ, et al. (1998) Distal small bowel hormones: correlation with fasting antroduodenal motility and gastric emptying. *Dig Dis Sci* 43: 945-952.
399. Verdich C, Toubro S, Buemann B, Lysgard Madsen J, Juul Holst J, et al. (2001) The role of postprandial releases of insulin and incretin hormones in meal-induced satiety - effect of obesity and weight reduction. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25: 1206-1214.
400. Patti ME, McMahon G, Mun EC, Bitton A, Holst JJ, et al. (2005) Severe hypoglycaemia post-gastric bypass requiring partial pancreatectomy: evidence for inappropriate insulin secretion and pancreatic islet hyperplasia. *Diabetologia* 48: 2236-2240.
401. Naslund E, Barkeling B, King N, Gutniak M, Blundell JE, et al. (1999) Energy intake and appetite are suppressed by glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in obese men. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23: 304-311.
402. Mul JD, Begg DP, Barrera JG, Li B, Matter EK, et al. (2013) High-fat diet changes the temporal profile of GLP-1 receptor-mediated hypophagia in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*.
403. Duca FA, Sakar Y, Covasa M (2013) Combination of obesity and high-fat feeding diminishes sensitivity to GLP-1R agonist, Exendin-4. *Diabetes*.
404. Hisadome K, Reimann F, Gribble FM, Trapp S (2011) CCK stimulation of GLP-1 neurons involves alpha1-adrenoceptor-mediated increase in glutamatergic synaptic inputs. *Diabetes* 60: 2701-2709.
405. Neary NM, Small CJ, Druce MR, Park AJ, Ellis SM, et al. (2005) Peptide YY3-36 and glucagon-like peptide-17-36 inhibit food intake additively. *Endocrinology* 146: 5120-5127.
406. De Silva A, Salem V, Long CJ, Makwana A, Newbould RD, et al. (2011) The gut hormones PYY 3-36 and GLP-1 7-36 amide reduce food intake and modulate brain activity in appetite centers in humans. *Cell Metab* 14: 700-706.
407. Naslund E, Bogefors J, Skogar S, Gryback P, Jacobsson H, et al. (1999) GLP-1 slows solid gastric emptying and inhibits insulin, glucagon, and PYY release in humans. *Am J Physiol* 277: R910-916.
408. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, et al. (1999) Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402: 656-660.
409. Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K (2000) Purification and characterization of rat des-Gln14-Ghrelin, a second endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *J Biol Chem* 275: 21995-22000.

410. Hosoda H, Kojima M, Mizushima T, Shimizu S, Kangawa K (2003) Structural divergence of human ghrelin. Identification of multiple ghrelin-derived molecules produced by post-translational processing. *J Biol Chem* 278: 64-70.
411. Rindi G, Leiter AB, Kopin AS, Bordi C, Solcia E (2004) The "normal" endocrine cell of the gut: changing concepts and new evidences. *Ann N Y Acad Sci* 1014: 1-12.
412. Sakata I, Nakamura K, Yamazaki M, Matsubara M, Hayashi Y, et al. (2002) Ghrelin-producing cells exist as two types of cells, closed- and opened-type cells, in the rat gastrointestinal tract. *Peptides* 23: 531-536.
413. Hosoda H, Kangawa K (2008) The autonomic nervous system regulates gastric ghrelin secretion in rats. *Regul Pept* 146: 12-18.
414. Gomez G, Englander EW, Greeley GH, Jr. (2004) Nutrient inhibition of ghrelin secretion in the fasted rat. *Regul Pept* 117: 33-36.
415. Gauna C, van der Lely AJ (2005) Somatostatin, cortistatin, ghrelin and glucose metabolism. *J Endocrinol Invest* 28: 127-131.
416. Murakami N, Hayashida T, Kuroiwa T, Nakahara K, Ida T, et al. (2002) Role for central ghrelin in food intake and secretion profile of stomach ghrelin in rats. *J Endocrinol* 174: 283-288.
417. Masuda Y, Tanaka T, Inomata N, Ohnuma N, Tanaka S, et al. (2000) Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 276: 905-908.
418. Callahan HS, Cummings DE, Pepe MS, Breen PA, Matthys CC, et al. (2004) Postprandial suppression of plasma ghrelin level is proportional to ingested caloric load but does not predict intermeal interval in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 1319-1324.
419. Little TJ, Doran S, Meyer JH, Smout AJ, O'Donovan DG, et al. (2006) The release of GLP-1 and ghrelin, but not GIP and CCK, by glucose is dependent upon the length of small intestine exposed. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291: E647-655.
420. Shiiya T, Nakazato M, Mizuta M, Date Y, Mondal MS, et al. (2002) Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 240-244.
421. Bowen J, Noakes M, Clifton PM (2006) Appetite regulatory hormone responses to various dietary proteins differ by body mass index status despite similar reductions in ad libitum energy intake. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 2913-2919.
422. Erdmann J, Lippl F, Schusdziarra V (2003) Differential effect of protein and fat on plasma ghrelin levels in man. *Regul Pept* 116: 101-107.
423. Foster-Schubert KE, Overduin J, Prudom CE, Liu J, Callahan HS, et al. (2008) Acyl and total ghrelin are suppressed strongly by ingested proteins, weakly by lipids, and biphasically by carbohydrates. *J Clin Endocrinol Metab* 93: 1971-1979.

424. Greenman Y, Golani N, Gilad S, Yaron M, Limor R, et al. (2004) Ghrelin secretion is modulated in a nutrient- and gender-specific manner. *Clin Endocrinol (Oxf)* 60: 382-388.
425. Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, et al. (2001) A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 50: 1714-1719.
426. Englander EW, Gomez GA, Greeley GH, Jr. (2004) Alterations in stomach ghrelin production and in ghrelin-induced growth hormone secretion in the aged rat. *Mech Ageing Dev* 125: 871-875.
427. Rigamonti AE, Pincelli AI, Corra B, Viarengo R, Bonomo SM, et al. (2002) Plasma ghrelin concentrations in elderly subjects: comparison with anorexic and obese patients. *J Endocrinol* 175: R1-5.
428. Schutte AE, Huisman HW, Schutte R, van Rooyen JM, Malan L, et al. (2007) Aging influences the level and functions of fasting plasma ghrelin levels: the POWIRS-Study. *Regul Pept* 139: 65-71.
429. Barkan AL, Dimaraki EV, Jessup SK, Symons KV, Ermolenko M, et al. (2003) Ghrelin secretion in humans is sexually dimorphic, suppressed by somatostatin, and not affected by the ambient growth hormone levels. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 2180-2184.
430. Atalayer D, Gibson C, Konopacka A, Geliebter A (2013) Ghrelin and eating disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 40: 70-82.
431. Guan XM, Yu H, Palyha OC, McKee KK, Feighner SD, et al. (1997) Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain Res Mol Brain Res* 48: 23-29.
432. De Vriese C, Perret J, Delporte C (2010) Focus on the short- and long-term effects of ghrelin on energy homeostasis. *Nutrition* 26: 579-584.
433. Korbonits M, Goldstone AP, Gueorguiev M, Grossman AB (2004) Ghrelin-a hormone with multiple functions. *Front Neuroendocrinol* 25: 27-68.
434. Granado M, Priego T, Martin AI, Villanua MA, Lopez-Calderon A (2005) Anti-inflammatory effect of the ghrelin agonist growth hormone-releasing peptide-2 (GHRP-2) in arthritic rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288: E486-492.
435. Ghanbari-Niaki A, Abednazari H, Tayebi SM, Hossaini-Kakhak A, Kraemer RR (2009) Treadmill training enhances rat agouti-related protein in plasma and reduces ghrelin levels in plasma and soleus muscle. *Metabolism* 58: 1747-1752.
436. Korner J, Bessler M, Cirilo LJ, Conwell IM, Daud A, et al. (2005) Effects of Roux-en-Y gastric bypass surgery on fasting and postprandial concentrations of plasma ghrelin, peptide YY, and insulin. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 359-365.
437. Shanado Y, Kometani M, Uchiyama H, Koizumi S, Teno N (2004) Lysophospholipase I identified as a ghrelin deacylation enzyme in rat stomach. *Biochem Biophys Res Commun* 325: 1487-1494.

438. Kojima M, Kangawa K (2010) Ghrelin: from gene to physiological function. *Results Probl Cell Differ* 50: 185-205.
439. Wren AM, Small CJ, Ward HL, Murphy KG, Dakin CL, et al. (2000) The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology* 141: 4325-4328.
440. Druce MR, Wren AM, Park AJ, Milton JE, Patterson M, et al. (2005) Ghrelin increases food intake in obese as well as lean subjects. *Int J Obes (Lond)* 29: 1130-1136.
441. Esler WP, Rudolph J, Claus TH, Tang W, Barucci N, et al. (2007) Small-molecule ghrelin receptor antagonists improve glucose tolerance, suppress appetite, and promote weight loss. *Endocrinology* 148: 5175-5185.
442. Asakawa A, Inui A, Kaga T, Katsuura G, Fujimiya M, et al. (2003) Antagonism of ghrelin receptor reduces food intake and body weight gain in mice. *Gut* 52: 947-952.
443. Otto B, Cuntz U, Fruehauf E, Wawarta R, Folwaczny C, et al. (2001) Weight gain decreases elevated plasma ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa. *Eur J Endocrinol* 145: 669-673.
444. Riediger T, Bothe C, Becskei C, Lutz TA (2004) Peptide YY directly inhibits ghrelin-activated neurons of the arcuate nucleus and reverses fasting-induced c-Fos expression. *Neuroendocrinology* 79: 317-326.
445. Wang J, Yuan Z, Dong J, Zhang D, Usami T, et al. (2013) Neuropeptide Y loses its orexigenic effect in rats with lesions of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocr Res* 38: 8-14.
446. Stengel A, Tache Y (2012) Ghrelin - a pleiotropic hormone secreted from endocrine x/a-like cells of the stomach. *Front Neurosci* 6: 24.
447. Tschöp M, Smiley DL, Heiman ML (2000) Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407: 908-913.
448. Tschöp M, Weyer C, Tataranni PA, Devanarayan V, Ravussin E, et al. (2001) Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes* 50: 707-709.
449. English PJ, Ghatei MA, Malik IA, Bloom SR, Wilding JP (2002) Food fails to suppress ghrelin levels in obese humans. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 2984.
450. Briggs DI, Enriori PJ, Lemus MB, Cowley MA, Andrews ZB (2010) Diet-induced obesity causes ghrelin resistance in arcuate NPY/AgRP neurons. *Endocrinology* 151: 4745-4755.
451. Hagemann D, Holst JJ, Gethmann A, Banasch M, Schmidt WE, et al. (2007) Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) suppresses ghrelin levels in humans via increased insulin secretion. *Regul Pept* 143: 64-68.
452. Kobelt P, Goebel M, Stengel A, Schmidtman M, van der Voort IR, et al. (2006) Bombesin, but not amylin, blocks the orexigenic effect of peripheral ghrelin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291: R903-913.

453. Egido EM, Rodriguez-Gallardo J, Silvestre RA, Marco J (2002) Inhibitory effect of ghrelin on insulin and pancreatic somatostatin secretion. *Eur J Endocrinol* 146: 241-244.
454. Reimer MK, Pacini G, Ahren B (2003) Dose-dependent inhibition by ghrelin of insulin secretion in the mouse. *Endocrinology* 144: 916-921.
455. Broglio F, Arvat E, Benso A, Gottero C, Muccioli G, et al. (2001) Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 5083-5086.
456. Yada T, Dezaki K, Sone H, Koizumi M, Damdindorj B, et al. (2008) Ghrelin regulates insulin release and glycemia: physiological role and therapeutic potential. *Curr Diabetes Rev* 4: 18-23.
457. Wisser AS, Habbel P, Wiedenmann B, Klapp BF, Monnikes H, et al. (2010) Interactions of gastrointestinal peptides: ghrelin and its anorexigenic antagonists. *Int J Pept* 2010.
458. Sanger F, Tuppy H (1951) The amino-acid sequence in the phenylalanyl chain of insulin. 2. The investigation of peptides from enzymic hydrolysates. *Biochem J* 49: 481-490.
459. Sanger F, Tuppy H (1951) The amino-acid sequence in the phenylalanyl chain of insulin. I. The identification of lower peptides from partial hydrolysates. *Biochem J* 49: 463-481.
460. Banks WA, Owen JB, Erickson MA (2012) Insulin in the brain: there and back again. *Pharmacol Ther* 136: 82-93.
461. Polonsky KS (2012) The past 200 years in diabetes. *N Engl J Med* 367: 1332-1340.
462. Henquin JC (2000) Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes* 49: 1751-1760.
463. Braun M, Ramracheya R, Rorsman P (2012) Autocrine regulation of insulin secretion. *Diabetes Obes Metab* 14 Suppl 3: 143-151.
464. Ishiyama N, Ravier MA, Henquin JC (2006) Dual mechanism of the potentiation by glucose of insulin secretion induced by arginine and tolbutamide in mouse islets. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290: E540-549.
465. Woods SC, Seeley RJ (2001) Insulin as an adiposity signal. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25 Suppl 5.
466. Gual P, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF (2005) Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie* 87: 99-109.
467. Previs SF, Withers DJ, Ren JM, White MF, Shulman GI (2000) Contrasting effects of IRS-1 versus IRS-2 gene disruption on carbohydrate and lipid metabolism in vivo. *J Biol Chem* 275: 38990-38994.
468. Kido Y, Burks DJ, Withers D, Bruning JC, Kahn CR, et al. (2000) Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1, and IRS-2. *J Clin Invest* 105: 199-205.

469. Baskin DG, Schwartz MW, Sipols AJ, D'Alessio DA, Goldstein BJ, et al. (1994) Insulin receptor substrate-1 (IRS-1) expression in rat brain. *Endocrinology* 134: 1952-1955.
470. Taguchi A, Wartschow LM, White MF (2007) Brain IRS2 signaling coordinates life span and nutrient homeostasis. *Science* 317: 369-372.
471. Pardridge WM (2007) Blood-brain barrier delivery. *Drug Discov Today* 12: 54-61.
472. Banks WA, Kastin AJ (1998) Differential permeability of the blood-brain barrier to two pancreatic peptides: insulin and amylin. *Peptides* 19: 883-889.
473. Derakhshan F, Toth C (2013) Insulin and the brain. *Curr Diabetes Rev* 9: 102-116.
474. Schroeder N, Marquart LF, Gallaher DD (2013) The role of viscosity and fermentability of dietary fibers on satiety- and adiposity-related hormones in rats. *Nutrients* 5: 2093-2113.
475. Huang W, Dedousis N, O'Doherty RM (2007) Hepatic steatosis and plasma dyslipidemia induced by a high-sucrose diet are corrected by an acute leptin infusion. *J Appl Physiol* (1985) 102: 2260-2265.
476. Burt RL, Davidson IW (1974) Insulin half-life and utilization in normal pregnancy. *Obstet Gynecol* 43: 161-170.
477. Meguid MM, Aun F, Soeldner JS, Albertson DA, Boyden CM (1981) Insulin half-life in man after trauma. *Surgery* 89: 650-653.
478. Polonsky KS, Rubenstein AH (1984) C-peptide as a measure of the secretion and hepatic extraction of insulin. Pitfalls and limitations. *Diabetes* 33: 486-494.
479. Valera Mora ME, Scarfone A, Calvani M, Greco AV, Mingrone G (2003) Insulin clearance in obesity. *J Am Coll Nutr* 22: 487-493.
480. Gil A (2010) *Tratado de nutrición*. España: Editorial Panamericana.
481. Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Jr., Seeley RJ, Baskin DG (2000) Central nervous system control of food intake. *Nature* 404: 661-671.
482. Baskin DG, Figlewicz Lattemann D, Seeley RJ, Woods SC, Porte D, Jr., et al. (1999) Insulin and leptin: dual adiposity signals to the brain for the regulation of food intake and body weight. *Brain Res* 848: 114-123.
483. Woods SC, Lotter EC, McKay LD, Porte D, Jr. (1979) Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature* 282: 503-505.
484. Jauch-Chara K, Friedrich A, Rezmer M, Melchert UH, H GS-E, et al. (2012) Intranasal insulin suppresses food intake via enhancement of brain energy levels in humans. *Diabetes* 61: 2261-2268.
485. Hallschmid M, Benedict C, Schultes B, Fehm HL, Born J, et al. (2004) Intranasal insulin reduces body fat in men but not in women. *Diabetes* 53: 3024-3029.
486. Okamoto H, Nakae J, Kitamura T, Park BC, Dragatsis I, et al. (2004) Transgenic rescue of insulin receptor-deficient mice. *J Clin Invest* 114: 214-223.

487. Park-York M, Boghossian S, Oh H, York DA (2013) PKC $\theta$  expression in the amygdala regulates insulin signaling, food intake and body weight. *Obesity (Silver Spring)* 21: 755-764.
488. Stockhorst U, de Fries D, Steingrueber HJ, Scherbaum WA (2004) Insulin and the CNS: effects on food intake, memory, and endocrine parameters and the role of intranasal insulin administration in humans. *Physiol Behav* 83: 47-54.
489. Langhans W, Grossmann F, Geary N (2001) Intrameal hepatic-portal infusion of glucose reduces spontaneous meal size in rats. *Physiol Behav* 73: 499-507.
490. Brown LM, Clegg DJ, Benoit SC, Woods SC (2006) Intraventricular insulin and leptin reduce food intake and body weight in C57BL/6J mice. *Physiol Behav* 89: 687-691.
491. McGowan MK, Andrews KM, Grossman SP (1992) Chronic intrahypothalamic infusions of insulin or insulin antibodies alter body weight and food intake in the rat. *Physiol Behav* 51: 753-766.
492. Gloy VL, Lutz TA, Langhans W, Geary N, Hillebrand JJ (2010) Basal plasma levels of insulin, leptin, ghrelin, and amylin do not signal adiposity in rats recovering from forced overweight. *Endocrinology* 151: 4280-4288.
493. Matsuzawa-Nagata N, Takamura T, Ando H, Nakamura S, Kurita S, et al. (2008) Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity. *Metabolism* 57: 1071-1077.
494. Li S, Zhang HY, Hu CC, Lawrence F, Gallagher KE, et al. (2008) Assessment of diet-induced obese rats as an obesity model by comparative functional genomics. *Obesity (Silver Spring)* 16: 811-818.
495. Faber OK, Christensen K, Kehlet H, Madsbad S, Binder C (1981) Decreased insulin removal contributes to hyperinsulinemia in obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 53: 618-621.
496. Jones CN, Abbasi F, Carantoni M, Polonsky KS, Reaven GM (2000) Roles of insulin resistance and obesity in regulation of plasma insulin concentrations. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278: E501-508.
497. Ernsberger P, Velliquette R, Johnson J, Koletsky R (2005) Improvements in glucose tolerance and insulin resistance following weight loss persist after regain of the lost weight. *Obesity Research* 13: A53-A53.
498. Kaiyala KJ, Prigeon RL, Kahn SE, Woods SC, Schwartz MW (2000) Obesity induced by a high-fat diet is associated with reduced brain insulin transport in dogs. *Diabetes* 49: 1525-1533.
499. Banks WA (2010) Blood-brain barrier as a regulatory interface. *Forum Nutr* 63: 102-110.
500. Lin X, Taguchi A, Park S, Kushner JA, Li F, et al. (2004) Dysregulation of insulin receptor substrate 2 in beta cells and brain causes obesity and diabetes. *J Clin Invest* 114: 908-916.

501. Tsai M, Asakawa A, Amitani H, Inui A (2012) Stimulation of leptin secretion by insulin. *Indian J Endocrinol Metab* 16: S543-548.
502. Konner AC, Klockener T, Bruning JC (2009) Control of energy homeostasis by insulin and leptin: targeting the arcuate nucleus and beyond. *Physiol Behav* 97: 632-638.
503. Langslow DR, Kimmel JR, Pollock HG (1973) Studies of the distribution of a new avian pancreatic polypeptide and insulin among birds, reptiles, amphibians and mammals. *Endocrinology* 93: 558-565.
504. Schwartz TW, Stenquist B, Olbe L (1979) Cephalic phase of pancreatic-polypeptide secretion studied by sham feeding in man. *Scand J Gastroenterol* 14: 313-320.
505. Cox HM (2007) Neuropeptide Y receptors; antisecretory control of intestinal epithelial function. *Auton Neurosci* 133: 76-85.
506. Keire DA, Kobayashi M, Solomon TE, Reeve JR, Jr. (2000) Solution structure of monomeric peptide YY supports the functional significance of the PP-fold. *Biochemistry* 39: 9935-9942.
507. Schwartz TW (1983) Pancreatic polypeptide: a hormone under vagal control. *Gastroenterology* 85: 1411-1425.
508. Taylor IL, Impicciatore M, Carter DC, Walsh JH (1978) Effect of atropine and vagotomy on pancreatic polypeptide response to a meal in dogs. *Am J Physiol* 235: E443-447.
509. Sive AA, Vinik AI, van Tonder SV (1979) Pancreatic polypeptide (PP) responses to oral and intravenous glucose in man. *Am J Gastroenterol* 71: 183-185.
510. Simonian HP, Kresge KM, Boden GH, Parkman HP (2005) Differential effects of sham feeding and meal ingestion on ghrelin and pancreatic polypeptide levels: evidence for vagal efferent stimulation mediating ghrelin release. *Neurogastroenterol Motil* 17: 348-354.
511. Tasaka Y, Inoue S, Maruno K, Hirata Y (1980) Twenty-four-hour variations of plasma pancreatic polypeptide, insulin and glucagon in normal human subjects. *Endocrinol Jpn* 27: 495-498.
512. Schmid R, Schulte-Frohlinde E, Schusdziarra V, Neubauer J, Stegmann M, et al. (1992) Contribution of postprandial amino acid levels to stimulation of insulin, glucagon, and pancreatic polypeptide in humans. *Pancreas* 7: 698-704.
513. Lawson M, Everson GT, Klingensmith W, Kern F, Jr. (1983) Coordination of gastric and gallbladder emptying after ingestion of a regular meal. *Gastroenterology* 85: 866-870.
514. Adrian TE, Besterman HS, Cooke TJ, Bloom SR, Barnes AJ, et al. (1977) Mechanism of pancreatic polypeptide release in man. *Lancet* 1: 161-163.
515. Holmback U, Forslund A, Lowden A, Forslund J, Akerstedt T, et al. (2003) Endocrine responses to nocturnal eating--possible implications for night work. *Eur J Nutr* 42: 75-83.



516. Brimnes Damholt M, Rasmussen BK, Hilsted L, Jensen R, Hilsted J (1997) Basal serum pancreatic polypeptide is dependent on age and gender in an adult population. *Scand J Clin Lab Invest* 57: 695-702.
517. Johns CE, Newton JL, Westley BR, May FE (2006) Human pancreatic polypeptide has a marked diurnal rhythm that is affected by ageing and is associated with the gastric TFF2 circadian rhythm. *Peptides* 27: 1341-1348.
518. Berger D, Crowther RC, Floyd JC, Jr., Pek S, Fajans SS (1978) Effect of age on fasting plasma levels of pancreatic hormones in man. *J Clin Endocrinol Metab* 47: 1183-1189.
519. Iyengar S, Li DL, Simmons RM (1999) Characterization of neuropeptide Y-induced feeding in mice: do Y1-Y6 receptor subtypes mediate feeding? *J Pharmacol Exp Ther* 289: 1031-1040.
520. Gehlert DR, Schober DA, Beavers L, Gadski R, Hoffman JA, et al. (1996) Characterization of the peptide binding requirements for the cloned human pancreatic polypeptide-preferring receptor. *Mol Pharmacol* 50: 112-118.
521. Whitcomb DC, Puccio AM, Vigna SR, Taylor IL, Hoffman GE (1997) Distribution of pancreatic polypeptide receptors in the rat brain. *Brain Res* 760: 137-149.
522. Dumont Y, Moyse E, Fournier A, Quirion R (2007) Distribution of peripherally injected peptide YY ([125I] PYY (3-36)) and pancreatic polypeptide ([125I] hPP) in the CNS: enrichment in the area postrema. *J Mol Neurosci* 33: 294-304.
523. von Hörsten S, Hoffman T, Alfalah M, Wrann C, D., Karl T, et al. (2004) *Handbook of Experimental Pharmacology*.
524. Reinehr T, Roth CL, Enriori PJ, Masur K (2010) Changes of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) in obese children with weight loss: relationships to peptide YY, pancreatic peptide, and insulin sensitivity. *J Pediatr Endocrinol Metab* 23: 101-108.
525. Adrian TE, Greenberg GR, Besterman HS, Bloom SR (1978) Pharmacokinetics of pancreatic polypeptide in man. *Gut* 19: 907-909.
526. Miyasaka K, Miyazaki K, Funakoshi A, Kitani K (1989) Involvement of pancreatic polypeptide (PP) in luminal feedback regulation in the conscious rat. *Dig Dis Sci* 34: 474-480.
527. Akpan JO, Havel PJ, Parry SJ, Shalwitz RA, Gingerich RL (1992) The characterization of radioimmunoassay for rat pancreatic polypeptide in serum. *Regul Pept* 37: 59-69.
528. Kojima S, Ueno N, Asakawa A, Sagiya K, Naruo T, et al. (2007) A role for pancreatic polypeptide in feeding and body weight regulation. *Peptides* 28: 459-463.
529. Asakawa A, Inui A, Yuzuriha H, Ueno N, Katsuura G, et al. (2003) Characterization of the effects of pancreatic polypeptide in the regulation of energy balance. *Gastroenterology* 124: 1325-1336.

530. Batterham RL, Le Roux CW, Cohen MA, Park AJ, Ellis SM, et al. (2003) Pancreatic polypeptide reduces appetite and food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 3989-3992.
531. Jesudason DR, Monteiro MP, McGowan BM, Neary NM, Park AJ, et al. (2007) Low-dose pancreatic polypeptide inhibits food intake in man. *Br J Nutr* 97: 426-429.
532. Banks WA, Kastin AJ, Jaspan JB (1995) Regional variation in transport of pancreatic polypeptide across the blood-brain barrier of mice. *Pharmacol Biochem Behav* 51: 139-147.
533. Campbell RE, Smith MS, Allen SE, Grayson BE, Ffrench-Mullen JM, et al. (2003) Orexin neurons express a functional pancreatic polypeptide Y4 receptor. *J Neurosci* 23: 1487-1497.
534. Tasan RO, Lin S, Hetzenauer A, Singewald N, Herzog H, et al. (2009) Increased novelty-induced motor activity and reduced depression-like behavior in neuropeptide Y (NPY)-Y4 receptor knockout mice. *Neuroscience* 158: 1717-1730.
535. Jorde R, Burhol PG (1984) Fasting and postprandial plasma pancreatic polypeptide (PP) levels in obesity. *Int J Obes* 8: 393-397.
536. Glaser B, Zoghlin G, Pienta K, Vinik AI (1988) Pancreatic polypeptide response to secretin in obesity: effects of glucose intolerance. *Horm Metab Res* 20: 288-292.
537. Uhe AM, Szmukler GI, Collier GR, Hansky J, O'Dea K, et al. (1992) Potential regulators of feeding behavior in anorexia nervosa. *Am J Clin Nutr* 55: 28-32.
538. Zipf WB, O'Dorisio TM, Cataland S, Dixon K (1983) Pancreatic polypeptide responses to protein meal challenges in obese but otherwise normal children and obese children with Prader-Willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 57: 1074-1080.
539. Arosio M, Ronchi CL, Gebbia C, Cappiello V, Beck-Peccoz P, et al. (2003) Stimulatory effects of ghrelin on circulating somatostatin and pancreatic polypeptide levels. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 701-704.
540. Tatemoto K (1982) Isolation and characterization of peptide YY (PYY), a candidate gut hormone that inhibits pancreatic exocrine secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 2514-2518.
541. Habib AM, Richards P, Rogers GJ, Reimann F, Gribble FM (2013) Co-localisation and secretion of glucagon-like peptide 1 and peptide YY from primary cultured human L cells. *Diabetologia* 56: 1413-1416.
542. Field BC, Wren AM, Peters V, Baynes KC, Martin NM, et al. (2010) PYY3-36 and oxyntomodulin can be additive in their effect on food intake in overweight and obese humans. *Diabetes* 59: 1635-1639.
543. Pedersen-Bjergaard U, Host U, Kelbaek H, Schifter S, Rehfeld JF, et al. (1996) Influence of meal composition on postprandial peripheral plasma

- concentrations of vasoactive peptides in man. *Scand J Clin Lab Invest* 56: 497-503.
544. Batterham RL, Heffron H, Kapoor S, Chivers JE, Chandarana K, et al. (2006) Critical role for peptide YY in protein-mediated satiation and body-weight regulation. *Cell Metab* 4: 223-233.
545. MacIntosh CG, Andrews JM, Jones KL, Wishart JM, Morris HA, et al. (1999) Effects of age on concentrations of plasma cholecystokinin, glucagon-like peptide 1, and peptide YY and their relation to appetite and pyloric motility. *Am J Clin Nutr* 69: 999-1006.
546. Serrano P, Yago MD, Manas M, Calpena R, Mataix J, et al. (1997) Influence of type of dietary fat (olive and sunflower oil) upon gastric acid secretion and release of gastrin, somatostatin, and peptide YY in man. *Dig Dis Sci* 42: 626-633.
547. Adrian TE, Savage AP, Sagor GR, Allen JM, Bacarese-Hamilton AJ, et al. (1985) Effect of peptide YY on gastric, pancreatic, and biliary function in humans. *Gastroenterology* 89: 494-499.
548. Fu-Cheng X, Anini Y, Chariot J, Castex N, Galmiche JP, et al. (1997) Mechanisms of peptide YY release induced by an intraduodenal meal in rats: neural regulation by proximal gut. *Pflugers Arch* 433: 571-579.
549. Mentlein R, Dahms P, Grandt D, Kruger R (1993) Proteolytic Processing of Neuropeptide-Y and Peptide-Yy by Dipeptidyl Peptidase-Iv. *Regulatory Peptides* 49: 133-144.
550. Ali-Rachedi A, Varndell IM, Adrian TE, Gapp DA, Van Noorden S, et al. (1984) Peptide YY (PYY) immunoreactivity is co-stored with glucagon-related immunoreactants in endocrine cells of the gut and pancreas. *Histochemistry* 80: 487-491.
551. Keire DA, Bowers CW, Solomon TE, Reeve JR, Jr. (2002) Structure and receptor binding of PYY analogs. *Peptides* 23: 305-321.
552. le Roux CW, Borg C, Wallis K, Vincent RP, Bueter M, et al. (2010) Gut hypertrophy after gastric bypass is associated with increased glucagon-like peptide 2 and intestinal crypt cell proliferation. *Ann Surg* 252: 50-56.
553. Lluís F, Fujimura M, Gomez G, Salva JA, Greeley GH, Jr., et al. (1989) Cellular localization, half-life, and secretion of peptide YY. *Rev Esp Fisiol* 45: 377-384.
554. Degen L, Oesch S, Casanova M, Graf S, Ketterer S, et al. (2005) Effect of peptide YY3-36 on food intake in humans. *Gastroenterology* 129: 1430-1436.
555. Batterham RL, Cohen MA, Ellis SM, Le Roux CW, Withers DJ, et al. (2003) Inhibition of food intake in obese subjects by peptide YY3-36. *N Engl J Med* 349: 941-948.
556. Challis BG, Pinnock SB, Coll AP, Carter RN, Dickson SL, et al. (2003) Acute effects of PYY3-36 on food intake and hypothalamic neuropeptide expression in the mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 311: 915-919.

557. Chelikani PK, Haver AC, Reeve JR, Jr., Keire DA, Reidelberger RD (2006) Daily, intermittent intravenous infusion of peptide YY(3-36) reduces daily food intake and adiposity in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290: R298-305.
558. Batterham RL, Cowley MA, Small CJ, Herzog H, Cohen MA, et al. (2002) Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. *Nature* 418: 650-654.
559. Tschöp M, Castaneda TR, Joost HG, Thone-Reineke C, Ortmann S, et al. (2004) Physiology: does gut hormone PYY3-36 decrease food intake in rodents? *Nature* 430: 1 p following 165; discussion 162 p following 165.
560. Ueno H, Yamaguchi H, Mizuta M, Nakazato M (2008) The role of PYY in feeding regulation. *Regul Pept* 145: 12-16.
561. Pfluger PT, Kampe J, Castaneda TR, Vahl T, D'Alessio DA, et al. (2007) Effect of human body weight changes on circulating levels of peptide YY and peptide YY3-36. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 583-588.
562. le Roux CW, Batterham RL, Aylwin SJ, Patterson M, Borg CM, et al. (2006) Attenuated peptide YY release in obese subjects is associated with reduced satiety. *Endocrinology* 147: 3-8.
563. Lin HC, Chey WY, Zhao X (2000) Release of distal gut peptide YY (PYY) by fat in proximal gut depends on CCK. *Peptides* 21: 1561-1563.
564. Sloth B, Holst JJ, Flint A, Gregersen NT, Astrup A (2007) Effects of PYY1-36 and PYY3-36 on appetite, energy intake, energy expenditure, glucose and fat metabolism in obese and lean subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292: E1062-1068.
565. Unniappan S, Kieffer TJ (2008) Leptin extends the anorectic effects of chronic PYY(3-36) administration in ad libitum-fed rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295: R51-58.
566. Chan JL, Stoyneva V, Kelesidis T, Raciti P, Mantzoros CS (2006) Peptide YY levels are decreased by fasting and elevated following caloric intake but are not regulated by leptin. *Diabetologia* 49: 169-173.
567. Coleman DL (1978) Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetologia* 14: 141-148.
568. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, et al. (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372: 425-432.
569. Fruhbeck G (2001) A heliocentric view of leptin. *Proc Nutr Soc* 60: 301-318.
570. Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, et al. (1995) Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* 1: 1155-1161.
571. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, et al. (1996) Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 334: 292-295.

572. Saad MF, Riad-Gabriel MG, Khan A, Sharma A, Michael R, et al. (1998) Diurnal and ultradian rhythmicity of plasma leptin: effects of gender and adiposity. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 453-459.
573. Korbonits M, Trainer PJ, Little JA, Edwards R, Kopelman PG, et al. (1997) Leptin levels do not change acutely with food administration in normal or obese subjects, but are negatively correlated with pituitary-adrenal activity. *Clin Endocrinol (Oxf)* 46: 751-757.
574. Senaris R, Garcia-Caballero T, Casabiell X, Gallego R, Castro R, et al. (1997) Synthesis of leptin in human placenta. *Endocrinology* 138: 4501-4504.
575. Wolsk E, Mygind H, Grondahl TS, Pedersen BK, van Hall G (2012) Human skeletal muscle releases leptin in vivo. *Cytokine* 60: 667-673.
576. Sobhani I, Bado A, Vissuzaine C, Buyse M, Kermorgant S, et al. (2000) Leptin secretion and leptin receptor in the human stomach. *Gut* 47: 178-183.
577. Cammisotto PG, Renaud C, Gingras D, Delvin E, Levy E, et al. (2005) Endocrine and exocrine secretion of leptin by the gastric mucosa. *J Histochem Cytochem* 53: 851-860.
578. Cinti S, Matteis RD, Pico C, Ceresi E, Obrador A, et al. (2000) Secretory granules of endocrine and chief cells of human stomach mucosa contain leptin. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24: 789-793.
579. Cinti S, de Matteis R, Ceresi E, Pico C, Oliver J, et al. (2001) Leptin in the human stomach. *Gut* 49: 155.
580. Sobhani I, Buyse M, Goiot H, Weber N, Laigneau JP, et al. (2002) Vagal stimulation rapidly increases leptin secretion in human stomach. *Gastroenterology* 122: 259-263.
581. Mix H, Widjaja A, Jandl O, Cornberg M, Kaul A, et al. (2000) Expression of leptin and leptin receptor isoforms in the human stomach. *Gut* 47: 481-486.
582. Karl JP, Young AJ, Montain SJ (2011) Eating rate during a fixed-portion meal does not affect postprandial appetite and gut peptides or energy intake during a subsequent meal. *Physiology & Behavior* 102: 524-531.
583. Imbeault P, Doucet E, Mauriege P, St-Pierre S, Couillard C, et al. (2001) Difference in leptin response to a high-fat meal between lean and obese men. *Clin Sci (Lond)* 101: 359-365.
584. Romon M, Lebel P, Velly C, Marecaux N, Fruchart JC, et al. (1999) Leptin response to carbohydrate or fat meal and association with subsequent satiety and energy intake. *Am J Physiol* 277: E855-861.
585. Das M, Gabriely I, Barzilai N (2004) Caloric restriction, body fat and ageing in experimental models. *Obes Rev* 5: 13-19.
586. Muzumdar RH, Ma X, Yang X, Atzmon G, Barzilai N (2006) Central resistance to the inhibitory effects of leptin on stimulated insulin secretion with aging. *Neurobiol Aging* 27: 1308-1314.

587. Escriva F, Gavete ML, Fermin Y, Perez C, Gallardo N, et al. (2007) Effect of age and moderate food restriction on insulin sensitivity in Wistar rats: role of adiposity. *J Endocrinol* 194: 131-141.
588. Kmiec Z, Pokrywka L, Kotlarz G, Kubasik J, Szutowicz A, et al. (2005) Effects of fasting and refeeding on serum leptin, adiponectin and free fatty acid concentrations in young and old male rats. *Gerontology* 51: 357-362.
589. Zamboni M, Zoico E, Fantin F, Panourgia MP, Di Francesco V, et al. (2004) Relation between leptin and the metabolic syndrome in elderly women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 59: 396-400.
590. Bauer JM, Haack A, Winning K, Wirth R, Fischer B, et al. (2010) Impaired postprandial response of active ghrelin and prolonged suppression of hunger sensation in the elderly. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 65: 307-311.
591. Di Francesco V, Zamboni M, Zoico E, Mazzali G, Dioli A, et al. (2006) Unbalanced serum leptin and ghrelin dynamics prolong postprandial satiety and inhibit hunger in healthy elderly: another reason for the "anorexia of aging". *Am J Clin Nutr* 83: 1149-1152.
592. Fruhbeck G (2006) Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem J* 393: 7-20.
593. Baskin DG, Hahn TM, Schwartz MW (1999) Leptin sensitive neurons in the hypothalamus. *Horm Metab Res* 31: 345-350.
594. Figlewicz DP (2003) Adiposity signals and food reward: expanding the CNS roles of insulin and leptin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284: R882-892.
595. Klein S, Coppack SW, Mohamed-Ali V, Landt M (1996) Adipose tissue leptin production and plasma leptin kinetics in humans. *Diabetes* 45: 984-987.
596. Ahren B, Baldwin RM, Havel PJ (2000) Pharmacokinetics of human leptin in mice and rhesus monkeys. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24: 1579-1585.
597. Vila R, Adan C, Rafecas I, Fernandez-Lopez JA, Remesar X, et al. (1998) Plasma leptin turnover rates in lean and obese Zucker rats. *Endocrinology* 139: 4466-4469.
598. Cumin F, Baum HP, Levens N (1996) Leptin is cleared from the circulation primarily by the kidney. *Int J Obes Relat Metab Disord* 20: 1120-1126.
599. Canpolat S, Sandal S, Yilmaz B, Yasar A, Kutlu S, et al. (2001) Effects of pinealectomy and exogenous melatonin on serum leptin levels in male rat. *Eur J Pharmacol* 428: 145-148.
600. Patel JD, Ebenezer IS (2008) The effect of intraperitoneal administration of leptin on short-term food intake in rats. *Eur J Pharmacol* 580: 143-152.
601. Friedman JM, Halaas JL (1998) Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395: 763-770.
602. Richy S, Burlet A, Max J, Burlet C, Beck B (2000) Effect of chronic intraperitoneal injections of leptin on hypothalamic neurotensin content and food intake. *Brain Res* 862: 276-279.

603. Flynn MC, Scott TR, Pritchard TC, Plata-Salaman CR (1998) Mode of action of OB protein (leptin) on feeding. *Am J Physiol* 275: R174-179.
604. Buyse M, Ovesjo ML, Goiot H, Guilmeau S, Peranzi G, et al. (2001) Expression and regulation of leptin receptor proteins in afferent and efferent neurons of the vagus nerve. *Eur J Neurosci* 14: 64-72.
605. Hosoi T, Kawagishi T, Okuma Y, Tanaka J, Nomura Y (2002) Brain stem is a direct target for leptin's action in the central nervous system. *Endocrinology* 143: 3498-3504.
606. Peters JH, McKay BM, Simasko SM, Ritter RC (2005) Leptin-induced satiation mediated by abdominal vagal afferents. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288: R879-884.
607. Song CK, Schwartz GJ, Bartness TJ (2009) Anterograde transneuronal viral tract tracing reveals central sensory circuits from white adipose tissue. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296: R501-511.
608. Bado A, Lévassieur S, Attoub S, Kermorgant S, Laigneau JP, et al. (1998) The stomach is a source of leptin. *Nature* 394: 790-793.
609. Cakir B, Kasimay O, Devseren E, Yegen BC (2007) Leptin inhibits gastric emptying in rats: role of CCK receptors and vagal afferent fibers. *Physiol Res* 56: 315-322.
610. Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, et al. (1996) Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 382: 250-252.
611. Kolaczynski JW, Considine RV, Ohannesian J, Marco C, Opentanova I, et al. (1996) Responses of leptin to short-term fasting and refeeding in humans: a link with ketogenesis but not ketones themselves. *Diabetes* 45: 1511-1515.
612. Grill HJ (2010) Leptin and the systems neuroscience of meal size control. *Front Neuroendocrinol* 31: 61-78.
613. Bouret SG, Simerly RB (2004) Minireview: Leptin and development of hypothalamic feeding circuits. *Endocrinology* 145: 2621-2626.
614. Coppari R, Bjorbaek C (2012) Leptin revisited: its mechanism of action and potential for treating diabetes. *Nat Rev Drug Discov* 11: 692-708.
615. Rodrigues AM, Radominski RB, Suplicy Hde L, De Almeida SM, Niclewicz PA, et al. (2002) The cerebrospinal fluid/serum leptin ratio during pharmacological therapy for obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 1621-1626.
616. Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, et al. (1995) Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 269: 543-546.
617. Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, et al. (1997) Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 387: 903-908.
618. Knight ZA, Hannan KS, Greenberg ML, Friedman JM (2010) Hyperleptinemia is required for the development of leptin resistance. *PLoS One* 5: e11376.

619. Caro JF, Kolaczynski JW, Nyce MR, Ohannesian JP, Opentanova I, et al. (1996) Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet* 348: 159-161.
620. Ruffin MP, Adage T, Kuipers F, Strubbe JH, Scheurink AJ, et al. (2004) Feeding and temperature responses to intravenous leptin infusion are differential predictors of obesity in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286: R756-763.
621. Adam CL, Findlay PA (2010) Decreased blood-brain leptin transfer in an ovine model of obesity and weight loss: resolving the cause of leptin resistance. *Int J Obes (Lond)* 34: 980-988.
622. Caro JF, Sinha MK, Kolaczynski JW, Zhang PL, Considine RV (1996) Leptin: the tale of an obesity gene. *Diabetes* 45: 1455-1462.
623. Fruhbeck G, Aguado M, Gomez-Ambrosi J, Martinez JA (1998) Lipolytic effect of in vivo leptin administration on adipocytes of lean and ob/ob mice, but not db/db mice. *Biochem Biophys Res Commun* 250: 99-102.
624. Zhao S, Kanoski SE, Yan J, Grill HJ, Hayes MR (2012) Hindbrain leptin and glucagon-like-peptide-1 receptor signaling interact to suppress food intake in an additive manner. *Int J Obes (Lond)* 36: 1522-1528.
625. Nowak A, Bojanowska E (2008) Effects of peripheral or central GLP-1 receptor blockade on leptin-induced suppression of appetite. *J Physiol Pharmacol* 59: 501-510.
626. Bensaid A, Tome D, Gietzen D, Even P, Morens C, et al. (2002) Protein is more potent than carbohydrate for reducing appetite in rats. *Physiol Behav* 75: 577-582.
627. Anderson GH, Moore SE (2004) Dietary proteins in the regulation of food intake and body weight in humans. *J Nutr* 134: 974S-979S.
628. Lane MD, Cha SH (2009) Effect of glucose and fructose on food intake via malonyl-CoA signaling in the brain. *Biochem Biophys Res Commun* 382: 1-5.
629. Duca FA, Sakar Y, Covasa M (2013) The modulatory role of high fat feeding on gastrointestinal signals in obesity. *J Nutr Biochem* 24: 1663-1677.
630. Lam TK, Schwartz GJ, Rossetti L (2005) Hypothalamic sensing of fatty acids. *Nat Neurosci* 8: 579-584.
631. Tome D, Schwarz J, Darcel N, Fromentin G (2009) Protein, amino acids, vagus nerve signaling, and the brain. *Am J Clin Nutr* 90: 838S-843S.
632. Belza A, Ritz C, Sorensen MQ, Holst JJ, Rehfeld JF, et al. (2013) Contribution of gastroenteropancreatic appetite hormones to protein-induced satiety. *Am J Clin Nutr* 97: 980-989.
633. Blouet C, Jo YH, Li X, Schwartz GJ (2009) Mediobasal hypothalamic leucine sensing regulates food intake through activation of a hypothalamus-brainstem circuit. *J Neurosci* 29: 8302-8311.



634. Karhunen LJ, Juvonen KR, Huotari A, Purhonen AK, Herzig KH (2008) Effect of protein, fat, carbohydrate and fibre on gastrointestinal peptide release in humans. *Regul Pept* 149: 70-78.
635. Parker JA, Bloom SR (2012) Hypothalamic neuropeptides and the regulation of appetite. *Neuropharmacology* 63: 18-30.
636. Sohn JW, Elmquist JK, Williams KW (2013) Neuronal circuits that regulate feeding behavior and metabolism. *Trends Neurosci* 36: 504-512.
637. Baldassano S, Bellanca AL, Serio R, Mule F (2012) Food intake in lean and obese mice after peripheral administration of glucagon-like peptide 2. *J Endocrinol* 213: 277-284.
638. Parker JA, McCullough KA, Field BC, Minnion JS, Martin NM, et al. (2013) Glucagon and GLP-1 inhibit food intake and increase c-fos expression in similar appetite regulating centres in the brainstem and amygdala. *Int J Obes (Lond)*.
639. Dakin CL, Small CJ, Batterham RL, Neary NM, Cohen MA, et al. (2004) Peripheral oxyntomodulin reduces food intake and body weight gain in rats. *Endocrinology* 145: 2687-2695.
640. Cohen MA, Ellis SM, Le Roux CW, Batterham RL, Park A, et al. (2003) Oxyntomodulin suppresses appetite and reduces food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 4696-4701.
641. Kovacs EM, Lejeune MP, Westerterp-Plantenga MS (2003) The effects of enterostatin intake on food intake and energy expenditure. *Br J Nutr* 90: 207-214.
642. Cheng CY, Chu JY, Chow BK (2011) Central and peripheral administration of secretin inhibits food intake in mice through the activation of the melanocortin system. *Neuropsychopharmacology* 36: 459-471.
643. Lo CC, Langhans W, Georgievsky M, Arnold M, Caldwell JL, et al. (2012) Apolipoprotein AIV requires cholecystokinin and vagal nerves to suppress food intake. *Endocrinology* 153: 5857-5865.
644. Fujimoto K, Fukagawa K, Sakata T, Tso P (1993) Suppression of food intake by apolipoprotein A-IV is mediated through the central nervous system in rats. *J Clin Invest* 91: 1830-1833.
645. Cifani C, Durocher Y, Pathak A, Penicaud L, Smih F, et al. (2009) Possible common central pathway for resistin and insulin in regulating food intake. *Acta Physiol (Oxf)* 196: 395-400.
646. Ahima RS (2006) Metabolic actions of adipocyte hormones: focus on adiponectin. *Obesity (Silver Spring)* 14 Suppl 1: 9S-15S.
647. Langhans W, Hrupka B (1999) Interleukins and tumor necrosis factor as inhibitors of food intake. *Neuropeptides* 33: 415-424.
648. Raposinho PD, Pierroz DD, Broqua P, White RB, Pedrazzini T, et al. (2001) Chronic administration of neuropeptide Y into the lateral ventricle of C57BL/6J male

- mice produces an obesity syndrome including hyperphagia, hyperleptinemia, insulin resistance, and hypogonadism. *Mol Cell Endocrinol* 185: 195-204.
649. Zarjevski N, Cusin I, Vettor R, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B (1993) Chronic intracerebroventricular neuropeptide-Y administration to normal rats mimics hormonal and metabolic changes of obesity. *Endocrinology* 133: 1753-1758.
650. Tang-Christensen M, Vrang N, Ortmann S, Bidlingmaier M, Horvath TL, et al. (2004) Central administration of ghrelin and agouti-related protein (83-132) increases food intake and decreases spontaneous locomotor activity in rats. *Endocrinology* 145: 4645-4652.
651. Dube MG, Kalra SP, Kalra PS (1999) Food intake elicited by central administration of orexins/hypocretins: identification of hypothalamic sites of action. *Brain Res* 842: 473-477.
652. Williams CM, Kirkham TC (1999) Anandamide induces overeating: mediation by central cannabinoid (CB1) receptors. *Psychopharmacology (Berl)* 143: 315-317.
653. Hao S, Avraham Y, Mechoulam R, Berry EM (2000) Low dose anandamide affects food intake, cognitive function, neurotransmitter and corticosterone levels in diet-restricted mice. *Eur J Pharmacol* 392: 147-156.
654. Qu D, Ludwig DS, Gammeltoft S, Piper M, Pellemounter MA, et al. (1996) A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature* 380: 243-247.
655. Arase K, York DA, Shimizu H, Shargill N, Bray GA (1988) Effects of corticotropin-releasing factor on food intake and brown adipose tissue thermogenesis in rats. *Am J Physiol* 255.
656. Vrang N, Tang-Christensen M, Larsen PJ, Kristensen P (1999) Recombinant CART peptide induces c-Fos expression in central areas involved in control of feeding behaviour. *Brain Res* 818: 499-509.
657. Challet E (2013) Circadian clocks, food intake, and metabolism. *Prog Mol Biol Transl Sci* 119: 105-135.
658. Adam TC, Epel ES (2007) Stress, eating and the reward system. *Physiol Behav* 91: 449-458.
659. Hoffman GE, Smith MS, Verbalis JG (1993) c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol* 14: 173-213.
660. Detre JA, Wang J (2002) Technical aspects and utility of fMRI using BOLD and ASL. *Clin Neurophysiol* 113: 621-634.
661. Whitcomb DC, Taylor IL, Vigna SR (1990) Characterization of saturable binding sites for circulating pancreatic polypeptide in rat brain. *Am J Physiol* 259: G687-691.
662. Bailey EF (2008) A tasty morsel: the role of the dorsal vagal complex in the regulation of food intake and swallowing. Focus on "BDNF/TrkB signaling

- interacts with GABAergic system to inhibit rhythmic swallowing in the rat," by Bariohay et al. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295.
663. Jordan LM, Brownstone RM, Noga BR (1992) Control of functional systems in the brainstem and spinal cord. *Curr Opin Neurobiol* 2: 794-801.
664. Grill HJ, Kaplan JM (2001) Interoceptive and integrative contributions of forebrain and brainstem to energy balance control. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25 Suppl 5: S73-77.
665. Elmquist JK, Elias CF, Saper CB (1999) From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron* 22: 221-232.
666. Fernandez-Tresguerres JA, Arizanavarreta C, Cardinali DP, Escrich E, Gil-Loyzaga P, et al. (2010) *Fisiología Humana*.
667. Valassi E, Scacchi M, Cavagnini F (2008) Neuroendocrine control of food intake. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 18: 158-168.
668. Karnani M, Burdakov D (2011) Multiple hypothalamic circuits sense and regulate glucose levels. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 300: R47-55.
669. Obici S, Feng Z, Morgan K, Stein D, Karknias G, et al. (2002) Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake. *Diabetes* 51: 271-275.
670. Field BC, Chaudhri OB, Bloom SR (2010) Bowels control brain: gut hormones and obesity. *Nat Rev Endocrinol* 6: 444-453.
671. Dagher A (2012) Functional brain imaging of appetite. *Trends Endocrinol Metab* 23: 250-260.
672. Berridge KC (1996) Food reward: brain substrates of wanting and liking. *Neurosci Biobehav Rev* 20: 1-25.
673. Smith KS, Berridge KC (2005) The ventral pallidum and hedonic reward: neurochemical maps of sucrose "liking" and food intake. *J Neurosci* 25: 8637-8649.
674. Havermans RC (2011) "You Say it's Liking, I Say it's Wanting ...". On the difficulty of disentangling food reward in man. *Appetite* 57: 286-294.
675. Palmiter RD (2007) Is dopamine a physiologically relevant mediator of feeding behavior? *Trends Neurosci* 30: 375-381.
676. Lutter M, Nestler EJ (2009) Homeostatic and hedonic signals interact in the regulation of food intake. *J Nutr* 139: 629-632.
677. Arana FS, Parkinson JA, Hinton E, Holland AJ, Owen AM, et al. (2003) Dissociable contributions of the human amygdala and orbitofrontal cortex to incentive motivation and goal selection. *J Neurosci* 23: 9632-9638.
678. Morrison SF (2003) Raphe pallidus neurons mediate prostaglandin E2-evoked increases in brown adipose tissue thermogenesis. *Neuroscience* 121: 17-24.
679. Bamshad M, Aoki VT, Adkison MG, Warren WS, Bartness TJ (1998) Central nervous system origins of the sympathetic nervous system outflow to white adipose tissue. *Am J Physiol* 275.

680. Woods SC, Strubbe JH (1994) The Psychobiology of Meals. *Psychonomic Bulletin & Review* 1: 141-155.
681. Cameron J, Doucet E (2007) Getting to the bottom of feeding behaviour: who's on top? *Appl Physiol Nutr Metab* 32: 177-189.
682. Berthoud HR (2011) Metabolic and hedonic drives in the neural control of appetite: who is the boss? *Curr Opin Neurobiol* 21: 888-896.
683. Harrold JA, Dovey TM, Blundell JE, Halford JC (2012) CNS regulation of appetite. *Neuropharmacology* 63: 3-17.
684. Rolls ET (2012) Taste, olfactory and food texture reward processing in the brain and the control of appetite. *Proc Nutr Soc* 71: 488-501.
685. Rolls ET (2006) Brain mechanisms underlying flavour and appetite. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361: 1123-1136.
686. Begg DP, Woods SC (2013) Interactions between the central nervous system and pancreatic islet secretions: a historical perspective. *Adv Physiol Educ* 37: 53-60.
687. Davis JD, Smith GP (1990) Learning to sham feed: behavioral adjustments to loss of physiological postingestional stimuli. *Am J Physiol* 259: R1228-1235.
688. Powley TL, Phillips RJ (2004) Gastric satiation is volumetric, intestinal satiation is nutritive. *Physiol Behav* 82: 69-74.
689. Murphy KG, Bloom SR (2006) Gut hormones and the regulation of energy homeostasis. *Nature* 444: 854-859.
690. Fraser KA, Davison JS (1992) Cholecystokinin-induced c-fos expression in the rat brain stem is influenced by vagal nerve integrity. *Exp Physiol* 77: 225-228.
691. Parada J, Aguilera JM (2007) Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *J Food Sci* 72.
692. Deuel HJ (1955) *Biochemistry*. New York: Interscience Publishers Inc.
693. Harper AE, Kumta US (1959) Amino Acid Balance and Protein Requirement. *Federation Proceedings* 18: 1136-1142.
694. Harper AE (1958) Balance and imbalance of amino acids. *Ann N Y Acad Sci* 69: 1025-1038.
695. Young VR, Pellett PL (1994) Plant-Proteins in Relation to Human Protein and Amino-Acid Nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition* 59: S1203-S1212.
696. Erbersdobler H (1973) The normal course of protein digestion of food proteins. *Protein in Human Nutrition*: 453-467.
697. Eggum BO, Juliano BO (1973) Nitrogen Balance in Rats Fed Rices Differing in Protein Content. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 24: 921-927.
698. Ballesta MC, Martinez-Victoria E, Manas M, Mataix FJ, Seiquer I, et al. (1991) Protein digestibility in dog. Effect of the quantity and quality of dietary fat (virgin olive oil and sunflower oil). *Nahrung* 35: 161-167.

699. Teuber SS (2002) Hypothesis: The protein body effect and other aspects of food matrix effects. *Genetically Engineered Foods Assessing Potential Allergenicity* 964: 111-116.
700. Gilani GS, Cockell KA, Sepehr E (2005) Effects of antinutritional factors on protein digestibility and amino acid availability in foods. *J AOAC Int* 88: 967-987.
701. Knutson L, Koenders DJ, Fridblom H, Viberg A, Sein A, et al. (2010) Gastrointestinal metabolism of a vegetable-oil emulsion in healthy subjects. *Am J Clin Nutr* 92: 515-524.
702. Gunstone FD, Harwood JL, Dijkstra AJ (2007) *The Lipid Handbook* 3rd edition. Florida: CRC Press.
703. Mela DJ (2006) Novel food technologies: enhancing appetite control in liquid meal replacers. *Obesity (Silver Spring)* 14 Suppl 4: 179S-181S.
704. Ramirez M, Amate L, Gil A (2001) Absorption and distribution of dietary fatty acids from different sources. *Early Hum Dev* 65 Suppl: S95-S101.
705. Salvia-Trujillo L, Qian C, Martin-Belloso O, McClements DJ (2013) Influence of particle size on lipid digestion and beta-carotene bioaccessibility in emulsions and nanoemulsions. *Food Chem* 141: 1472-1480.
706. Denke MA, Fox MM, Schulte MC (1993) Short-Term Dietary Calcium Fortification Increases Fecal Saturated Fat-Content and Reduces Serum-Lipids in Men. *Journal of Nutrition* 123: 1047-1053.
707. Brink EJ, Haddeman E, Defouw NJ, Weststrate JA (1995) Positional Distribution of Stearic-Acid and Oleic-Acid in a Triacylglycerol and Dietary Calcium-Concentration Determines the Apparent Absorption of These Fatty-Acids in Rats. *Journal of Nutrition* 125: 2379-2387.
708. Porres JM, Aranda P, Lopez-Jurado M, Urbano G (2006) Nutritional evaluation of protein, phosphorus, calcium and magnesium bioavailability from lupin (*Lupinus albus* var. *multolupa*)-based diets in growing rats: effect of alpha-galactoside oligosaccharide extraction and phytase supplementation. *Br J Nutr* 95: 1102-1111.
709. Hanczakowski P, Szymczyk B (2007) Digestibility of different fats and fat deposition in rats. *Annals of Animal Science* 7: 289-294.
710. Llado I, Pico C, Palou A, Pons A (1995) Protein and amino acid intake in cafeteria fed obese rats. *Physiol Behav* 58: 513-519.
711. Rafecas I, Esteve M, Fernandez-Lopez JA, Remesar X, Alemany M (1993) Individual amino acid balances in young lean and obese Zucker rats fed a cafeteria diet. *Mol Cell Biochem* 121: 45-58.
712. Esteve M, Rafecas I, Fernandez-Lopez JA, Remesar X, Alemany M (1993) Dietary amino acid balances in young Wistar rats fed a cafeteria diet. *Biochem Mol Biol Int* 29: 1069-1081.

713. Jensen MD, Haymond MW (1991) Protein metabolism in obesity: effects of body fat distribution and hyperinsulinemia on leucine turnover. *Am J Clin Nutr* 53: 172-176.
714. Solini A, Bonora E, Bonadonna R, Castellino P, DeFronzo RA (1997) Protein metabolism in human obesity: relationship with glucose and lipid metabolism and with visceral adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 2552-2558.
715. Guillet C, Masgrau A, Boirie Y (2011) Is protein metabolism changed with obesity? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 14: 89-92.
716. Katsanos CS, Mandarino LJ (2011) Protein metabolism in human obesity: a shift in focus from whole-body to skeletal muscle. *Obesity (Silver Spring)* 19: 469-475.
717. Hernandez Vallejo SJ, Alqub M, Luquet S, Cruciani-Guglielmacci C, Delerive P, et al. (2009) Short-term adaptation of postprandial lipoprotein secretion and intestinal gene expression to a high-fat diet. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 296: G782-792.
718. Lu S, Yao Y, Meng S, Cheng X, Black DD (2002) Overexpression of apolipoprotein A-IV enhances lipid transport in newborn swine intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 277: 31929-31937.
719. Khan J, Islam MN (2012) Mechanisms of Obesity Induced Higher Intestinal Permeability. *International Medical Journal* 19: 307-308.
720. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 123: 1939-1951.
721. Sullivan DM, Carpenter DE (1993) Methods of analysis for nutrition labeling: Association of Official Analytical chemists Inc.
722. Hubbard WD, Sheppard AJ, Newkirk DR, Prosser AR, Osgood T (1977) Comparison of various methods for the extraction of total lipids, fatty acids, cholesterol, and other sterols from food products. *J Am Oil Chem Soc* 54: 81-83.
723. FAO/OMS (1966) Protein requirements. Meeting on Nutrition and Advances. Roma. 37.
724. Prieto PG, Cancelas J, Villanueva-Penacarrillo ML, Valverde I, Malaise WJ (2004) Plasma D-glucose, D-fructose and insulin responses after oral administration of D-glucose, D-fructose and sucrose to normal rats. *J Am Coll Nutr* 23: 414-419.
725. Dubois D, Dubois EF (1989) Nutrition Metabolism Classic - a Formula to Estimate the Approximate Surface-Area If Height and Weight Be Known (Reprinted from *Archives Internal Medicine*, Vol 17, Pg 863, 1916). *Nutrition* 5: 303-311.
726. Haber GB, Heaton KW, Murphy D, Burroughs LF (1977) Depletion and disruption of dietary fibre. Effects on satiety, plasma-glucose, and serum-insulin. *Lancet* 2: 679-682.

727. Pruessner JC, Kirschbaum C, Meinlschmid G, Hellhammer DH (2003) Two formulas for computation of the area under the curve represent measures of total hormone concentration versus time-dependent change. *Psychoneuroendocrinology* 28: 916-931.
728. Gallaher DD (1992) Animal models in human nutrition research. *Nutr Clin Pract* 7: 37-39.
729. Clegg D, Benoit S, Barrera J, Woods S (2003) Estrogen mediates body fat distribution and brain sensitivity to adiposity signals. *Diabetes* 52: A24-A24.
730. Reimer RA, Maurer AD, Eller LK, Hallam MC, Shaykhtudinov R, et al. (2012) Satiety hormone and metabolomic response to an intermittent high energy diet differs in rats consuming long-term diets high in protein or prebiotic fiber. *J Proteome Res* 11: 4065-4074.
731. Hallam MC, Reimer RA (2013) A maternal high-protein diet predisposes female offspring to increased fat mass in adulthood whereas a prebiotic fibre diet decreases fat mass in rats. *Br J Nutr* 110: 1732-1741.
732. L'Heureux-Bouron D, Tome D, Bensaid A, Morens C, Lacroix M, et al. (2004) Preabsorptive factors are not the main determinants of intake depression induced by a high-protein diet in the rat. *Physiol Behav* 81: 499-504.
733. Kapravelou G, Martínez R, Andrade AM, Sánchez C, Chaves CL, et al. (2013) Health promoting effects of Lupin (*Lupinus albus* var. *multolupa*) protein hydrolyzate and insoluble fiber in a diet-induced animal experimental model of hypercholesterolemia. *Food Research International* 54: 1471-1481.
734. Aparicio VA, Sanchez C, Ortega FB, Nebot E, Kapravelou G, et al. (2013) Effects of the dietary amount and source of protein, resistance training and anabolic-androgenic steroids on body weight and lipid profile of rats. *Nutr Hosp* 28: 127-136.
735. Bocanegra A, Nieto A, Bastida S, Benedi J, Sanchez-Muniz FJ (2008) A Nori but not a Konbu, dietary supplement decreases the cholesterolaemia, liver fat infiltration and mineral bioavailability in hypercholesterolaemic growing Wistar rats. *Br J Nutr* 99: 272-280.
736. Donato J, Jr., Pedrosa RG, Cruzat VF, Pires IS, Tirapegui J (2006) Effects of leucine supplementation on the body composition and protein status of rats submitted to food restriction. *Nutrition* 22: 520-527.
737. Jean C, Rome S, Mathe V, Huneau JF, Aattouri N, et al. (2001) Metabolic evidence for adaptation to a high protein diet in rats. *J Nutr* 131: 91-98.
738. Naim M, Brand JG, Christensen CM, Kare MR, Van Buren S (1986) Preference of rats for food flavors and texture in nutritionally controlled semi-purified diets. *Physiol Behav* 37: 15-21.
739. Beck CH, Huh TJ, Mumby DG, Fundytus ME (1989) Schedule-induced behavior in rats: Pellets versus powder. *Animal Learning & Behavior* 17: 49-62.

740. Booth D, Duggan J, Gibson E. Roles for the SCN in control of dietary intake and selection; 1993. Libbey. pp. 149.
741. Gudiel-Urbano M, Goni I (2002) Effect of short-chain fructooligosaccharides and cellulose on cecal enzyme activities in rats. *Ann Nutr Metab* 46: 254-258.
742. Urbano MG, Goñi I (2002) Bioavailability of nutrients in rats fed on edible seaweeds, Nori (< i> *Porphyra tenera*</i>) and Wakame (< i> *Undaria pinnatifida*</i>), as a source of dietary fibre. *Food chemistry* 76: 281-286.
743. Hallam CM (2013) Influence of Nutrients on Developmental Programming on Glucose and Lipid Metabolism in a Wistar Rat Model. Calgary: Calgary.
744. Zhao K, Ao Y, Harper RM, Go VL, Yang H (2013) Food-intake dysregulation in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats: hypothesized role of dysfunctional brainstem thyrotropin-releasing hormone and impaired vagal output. *Neuroscience* 247: 43-54.
745. Edwards BJ, Perry HM, Kaiser FE, Morley JE, Kraenzle D, et al. (1996) Age-related changes in amylin secretion. *Mech Ageing Dev* 86: 39-51.
746. Sengupta P (2013) The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *Int J Prev Med* 4: 624-630.
747. Maurer AD, Eller LK, Hallam MC, Taylor K, Reimer RA (2010) Consumption of diets high in prebiotic fiber or protein during growth influences the response to a high fat and sucrose diet in adulthood in rats. *Nutr Metab (Lond)* 7: 77.
748. Martin LJ, Siliart B, Lutz TA, Biourge V, Nguyen P, et al. (2010) Postprandial response of plasma insulin, amylin and acylated ghrelin to various test meals in lean and obese cats. *Br J Nutr* 103: 1610-1619.
749. Elahi D, Andersen DK, Muller DC, Tobin JD, Brown JC, et al. (1984) The enteric enhancement of glucose-stimulated insulin release. The role of GIP in aging, obesity, and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 33: 950-957.
750. Cummings DE, Overduin J (2007) Gastrointestinal regulation of food intake. *J Clin Invest* 117: 13-23.
751. Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T, Katsuma S, Adachi T, et al. (2005) Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med* 11: 90-94.
752. Savino F, Fissore MF, Liguori SA, Grassino EC, Guidi C, et al. (2007) Serum ghrelin concentration, fasting time and feeding in infants. *J Pediatr Endocrinol Metab* 20: 1027-1033.
753. Yavuz N, Unal E, Memisoglu K, Krand O, Kiziler AR, et al. (2004) Plasma leptin levels in rats with pancreatitis. *Tohoku J Exp Med* 204: 243-248.
754. Le Blanc-Louvry I, Ducrotte P, Chayvialle JA, Coquerel A, Michot F, et al. (2000) Distal gastrectomy and Roux-Y limb in the rat: plasma motilin, pancreatic polypeptide concentrations, and duodenojejunal motility. *Dig Dis Sci* 45: 1525-1530.



755. Totani N, Morita A, Nishinaka M, Tateishi S, Kida H (2010) A novel body weight-loss promoting oil prepared with vegetable protein. *J Oleo Sci* 59: 41-48.
756. Xu RY, Wan YP, Tang QY, Wu J, Cai W (2008) The effects of high fat on central appetite genes in Wistar rats: a microarray analysis. *Clin Chim Acta* 397: 96-100.
757. Lecumberri E, Goya L, Mateos R, Alia M, Ramos S, et al. (2007) A diet rich in dietary fiber from cocoa improves lipid profile and reduces malondialdehyde in hypercholesterolemic rats. *Nutrition* 23: 332-341.
758. Martín-Carrón N, Saura-Calixto F, Goñi I (2000) Effects of dietary fibre- and polyphenol-rich grape products on lipidaemia and nutritional parameters in rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 1183-1188.
759. Krol E, Krejpcio Z (2010) Chromium(III) propionate complex supplementation improves carbohydrate metabolism in insulin-resistance rat model. *Food Chem Toxicol* 48: 2791-2796.
760. Aparicio VA, Nebot E, Garcia-del Moral R, Machado-Vilchez M, Porres JM, et al. (2013) High-protein diets and renal status in rats. *Nutr Hosp* 28: 232-237.
761. Aparicio VA, Nebot E, Porres JM, Ortega FB, Heredia JM, et al. (2011) Effects of high-whey-protein intake and resistance training on renal, bone and metabolic parameters in rats. *Br J Nutr* 105: 836-845.
762. Perona JS, Ruiz-Gutiérrez V (1998) Two highly monounsaturated oils, olive oil and high-oleic sunflower oil, induce different triacylglycerol molecular species distribution in rat liver. *Nutrition research* 18: 1723-1732.
763. Riediger T, Zuend D, Becskei C, Lutz TA (2004) The anorectic hormone amylin contributes to feeding-related changes of neuronal activity in key structures of the gut-brain axis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286: R114-122.
764. Forssten SD, Korczynska MZ, Zwijsen RM, Noordman WH, Madetoja M, et al. (2013) Changes in satiety hormone concentrations and feed intake in rats in response to lactic acid bacteria. *Appetite* 71: 16-21.
765. Ellrichmann M, Kapelle M, Ritter PR, Holst JJ, Herzig KH, et al. (2008) Orlistat inhibition of intestinal lipase acutely increases appetite and attenuates postprandial glucagon-like peptide-1-(7-36)-amide-1, cholecystokinin, and peptide YY concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* 93: 3995-3998.
766. Gniuli D, Calcagno A, Dalla Libera L, Calvani R, Leccesi L, et al. (2010) High-fat feeding stimulates endocrine, glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP)-expressing cell hyperplasia in the duodenum of Wistar rats. *Diabetologia* 53: 2233-2240.
767. Parnell JA, Reimer RA (2012) Prebiotic fibres dose-dependently increase satiety hormones and alter Bacteroidetes and Firmicutes in lean and obese JCR:LA-cp rats. *Br J Nutr* 107: 601-613.

768. Layer P, Holst JJ, Grandt D, Goebell H (1995) Ileal release of glucagon-like peptide-1 (GLP-1). Association with inhibition of gastric acid secretion in humans. *Dig Dis Sci* 40: 1074-1082.
769. Guo ZF, Ren AJ, Zheng X, Qin YW, Cheng F, et al. (2008) Different responses of circulating ghrelin, obestatin levels to fasting, re-feeding and different food compositions, and their local expressions in rats. *Peptides* 29: 1247-1254.
770. Yin X, Li Y, Xu G, An W, Zhang W (2009) Ghrelin fluctuation, what determines its production? *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 41: 188-197.
771. Drazen DL, Vahl TP, D'Alessio DA, Seeley RJ, Woods SC (2006) Effects of a fixed meal pattern on ghrelin secretion: evidence for a learned response independent of nutrient status. *Endocrinology* 147: 23-30.
772. Welch IM, Bruce C, Hill SE, Read NW (1987) Duodenal and ileal lipid suppresses postprandial blood glucose and insulin responses in man: possible implications for the dietary management of diabetes mellitus. *Clin Sci (Lond)* 72: 209-216.
773. Benatti FB, Polacow VO, Ribeiro SM, Gualano B, Coelho DF, et al. (2008) Swimming training down-regulates plasma leptin levels, but not adipose tissue ob mRNA expression. *Braz J Med Biol Res* 41: 866-871.
774. Schoeller DA, Cella LK, Sinha MK, Caro JF (1997) Entrainment of the diurnal rhythm of plasma leptin to meal timing. *J Clin Invest* 100: 1882-1887.
775. Evans K, Clark ML, Frayn KN (2001) Carbohydrate and fat have different effects on plasma leptin concentrations and adipose tissue leptin production. *Clin Sci (Lond)* 100: 493-498.
776. Fried SK, Ricci MR, Russell CD, Laferrere B (2000) Regulation of leptin production in humans. *J Nutr* 130: 3127S-3131S.
777. Havel PJ, Parry SJ, Curry DL, Stern JS, Akpan JO, et al. (1992) Autonomic nervous system mediation of the pancreatic polypeptide response to insulin-induced hypoglycemia in conscious rats. *Endocrinology* 130: 2225-2229.
778. Adrian TE, Ferri GL, Bacarese-Hamilton AJ, Fuessl HS, Polak JM, et al. (1985) Human distribution and release of a putative new gut hormone, peptide YY. *Gastroenterology* 89: 1070-1077.
779. So M, Gaidhu MP, Maghdoori B, Ceddia RB (2011) Analysis of time-dependent adaptations in whole-body energy balance in obesity induced by high-fat diet in rats. *Lipids Health Dis* 10: 99.
780. Artiss JD, Brogan K, Brucal M, Moghaddam M, Jen KL (2006) The effects of a new soluble dietary fiber on weight gain and selected blood parameters in rats. *Metabolism* 55: 195-202.
781. Reimer RA, Russell JC (2008) Glucose tolerance, lipids, and GLP-1 secretion in JCR:LA-cp rats fed a high protein fiber diet. *Obesity (Silver Spring)* 16: 40-46.
782. Raasmaja A, Lecklin A, Li XM, Zou J, Zhu GG, et al. (2013) A water-alcohol extract of *Citrus grandis* whole fruits has beneficial metabolic effects in the obese

- Zucker rats fed with high fat/high cholesterol diet. *Food Chem* 138: 1392-1399.
783. Reinehr T, de Sousa G, Niklowitz P, Roth CL (2007) Amylin and its relation to insulin and lipids in obese children before and after weight loss. *Obesity* (Silver Spring) 15: 2006-2011.
784. Ludvik B, Lell B, Hartter E, Schnack C, Prager R (1991) Decrease of stimulated amylin release precedes impairment of insulin secretion in type II diabetes. *Diabetes* 40: 1615-1619.
785. Li J, Ma W, Wang S (2011) Slower gastric emptying in high-fat diet induced obese rats is associated with attenuated plasma ghrelin and elevated plasma leptin and cholecystokinin concentrations. *Regul Pept* 171: 53-57.
786. Duca FA, Zhong L, Covasa M (2013) Reduced CCK signaling in obese-prone rats fed a high fat diet. *Horm Behav* 64: 812-817.
787. Guilmeau S, Buyse M, Tsocas A, Laigneau JP, Bado A (2003) Duodenal leptin stimulates cholecystokinin secretion: evidence of a positive leptin-cholecystokinin feedback loop. *Diabetes* 52: 1664-1672.
788. Pyra KA, Saha DC, Reimer RA (2012) Prebiotic fiber increases hepatic acetyl CoA carboxylase phosphorylation and suppresses glucose-dependent insulinotropic polypeptide secretion more effectively when used with metformin in obese rats. *J Nutr* 142: 213-220.
789. Iritani N, Sugimoto T, Fukuda H, Komiya M, Ikeda H (1999) Oral triacylglycerols regulate plasma glucagon-like peptide-1(7-36) and insulin levels in normal and especially in obese rats. *J Nutr* 129: 46-50.
790. Wang GL, Jiang BH, Semenza GL (1995) Effect of altered redox states on expression and DNA-binding activity of hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Biophys Res Commun* 212: 550-556.
791. Lindqvist A, de la Cour CD, Stegmark A, Hakanson R, Erlanson-Albertsson C (2005) Overeating of palatable food is associated with blunted leptin and ghrelin responses. *Regul Pept* 130: 123-132.
792. Sahin I, Aydin S, Ozkan Y, Dagli AF, Akin KO, et al. (2011) Diet-induced obesity suppresses ghrelin in rat gastrointestinal tract and serum. *Mol Cell Biochem* 355: 299-308.
793. Overduin J, Schoterman MH, Calame W, Schonewille AJ, Ten Bruggencate SJ (2013) Dietary galacto-oligosaccharides and calcium: effects on energy intake, fat-pad weight and satiety-related, gastrointestinal hormones in rats. *Br J Nutr* 109: 1338-1348.
794. Guo J, Jou W, Gavriloova O, Hall KD (2009) Persistent diet-induced obesity in male C57BL/6 mice resulting from temporary obesigenic diets. *PLoS One* 4: e5370.
795. Kaiyala KJ, Prigeon RL, Kahn SE, Woods SC, Porte D, Jr., et al. (1999) Reduced beta-cell function contributes to impaired glucose tolerance in dogs made obese by high-fat feeding. *Am J Physiol* 277: E659-667.

796. Hull RL, Kodama K, Utschneider KM, Carr DB, Prigeon RL, et al. (2005) Dietary-fat-induced obesity in mice results in beta cell hyperplasia but not increased insulin release: evidence for specificity of impaired beta cell adaptation. *Diabetologia* 48: 1350-1358.
797. Vincent M, Philippe E, Everard A, Kassis N, Rouch C, et al. (2013) Dietary supplementation with *Agaricus blazei murill* extract prevents diet-induced obesity and insulin resistance in rats. *Obesity (Silver Spring)* 21: 553-561.
798. Chan CB, De Leo D, Joseph JW, McQuaid TS, Ha XF, et al. (2001) Increased uncoupling protein-2 levels in beta-cells are associated with impaired glucose-stimulated insulin secretion: mechanism of action. *Diabetes* 50: 1302-1310.
799. Baldwin JK, Griminger P (1985) Nitrogen balance studies in aging rats. *Exp Gerontol* 20: 29-34.
800. Funaba M, Kagiya K, Iriki T, Abe M (1994) Changes in nitrogen balance with age in calves weaned at 5 or 6 weeks of age. *J Anim Sci* 72: 732-738.
801. Pu S, Dube MG, Kalra PS, Kalra SP (2000) Regulation of leptin secretion: effects of aging on daily patterns of serum leptin and food consumption. *Regul Pept* 92: 107-111.
802. Sweet MA, Ntambi JA, Gaumnitz EA, Pugh TD, Weindruch R, et al. (1996) Neuropeptide Y- and peptide YY-containing colonic cells increase with ageing in male rats. *Neuropeptides* 30: 385-390.
803. Ferreira CL, Macedo GM, Latorraca MQ, Arantes VC, Veloso RV, et al. (2007) Serum leptin and insulin levels in lactating protein-restricted rats: implications for energy balance. *Br J Nutr* 97: 27-34.
804. Olefsky J, Crapo PA, Ginsberg H, Reaven GM (1975) Metabolic effects of increased caloric intake in man. *Metabolism* 24: 495-503.
805. Beck B, Villeneuve C (1985) Influence of ingested load on postprandial insulin secretion. Role of gastric inhibitory polypeptide (GIP). *Arch Int Physiol Biochim* 93: 101-106.
806. Muzumdar R, Ma X, Atzmon G, Vuguin P, Yang X, et al. (2004) Decrease in glucose-stimulated insulin secretion with aging is independent of insulin action. *Diabetes* 53: 441-446.
807. Reaven E, Wright D, Mondon CE, Solomon R, Ho H, et al. (1983) Effect of age and diet on insulin secretion and insulin action in the rat. *Diabetes* 32: 175-180.
808. Liu YL, Yakar S, Otero-Corchon V, Low MJ, Liu JL (2002) Ghrelin gene expression is age-dependent and influenced by gender and the level of circulating IGF-I. *Mol Cell Endocrinol* 189: 97-103.
809. DiGirolamo M, Fine JB, Tagra K, Rossmanith R (1998) Qualitative regional differences in adipose tissue growth and cellularity in male Wistar rats fed ad libitum. *Am J Physiol* 274: R1460-1467.
810. Poretzky L, Lesser M, Brillion D (2001) Lack of postprandial leptin peaks in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes Metab* 3: 105-111.

811. Wurm S, Neumeier M, Weigert J, Schaffler A, Buechler C (2007) Plasma levels of leptin, omentin, collagenous repeat-containing sequence of 26-kDa protein (CORS-26) and adiponectin before and after oral glucose uptake in slim adults. *Cardiovasc Diabetol* 6: 7.
812. Scoaris CR, Rizo GV, Roldi LP, de Moraes SM, de Proenca AR, et al. (2010) Effects of cafeteria diet on the jejunum in sedentary and physically trained rats. *Nutrition* 26: 312-320.
813. Baldassano S, Amato A, Cappello F, Rappa F, Mule F (2013) Glucagon-like peptide-2 and mouse intestinal adaptation to a high-fat diet. *J Endocrinol* 217: 11-20.
814. Feinle C, Chapman IM, Wishart J, Horowitz M (2002) Plasma glucagon-like peptide-1 (GLP-1) responses to duodenal fat and glucose infusions in lean and obese men. *Peptides* 23: 1491-1495.
815. Leibowitz SF, Chang GQ, Dourmashkin JT, Yun R, Julien C, et al. (2006) Leptin secretion after a high-fat meal in normal-weight rats: strong predictor of long-term body fat accrual on a high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290: E258-267.
816. Frederich RC, Hamann A, Anderson S, Lollmann B, Lowell BB, et al. (1995) Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med* 1: 1311-1314.
817. Jacobsen SH, Olesen SC, Dirksen C, Jørgensen NB, Bojsen-Møller KN, et al. (2012) Changes in Gastrointestinal Hormone Responses, Insulin Sensitivity, and Beta-Cell Function Within 2 Weeks After Gastric Bypass in Non-diabetic Subjects. *Obesity Surgery* 22: 1084-1096.
818. Adams CE, Greenway FL, Brantley PJ (2011) Lifestyle factors and ghrelin: critical review and implications for weight loss maintenance. *Obes Rev* 12: e211-218.
819. Juntunen KS, Niskanen LK, Liukkonen KH, Poutanen KS, Holst JJ, et al. (2002) Postprandial glucose, insulin, and incretin responses to grain products in healthy subjects. *Am J Clin Nutr* 75: 254-262.
820. Erdmann J, Lippl F, Wagenpfeil S, Schusdziarra V (2005) Differential association of basal and postprandial plasma ghrelin with leptin, insulin, and type 2 diabetes. *Diabetes* 54: 1371-1378.
821. Teff KL, Elliott SS, Tschop M, Kieffer TJ, Rader D, et al. (2004) Dietary fructose reduces circulating insulin and leptin, attenuates postprandial suppression of ghrelin, and increases triglycerides in women. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 2963-2972.
822. Kanaley JA, Heden TD, Liu Y, Whaley-Connell AT, Chockalingam A, et al. (2013) Short-term aerobic exercise training increases postprandial pancreatic polypeptide but not peptide YY concentrations in obese individuals. *Int J Obes (Lond)*.
823. World Health Organization 2006 <[www.who.int/nutrition/topics/obesity/en](http://www.who.int/nutrition/topics/obesity/en)> [Accessed 02-10-2014]).

824. International Obesity Taskforce (IOTF) <<http://www.iaso.org/iotf/obesity/obesitytheglobalepidemic/>> [Accesed 26/01/2014].
825. Olshansky SJ, Passaro DJ, Hershow RC, Layden J, Carnes BA, et al. (2005) A potential decline in life expectancy in the United States in the 21st century. *N Engl J Med* 352: 1138-1145.
826. Ministerio de Sanidad y consumo 2005  
<[http://www.naos.aesan.mssi.gob.es/naos/ficheros/estrategia/NAOS\\_Strategy.pdf](http://www.naos.aesan.mssi.gob.es/naos/ficheros/estrategia/NAOS_Strategy.pdf)>].
827. Appleton DS, Sandrasagra FA, Flower CD (1979) Perforated oesophagus: review of twenty-eight consecutive cases. *Clin Radiol* 30: 493-497.
828. Fernandez-Sanchez A, Madrigal-Santillan E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-Gonzalez A, et al. (2011) Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int J Mol Sci* 12: 3117-3132.
829. Holst JJ, Schwartz TW, Lovgreen NA, Pedersen O, Beck-Nielsen H (1983) Diurnal profile of pancreatic polypeptide, pancreatic glucagon, gut glucagon and insulin in human morbid obesity. *Int J Obes* 7: 529-538.
830. Swinburn B, Egger G (2002) Preventive strategies against weight gain and obesity. *Obes Rev* 3: 289-301.
831. Bruen CM, O'Halloran F, Cashman KD, Giblin L (2012) The effects of food components on hormonal signalling in gastrointestinal enteroendocrine cells. *Food Funct* 3: 1131-1143.



**ANEXO**





## APORTACIONES A CONGRESOS

Alcalá-Bejarano J, Olivares M, Pérez Martínez L, Yeste M, Aranda P, López-Jurado M, Martínez MA, Urbano G, Porres JM, Yago MD, Mañas M, Martínez-Victoria E. Influence of two functional ingredients on the plasma concentrations of insulin, leptin, ghrelin and peptide YY (PYY) in rats. *Acta Physiologica* 2012; Volume 206, Supplement 693:P161.

Alcalá-Bejarano J, Olivares M, Pérez Martínez L, Yeste M, Aranda P, López-Jurado M, Urbano G, Porres JM, Yago MD, Mañas M, Martínez-Victoria E. Effects of two functional ingredients on food intake, nutrient digestibility and body weight gain in rats. *Acta Physiologica* 2012; Volume 206, Supplement 693:P156.

Alcalá-Bejarano J, Olivares M, Pérez Martínez L, Yeste M, Aranda P, López-Jurado M, Urbano G, Porres JM, Yago MD, Mañas M, Martínez-Victoria E. Influence of two functional ingredients on the plasma concentrations of leptin, ghrelin and glucagon like peptide-1 in lean and obese rats. *Annals of Nutrition and Metabolism* 2013; Volume 31, Supplement 1:P519.

Alcalá-Bejarano J, Olivares M, Pérez Martínez L, Yeste M, Martínez-Burgos MA, Porres JM, Yago MD, Mañas M, Martínez-Victoria E. Influence of a functional ingredient on body weight and plasma leptin and insulin in rats. *Acta Physiologica* 2014; Volume 212, Supplement 698:P72.

Alcalá-Bejarano J, Aranda P, López-Jurado M, Urbano G, Porres JM, Yago MD, Mañas M, Martínez-Victoria E. Influence of a functional ingredient on digestive and metabolic parameters in lean and obese rats. *Acta Physiologica* 2014; Volume 212, Supplement 698:P72.

Alcalá-Bejarano J, Olivares M, Porres JM, Yago MD, Mañas M, Martínez-Victoria E. Influence of a functional ingredient on food intake and gut hormones in rats. *Acta Physiologica* 2014; Volume 212, Supplement 698:P32.

## PUBLICACIONES

Alcalá-Bejarano J<sup>1</sup>, Yago MD<sup>1</sup>, Mañas M<sup>1</sup>, López-Millán MB<sup>1</sup>, Martínez-Burgos MA<sup>1</sup>, Martínez-Victoria E<sup>1</sup> Macronutrientes, ingesta de alimentos y peso corporal. Papel de la grasa. [Macronutrients, food intake and body weight. The role of fat]. *Nutr Hosp.* 2014. *In press.*