

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**  
**FACULTAD DE FARMACIA**  
**DEPARTAMENTO DE FRAMACOLOGÍA**



**Efectos de distintas fibras dietéticas en el  
modelo experimental de rata  
Zucker obesa**

**Tesis Doctoral para aspirar al Grado de Doctor en Farmacia que presenta la  
Licenciada Dña. Rocío Morón Romero**

**2010**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Rocío Morón Romero  
D.L.: GR 3203-2010  
ISBN: 978-84-6934-410-1





UNIVERSIDAD  
DE  
GRANADA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

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

Certifica: que la Tesis Doctoral titulada "Efectos de distintas fibras dietéticas en el modelo experimental de rata Zucker obesa", ha sido realizada por la Licenciada en Farmacia Dña. Rocío Morón Romero, en los laboratorios de este Departamento.

Y a los efectos legales se firma la siguiente constancia en Granada, a 22 de Abril de 2010.

Dr. Julio Gálvez Peralta





UNIVERSIDAD  
DE  
GRANADA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

D. Antonio Zarzuelo Zurita y Dña Milagros Galisteo Moya, Catedráticos y Profesora Contratada Doctora respectivamente del Departamento de Farmacología de la Universidad de Granada, como Directores,

Certifican: que la Tesis Doctoral titulada "Efectos de distintas fibras dietéticas en el modelo experimental de rata Zucker obesa", presentada por la Licenciada en Farmacia Dña. Rocío Morón Romero, reúne todos y cada uno de los requisitos necesarios para optar al Grado de Doctor.

Y a los efectos legales se firma la siguiente constancia en Granada, a 22 de Abril de 2010.

Dr. Antonio Zarzuelo Zurita

Dra. Milagros Galisteo Moya



## *Abreviaturas*

---





<b>4-AF</b>	4-Aminofenazona
<b>AACC</b>	American Association of Cereal Chemist
<b>ACC</b>	Acetil Co-A carboxilasa
<b>AdipoR1</b>	Receptor de adiponectina 1
<b>AdipoR2</b>	Receptor de adiponectina 2
<b>ADP</b>	Adenosina-5-difosfato
<b>AGCC</b>	Ácidos grasos de cadena corta
<b>AGL</b>	Ácidos grasos libres
<b>AMP</b>	Adenosín monofosfato
<b>AMPc</b>	Adenosín monofosfato cíclico
<b>AMPK</b>	Protein kinasa activada por 5'-AMP
<b>AP-1</b>	Activador de proteína-1
<b>Apo B</b>	Apoproteína B
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>CCK</b>	Colecistokinina
<b>CPT1</b>	Carnitina palmitoil-transferasa-1
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>DAP</b>	Dihidroxiacetona fosfato
<b>DTNB</b>	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico
<b>FAS</b>	Sintasa de ácidos grasos
<b>FID</b>	Federación Internacional de Diabetes
<b>G3P</b>	Glicerol-3-fosfato
<b>G-6-pasa</b>	Glucosa-6-fosfatasa
<b>GH</b>	Hormona del crecimiento

## Abreviaturas

---

<b>GIP</b>	Hormona polipeptídica insulino-trópica dependiente de la glucosa
<b>GK</b>	Glicerol kinasa
<b>GLP-1</b>	Péptido glucagón-like-1
<b>GLUT-4</b>	Transportador de glucosa-4
<b>GOD</b>	Glucosa oxidasa
<b>GPAT</b>	Glicerol-fosfato acil-transferasa
<b>GPO</b>	Glicerolfosfato deshidrogenasa
<b>GRD</b>	Glutation reductasa
<b>GSH</b>	Glutation
<b>GSSG</b>	Glutation oxidado
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno
<b>HDL</b>	Lipoproteína de alta densidad
<b>HMG-CoA</b>	Hidroximetil-glutaril-CoA reductasa
<b>HOMA<sub>IR</sub></b>	Homeostasis Assessment Model para resistencia a la insulina
<b>HSL</b>	Lipasa sensible a hormonas
<b>IKK<math>\beta</math></b>	Kinasa del inhibidor I $\kappa$ $\beta$
<b>IL-6</b>	Interleuquina-6
<b>IMC</b>	Índice de masa corporal
<b>IRS</b>	Sustrato del receptor de la insulina
<b>I<math>\kappa</math><math>\beta</math></b>	Inhibidor del factor nuclear <i>kappa</i> $\beta$
<b>JAK</b>	Janus kinasa
<b>JNK</b>	Jun N-terminal kinasa
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baja densidad
<b>LKB1</b>	Serin/treonin kinasa
<b>LPL</b>	Lipoproteinlipasa

---

<b>MAPK</b>	Protein kinasa activada por mitógeno
<b>MDA</b>	Malonildialdehído
<b>NADPH</b>	Nicotín-adenín-dinucleótido fosfato (forma reducida)
<b>NF-<math>\kappa</math><math>\beta</math></b>	Factor nuclear <i>Kappa</i> $\beta$
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>p47<sup>phox</sup></b>	Subunidad p47 de la enzima NADPH-oxidasa
<b>PAI-1</b>	Inhibidor del activador de plasminógeno-1
<b>PAS</b>	Ácido peryódico-Schiff
<b>PBS</b>	Solución tampón fosfato
<b>PCR</b>	Proteína C reactiva
<b>PEPCK</b>	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
<b>PI3K</b>	Fosfatidil inositol 3-kinasa
<b>PKA</b>	Protein kinasa A o protein kinasa dependiente de AMPc
<b>PKC</b>	Protein kinasa C
<b>POD</b>	Peroxidasa
<b>PP2C</b>	Proteína fosfatasa 2C
<b>PPAR</b>	Receptor activador de la proliferación de peroxisomas
<b>RBP-4</b>	Proteína transportadora del retinol-4
<b>ROS</b>	Especies reactivas del oxígeno
<b>SDS</b>	Lauril sulfato sódico
<b>SOCS</b>	Supresores de señalización de citoquinas
<b>STAT</b>	Transductor de señales y activador de transcripción
<b>TAV</b>	Tejido adiposo visceral
<b>TBARS</b>	Especies reactivas del ácido tiobarbiturico
<b>TBS-T</b>	Tampón de lavado

## Abreviaturas

---

<b>TLR-4</b>	Receptor to//-like 4
<b>TNB</b>	Ácido 5-tio-2-nitrobenzoico
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral- $\alpha$
<b>VLDL</b>	Lipoproteínas de muy baja densidad

# *Índice*

---



---

<b>ABREVIATURAS</b> .....	iii
<b>ÍNDICE</b> .....	vii
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1. CONCEPTO DE SÍNDROME METABÓLICO</b> .....	3
1.1. DEFINICIÓN DE SÍNDROME METABÓLICO .....	4
1.2. ETIOPATOGENESIS DEL SÍNDROME METABÓLICO.....	8
1.2.1. Resistencia a la insulina .....	9
1.2.1.1. Papel fisiológico de la insulina .....	9
1.2.1.2. Resistencia a la insulina.....	11
1.2.2. Obesidad.....	14
1.2.3. Inflamación y síndrome metabólico.....	17
1.2.3.1. Implicación de las adipocitoquinas .....	18
a) TNF- $\alpha$ .....	18
b) Adiponectina .....	20
c) Leptina .....	25
1.3. IMPLICACIONES ENERGÉTICAS DE LA 5'-AMPK.....	29
<b>2. FIBRA DIETÉTICA</b> .....	33
2.1. CONCEPTO.....	33



2.2. CLASIFICACIÓN DE LA FIBRA DIETÉTICA.....	34
2.3. EFECTOS BENEFICIOSOS DE LA FIBRA DIETÉTICA.....	37
2.3.1. Efectos de la fibra dietética y las alteraciones incluidas en el síndrome metabólico.....	39
2.3.1.1. Fibra y obesidad .....	40
2.3.1.2. Fibra dietética y resistencia a la insulina .....	41
2.3.1.3. Fibra dietética y dislipidemia .....	43
2.3.1.4. Fibra dietética e hipertensión arterial .....	44
2.3.1.5. Fibra dietética y estado inflamatorio .....	46
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>49</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>53</b>
<b>1. PREPARACIÓN DE LAS DIETAS Y REACTIVOS.....</b>	<b>55</b>
<b>2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN .....</b>	<b>55</b>
<b>3. GRUPOS EXPERIMENTALES.....</b>	<b>57</b>
<b>4. MÉTODOS EXPERIMENTALES .....</b>	<b>57</b>
4.1. SACRIFICIO DE LOS ANIMALES Y RECOGIDA DE MUESTRAS .....	58
4.2. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS PLASMÁTICOS.....	58
4.2.1. Lípidos plasmáticos .....	58
4.2.1.a. Colesterol plasmático .....	58

---

4.2.1.b. Triglicéridos plasmáticos.....	59
4.2.1.c. Ácidos grasos libres.....	60
4.2.2. Parámetros relacionados con la resistencia a la insulina .....	60
4.2.2.a. Glucosa .....	60
4.2.2.b. Insulina .....	61
4.2.2.c. Índice de resistencia a la insulina HOMA (HOMA-IR) .....	62
4.2.3. Leptina .....	63
4.3. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS TISULARES .....	63
4.3.1. Producción de TNF- $\alpha$ por el tejido adiposo visceral.....	63
4.3.2. Producción de adiponectina por el tejido adiposo visceral .....	64
4.3.3. Determinación del contenido lipídico en hígado .....	65
4.3.4. Determinación de proteínas en tejidos .....	66
4.3.5. Expresión proteica de los receptores de adiponectina mediante Western blot en tejidos .....	67
4.3.6. Determinación de la actividad AMPK en tejidos.....	69
4.3.7. Determinación de la actividad ACC en tejidos.....	70
4.3.8. Análisis de la expresión proteica de FAS en tejidos .....	71
4.3.9. Determinación de la actividad de AKT en el hígado .....	71

4.3.10. Determinación de la expresión proteica de las isoformas de SREBP en extractos nucleares hepáticos .....	73
4.3.11. Estado oxidativo hepático .....	75
4.3.11.a. Determinación del contenido de glutatión total .....	76
4.3.11.b. Determinación de la peroxidación lipídica .....	76
<b>5. ESTUDIO HISTOLÓGICO DEL HÍGADO.....</b>	<b>77</b>
<b>5.1. TÉCNICAS REALIZADAS.....</b>	<b>78</b>
<b>6. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.....</b>	<b>79</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>80</b>
<b>A) EFECTOS DE LA INGESTA PROLONGADA DE DISTINTAS FIBRAS DIETÉTICAS EN RATAS ZACKER OBESAS .....</b>	<b>83</b>
<b>1. VARIABLES MORFOLÓGICAS .....</b>	<b>83</b>
1.1. PESO CORPORAL E INGESTA DIETÉTICA.....	83
1.2. PESO RELATIVO DE LOS ÓRGANOS.....	84
<b>2. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS PLASMÁTICOS .....</b>	<b>86</b>
2.1. LÍPIDOS PLASMÁTICOS .....	86
2.1.1. Triglicéridos.....	86
2.1.2. Colesterol total .....	86
2.1.3. Ácidos grasos libres .....	86

---

2.2. PARÁMETROS RELACIONADOS CON LA RESISTENCIA A LA INSULINA .....	87
2.2.1. Glucosa plasmática.....	88
2.2.2. Insulina plasmática.....	88
2.2.3. Índice de resistencia a la insulina HOMA.....	89
2.3. LEPTINA PLASMÁTICA .....	89
3. MARCADORES BIOQUÍMICOS EN TEJIDOS INSULINO-RESISTENTES .....	90
3.1. TEJIDO ADIPOSO VISCERAL.....	90
3.1.1. Producción de TNF- $\alpha$ por el tejido adiposo visceral.....	91
3.1.2. Producción de adiponectina por el tejido adiposo visceral .....	92
3.1.3. Expresión de receptores de adiponectina, adipoR1 y adipoR2, en el tejido adiposo visceral.....	93
3.2. HÍGADO.....	94
3.2.1. Lípidos hepáticos.....	94
3.2.1.1. Colesterol total.....	94
3.2.1.2. Triglicéridos hepáticos .....	94
<b>B) EFECTOS DE LA INGESTA PROLONGADA DE UNA DIETA SUPLEMENTADA CON CUTÍCULAS DE <i>P. OVATA</i> EN ÓRGANOS INSULINO-RESISTENTES .....</b>	<b>96</b>
<b>1. VARIABLES PONDERALES .....</b>	<b>96</b>
<b>2. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS .....</b>	<b>97</b>

<b>3. EFECTOS DE LAS CUTÍCULAS DE <i>P. OVATA</i> EN ÓRGANOS INSULINO-RESISTENTES</b> .....	99
3.1. HÍGADO .....	99
3.1.1. Lípidos hepáticos.....	99
3.1.1.1. Colesterol total y triglicéridos hepáticos.....	99
3.1.2. Expresión hepática de adipoR1 y de las enzimas AMPK, ACC y FAS	100
3.1.3. Análisis de la expresión proteica de los factores de transcripción SREBP-1c y SREBP-2 .....	102
3.1.4. Expresión proteica de la enzima AKT .....	103
3.1.5. Expresión de adipoR2 .....	104
3.1.6. Marcadores del estado oxidativo hepático.....	105
3.1.7. Estudio histológico .....	106
3.2. TEJIDO ADIPOSO VISCERAL.....	114
3.2.1. Expresión de receptores de adiponectina, adipoR1 y adipoR2, en el tejido adiposo visceral.....	114
3.2.2. Expresión de AMPK total y fosforilada .....	115
3.2.3. Expresión de ACC total y fosforilada .....	116
3.2.4. Expresión de FAS en tejido adiposo visceral.....	117
<b>DISCUSIÓN</b> .....	119

---

<b>1. MODELO EXPERIMENTAL DE SÍNDROME METABÓLICO:</b>	
<b>RATA ZUCKER OBESA .....</b>	<b>122</b>
1.1. PESO CORPORAL E INGESTA .....	122
1.2. ALTERACIONES BIOQUÍMICAS EN PLASMA.....	123
1.3. ALTERACIONES EN TEJIDOS INSULINO-RESISTENTES.....	125
<b>2. EFECTOS COMPARATIVOS DE LA INGESTA PROLONGADA DE DISTINTAS FIBRAS DIETÉTICAS EN RATAS ZUCKER OBESAS .....</b>	<b>128</b>
2.1. EFECTOS DE LA DIETA SUPLEMENTADA CON UTÍCULAS DE <i>P. OVATA</i> EN RATAS ZUCKER OBESAS.....	129
2.2. EFECTOS DE LA DIETA SUPLEMENTADA CON METILCELULOSA EN RATAS ZUCKER OBESAS.....	134
2.3. EFECTOS DE LA DIETA SUPLEMENTADA CON CELULOSA EN RATAS ZUCKER OBESAS .....	136
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>141</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>145</b>



# *Introducción*

---





# 1. CONCEPTO DE SÍNDROME METABÓLICO

Durante las dos últimas décadas, se ha producido un fuerte incremento en el número de individuos afectados por el síndrome metabólico en todo el mundo. La incidencia de este síndrome está estrechamente relacionada con la epidemia de obesidad y diabetes que afecta a la población mundial (Zimmet *y cols.*, 2001). El dramático incremento de ambos trastornos, considerados como los componentes fundamentales del síndrome metabólico, está teniendo lugar en países tanto desarrollados como en vías de desarrollo y afectando a poblaciones de todas las edades (Alberti *y cols.*, 2004).

El síndrome metabólico es un desorden que agrupa a toda una serie de alteraciones metabólicas y funcionales entre las que destacan obesidad central, hipertensión, dislipemia aterogénica (niveles elevados de triglicéridos y colesterol-LDL y reducidos de colesterol-HDL), y resistencia a la insulina. Está asociado a un mayor riesgo de desarrollar posteriormente graves patologías crónicas como diabetes de tipo 2 y enfermedades cardiovasculares, ya que cada una de las alteraciones que lo componen constituye un factor de riesgo independiente para desarrollar estas enfermedades (Reaven *y cols.*, 1988; Liese *y cols.*, 1998). En este sentido, la presencia del síndrome metabólico se ha asociado a un incremento de 5 veces en la prevalencia de diabetes tipo 2 y de 2-3 veces en la de las enfermedades cardiovasculares (Eckel *y cols.*, 2005 y Zimmet *y cols.*, 2001). El incremento del riesgo de padecer diabetes de tipo 2 y enfermedades cardiovasculares requiere atención terapéutica urgente y una apropiada intervención para aquellos pacientes que presentan alto riesgo.

Por otra parte, estudios recientes establecen una asociación directa entre el síndrome metabólico o alguno de sus componentes y el riesgo de desarrollar otras patologías crónicas graves, entre las que se incluyen síndrome de ovario poliquístico (De Leo *y col.*, 2009), hígado graso (Marchesini *y col.*, 2001), asma (Hacken *y cols.*, 2009), alteraciones del sueño (Nieto *y cols.*, 2009), distintos tipos de cáncer, como el colorrectal o el de mama (Ahmed *y cols.*, 2006; Lorincz *y cols.*, 2006), o con distintos tipos de demencia clínica, como la enfermedad de Alzheimer (Kivipelto *y cols.*, 2008).

Por todo lo expuesto, el síndrome metabólico se ha convertido actualmente en una de las principales amenazas sanitarias del S. XXI, y las autoridades sanitarias se están volcando en su prevención y tratamiento.

## 1.1. DEFINICIÓN DE SÍNDROME METABÓLICO

El concepto de síndrome metabólico se “acuño” a finales de los años 80. Esta agrupación de alteraciones metabólicas, fue descrita por primera vez en el año 1923 por Kylin, un médico sueco, que lo definió como la asociación en un mismo paciente de hipertensión, hiperglucemia y gota (Kylin *y cols.*, 1923). En 1947, Vague publicó un artículo en el que llamaba la atención sobre el hecho de que el fenotipo de obesidad con acumulación excesiva de tejido adiposo en la parte superior del cuerpo (obesidad de tipo androide o masculino) se asociaba con las alteraciones metabólicas que se observaban en la diabetes tipo 2 y en las enfermedades cardiovasculares (Vague *y cols.*, 1947). La importancia clínica del síndrome metabólico fue destacada de nuevo 40 años después por Reaven (Reaven *y cols.*, 1988), quien describió la presencia de un conjunto de alteraciones metabólicas cuya causa fisiopatológica central era la resistencia a la insulina. De manera sorprendente, Reaven no incluyó entre los componentes del síndrome metabólico a la obesidad que, sin embargo, se ha recogido en el concepto de síndrome metabólico en todas las definiciones posteriores (Organización Mundial de la Salud 1999; Balkau *y cols.*, 1999).

El síndrome metabólico ha tenido numerosas denominaciones, como el cuarteto de la muerte (Kaplan *y cols.*, 1989), Síndrome X (Reaven *y cols.*, 1988) ó síndrome de resistencia a la insulina (DeFronzo *y cols.*, 1991). Distintos grupos de expertos han propuesto definiciones para el síndrome metabólico. Las más aceptadas mundialmente han sido propuestas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), The European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR) y the National Cholesterol Education Program-Third Adult Treatment Panel /NCEP ATP III) (World Health Organization. 1999; Balkau *y cols.*, 1999; NCEP Y ATP III JAMA 2001). Todos estos grupos coinciden en destacar que los componentes centrales del síndrome metabólico son obesidad, resistencia a la insulina, dislipemia e hipertensión. Sin embargo, se apoyan en diferentes criterios clínicos para identificar tal asociación de elementos (Tabla 1), lo que ha generado una importante controversia en cuanto a la definición del síndrome metabólico.

**Tabla 1.** Definiciones del Síndrome metabólico según OMS, EGIR y ATP III.

OMS 1999	EGIR 1999	ATP III 2001
Diabetes ó intolerancia a la glucosa ó resistencia a la insulina* Más dos de los siguientes:	Resistencia a la insulina ó hiperinsulinemia (solo para sujetos no diabéticos) Más dos de los siguientes:	Tres de los siguientes criterios:
1. Obesidad: IBM>30 Kg/m <sup>2</sup> ó relación cintura-cadera>0,9 (hombres), >0,85 (mujeres)	1. Obesidad central: circunferencia de cintura >94 cm (hombres) >80 cm (mujeres)	1. Obesidad central: circunferencia de cintura >102 cm (hombres), >88 cm (mujeres)
2. Dislipemia: Triglicéridos >150 mg/dl (>1,7 mmol/l), Colesterol HDL <35 mg/dl (0,9 mmol/l) en hombres y <40 mg/dl (<1,0 mmol/l) en mujeres	2. Dislipemia: Triglicéridos >177 mg/dl (>2,0 mmol/l) ó Colesterol HDL <40 mg/dl (<1,0 mmol/l)	2. Hipertrigliceridemia: Triglicéridos >150 mg/dl (1,7 mmol/l)
3. Hipertensión arterial: Presión arterial >140/90 mmHg ó medicación	3. Hipertensión arterial: Presión arterial >140/190 mmHg ó medicación	3. Colesterol HDL: <40 mg/dl (<1,0 mmol/l) en hombres, <50 mg/dl (<1,3 mmol/l) en mujeres
4. Microalbuminuria: Excrección de albumina >20µg/minuto ó relación albumina/creatinina >30mg/g	4. Glucosa en ayunas: >110 mg/dl (>6,1 mmol/l)	4. Hipertensión arterial: Presión arterial >130/85 mmHg ó medicación
		5. Glucosa en ayunas: >110 mg/dl (6,1 mmol/l)

\*definida como la concentración superior de insulina en ayunas en la población no diabética.

Estas definiciones no sólo han presentado diferencias en cuanto a los componentes propuestos, sino también en los valores umbrales utilizados para definir la presencia de cada uno de esos componentes, lo que ha generado una confusión considerable. Esta confusión no sólo ha reducido la utilidad de las definiciones en el contexto clínico, sino que también ha dificultado la comparación de la incidencia del síndrome metabólico en los diferentes grupos de población. Por ello, la Federación Internacional de Diabetes (FID) solicitó en 2005 a su grupo de trabajo epidemiológico la creación de un grupo de expertos de las diferentes regiones del mundo para establecer una nueva definición que pudiera tener alcance universal (Zimmet *y cols.*, 2005). El objetivo de este grupo fue desarrollar una nueva definición, que facilitara la práctica clínica, permitiera la comparación entre las investigaciones del síndrome metabólico a través de países y poblaciones, y destacara las áreas donde la investigación fuera más necesaria.

## Introducción

---

La FID propone que la obesidad central es el determinante más importante del síndrome metabólico y que existe una fuerte asociación entre la circunferencia de la cintura, las enfermedades cardiovasculares y otros componentes del Síndrome metabólico (Tabla 2). Por lo tanto la obesidad central es el componente esencial y ocupa la posición principal de esta nueva definición, en la que, por primera vez se ofrece un valor umbral para definir la obesidad que varía según los diferentes grupos étnicos. La presencia de resistencia a la insulina no es requisito indispensable en esta definición.

**Tabla 2.** Definición mundial de Síndrome metabólico según la Federación Internacional de Diabetes (FID).

---

---

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

---

---

Además de la nueva definición para el síndrome metabólico, el grupo de consenso de la FID estableció parámetros adicionales que deben emplearse en los estudios de investigación para determinar su capacidad para pronosticar las enfermedades cardiovasculares o la diabetes tipo 2. Estas investigaciones también permitirán ajustar aún más la definición de Síndrome metabólico y validar la nueva definición clínica en los diferentes grupos étnicos (Tabla 3).

**Tabla 3.** Criterios metabólicos adicionales para emplear en la investigación. Según la Federación Internacional de Diabetes (FID).

---

---

<b>1. Alteraciones en la distribución de la grasa corporal.</b>
a. Distribución general de la grasa corporal, por absorción dual de rayos X
b. Distribución central de la grasa, mediante tomografía digital ó resonancia magnética
c. Biomarcadores del tejido adiposo: leptina, adiponectina
d. Contenido de grasa en hígado, mediante espectroscopia por resonancia magnética nuclear

---

<b>2. Dislipemia aterogénica</b> (además de triglicéridos elevados y bajo colesterol ligado a HDL en el plasma).
a. Apolipoproteína B (Apo B) ó colesterol que no este ligado a HDL
b. Pequeñas partículas de LDL

---

<b>3. Disglucemia.</b>
a. Prueba oral de tolerancia a la glucosa

---

<b>4. Resistencia a la insulina</b> (además de la glucemia elevada en ayunas).
a. Concentraciones de insulina y proinsulina en ayunas
b. Índice de resistencia a la insulina, mediante el modelo matemático HOMA
c. Resistencia a la insulina, según el modelo mínimo de Bergman
d. Aumento de ácidos grasos libres (en ayunas y durante la prueba oral de tolerancia a la glucosa)
e. Sensibilidad a la glucosa (valor M) con pinzamiento

---

<b>5. Disregulación vascular</b> (además de hipertensión).
a. Medición de la disfunción endotelial
b. Microalbuminuria

---

<b>6. Estado proinflamatorio.</b>
a. Aumento de la proteína C reactiva de alta sensibilidad (proteína amiloide A en el suero)
b. Aumento de citoquinas inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-6)
c. Reducción de las concentraciones d adiponectina plasmática

---

<b>7. Estado protrómbotico.</b>
a. Factores fibrinolíticos
b. Factores de la coagulación (fibrinógeno)

---

<b>8. Factores hormonales.</b>
a. Eje hipotálamo-hipófiso-suprarrenal

---

## 1.2. ETIOPATOGENESIS DEL SÍNDROME METABÓLICO

Las causas que conducen al desarrollo del síndrome metabólico son múltiples, complejas y aún no han sido bien esclarecidas. La mayoría de los expertos coinciden en señalar a la obesidad central junto con la resistencia a la insulina como los principales factores etiológicos de este síndrome (Eckel *y cols.*, 2005; Anderson *y cols.*, 2001; Grundy *y cols.*, 2004). No obstante, no se puede descartar la influencia que otros agentes causales, como el perfil genético y factores adquiridos como la inactividad física, la edad, o el consumo de una dieta inapropiada, pueden desempeñar en su desarrollo (Eckel *y cols.*, 2005; Anderson *y cols.*, 2001; Ukkola *y cols.*, 2001).

En los últimos años se ha propuesto además la existencia de una relación directa entre inflamación y síndrome metabólico, ya que pacientes afectados por este síndrome presentan niveles anormales de marcadores y citoquinas inflamatorios (Kirilmaz *y cols.*, 2010). Entre los marcadores y citoquinas relacionadas con el síndrome metabólico y las alteraciones que lo componen como la obesidad ó resistencia a la insulina, destacan la interleucina 6 (IL-6), la proteína C reactiva (PCR) y el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Pickup *y cols.*, 1997; Matsuzawa *y cols.*, 2006). En este sentido, una revisión establece una hipótesis para explicar la patogénesis del síndrome metabólico, según la cual el estado proinflamatorio induciría la resistencia a la insulina y conduciría a las manifestaciones clínicas y bioquímicas propias de este síndrome. A su vez la resistencia a la insulina promovería un estado inflamatorio a través de un incremento en la concentración de ácidos grasos libres (AGL), que interferiría con los efectos antiinflamatorios de la insulina (Dandona *y cols.*, 2005). Otra perspectiva que apoya esta hipótesis propone que en el síndrome metabólico existe una producción anormal de hormonas y citoquinas por el tejido adiposo, puesta de manifiesto por un aumento de la producción y liberación de moléculas inflamatorias como IL-6 y TNF- $\alpha$  y una baja secreción de moléculas antiinflamatorias como la adiponectina (Kadowaki *y cols.*, 2006). De hecho, se ha demostrado que los bajos niveles de adiponectina se asocian de forma independiente con el síndrome metabólico, siendo dicha asociación incluso más fuerte que la que presentan otros marcadores inflamatorios como TNF- $\alpha$ , IL-6 ó PCR (Matsushita *y cols.*, 2006; Pickup *y cols.*, 1997; Matsuzawa *y cols.*, 2006). En cualquier caso, el estado proinflamatorio, la resistencia a la insulina y la obesidad central están íntimamente asociados y están relacionados con el resto de alteraciones que integran el síndrome metabólico.

## 1.2.1. RESISTENCIA A LA INSULINA

### 1.2.1.1. PAPEL FISIOLÓGICO DE LA INSULINA

La insulina es la principal hormona anabólica y anticatabólica en el ser humano. Es sintetizada en las células  $\beta$  de los islotes pancreáticos y se libera al torrente circulatorio en respuesta al aumento de los niveles de glucosa en sangre. Su acción es esencial para un apropiado desarrollo y crecimiento de los tejidos. Es la encargada del mantenimiento de la homeostasis de la glucosa, ya que su función fundamental es la de mantener la concentración de glucosa en sangre en un rango normal, entre 80-105 mg/dl (Satiel *y cols.*, 2001). En situaciones normales, tras la ingesta, los niveles de glucosa en plasma del individuo aumentan, esta subida es detectada por las células  $\beta$  del páncreas que proceden a la secreción de insulina para mantener los niveles de glucosa plasmáticos constantes. La insulina promueve la entrada de glucosa en el músculo, el tejido adiposo y el hígado, favoreciendo su almacenamiento. Además, regula el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas y promueve la división y el crecimiento celular a través de sus efectos mitogénicos (Avruch *y cols.*, 1998; Myers *y cols.*, 2002).

Los principales efectos metabólicos de la insulina afectan al músculo, al tejido adiposo y al hígado (Zierath *y cols.*, 2000). En el músculo esquelético la insulina promueve la entrada de glucosa por la translocación del transportador de glucosa GLUT-4 desde el núcleo de la célula a su membrana plasmática. En el hígado, la insulina inhibe la expresión de enzimas gluconeogénicas y ejerce dos acciones en el tejido adiposo: por un lado favorece la adipogénesis (síntesis de triglicéridos) y, por otro, ejerce una acción antilipolítica, lo que conduce a una disminución en la liberación de AGL desde el tejido adiposo.

Por otra parte, distintos estudios describen a la insulina como una molécula antiinflamatoria. Esta hormona suprime la acción de varios factores de transcripción proinflamatorios como el factor nuclear *Kappa*  $\beta$  (NF- $\kappa\beta$ ) y el activador de la proteína 1 (AP-1), a la vez que aumenta la expresión del inhibidor del factor nuclear *kappa*  $\beta$  ( $I\kappa\beta$ ) (Dandona *y cols.*, 2001; Aljada *y cols.*, 2002). Además, posee un efecto antioxidante, al producir la inhibición de la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y disminuir la expresión proteica de  $p47^{\text{phox}}$ , uno de los componentes de la NADPH, necesario para la producción del agente oxidante  $O_2^-$  (Dandona *y cols.*, 2001; Chaudhuri *y cols.*, 2004).

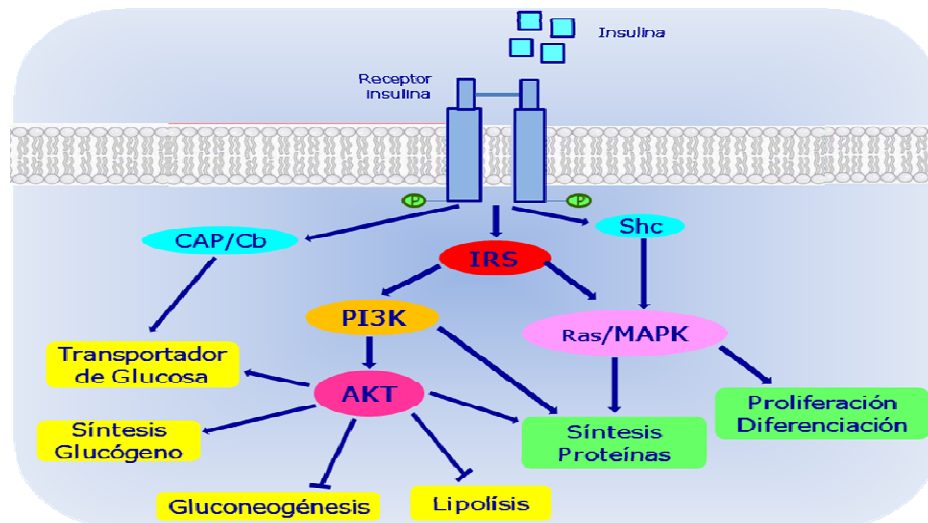


**Tabla 4.** Efectos biológicos clásicos de la insulina.

<b>Acción normal de la insulina</b>	
<b>Carbohidratos</b>	↓Producción hepática de glucosa ↓Utilización de glucosa ↑Glucogénesis
<b>Lípidos</b>	↓Lipólisis ↓AGL y glicerol ↑Lipogénesis ↑HDL ↓Triglicéridos
<b>Proteínas</b>	↓Gluconeogénesis ↓Aminoácidos ↑Síntesis de proteínas
<b>Purinas</b>	↓Formación de ácido úrico

La insulina ejerce todas sus acciones en los distintos tejidos mencionados, mediante su interacción con un receptor específico. La unión desencadena una compleja cascada de señalización intracelular que se ramifica en 2 vías principales: la vía de la proteína cinasa activada mitogeno-Ras (MAPK), denominada la vía mitogénica y la fosfatidilinositol-3-Kinasa (PI3K), denominada la vía metabólica. Estas vías moleculares actúan de forma integrada para coordinar la regulación del tráfico vesicular, la síntesis de proteínas, la activación de enzimas claves y, principalmente la expresión genética desde el núcleo, de transportadores de glucosa (GLUT-4), cuyo resultado final es la regulación del metabolismo de la glucosa, de los lípidos y de las proteínas (Patty *y cols.*, 1998).

El intermediario común de estas vías de señalización es el sustrato del receptor de insulina (IRS), del cual se conocen 4 isoformas IRS-1 a IRS-4. La activación del receptor de la insulina conduce a una fosforilación en el residuo tirosina Tyr<sup>608</sup> y Tyr<sup>628</sup> del IRS-1, dando lugar de este modo al inicio de la cascada de señalización.



**Figura 1.** Señalización del receptor de la insulina. CAP/Cbl, protooncogen asociado a la proteína adaptadora CAP; IRS, Sustrato del receptor de insulina; PI3K, Fosfoinositol 3 quinasa; AKT, Familia de protein-quinasa, que también se llaman protein-quinasa B (PKB); Shc, Proteínas de señalización; Ras/MAPK, Proteín kinasas activadas por mitógenos.

### 1.2.1.2. RESISTENCIA A LA INSULINA

La insulina, por la importancia de sus acciones, es una molécula clave en el control del metabolismo. Una respuesta insuficiente de los órganos diana (hígado, músculo esquelético y tejido adiposo) ante niveles plasmáticos fisiológicos de insulina se puede definir como Resistencia a la insulina. Entre los mecanismos moleculares más importantes que pueden originarla destaca la interferencia o interrupción en las vías de señalización que desencadena la interacción de la insulina con su receptor. La resistencia a la insulina conduce a un aumento en la producción de insulina por las células  $\beta$  pancreática como mecanismo compensatorio,

dando lugar a hiperinsulinemia, una de las primeras manifestaciones clínicas de la resistencia a la insulina.

El origen de esta alteración en la respuesta a la insulina no está bien esclarecido y factores ambientales ó relacionados con el estilo de vida, como el exceso de ingesta y la inactividad física, pueden contribuir a su desarrollo (Park *y cols.*, 2003; Zhu *y cols.*, 2004). Otros factores, como la susceptibilidad genética (Phillips *y cols.*, 2006) y el desequilibrio en el sistema nervioso autónomo pueden también estar involucrados en la aparición de la resistencia a la insulina (Kreier *y cols.*, 2003). En los últimos años se apunta a que, desde un punto de vista metabólico, los AGL podrían jugar un papel central en la patogénesis de la resistencia a la insulina.

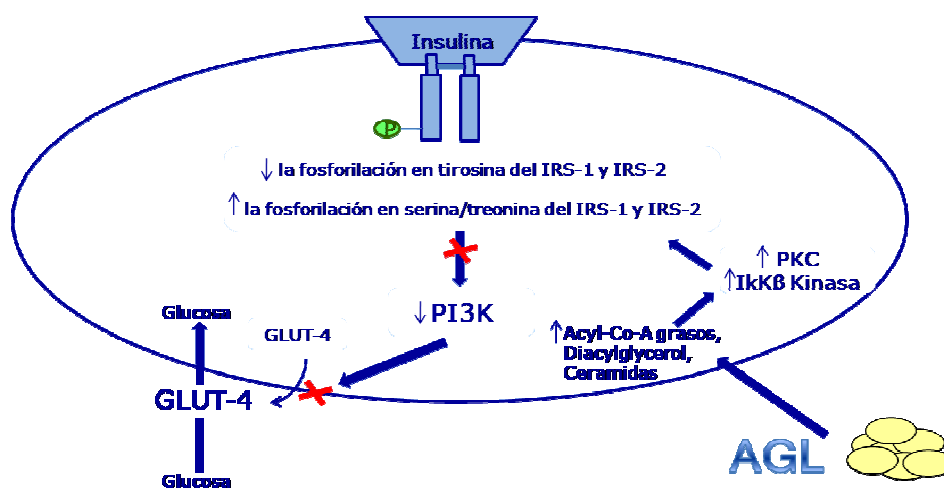
El mecanismo por el que los AGL inducen resistencia a la insulina ha generado mucha controversia desde su inicio. La primera evidencia de la participación de los AGL en la menor captación de glucosa en el músculo fue propuesta en 1963 por Randle (Randle *y cols.*, 1963). Estos investigadores propusieron una conexión entre la resistencia a la insulina en el esquelético músculo y concentraciones elevadas de AGL. Demostraron que los AGL competían por la glucosa como sustrato energético en el músculo y el tejido adiposo, y describieron esta relación como el ciclo de la glucosa-AGL.

Con el paso de los años, se ha demostrado que niveles elevados de AGL, mantenidos de manera de crónica, están fuertemente asociados tanto con la obesidad como con la diabetes mellitus tipo 2. Se ha pensado que los AGL pueden ser el nexo de unión entre estas dos enfermedades (Carvalho *y cols.*, 1999; Arner *y cols.*, 2002; Boden *y cols.*, 2002). En individuos con obesidad visceral, existe una menor inhibición de la lipólisis inducida por la insulina, esto conlleva un incremento en la concentración de AGL circulantes que favorece la resistencia a la insulina en el hígado y tejidos periféricos, al verse afectada la vía de señalización de la insulina.

Se ha observado que la acumulación lipídica intracelular inhibe la señalización de la insulina. Estudios *in vivo* sugieren que la acumulación intramiocelular de triglicéridos está estrechamente relacionado con la resistencia a la insulina en el músculo en humanos (Kelley *y cols.*, 2002). Mediante resonancia magnética nuclear se ha mostrado una estrecha relación entre el contenido en triglicéridos intramiocelulares y la resistencia a la insulina a nivel central en pacientes con obesidad y diabetes tipo 2 (Hwang *y cols.*, 2001). Existen ratones

transgénicos en los que el desarrollo normal del tejido adiposo está impedido, lo que genera una mayor acumulación de grasa en los tejidos periféricos (lipodistrofia) con respecto a animales normales. Estos ratones acumulan el doble de lípidos en músculo e hígado, lo que los vuelve irremediablemente resistentes a la insulina. De hecho, cuando a estos ratones transgénicos se les transplanta tejido adiposo normal, los lípidos intracelulares y la sensibilidad a la insulina se normalizan (Boden *y cols.*, 2002).

La acumulación de los AGL ó sus metabolitos en tejidos periféricos (músculo esquelético, tejido adiposo e hígado) (Boden *y cols.*, 1997; Petersen *y cols.*, 2002; Shulman *y cols.*, 2000) induce fosforilación en residuos de serina en lugar de los residuos de tirosina en el IRS-1 (Paz *y cols.*, 1997). Existe un gran número de kinasas capaces de provocar esta fosforilación anómala, incluyendo isoformas de la protein-kinasa C (PKC) y la quinasa del inhibidor I $\kappa$ B (IKK $\beta$ ). Estas Kinasas se encuentran elevadas en situaciones donde se acumula un exceso de lípidos y derivados como diacilglicerol (DAG) y ceramidas en el interior de las células musculares activando a la PKC (Griffin *y cols.*, 1999), contribuyendo así a la alteración de las vías de señalización activadas por la insulina.



**Figura 2.** Efecto de los ácidos grasos libres (AGL) en la señalización de la insulina. PKC, Protein kinasa C; IKK $\beta$ , Quinasa del inhibidor I $\kappa$ B; IRS-1 Sustrato del receptor de la insulina 1; IRS-2, Sustrato del receptor de la insulina 2; PI3K, Fosfoinositol 3 kinasa; GLUT-4, Transportador de glucosa sensible a la insulina.

### 1.2.2. OBESIDAD

En los países desarrollados y en vías de desarrollo la incidencia de la obesidad ha crecido de forma exponencial y sigue aumentando. Los valores de incidencia en el mundo se han triplicado en los últimos 20 años afectando a todo tipo de población y ocurriendo incluso en individuos a edades muy tempranas (Rocchini *y cols.*, 2002). En 2005 la OMS estimó que globalmente existía más de mil millones de adultos con sobrepeso (índice de masa corporal: (IMC)  $>27 \text{ Kg/m}^2$ ), de los cuales 300 millones eran obesos (IMC:  $>30 \text{ Kg/m}^2$ ) (OMS., 2005). Sólo en Europa, la población afectada en el año 2010 puede alcanzar unos 150 millones de personas (20 % de la población), incluyendo 15 millones de niños y adolescentes (10 % de la población) (OMS). Este hecho plantea una importante cuestión de salud pública: la obesidad y el sobrepeso incrementan el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas, como diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares, hipertensión, hipercolesterolemia, hipertriglicéridemia, artritis, asma, ciertos tipos de cáncer, o enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Mokadad, A. H *y cols.*, 2001; ).

La incidencia de obesidad ha aumentado por cambios en el estilo de vida, con un descenso en la actividad física y desajustes en la ingesta dietética marcados por un exceso calórico, lo que conduce a una situación para la que el organismo no está preparado. A diferencia de la situación actual en países desarrollados y en vías de desarrollo, durante la mayor parte de su historia, el ser humano ha tenido que vivir en situaciones en las que el acceso a la comida no siempre estaba asegurado. En este sentido, los mamíferos en general y el ser humano en particular desarrollaron sistemas de almacenamiento de energía, que les permitieran subsistir en períodos de escasez alimentaria. Sin embargo, el hombre no ha tenido tiempo material para adaptarse a la nueva situación de acceso fácil y de abundancia a los alimentos (Hotamisligil *y cols.*, 2006).

La obesidad refleja un desequilibrio en el que la energía ingerida excede a la consumida, y es almacenada en forma de grasa, lo que ocasiona la expansión del tejido adiposo. Cuando un individuo llega a ser obeso, su tejido adiposo se extiende, los adipocitos se hipertrofian y se hacen más sensibles al efecto lipolítico de las catecolaminas teniendo una menor respuesta a las acciones de la insulina. La pérdida de la sensibilidad a la insulina hace que ésta no inhiba eficazmente la lipólisis, dando lugar al aumento de los niveles plasmáticos

de AGL y glicerol. Existe un umbral, condicionado por factores genéticos y adquiridos, en el que se satura la capacidad de almacenamiento del tejido adiposo, de forma que el exceso de grasa se redirige a depósitos ectópicos en otros órganos como el hígado, el páncreas ó el músculo. En estos órganos la acumulación de lípidos intracelulares ejerce un efecto tóxico e induce la resistencia a la insulina, fenómeno conocido como lipotoxicidad (Danforth *y cols.*, 2000; Machann *y cols.*, 2004; Seppala-Lindroos *y cols.*, 2002; Bajaj *y cols.*, 2003; Tomas *y cols.*, 2002a; Ruderman *y cols.*, 2003; Kahn *y cols.*, 2000; Boden *y cols.*, 1997).

El tejido adiposo cada vez se percibe más como un órgano endocrino clave en la regulación de la homeostasis energética del organismo y no como un mero almacén de grasa y de energía (Kahn *y cols.*, 2000; Havel *y cols.*, 2002). Los adipocitos liberan AGL y un gran número de moléculas que actúan como auténticas hormonas, responsables, entre otras funciones, del control de la ingesta y del gasto energético (Mora *y cols.*, 2002). Estas hormonas, también llamadas adipocitoquinas, incluyen al TNF- $\alpha$ , la leptina, la IL-6, la angiotensina, el inhibidor del activador del plasminogeno (PAI-1), la PCR, la adiponectina, la resistina, la proteína transportadora del retinol-4 (RBP-4). Todos estos factores intervienen en la regulación de numerosas funciones, como la homeostasis energética, el metabolismo glucídico y lipídico, ó la sensibilidad a la insulina. Participan en el control del apetito y la modulación de la respuesta inmune e inflamatoria, e intervienen en otros muchos procesos como la función cardiovascular, la reproducción y la regulación hormonal. Las acciones de estas moléculas se llevan a cabo tanto a nivel central como periférico, en tejidos como el músculo esquelético, el hígado e incluso el propio tejido adiposo, que expresa numerosos receptores que le permiten dar respuesta a señales aferentes procedentes de distintos órganos endocrinos y del sistema nervioso central.

La expansión del tejido adiposo, produce una alteración en el patrón de secreción de estas moléculas. Principalmente se incrementa la liberación de citoquinas inflamatorias, como TNF- $\alpha$  e IL-6 y disminuye la secreción de adiponectina (Jaswinder *y cols.*, 2007). Este desequilibrio afecta negativamente a la vía de señalización de la insulina, constituyendo de forma importante a la menor respuesta a dicha hormona.

A lo largo de las dos últimas décadas, se ha visto que la obesidad es consecuencia del aumento en el número y tamaño de los adipocitos que conforman el tejido adiposo, lo que se traduce en un incremento de la masa de grasa en distintas partes del organismo. Esto ocasiona cambios en las funciones metabólicas y endocrinas de este tejido, provocando alteraciones a nivel sistémico que justifican que la obesidad sea un factor de riesgo en enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo 2, etc.

Pero además del incremento ó expansión del tejido graso, la distribución ó localización de la grasa también desempeña un papel clave en la obesidad, y en las alteraciones metabólicas asociadas. Muchos estudios han demostrado que el exceso de grasa en la parte superior del cuerpo (visceral ó abdominal) considerada como "obesidad tipo androide ó masculina" (Vague *y cols.*, 1947), está más relacionada con un incremento en la mortalidad y en padecer desórdenes como diabetes, hiperlipidemia, hipertensión y arterosclerosis, que la obesidad ginoide (la grasa se acumula en la parte baja del cuerpo, sobretodo en el tejido adiposo subcutáneo femoral y gluteal) (Larsson *y cols.*, 1984; Lapidus *y cols.*, 1984; Ducimetière *y cols.*, 1986; Donahue *y cols.*, 1987). La grasa visceral posee diferente actividad metabólica y histológica que la grasa subcutánea, lo cual puede explicar su diferente papel en relación a padecer enfermedades metabólicas y cardiovasculares (Garaulet *y cols.*, 2006). Concretamente, los adipocitos viscerales son más lipolíticos que los adipocitos subcutáneos, en parte debido a que poseen un mayor número de receptores adrenérgicos (Wajchenberg *y cols.*, 2000). Este aumento en la sensibilidad a la catecolaminas, puede llevar a una liberación masiva de AGL al sistema porta, dando lugar al aumento de la producción de glucosa y de la secreción de lipoproteínas de muy baja densidad, y a una disminución en la excreción de la insulina hepática. La alta actividad lipolítica del tejido adiposo visceral (TAV), junto con la conexión directa con el hígado, está asociado con una elevación con los AGL en la circulación portal y sistémica (Bjorntorp *y cols.*, 1996). Por lo tanto, el incremento del TAV contribuye a desarrollar dislipemia, aumento de la gluconeogénesis, y resistencia a la insulina (Wajchenberg *y cols.*, 2000; Ritchie *y cols.*, 2007).

Estudios en roedores han puesto de manifiesto que la eliminación de la grasa visceral mediante cirugía mejora las alteraciones metabólicas relacionadas con la producción excesiva de este tejido (Barzilai *y cols.*, 1999; Einstein *y cols.*, 2008; Borst *y cols.*, 2005; Gabriely *y cols.*, 2002; Pitombo *y cols.*, 2006; Kim *y cols.*, 1999).

### 1.2.3. INFLAMACIÓN Y SÍNDROME METABÓLICO

Numerosos autores han sugerido en los últimos años la existencia de una asociación directa entre inflamación y síndrome metabólico, teniendo en cuenta los elevados niveles de marcadores y citoquinas inflamatorias detectados en los pacientes afectados por este síndrome (Hotamisligil *y cols.*, 1995). De hecho, la inflamación crónica puede representar un factor desencadenante del síndrome metabólico (Pickup, J *y cols.*, 2004). La idea que establece una relación entre inflamación y alteraciones metabólicas como obesidad y resistencia a la insulina se introduce por primera vez en un estudio de Hotamisligil *y cols.*, 1993, en el que ponen de manifiesto que los adipocitos expresan de forma constitutiva la citoquina proinflamatoria TNF- $\alpha$ , y que dicha expresión se encontraba aumentada en los adipocitos de animales obesos (ratón *ob/ob*, ratón *db/db* y rata *fa/fa*) (Hotamisligil *y cols.*, 1993). Paralelamente, otros autores propusieron, a raíz de otras investigaciones, que la diabetes tipo 2 podría ser considerada una condición inflamatoria caracterizada por elevadas concentraciones plasmáticas de IL-6 y ácido siálico (Crook *y cols.*, 1993; Pickup *y cols.*, 1997).

Se ha demostrado que la ingesta de determinados macronutrientes puede inducir estrés oxidativo y respuestas inflamatorias. El patrón dietético de consumo crónico de dietas ricas en azúcares y grasas saturadas es el que desencadena una mayor respuesta inflamatoria. En este sentido, la ingesta de 75 g de glucosa, induce en leucocitos un incremento en la generación de anión superóxido, además de un aumento de la expresión de p47<sup>phox</sup> (Mohanty *y cols.*, 2000). La ingesta de cantidades equivalentes de grasa también produce estrés oxidativo (Mohanty *y cols.*, 2002). Igualmente se ha visto que tanto la ingesta de glucosa como la de grasa implica una inflamación a nivel global, debido a un incremento del NF- $\kappa$ B (Dhindsa *y cols.*, 2004; Aljada *y cols.*, 2004 (a); Aljada *y cols.*, 2004 (b)). Además, se ha demostrado que la infusión intravenosa de lípidos a individuos sanos, induce inflamación y estrés oxidativo (Tripathy *y cols.*, 2003). Se ha observado que todos estos genes que dan lugar a moléculas inflamatorias ó a enzimas implicadas en el estrés oxidativo y que ven incrementada su expresión en respuesta a la ingesta aguda de los nutrientes descritos, se encuentran también sobreexpresados en sujetos obesos durante su estado basal. Logicamente, una reducción en la ingesta de macronutrientes en estos sujetos (1000 Kcal/d, 4 semanas) promueve la reducción de los mediadores inflamatorios y del estrés oxidativo (Dandona *y cols.*, 2001).



### 1.2.3.1. IMPLICACIÓN DE LAS ADIPOCITOQUINAS

Sin duda, el mejor argumento para sostener la hipótesis del origen inflamatorio del síndrome metabólico se basa en el desequilibrio en la producción de adipocitoquinas inflamatorias y antiinflamatorias por el tejido adiposo que existe ante la presencia de alteraciones metabólicas como la obesidad (Hotamisligil *y cols.*, 1993). Las distintas moléculas secretadas por el tejido adiposo juegan un importante papel en la homeostasis energética y en la regulación de los mecanismos que conducen a la resistencia a la insulina.

#### a) TNF- $\alpha$

El TNF- $\alpha$  es una proteína de 17 kD secretada como trímero de 51 kD que toma su nombre de su identificación inicial como factor proapoptótico en células tumorales. Fue identificado por primera vez en macrófagos, aunque posteriormente se descubrió que también es producido por los adipocitos, y cumple una función paracrina y autocrina (Ruan *y cols.*, 2003). Hotamisligil *y cols.* demostraron que tanto la expresión de ARNm como de proteína del TNF- $\alpha$ , estaban fuertemente aumentadas en el tejido adiposo de animales obesos (Hotamisligil *y cols.*, 1993) y de humanos obesos (Hotamisligil *y cols.*, 1995).

La evidencia directa de la participación de esta citoquina en la resistencia a la insulina se obtuvo al observar que la infusión aguda de TNF- $\alpha$  inhibía la disponibilidad de glucosa estimulada por la insulina tanto en roedores obesos (Hotamisligil *y cols.*, 1994a; 1996; Hofmann *y cols.*, 1994) como en humanos sanos (Plomgaard *y cols.*, 2005). La inhibición de la señalización del TNF- $\alpha$  o su neutralización mediante el uso de *receptores solubles* restauró la sensibilidad a la insulina en ratas obesas Zucker (Hotamisligil *y cols.*, 1994b), pero no fue efectiva en humanos tratados durante 6 semanas (Ofei *y cols.*, 1996).

El TNF- $\alpha$ , guarda una relación directamente proporcional con la cantidad de masa grasa corporal del individuo, ya que la pérdida de peso disminuye la expresión y secreción de TNF- $\alpha$  por el tejido adiposo (Kern *y cols.*, 1995). La producción de TNF- $\alpha$  fue en un principio atribuida a los adipocitos del tejido adiposo. Recientemente se ha puesto de manifiesto que cuando existe obesidad se produce una gran infiltración de macrófagos en dicho tejido (Weisberg *y cols.*, 2003; Ferrante *y cols.*, 2007) en el que actúan como células "barredoras"

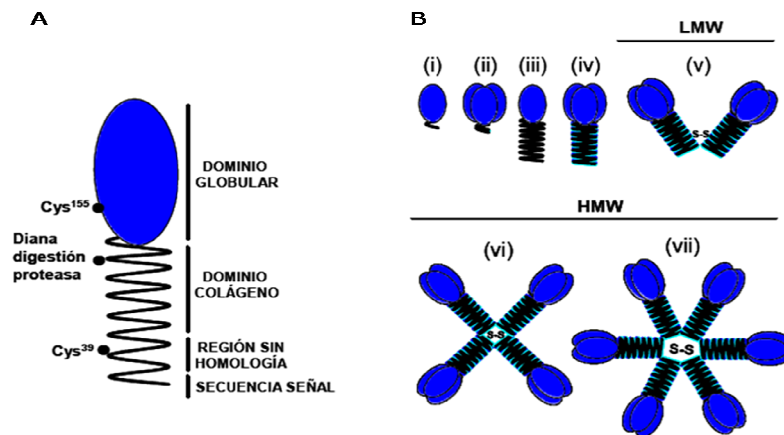
("scavenger") de adipocitos muertos. Los macrófagos constituyen la principal fuente productora de ésta y otras citoquinas inflamatorias en el tejido adiposo (Weisberg *y cols.*, 2003), como las cantidades significativas de IL-6 y el aumento de la expresión de óxido nítrico sintasa (Weisberg *y cols.*, 2003). En individuos obesos los macrófagos del tejido se encuentran en un estado proinflamatorio caracterizado por el aumento de la activación del NF- $\kappa$ B, la reducción IK $\beta$ , y por aumentar la transcripción de genes proinflamatorios como TNF- $\alpha$  (Weisberg *y cols.*, 2003 y Ghanim *y cols.*, 2004). Estudios recientes sugieren que los AGL desempeñan un papel esencial en este estado proinflamatorio.

Los AGL circulantes se encuentran en altas concentraciones en el síndrome metabólico. En un estudio se observó que la infusión aguda de una emulsión rica en grasas que elevaba la concentración plasmática de AGL provocaba un considerable aumento de la concentración de TNF- $\alpha$  circulante (Itani *y cols.*, 2002). Varios estudios sugieren que los AGL activan las vías proinflamatorias en los macrófagos bien de forma directa, vía receptor toll-like 4 (TLR-4), bien de forma indirecta mediante reacciones de lipotoxicidad que son consecuencia de la acumulación ectópica de derivados lipídicos (Lee *y cols.*, 2003). El TNF- $\alpha$  a su vez, activa rutas lipolíticas en el tejido adiposo (Zhang *y cols.*, 2002), provocando una liberación masiva de AGL al torrente circulatorio. Este hecho contribuye a generar resistencia a la insulina así como a la retroalimentación de la producción de esta citoquina, que también puede desencadenar resistencia a la insulina de forma directa, por su capacidad para fosforilar un resto de serina del IRS mediante la activación de JNK e I $\kappa$ B/NF $\kappa$ B (Arkan *y cols.*, 2005; Cai *y cols.*, 2005), inhibiendo la cascada de señalización de la insulina. Además, el TNF- $\alpha$  causa alteraciones metabólicas en otros tejidos como hígado y músculo esquelético que parecen estar relacionadas con un descenso en la tasa de oxidación de AGL y que podría ser consecuencia de la inhibición que el TNF- $\alpha$  causa en la protein-quinasa activada por 5'-AMP (AMPK) (Steinberg *y cols.*, 2007). El TNF- $\alpha$  reduce la actividad de esta enzima al incrementar la expresión de la fosfatasa encargada de desfosforilar e inactivar a la AMPK, la proteína-fosfatasa 2C (PP2C) (Steinberg *y cols.*, 2007). Como consecuencia de la inhibición de la AMPK, se activa la acetil-CoA carboxilasa 2 (ACC2), que actúa inhibiendo la oxidación de AGL (Hardie *y cols.*, 2003).

### **b) ADIPONECTINA**

La adiponectina es la única de las moléculas secretadas por el tejido adiposo que intervienen en la regulación de la homeostasis energética, exclusivamente sintetizada por dicho tejido (Scherer *y cols.*, 1995; Maeda *y cols.*, 1996). Su concentración en sangre se encuentra en el rango de los  $\mu\text{g/ml}$  (Whitehead *y cols.*, 2006), pues el tejido graso la secreta en grandes cantidades, suponiendo aproximadamente un 0,01% del total de las proteínas plasmáticas. Al contrario de lo que sucede con otras moléculas secretadas por el adipocito, los niveles de adiponectina disminuyen al aumentar la masa de tejido adiposo (Arita *y cols.*, 1999) y su concentración está igualmente en una relación inversa con la resistencia a la insulina (Hotta *y cols.*, 2000).

La adiponectina es una hormona de 30 kDa. Se puede presentar bajo diferentes formas, como la fracción globular de la proteína, monómeros, homotrímeros, hexámeros que constituyen la forma completa de la molécula (Figura 3). Su secreción puede estar influenciada por factores como edad, sexo, fertilidad, ritmos circadianos, ayuno-alimentación, etc. Muchos de ellos dejan de ejercer esa influencia en situación de obesidad y recuperarla con la pérdida de peso (Calvani *y cols.*, 2004). Se ha observado que en estado de obesidad existe una correlación negativa entre secreción de adiponectina e IMC, y ésta es mayor en el TAV, que en el subcutáneo (Matsuzawa *y cols.*, 2006). La producción de esta molécula también puede verse afectada por la secreción de otras adipocitocinas como el TNF- $\alpha$ , con el que parece tener una relación recíproca de inhibición (Maeda *y cols.*, 2002; Cawthorn *y cols.*, 2008).



**Figura 3.** Estructura del monómero y de los homocomplejos de adiponectina. A) Representación esquemática del monómero de adiponectina con el dominio globular en el extremo C-terminal y la secuencia señal en el extremo N-terminal. Se indica la ubicación de los aminoácidos con los que forma los puentes disulfuro y el lugar de actuación de la proteasa. B) (i) monómero y (ii) homotrímero globulares obtenidos *in vitro* mediante digestión con proteasa, (iii) monómero completo, (iv) homotrímero, (v) hexámero ó supracomplejo de peso molecular (LMW). Los supracomplejos de alto peso molecular (HMW) están formados por complejos de doce (vi) y dieciocho (vii) monómeros.

La adiponectina ejerce sus acciones en el organismo mediante la interacción con sus receptores específicos. Se han descrito dos isoformas diferentes de receptores para la adiponectina (Yamauchi *y cols.*, 2003), los receptores adipoR1 y adipoR2. Los efectos biológicos de la adiponectina no dependen solo de sus niveles circulantes en plasma y de las propiedades de sus isoformas, sino también de la expresión de sus subtipos de receptores, que es específica de tejido. La expresión de estos receptores es bastante ubicua, aunque el adipoR1 se expresa principalmente en músculo esquelético, además de en otros tejidos como hueso y páncreas, mientras que el adipoR2 se expresa a niveles más altos en hígado (Kadowaki *y cols.*, 2005) (Yamauchi *y cols.*, 2003). Ambos receptores se expresan en el preadipocito pero su expresión aumenta notablemente a lo largo de la adipogénesis (Fasshauer *y cols.*, 2004; Bluher *y cols.*, 2005). Además los dos receptores están expresados

en célula  $\beta$  pancreática y los AGL regulan sus niveles (Kharroubi *y cols.*, 2003). La hormona del crecimiento (GH) es un regulador positivo de adipoR2 en células 3T3 y la insulina regula negativamente los niveles de mRNA de ambos receptores a través de la activación del PI3K (Tsuchida *y cols.*, 2005). La expresión de estos receptores aumenta en hígado y músculo esquelético con el ayuno, y la ingesta restablece rápidamente sus valores. En músculo esquelético de ratones hipoinsulinémicos e hiperglucémicos tratados con estreptozotocina, ambos receptores aumentan significativamente su expresión; el tratamiento con insulina revierte completamente sus niveles. La expresión del ARNm de adipoR1 y adipoR2 está disminuida también en músculo y tejido adiposo de ratones con resistencia a insulina (*ob/ob*), estos ratones tiene además alterados los sitios de unión de baja y alta afinidad para adiponectina globular en músculo esquelético, así como una disminución de la activación de AMPK por adiponectina. En conjunto estos datos sugieren que en ratones con niveles de expresión reducidos de adipoR1 y adipoR2 existe una resistencia a adiponectina, cuyo papel es crucial en el desarrollo de la resistencia a la insulina (Kadowaki y Yamauchi., 2005).

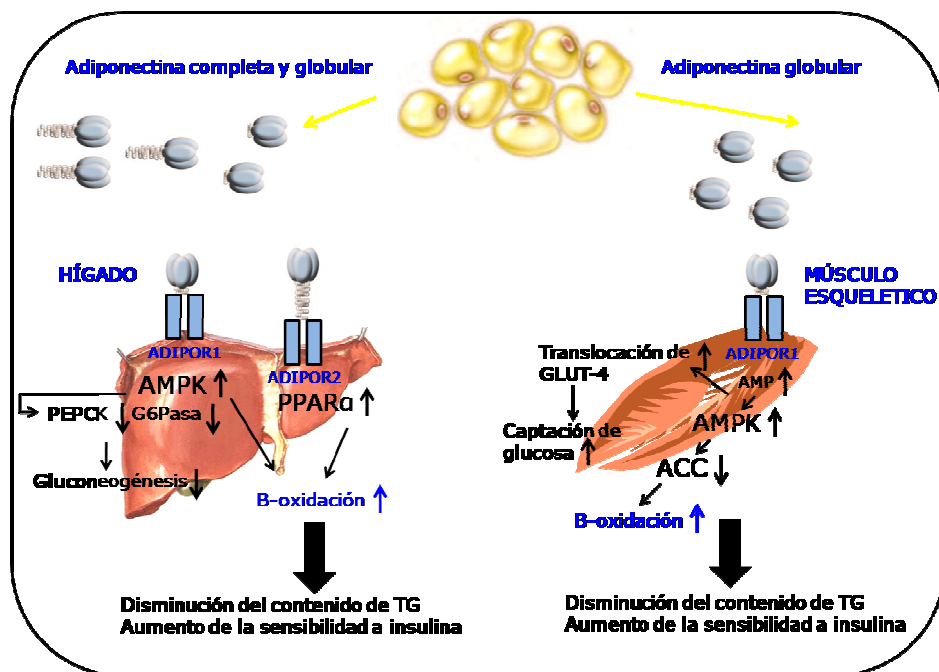
Los efectos fisiológicos derivados de la interacción entre la adiponectina y sus receptores son, por un lado, favorecer la sensibilidad a la insulina, mediante el aumento de la captación de glucosa y de la oxidación de AGL, y mediante la reducción de la gluconeogénesis, y por otro lado, ejercer un efecto antiinflamatorio que mantiene un equilibrio con otras citoquinas segregadas por el tejido adiposo.

Numerosas evidencias sugieren que son necesarios ciertos niveles de adiponectina para mantener la homeostasis energética y prevenir enfermedades metabólicas. Se ha demostrado que bajos niveles de adiponectina se asocian de forma independiente con el síndrome metabólico (Matsushita *y cols.*, 2006). Además, la administración exógena de adiponectina a individuos obesos aumenta la sensibilidad a la insulina, efecto asociado a una disminución de los niveles plasmáticos de AGL y triglicéridos (Hotta *y cols.*, 2001; Fruebis *y cols.*, 2001). Esta reducción de AGL sería consecuencia de la activación de la AMPK en músculo esquelético por la adiponectina globular en un efecto mediado por adipoR1 (Figura 3) (Yamauchi *y cols.*, 2002). En el hígado, tanto por la molécula completa como globular, mediante la unión con adipoR2 y adipoR1 respectivamente, activan AMPK y al receptor activador de la proliferación de peroxisomas (PPAR  $\alpha$ ), reduciendo por tanto las moléculas implicadas en la gluconeogénesis y estimulando la oxidación de ácidos grasos (Figura 3).

La adiponectina da lugar a la activación de la AMPK a través de su fosforilación, con la consecuente inhibición de la actividad de la ACC, dando lugar al incremento de la oxidación de AGL, con el consiguiente descenso de los niveles de estos en plasma. A través de la misma vía, la adiponectina aumenta la captación de glucosa, ya que es capaz de reducir la fosforilación de los restos de serina del IRS-1 provocada por los elevados niveles de mediadores inflamatorios mediante la activación de la kinasa encargada de fosforilar/activar a la AMPK, LKB1 (Changhua *y cols.*, 2007). Como consecuencia de esta activación se producen además el incremento de la producción de lactato en el músculo esquelético y la reducción de la expresión de moléculas implicadas en la gluconeogénesis en el hígado (Combs *y cols.*, 2001), donde se promueve la fosforilación de ACC y una reducción en la expresión de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) y de glucosa-6-fosfatasa (G-6-pasa) (Combs *y cols.*, 2002; Yamauchi *y cols.*, 2002). Todos estos efectos desaparecieron al bloquear la vía de la AMPK mediante adenovirus que expresaban un gen nulo para la subunidad  $\alpha$  de la AMPK, demostrando que esta vía es necesaria para la obtención estos efectos.

En humanos existen pocos estudios sobre la regulación de los receptores de adiponectina. La expresión de los receptores de adiponectina se encuentra disminuida en el músculo esquelético de pacientes con diabetes tipo 2 (Debard *y cols.*, 2004). Además, se ha establecido una correlación entre la expresión génica de los receptores de adiponectina y la sensibilidad a la insulina en poblaciones de mexicanos no diabéticos con o sin historial familiar de diabetes tipo 2 (Civitarese *y cols.*, 2004). Staiger y colaboradores encontraron una correlación positiva entre la expresión de adipoR1 en músculo esquelético humano y concentraciones de insulina, péptido C, primera fase de secreción de insulina, triglicéridos plasmáticos y concentraciones de colesterol, mientras que la expresión de adipoR2 sólo se correlacionó con las concentraciones plasmáticas de triglicéridos (Staiger *y cols.*, 2004). En un estudio más reciente, se puso de manifiesto una correlación positiva de la expresión de ambos receptores en músculo esquelético humano con la composición corporal, la sensibilidad a la insulina y diferentes parámetros metabólicos (Bluher *y cols.*, 2006). Además existen varios estudios que asocian ciertos polimorfismos de los receptores con una mayor susceptibilidad de padecer diabetes tipo 2 (Dancott *y cols.*, 2005; Stefan *y cols.*, 2005; Vaxillarie *y cols.*, 2006).

La adiponectina puede regular la fosforilación del receptor de insulina (Stefan y col., 2002) y su actividad tirosinquinasa (Yamauchi *y cols.*, 2002), paso esencial en la cascada de señalización de la insulina. El ratón genosuprimido para el gen de la adiponectina, alimentado con dieta alta en lípidos y carbohidratos, presenta una mayor resistencia a la insulina y una menor fosforilación del sustrato del receptor de la insulina-1 (IRS-1), efectos asociados a un descenso en la actividad del PI3K (Maeda *y cols.*, 2002). Así pues, la adiponectina puede interactuar directamente con la señalización de la insulina, mediante mecanismos que se desconocen, afectando a su capacidad de acción (Figura 3).



**Figura 4.** Modelo de acción de la adiponectina en hígado y músculo esquelético. ACC: Acetil-CoA carboxilasa; AMPK: quinasa dependiente de AMP; Glucosa-6-Pasa: Glucosa-6-fosfatasa; GLUT-4: transportador de glucosa-4; PEPCK: fosfoenolpiruvato carboxiquinasa; PPAR-alfa: receptor alfa activador de la proliferación de los peroxisomas; TG: triglicéridos.

### c) LEPTINA

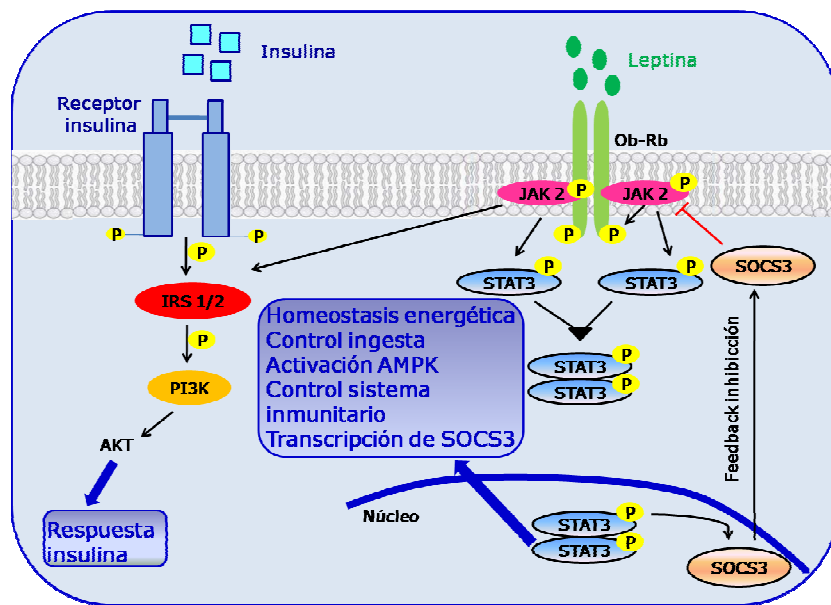
Otra adipocitokina implicada de forma destacada en la regulación de la homeostasis energética es la leptina. Su descubrimiento (Zhang *y cols.*, 1994), abrió las puertas a toda una serie de estudios acerca de las moléculas secretadas por el tejido adiposo y su papel en el mantenimiento de la homeostasis energética. La leptina es un péptido de 16 kDa, producto del gen *ob*. Aunque es sintetizada y secretada fundamentalmente por el tejido adiposo, puede proceder de otros tejidos como la placenta, la mucosa gástrica y el epitelio mamario (Masuzaki *y cols.*, 1997). Los niveles plasmáticos de leptina suelen ser bajos -del orden de ng/ml- (Simon *y cols.*, 2002) y guardan una relación directa con la masa de tejido adiposo y el IMC. En individuos delgados sanos, la mayor parte de la leptina plasmática circula unida a proteínas, lo que favorece su captación por los tejidos y el desempeño de su función. Además, de esta manera se retrasa su aclaramiento renal.

Inicialmente se pensó que las acciones de la leptina eran producidas exclusivamente a nivel central. Sin embargo, la detección de la presencia de sus receptores, OB-R, en prácticamente todos los tejidos del organismo determinó que se hayan atribuido a esta molécula numerosas funciones fisiológicas (Frühbeck *y cols.*, 2002). Existen distintas isoformas del receptor para la leptina (a,b,c,d,e y f), pero la forma larga del receptor, OB-Rb parece ser la única que inicialmente se considera funcional (Lee *y cols.*,1996). La ausencia o el mal funcionamiento de este receptor da lugar al fenotipo de obesidad que muestran algunos modelos animales como los ratones *db/db* o las ratas *fa/fa* (Zucker) respectivamente (Chua *y cols.*, 1996).

En los últimos años, el estudio de las rutas de señalización activadas como consecuencia de la unión de la leptina a su receptor ha llevado a una mayor comprensión de los mecanismos bioquímicos y moleculares de sus acciones en el organismo. Las principales vías de señalización intracelular implicadas incluyen la activación de JAK (Janus kinasas) y STAT (Transductores de señales y activadores de transcripción) (Sahu *y cols.*, 2004; Hegyi *y cols.*, 2004; Sweeney *y cols.*, 2002; Ahima *y cols.*, 2004). Sólo el receptor OB-Rb en su forma larga posee los motivos requeridos para la activación de la señalización JAK/STAT (Bjørnbæk *y cols.*, 1997; 2004; Myers *y cols.*, 2004).



La vía JAK/STAT comprende cuatro tirosin-kinasa no asociadas al receptor (JAK) y siete factores de transcripción (STAT) que están regulados por fosforilación en residuos específicos de serina y tirosina. La vía es típicamente activada por interferones, interleukinas y otras citocinas cuyos receptores carecen de actividad kinasa. La secuencia de activación por leptina se da de la siguiente manera: la leptina se une a su receptor, dando lugar a un cambio de conformación que permite interaccionar a los JAKs. Esto permite su activación y con ella su capacidad para fosforilar otros JAKs y otros restos de tirosina de la región citoplasmática del receptor, lo que a su vez permite la asociación de STATs, que pasan a ser sustrato de los JAKs, y, una vez fosforilados, se disocian del receptor para migrar al núcleo y promover la transcripción de genes. (Bates y Myers, 2003). Esta secuencia y sus efectos son modulados por un sistema de *feed-back negativo* mediado por los *supresores de señalización de citocinas* (SOCS) (Bjørnbæk y cols., 2000).



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

Los principales efectos que se le pueden atribuir a la leptina son los del control del balance energético del organismo, la modulación del sistema inmunitario y el control de la reproducción y el desarrollo sexual. Entre ellos, el que nos ocupa en este caso es el mantenimiento de la homeostasis energética. En este sentido, la leptina, al ser secretada por el tejido adiposo en cantidades proporcionales a la masa del mismo, actúa como un indicador del estado de la reserva energética del organismo completo. En consecuencia, en caso de reserva abundante de energía (elevado IMC), los niveles de leptina se encuentran aumentados (Isaganaitis *y cols.*, 2005). Este control se lleva a cabo tanto a nivel periférico como central. En el primer caso, la regulación se realiza mediante la activación de diferentes rutas, destacando la activación de la enzima 5'-AMPK. Se ha observado que la leptina es capaz de activar de forma directa e independiente de AMP, en parte mediante estimulación simpática, la subunidad  $\alpha 2$  de la AMPK en tejidos periféricos, lo que conlleva un aumento del gasto energético mediante la activación de la oxidación de glucosa y de AGL (Minokoshi *y cols.*, 2002; Ceddia *y cols.*, 2005; Kamohara *y cols.*, 1997; Muoio *y cols.*, 1997). En la regulación central de la homeostasis energética la leptina actúa transmitiendo información acerca de la reserva energética desde el resto del organismo hasta el hipotálamo, ejerciendo la modulación del apetito (Jéquier *y cols.*, 1999; Niswender *y cols.*, 2001). En una situación de acumulación de tejido adiposo, se produce un aumento de la concentración de leptina, aportando al hipotálamo el mensaje de abundancia que se traduce en una reducción del apetito y un aumento de la actividad catalítica en los tejidos efectores. Por el contrario, en el caso de que se produzca una reducción del nivel de leptina motivada por un ayuno de 12 horas o más, o por una pérdida de masa grasa, la señal interpretada por el hipotálamo es de escasez, lo que conduce a un aumento del apetito y a la disminución del gasto energético (Niswinder *y cols.*, 2004; Isaganaitis *y cols.*, 2005).

Estos efectos de la leptina se encuentran íntimamente ligados a la acción de la insulina. Ambas hormonas son sintetizadas y secretadas en situaciones de abundancia energética, sus receptores se encuentran en las mismas neuronas del hipotálamo y ambas producen efectos anorexígenos cuando se administran en el fluido cerebro-espinal, con la diferencia de que los niveles de insulina reflejan cambios agudos en la ingesta energética mientras los de leptina evidencian cambios a medio-largo plazo (Carvalho *y cols.*, 2005). Igualmente sus vías de señalización intracelular están conectadas ya que la activación del receptor OB-R por la leptina se traduce en la fosforilación de un resto de tirosina del IRS, contribuyendo a la activación de AKT (Niswender *y cols.*, 2004).

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

A nivel central se produce una reducción del transporte de las hormonas a través de la barrera hemato-encefálica y una disminución de la señalización intracelular. Lo primero se justifica porque los transportadores de la barrera son saturables y en situación de obesidad, dados los elevados niveles de leptina e insulina, no son capaces de introducir cantidades suficientes para llevar al hipotálamo la información real de la situación energética y obtener un efecto (Morrison *y cols.*, 2008). La reducción de la señalización intracelular se debe a que las dos hormonas comparten la enzima PI3K en sus cascadas intracelulares, estableciéndose un sinergismo entre ellas que se ve truncado en el caso del síndrome metabólico, ya que la fosforilación en un resto de serina en IRS impide la activación de PI3K (Niswender *y cols.*, 2001) (Figura 4).

En individuos sanos, la leptina incrementa la sensibilidad a la insulina y ejerce sus acciones beneficiosas sobre el metabolismo lipídico mediante la activación de la AMPK en tejidos periféricos. Para ello, en su cascada de señalización requiere la activación de PI3K. Pero en individuos obesos, al igual que sucede en el hipotálamo, estos efectos se pierden y aparece la resistencia a la leptina, al anularse la activación de PI3K por el mismo mecanismo. Además, este obstáculo en la señalización en tejidos periféricos provoca también resistencia a la insulina, que a su vez se verá agravada por la resistencia a la leptina. Por tanto en el punto de cruce entre las cascadas de señalización de insulina y leptina encontramos una posible explicación a la aparición de la resistencia a ambas hormonas (Huang *y cols.*, 2004).

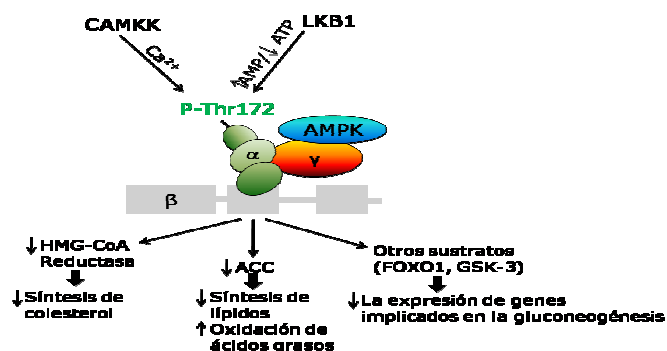
Se ha llegado a hipotetizar que, en el síndrome metabólico, la resistencia a la insulina podría ser secundaria a la resistencia a la leptina, e incluso podría tratarse de un mecanismo compensatorio (Unger 2003).

Se ha observado, una estrecha relación entre niveles elevados de leptina y el riesgo de padecer diabetes tipo 2 y síndrome metabólico (Lee *y cols.*, 2009). Estudios recientes han demostrado que no hay un consenso en los niveles de leptina a nivel de la población mundial, indicando que existen diferencias en función de la raza étnica a la que pertenezca el individuo (Liew *y cols.*, 2003; Ruhl *y cols.*, 2001; 2004; Pérez-Bravo *y cols.*, 1998). Un trabajo reciente establece que los Indios Asiáticos tienen niveles de leptina superiores a los encontrados en la población Criolla y Europea, independientemente del ajuste de estos niveles a las medidas tradicionales para el cálculo de la obesidad, como el IMC y la relación cintura-cadera (Lilja *y cols.*, 2010).

### 1.3. IMPLICACIONES ENERGÉTICAS DE LA 5'-AMPK

La AMPK es una proteína sensible al estrés metabólico, responsable de coordinar el metabolismo celular y la transcripción de genes para conseguir un equilibrio entre almacenamiento y gasto de energía en función del aporte de nutrientes y las demandas energéticas (Hardie *y cols.*, 1997). Se trata de una proteína heterotrimérica, formada por tres subunidades,  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ . El principal estímulo activador de la AMPK es la depleción energética manifestada por un aumento en la relación AMP/ATP, aunque también puede ser activada por el estrés celular o la hipoxia (Hardie *y cols.*, 2003). La activación de la AMPK depende fundamentalmente de la fosforilación en Thr<sup>172</sup> en el dominio catalítico de la subunidad  $\alpha$ , mediante la kinasa LKB1 (Sakamoto *y cols.*, 2005) (Figura 6). Además, la AMPK puede ser activada alostéricamente en la subunidad  $\gamma$  por AMP e inhibida por ATP (Davies *y cols.*, 1995). Los principales efectos de su activación originan:

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



**Figura 6.** Activación de la enzima AMPK. LKB1, serin/treonin protein kinase; HMG-CoA reductasa, Hidroximetil-glutaril-CoA reductasa; ACC, Acetil Co-A carboxilasa; FOXO1, factor de transcripción *forkhead1*.

Uno de los principales efectos derivados de la activación de la AMPK es el aumento de la tasas de oxidación de ácidos grasos. La AMPK activada fosforila a la ACC, inhibiéndola, lo que conduce a una reducción en el nivel de malonil-CoA y con ello un aumento del flujo de ácidos grasos hacia el interior de la mitocondria, vía carnitina-palmitoil-transferasa1 (CPT1). En este aspecto, la AMPK juega un importante papel, coordinando cambios en el metabolismo lipídico las rutas anabólicas a catabólicas en casos de escasez energética (Hardie *y cols.*, 2003).

La AMPK interviene en la regulación de muchos otros procesos metabólicos. Desempeña un papel clave en el control de la síntesis de lípidos a través de la inhibición de otras enzimas implicadas como la sintasa de ácidos grasos (FAS), la glicerolfosfatoaciltransferasa (GPAT) y la hidroximetilglutaril-CoA reductasa (HMG-CoA). También inhibe otro proceso de elevado coste energético como es la síntesis proteica. Su acción sobre el metabolismo glucídico consiste en la inhibición de la síntesis de glucógeno y en el aumento de la captación de glucosa favoreciendo su oxidación en la glucólisis (Hardie *y cols.*, 2003).

Dada la naturaleza de los efectos de la AMPK, es importante conocer la relación existente entre dichos efectos y los de la insulina, para dilucidar qué papel desempeña cada una de ellas en el síndrome metabólico. Las rutas de señalización de la insulina se activan en abundancia de nutrientes, mientras que las de la AMPK lo hacen en escasez de los mismos. La insulina y la glucosa inhiben la actividad de la AMPK en todos los tejidos estudiados, ya que son señales de abundancia energética (Kola *y cols.*, 2006). La inhibición de la AMPK por la

insulina se produce por la fosforilación en Ser<sup>485, 491</sup> de la subunidad  $\alpha$  por AKT, lo que conlleva un menor grado de fosforilación en Thr<sup>172</sup> (Horman *y cols.*, 2006).

No obstante insulina y AMPK pueden actuar en un mismo sentido, como ocurre en procesos que regulan los niveles plasmáticos de glucosa (Mhairi *y cols.*, 2007), o en el control de la lipólisis:

- En el músculo esquelético, la activación de ambas rutas estimula la captación de glucosa mediante el aumento de la translocación de GLUT-4 a la superficie de la membrana celular. Posteriormente la glucosa es destinada a fines distintos: La captada por acción de la insulina se emplea para la síntesis de glucógeno (efecto anabólico), mientras que la captada por acción de la AMPK es oxidada para obtener energía (efecto catabólico) (Kramer *y cols.*, 2006; Treebak *y cols.*, 2006).
- A nivel hepático la activación de estas dos vías reduce la expresión de enzimas gluconeogénicas (Lochhead *y cols.*, 2000). La insulina, como hormona liberada en respuesta a una elevada concentración de glucosa en sangre, reprime la síntesis hepática de glucosa. En el caso de la AMPK, esta represión de la síntesis hepática de glucosa puede tratarse de una de sus acciones antianabólicas, y parece ser una de las principales causas del efecto hipoglucemiante de la adiponectina e incluso de fármacos como la metformina (Shaw *y cols.*, 2005).
- Insulina y AMPK ejercen su cooperación también en los adipocitos, donde ambas suprimen la activación de la lipasa sensible a hormonas (HSL) y, en consecuencia, la lipólisis. La HSL se activa por fosforilación por protein-quinasas dependientes de (PKA) (AMPc). Las acciones de la insulina y la AMPK transcurren por vías de señalización diferentes. La insulina da lugar a la fosforilación y activación de la fosfodiesterasa 3B vía AKT, lo que disminuye la cantidad de AMPc (Wijkander *y cols.*, 1998). La AMPK fosforila directamente la HSL en Ser<sup>565</sup>, antagonizando así su activación por las PKA (Garton *y cols.*, 1989). Esta fosforilación impide su translocación a la gota lipídica del adipocito, previniendo con ello su acción lipolítica (Daval *y cols.*, 2005). En el caso de la insulina, se puede decir que ésta es una de sus acciones anticatabólicas. Sin embargo la actuación de la AMPK tiene una motivación más compleja. Si los AGL liberados como consecuencia de la lipólisis no son eliminados de la célula con rapidez, se reciclan dando lugar a nuevos triglicéridos, consumiendo ATP (Brooks *y cols.*, 1983). La inhibición de la lipólisis por AMPK, se ha propuesto como un mecanismo para limitar ese reciclaje, asegurando que la tasa de

lipólisis no supere la tasa de eliminación o metabolización de AGL y así no consumir energía en su transformación en triglicéridos (Hardie *y cols.*, 1997).

Los efectos paralelos de insulina y AMPK en la captación de glucosa en el músculo y la producción hepática de glucosa, constituyeron la base para proponer que los activadores de la AMPK podrían utilizarse en el tratamiento de la diabetes tipo 2 y el síndrome metabólico (Winder *y cols.*, 1999).

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

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

## 2. FIBRA DIETÉTICA

### 2.1. CONCEPTO

El concepto de fibra es complejo y ha ido evolucionando a lo largo de los años. Establecer una definición de la fibra dietética no es una tarea fácil y todavía hoy, no existe una definición universalmente aceptada de la fibra dietética.

Fue Hipsley, en 1953, quien acuñó por primera vez el término "fibra dietética" como una forma sencilla de referirse a los componentes no digeribles que constituyen la pared celular vegetal (Hipsley *y cols.*, 1953). Entre 1972 y 1975, Burkitt y Trowell adoptaron esa denominación de "fibra dietética", definiéndola como "*el remanente de los componentes de la planta que son resistentes a la hidrólisis por las enzimas intestinales humanas*" (Trowell *y cols.* 1972(a); Trowell *y cols.* 1972(b); Burkitt *y cols.* 1975). Esta definición engloba tanto a componentes de la pared celular (celulosas, hemicelulosas y lignina) como a otros polisacáridos presentes en las plantas (gomas, mucílagos, celulosas modificadas, oligosacáridos y pectinas) que son comestibles y resistentes a la digestión. El motivo que indujo a estos investigadores a incluir estos nuevos componentes de las plantas en la definición de fibra dietética fue basándose en las propiedades fisiológicas atribuidas a la misma, pero no necesariamente a su similitud en cuanto a composición química o su localización en la pared celular.

Investigaciones realizadas en las dos últimas décadas han demostrado que la fibra es resistente a las enzimas intestinales humanas, pero puede ser fermentada por la flora saprofítica del intestino grueso (fundamentalmente, por especies de *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*). Esta fermentación es muy importante para la homeostasis colónica, pues por una parte favorece el crecimiento de esta microbiota beneficiosa en detrimento de bacterias patógenas y, por otra, porque la fermentación de la fibra origina ácidos grasos de cadena corta (AGCC), especialmente el butirato, que constituye la fuente de energía fundamental del colonocito (Zarzuelo *y cols.* 2001; 2005).

Estos nuevos descubrimientos han conducido a la propuesta de un nuevo concepto de fibra dietética elaborado por la *American Association of Cereal Chemist (AACC)* (Dietary Fiber Definition Committee of the American Association of Cereal Chemist, 2001), que podría hacerse



sinónima de *fibra funcional*, definida como “la parte comestible de las plantas o hidratos de carbono análogos que son resistentes a la digestión y absorción en el intestino delgado, con fermentación completa o parcial en el intestino grueso. La fibra funcional engloba polisacáridos, oligosacáridos, lignina y sustancias asociadas a la planta. Las fibras dietéticas promueven efectos beneficiosos fisiológicos como el laxante, y/o atenúa los niveles de colesterol en sangre y/o atenúa la glucosa en sangre”. Este concepto resalta nuevos aspectos, como incluir en la definición la resistencia de la fibra a la digestión y su capacidad de fermentación en menor o mayor grado en el intestino grueso y destacar los efectos fisiológicos de la fibra, diferenciando además que los beneficios de su consumo van a depender del tipo de fibra. Así, la American Dietetic Association (Marletty *y cols.* 2002) propone que el consumo de fibra insoluble es útil para el estreñimiento o la prevención de la diverticulosis, mientras que el de fibra soluble es especialmente beneficioso para la prevención de la obesidad, la enfermedad cardiovascular y la DM2.

## 2.2. CLASIFICACIÓN DE LA FIBRA DIETÉTICA

Las fibras se pueden diferenciar atendiendo a las distintas características que las definen y que han ido ampliando su concepto. En este sentido, se podrían clasificar en función de su composición química, su localización en la planta o sus propiedades fisicoquímicas.

Una primera clasificación de los productos catalogados como fibra dietética puede hacerse atendiendo a la composición química. Numerosos compuestos, clasificados como fibra dietética se encuentran presentes, en distintos alimentos integrantes de la dieta humana habitual. En este sentido la *AACC* agrupa a estos tipos de fibra en polisacáridos, oligosacáridos, análogos de los hidratos de carbono y derivados no hidrocarbonados (Tabla 5).

**Tabla 5.** Compuestos considerados "fibra dietética", según la definición de la *American Association of Cereal Chemists*.

<b>Polisacáridos</b>	<b>Oligosacáridos</b>	<b>Análogos de HC</b>	<b>Derivados no HC</b>
<b>Celulosa</b>	<b>Inulina</b>	<b>Dextrinas no digeribles</b>	<b>Lignina</b>
<b>Hemicelulosa</b>	<b>Fructooligosacáridos</b>	<b>Maltodextrinas resistentes</b>	<b>Ceras</b>
<b>Pectinas</b>	<b>Galactooligosacáridos</b>	<b>Polidextrosa</b>	<b>Fitatos</b>
<b>Gomas</b>		<b>Metilcelulosa</b>	<b>Cutinas y suberinas</b>
<b>Mucílagos</b>		<b>Hidroxipropilmetilcelulosa</b>	<b>Compuestos polifenólicos (taninos)</b>
<b>Polifructosas</b>		<b>HC sintéticos</b>	

Sin embargo, en general se emplean otros criterios para clasificar las fibras, destacando los que atienden a dos de sus propiedades más importantes, y en las que residen gran parte de sus beneficios fisiológicos: su comportamiento con el agua ó solubilidad y su capacidad de fermentabilidad.

a) Clasificación de las fibras en función de la solubilidad

Atendiendo a este criterio, se habla de fibras solubles y fibras insolubles. Al entrar en contacto con el agua las fibras solubles forman un retículo donde ésta queda atrapada, originando geles de consistencia viscosa. Son fibras con elevada capacidad para retener agua. Dentro de este grupo destacan: las pectinas, algunas hemicelulosa, las gomas y mucílagos, polisacáridos procedentes de las algas, metilcelulosa, entre otras. La capacidad gelificante de estas fibras es la responsable de muchos de los efectos fisiológicos que presentan, como la disminución de la glucemia posprandial ó la atenuación de los niveles plasmáticos de colesterol.

Las fibras insolubles, se caracterizan por su escasa capacidad para formar geles de consistencia viscosa. En contacto con el agua, las fibras insolubles, como las celulosa, diversas hemicelulosas y la lignina, pueden retener agua, aunque esta capacidad es siempre menor que la que presentan las solubles. Poseen un efecto más marcado en la regulación intestinal, con reducción del tiempo de tránsito digestivo y aumento del peso de las heces.

### b) Clasificación en función de la fermentabilidad

La fermentabilidad es probablemente la propiedad más importante de un gran número de fibras y permite explicar múltiples efectos biológicos tanto locales como sistémicos, que se derivan de su ingesta.

La fibra dietética llega al intestino grueso de forma inalterada y, una vez allí, las bacterias del colón (mayoritariamente *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*), con sus numerosas enzimas de gran actividad metabólica, pueden digerirla en mayor o menor medida, dependiendo de su estructura química. Los principales productos de fermentación de la fibra son acetato, propionato y butirato, en una proporción molar casi constante (60:25:15). Se puede calcular por ejemplo que 64,5 moles de glúcidos fermentados producen 48 moles de acetato, 11 moles de propionato y 5 moles de butirato (Sastre y cols., 2003; García Peris y cols., 2002).

Una vez absorbidos, los AGCC (especialmente el butirato) son metabolizados por el epitelio colónico y constituyen su mayor sustrato energético. Aproximadamente el 90% del butirato y el 50% del propionato son metabolizados por la mucosa colónica. El remanente del propionato y el acetato alcanzan el hígado a través del sistema porta. El propionato es metabolizado en el hígado, actuando como molécula precursora en los procesos de gluconeogénesis y lipogénesis. Una parte del acetato puede ser metabolizado en los tejidos periféricos, esencialmente en el músculo, para obtener energía. Atendiendo al criterio de fermentabilidad, las fibras se pueden clasificar en:

1. Fibras no fermentables (<10%). Entre éstas, destacan fibras insolubles como la lignina y algunas fibras solubles como la carragenina, la metilcelulosa y la carboximetilcelulosa.

2. Fibras parcialmente fermentables (10-70%), entre las destacan las fibras insolubles ricas en celulosa. También se pueden incluir en este grupo algunas fibras solubles como el agar.

3. Fibras fermentables (presentan una capacidad de fermentación superior al 70%). Dentro de este grupo se incluyen fibras solubles ricas en hemicelulosas (goma guar, glucomanano) o ricas en ácidos glucurónicos (pectinas o algunas gomas) y los fructooligosacáridos.

## 2.3. EFECTOS BENEFICIOSOS DE LA FIBRA DIETÉTICA

Las primeras aportaciones sobre el papel beneficioso de la fibra dietética en la salud humana surgieron a raíz de unas investigaciones llevadas a cabo en el este de África hace más de 30 años por Trowell. Éste realizó unas observaciones, confirmadas más tarde por Burkitt, que sugerían que una alimentación rica en fibra e hidratos de carbono no refinados protegía frente a numerosas patologías propias de los países occidentales como la enfermedad cardiovascular, la diabetes mellitus, el cáncer de colón, la obesidad, la hipercolesterolemia y el estreñimiento (Trowell *y cols.*, 1972(a); Trowell *y cols.*, 1972(b); Burkitt *y cols.*, 1975).

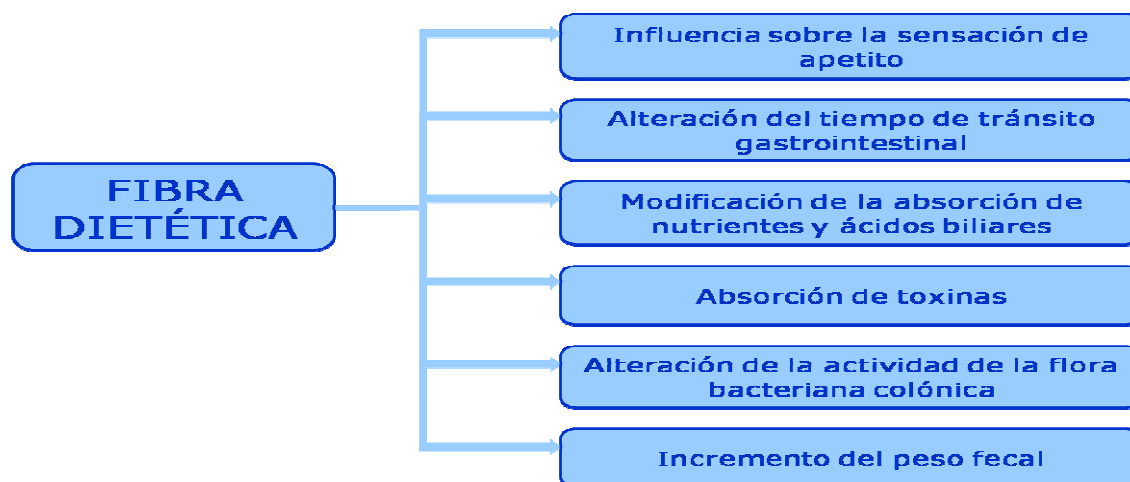
Desde entonces, numerosos estudios han intentado evaluar la importancia del consumo de la fibra dietética para nuestra salud y, en muchos casos, los resultados obtenidos han sido contradictorios (Roediger *y cols.*, 1980; Pitcher *y cols.*, 1996; Harris *y cols.*, 1999). Las causas que contribuyen a esta posible controversia podrían no estar originadas en la misma fibra, sino en la heterogeneidad de las fibras dietéticas estudiadas, en la variabilidad de las dosis utilizadas y en la duración de los períodos de consumo. En este mismo sentido, a pesar del amplio convencimiento sobre el beneficio para la salud que supone el consumo de fibra dietética, los datos provenientes de ensayos randomizados, a doble ciego y controlados, no han existido hasta hace muy poco tiempo (James *y cols.*, 2003).

A pesar de las evidencias acumuladas a favor del consumo de fibra, las recomendaciones actuales sobre el tipo de fibra que se debe consumir y su cantidad óptima están aún por definir. La ingestión de una cantidad elevada de fibra (< 25-30 g/día), a partir de diferentes fuentes alimentarias (frutas, verduras, legumbres y cereales) parece ser la mejor manera de prevenir muchas de las enfermedades anteriormente citadas.

Muy probablemente, la fibra dietética no sea la panacea para prevenir las enfermedades mencionadas en los estudios epidemiológicos. Probablemente se trate de un nutriente funcional con efectos saludables en un buen número de situaciones patológicas, o tal vez sea, simplemente, un marcador de hábito dietético y estilo de vida más saludable y, por tanto, protector frente a diversas enfermedades.

El predominio e intensidad de los efectos de la fibra dietética va a depender tanto del tipo y la cantidad de fibra, como de la persona que la ingiere. El grado en que cada tipo de fibra ejerce sus efectos fisiológicos depende de una acción conjunta y compleja debido a sus propiedades estructurales, químicas y físicas (Blackwood *y cols.*, 2000).

Entre los efectos fisiológicos que se han asociado al consumo de fibra dietética destacan, el incremento del peso fecal, la regulación del tránsito intestinal, alteración de la actividad de la flora bacteriana colónica, influencia sobre la sensación de apetito, absorción de tóxicos y modificación de la absorción de grasas, azúcares, minerales y ácidos biliares (Chaplin *y cols.*, 2003).



**Figura 7.** Efectos fisiológicos asociados al consumo de fibra dietética (Chaplin *y cols.*, 2003).

Debido a estos efectos fisiológicos que presenta el consumo de fibra se utiliza como agente terapéutico en diversas enfermedades ó alteraciones funcionales:

- **Estreñimiento:** La fibra dietética alivia el estreñimiento debido a su capacidad para regular la velocidad de tránsito intestinal. Tanto el aumento del residuo indigerible que provoca la fibra insoluble, como la retención de agua y el aumento de la masa bacteriana que provoca la fibra soluble, suponen un aumento de la masa fecal y por tanto un aumento del peristaltismo y velocidad de tránsito intestinal (Cummings *y cols.*, 2004).

- **Enfermedad inflamatoria intestinal:** La fibra soluble representa un sustrato altamente fermentable por la flora bacteriana colónica. Dicha fermentación provoca la liberación AGCC que actúan como sustrato nutritivo tanto para las células de la mucosa colónica como para la misma flora intestinal saprófita. Por este mecanismo se piensa que puede ser útil para la prevención de la enfermedad inflamatoria intestinal (Roeddiger y cols., 1980). Además, los AGCC son capaces de inhibir la producción de citoquinas inflamatorias, como el TNF- $\alpha$ , tanto en líneas celulares, como en ensayos *in vivo* (Kvale y cols., 1995; Limb y cols., 1997).
- **Diverticulosis:** En cuanto a la enfermedad diverticular, ya en la década de los años 70, Burkitt y cols. advirtieron de la relación inversa entre la ingesta de fibra y la diverticulosis (Burkitt y cols., 1975). Un interesante trabajo indica que el tipo de fibra insoluble más útil para la enfermedad diverticular era la procedente de las verduras y frutas y, en menor grado, la procedente de los cereales integrales (Aldoori y cols., 1998). La patogenia de este proceso tan prevalente se basa en que la fibra ayudaría a disminuir la presión intraluminal de colon, evitando la formación sacular a través de la pared intestinal.
- **Cáncer de colon:** La fibra dietética es uno de los factores más estudiados en la carcinogénesis colorrectal, aunque la naturaleza precisa y la magnitud de la relación entre la ingestión de fibra y el riesgo de cáncer colorrectal no ha sido suficientemente clarificada. Diferentes estudios ecológicos muestran un efecto protector elevado ó moderado atribuible a la fibra dietética o alimentos ricos en fibra (American Gastroenterology Association, 2000; Potter y cols., 1993; Hill y cols., 1998; Greenwald y cols., 1987) En cambio, en un estudio realizado a largo plazo (8 años) sí se ha descrito una relación negativa entre la fibra y la aparición de adenomas colorrectales diagnosticados endoscópicamente, especialmente la fibra procedente de las frutas, pero no así de la fibra procedente de los cereales, trigo, vegetales o vegetales crucíferos. Sólo la fibra soluble fue la que se relacionó con un menor riesgo de adenomas (Platz y cols., 1997).

### **2.3.1. EFECTOS DE LA FIBRA DIETÉTICA Y LAS ALTERACIONES INCLUIDAS EN EL SÍNDROME METABÓLICO**

De entre los numerosos efectos beneficiosos de la fibra dietética, destacan los que ejerce en el control de las distintas alteraciones funcionales y metabólicas agrupadas dentro del síndrome metabólico.

#### **2.3.1.1. FIBRA DIETÉTICA Y OBESIDAD**

Existen diversas evidencias epidemiológicas que ligan el consumo de fibra a la regulación del peso corporal. Así, la obesidad es muy poco frecuente en países en vías de desarrollo en los que se ingiere gran cantidad de fibra. En cambio, en los países desarrollados, en los que, la prevalencia de obesidad aumenta de manera alarmante, se tiende a ingerir cada vez menos hidratos de carbono complejos y fibra (Kromhout *y cols.*, 2001; Howarth *y cols.*, 2001). Por otra parte, la población vegetariana presenta una menor prevalencia de obesidad, lo que sugiere que la ingesta de fibra podría incidir en este hecho (Van Itallie *y cols.*, 1978).

Diversos estudios de intervención tratan de analizar el efecto de la suplementación o enriquecimiento de la alimentación con fibra sobre la regulación del peso corporal. En una revisión (Howarth *y cols.*, 2001) sobre este tipo de estudios se indica que la mayoría de las investigaciones al respecto muestran un descenso de la ingesta calórica en respuesta al consumo de suplementos de fibra (entre 6 y 40 g/día, dependiendo de los estudios), lo que se traduce en una reducción del peso corporal. En esta revisión se llega a la conclusión de que la ingesta de unos 12 g de fibra al día se asocia a una disminución del 10% de la energía ingerida y a una pérdida de peso de 1,9 Kg en 3,8 meses, siendo la pérdida de peso medio incluso superior en los pacientes que presentaban obesidad (18% de reducción de la ingesta calórica y 2,4 Kg de pérdida de peso).

Evidencias científicas establecen la existencia de un efecto de la fibra dietética sobre el hambre y la saciedad, basándose en mecanismos relacionados con varias hormonas intestinales. La fibra dietética puede alterar el patrón de secreción de dichas hormonas afectando concretamente al péptido glucagón-like-1 (GLP-1) ó a la colecistokinina (CCK). El GLP-1 actúa como un factor de saciedad y consecuentemente disminuye el peso corporal tanto en animales como en humanos (Orskov *y cols.*, 1989; Naslund *y cols.*, 1999; Meier *y cols.*, 2002; Zander *y cols.*, 2002). Esta hormona secretada en respuesta tanto a la glucosa y

a los lípidos, como a fibras fermentables y otros estímulos, ha mostrado una acción retardante del vaciado gástrico y una disminución del hambre promoviendo la pérdida de peso cuando se administra de forma exógena en humanos (Gutzwiller *y cols.*, 1999). La secreción de GLP-1 está reducida en individuos obesos (Ranganath *y cols.*, 1996; Naslund *y cols.*, 1998). En estudios con animales, la ingesta de fibra soluble promueve la secreción de GLP-1 (Gee *y cols.*, 1996; Reimer *y cols.*, 1996). Este péptido ha sido considerado como un agente antidiabético ya que estimula la secreción de insulina, inhibe la secreción de glucagón y retrasa el vaciamiento gástrico (Holst *y cols.*, 1997). La CCK también está implicada en la regulación del peso corporal y de la ingesta. Es secretada después de las comidas y regula la motilidad intestinal, la contracción vesicular, y la secreción de enzimas pancreáticas, ocasionando un retraso en el vaciamiento gástrico e induciendo saciedad central (Liddle *y cols.*, 1997). Algunos estudios han demostrado un incremento en la circulación de CCK tras la ingesta de alimentos ricos en fibra en relación con dietas energéticamente similares pero con bajo contenido en fibra (Holt *y cols.*, 1992; Bourdon *y cols.*, 1999).

Hace unos años se descubrió la grelina, una hormona producida principalmente por el estómago (Kojima y Kangawa, 2002) que también participa en la homeostasis energética. Es una hormona orexígena que estimula el apetito, e incrementa las concentraciones plasmáticas de insulina (Tsubone *y cols.*, 2005). Su administración periférica induce en ratas un incremento de la ingesta y del peso corporal. Diversos estudios muestran que los niveles circulantes de grelina son elevados en el ayuno y se reducen en respuesta a la alimentación (Asakawa *y cols.*, 2001). El consumo de fibra disminuye las concentraciones plasmáticas de grelina (García *y cols.*, 2007), posiblemente mediante su interacción con la somatostatina que aumenta en humanos después de una ingesta de fibra (Hagander *y cols.*, 1986). Se ha comprobado en ratas que la somatostatina suprime la secreción de grelina (Shimada *y cols.*, 2003) disminuyendo sus niveles circulantes en humanos (Norrelund *y cols.*, 2002). Varios autores han demostrado que el GLP-1, cuyos niveles aumenta con el consumo de fibra, puede reducir la secreción de grelina (Djurhuus *y cols.*, 2002; Lippl *y cols.*, 2004).

En definitiva, tanto estudios en modelos de animales de experimentación (Oku *y cols.*, 1982; Galisteo *y cols.*, 2005) como ensayos clínicos (Rigaud *y cols.*, 1990; Solum *y cols.*, 1987) ponen de manifiesto que el consumo de fibra dietética, sobre todo rica en fibra soluble, como psyllium, goma guar o glucomanano provocan la pérdida de peso corporal. Sin embargo distintos ensayos clínicos subrayan que la utilidad de administrar suplementos de fibra a largo plazo con el objetivo de inducir la pérdida de peso no está todavía clarificada (Pittler *y cols.*, 2001; 2004).



### 2.3.1.2. FIBRA DIETÉTICA Y RESISTENCIA A LA INSULINA

Distintos ensayos clínicos han demostrado que la fibra dietética soluble reduce los niveles de glucosa postprandial y mejora la sensibilidad a la insulina tanto en personas diabéticas como no diabéticas (Hanai *y cols.*, 1997; Anderson *y cols.*, 1999; Sierra *y cols.*, 2001; Sierra *y cols.*, 2002; Chandalia *y cols.*, 2000; Pastors *y cols.*, 1991). También se han descrito estos efectos en modelos experimentales (Wilson *y cols.*, 1984; De Leeuw *y cols.*, 2004). Estos efectos podrían estar relacionados con la capacidad de la fibra dietética soluble para aumentar la viscosidad del contenido del estómago, lo que impediría la absorción de hidratos de carbono y de macronutrientes (Lecrere *y cols.*, 1994), aunque también se ha comprobado que la ingesta de fibra favorece la captación de glucosa por el músculo esquelético. En un estudio en ratas con ictus genéticamente hipertensas, se observó que la ingesta de una dieta suplementada con fibra soluble de *P. ovata* prevenía la resistencia a la insulina, y este efecto estaba asociado a un incremento de los transportadores de glucosa sensibles a la insulina, GLUT-4, en la membrana plasmática del músculo esquelético a través de un mecanismo diferente al de la activación de PI3K (Song *y cols.* 2000). Una hipótesis que explicaría este hecho sugiere que AGCC, como el propionato y el butirato, resultantes de la fermentación anaeróbica colónica de la fibra soluble, incrementan en el músculo los transportadores GLUT-4, a través de la estimulación del receptor activador de la proliferación de peroxisomas (PPAR  $\gamma$ ) (Song *y cols.*, 2000; Park *y cols.*, 1998).

No obstante, el control de la glucemia y la disminución de la resistencia a la insulina no pueden ser atribuidos únicamente a la fibra soluble. Aunque las fibras insolubles son esencialmente no viscosas y afectan poco a la absorción de los nutrientes, muchos estudios epidemiológicos demuestran claramente que el consumo de fibra cereal insoluble mejora la sensibilidad a la insulina y disminuye las concentraciones plasmáticas de insulina (Ylonen *y cols.*, 2003; Pereira *y cols.*, 2002; Esposito *y cols.*, 2003). En el *Framingham Offspring Study* se ha demostrado que tanto el consumo de fibra de fruta como de cereales se relaciona inversamente con la resistencia a la insulina (McKeown *y cols.*, 2004). El mecanismo implicado en este efecto podría estar relacionado con el hecho de que el consumo de fibra de cereal, donde predomina la fracción insoluble, acelera la respuesta temprana de la insulina, efecto que se asocia con un incremento en la secreción de la hormona polipeptídica insulino-trópica dependiente de la glucosa (GIP), sin afectar los niveles de GLP-1. No obstante, los efectos de la fibra dietética en la respuesta postprandial de las incretinas GIP y GLP-1 no están totalmente esclarecidos. En este sentido, debemos resaltar que fibras solubles como los oligofruetosacáridos, presentan otros efectos sobre dichas hormonas, ya que incrementan

tanto la secreción de GIP como la concentración de GLP-1 (Cani *y cols.*, 2004; Kok *y cols.*, 1998; Cani *y cols.*, 2005).

### 2.3.1.3. FIBRA DIETÉTICA Y DISLIPIDEMIA

Distintos estudios en humanos muestran que la fibra dietética ejerce un efecto saludable sobre el metabolismo lipídico. Keys *y cols.*, en 1961, fueron los primeros en establecer que ciertas formas de fibra dietética pueden disminuir la colesterolemia en humanos (Keys *y cols.*, 1961). Con posterioridad, numerosos estudios clínicos y experimentales han puesto de manifiesto las propiedades hipocolesterolémicas de las principales fibras solubles (Gallaher *y cols.*, 2000; Galisteo *y cols.*, 2005; Anderson *y cols.*, 1999; Sierra *y cols.*, 2001; Fernández *y cols.*, 2001). En estos trabajos se demuestra que formas solubles de fibra como la pectina, la goma guar y los  $\beta$ -glucanos de la avena, disminuyen la colesterolemia tanto en sujetos sanos como en individuos con dislipemia. Por otro lado, fibras insolubles, como las del trigo o la celulosa, no presentan este efecto.

Brown *y cols.* 1999, evaluaron el efecto hipocolesterolemiante de las pectinas, psyllium, salvado de avena y goma guar de 67 estudios realizados sobre un total de 2.990 sujetos. Los resultados de este estudio conducen a la conclusión de que todas estas fibras son similarmente efectivas en la reducción plasmática del colesterol total y del colesterol LDL, mientras no se observaron cambios en el colesterol HDL plasmático ni en las concentraciones de triglicéridos.

En la práctica clínica, se han venido utilizando las dietas ricas en fibra dietética, así como los suplementos de fibra dietética, con el objetivo de disminuir la colesterolemia y así prevenir las enfermedades cardiovasculares. Las últimas recomendaciones del panel de expertos americanos sobre el control del colesterol (NCEP-III), sugieren la conveniencia de añadir a la dieta una cantidad variable de fibra soluble (10-25 g/día) y de fitoesteroles (2g/día) (Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults of the NCEP, 2001), como estrategia en prevención primaria o secundaria para retrasar el tratamiento farmacológico o evitar incrementar innecesariamente la dosificación de los fármacos hipolipemiantes.

Investigaciones en distintos modelos de experimentación animal han puesto de manifiesto una asociación inversa entre el efecto hipocolesterolemizante y el consumo de dietas con un alto contenido en fibras solubles como psyllium, pectinas, y goma guar (Fernández *y cols.*, 1995a, 1995b; Horton *y cols.*, 1994; Gallaher *y cols.*, 2000 Galisteo *y cols.*, 2005). Además, algunos de estos estudios también muestran una reducción en los niveles de triglicéridos plasmáticos.

Se han propuesto múltiples mecanismos en el efecto hipocolesterolemizante de la fibra dietética:

- La fibra dietética comporta una disminución en la absorción intestinal de ácidos biliares (Kritchevsky *y cols.*, 1974), pues dificulta su difusión hacia la superficie intestinal. Con ello incrementa la pérdida fecal de éstos ácidos y provoca un aumento de la síntesis hepática de novo a partir del colesterol intracelular (Everson *y cols.*, 1992; Marlett *y cols.*, 1994; Anderson *y cols.*, 1984; Kay *y cols.*, 1977; Jenkins *y cols.*, 1993). La fibra soluble facilita la pérdida de ácidos biliares interrumpiendo su circulación enterohepática (Trautwein *y cols.*, 1999) y, con ello, la tasa de absorción de los lípidos de la dieta. Como consecuencia, el aporte de colesterol y triglicéridos vehiculizados a través de los quilomicrones es menor y el pool hepático de colesterol libre para formar sales biliares disminuye (Fernández *y cols.*, 1995b). En la conversión hepática del colesterol en sales biliares participa la enzima colesterol-7- $\alpha$ -hidroxilasa. La fibra soluble y las resinas de intercambio iónico incrementan la actividad enzimática de la colesterol-7- $\alpha$ -hidroxilasa (Noshiro *y cols.*, 1990), contribuyendo aún más a disminuir las concentraciones intracelulares de colesterol libre.
- La fibra dietética provocaría una reducción en la estimulación insulínica de la lipogénesis hepática (Jenkins *y cols.*, 1993; Jones *y cols.*, 1993).
- La fermentación de la fibra dietética por la flora intestinal induciría una modificación en la producción de AGCC favoreciendo la reducción de acetato e incrementando el propionato, reduciendo la síntesis endógena de colesterol, ácidos grasos y las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (Thacker *y cols.*, 1981; Wolever *y cols.*, 1995; Wright *y cols.*, 1990; Cheng *y cols.*, 2000; Chen *y cols.*, 1984; Venter *y cols.*, 1989; Todesco *y cols.*, 1991; Illman *y cols.*, 1988).
- La fibra dietética provocaría la alteración de la síntesis lipoproteica post-prandial secundaria al retraso en la absorción lipídica (Jenkins *y cols.*, 1991; Spiller *y cols.*, 1999).

#### 2.3.1.4. FIBRA DIETÉTICA E HIPERTENSIÓN ARTERIAL

La hipertensión es otro de los componentes del síndrome metabólico y un importante factor de riesgo de cardiopatía isquémica, ictus e insuficiencia renal. Estudios observacionales han sugerido que la ingesta de fibra dietética está inversamente relacionada con la tensión arterial (Ascherio *y cols.*, 1996; Sacks *y cols.*, 1988). En un estudio experimental realizado en ratas, la administración de psyllium atenuó significativamente la hipertensión arterial inducida por NaCl en comparación al placebo ó a la administración de celulosa, probablemente debido a un aumento de la excreción fecal de sodio (Obata *y cols.*, 1998). Algunos estudios controlados y randomizados han identificado un efecto hipotensor de la fibra dietética (Kelsay *y cols.*, 1978; Brussaard *y cols.*, 1981; Onning *y cols.*, 1999; Saltzman *y cols.*, 2001). Sin embargo, muchos de los ensayos clínicos realizados para estudiar la eficacia de la ingesta de fibra dietética en disminuir la tensión arterial se han realizado a partir de muestras de reducido tamaño, que no proporcionan un poder estadístico suficiente para detectar una modesta, pero potencialmente importante, reducción de la tensión arterial.

Recientemente se ha publicado un meta-análisis a partir de 25 ensayos clínicos controlados y randomizados, evaluando el efecto de la ingesta de fibra dietética sobre la presión arterial de una población de 1.477 pacientes con un amplio rango de características étnicas y geográficas. En dicho estudio, la ingesta de fibra dietética se asocia con una reducción significativa de -1,65 mmHg en la presión arterial diastólica y con una reducción no significativa de -1,15 mmHg en la presión arterial sistólica. Únicamente se identificó una reducción significativa de la presión arterial sistólica y diastólica en los 5 ensayos realizados exclusivamente sobre pacientes hipertensos. En dicho meta-análisis se muestra una evidencia de reducción de la tensión arterial en los ensayos realizados sobre pacientes normotensos. Finalmente, no se estableció una relación dosis-respuesta entre el incremento de la ingesta de fibra dietética y la reducción de la tensión arterial (Whelton *y cols.*, 2005). Se han propuesto diversos mecanismos a través de los que la fibra dietética podría influir sobre la tensión arterial. Las fibras hidrosolubles ejercen una reducción de la resistencia a la insulina y de los niveles de insulina, tanto en pacientes diabéticos como en personas sanas (Anderson *y cols.*, 1991; Fukagawa *y cols.*, 1990). La resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia compensadora concomitante han sido definidas como el mecanismo patogénico más importante en el desarrollo de la hipertensión (Ferrannini *y cols.*, 1987).

Por otra parte, la suplementación de la dieta con fibra dietética ha dado lugar, en algunos estudios a una reducción del peso corporal (Rigaud *y cols.*, 1990; Solum *y cols.*, 1987; Rossner *y cols.*, 1987; Rytting *y cols.*, 1989), el cual, es un importante factor de riesgo de hipertensión arterial. De hecho, la práctica clínica demuestra que discretas pérdidas ponderales (5-10% del peso corporal) se acompañan de disminución en las cifras tensionales.

### 2.3.1.5. FIBRA DIETÉTICA Y ESTADO INFLAMATORIO

Existen numerosas aportaciones que relacionan el consumo de fibra dietética con las concentraciones plasmáticas de marcadores inflamatorios como la PCR y las citoquinas IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$ , parámetros que además se encuentran anormalmente elevados en el síndrome metabólico. Por otra parte, algunos estudios encuentran una asociación directa entre consumo de fibra dietética y niveles plasmáticos de adiponectina, una adipocitoquina antiinflamatoria.

Los resultados de dos estudios epidemiológicos del *National Health and Nutrition Examination* (NHANES) 1999-2000 que evalúan la relación entre fibra dietética y PCR, encuentran una asociación inversa entre el consumo de fibra y las concentraciones plasmáticas de este marcador inflamatorio (King *y cols.*, 2003; Ajani *y cols.*, 2004). Los resultados de otro estudio observacional confirman esta asociación inversa entre consumo de fibra total, fibra soluble y fibra insoluble y concentraciones de PCR (Ma *y cols.* 2006). Estos datos apoyan la hipótesis de que el consumo de altas cantidades de fibra dietética reduciría las concentraciones de este factor. Recientemente, un estudio en mujeres diabéticas (Qi *y cols.*, 2006) indica que, tras ajustar por edad, IMC y estilos de vida, el consumo de semillas de cereales enteras y de salvado se asocia con un descenso significativo de la PCR y el receptor 2 del TNF- $\alpha$ . Por otra parte, un estudio en pacientes con hipertensión, diabetes u obesidad, muestran que un incremento en el consumo de fibra dietética se tradujo en una reducción de la PCR plasmática, concluyendo que existía una asociación inversa entre el consumo de fibra y los marcadores inflamatorios, e incluso que esta relación era más intensa entre los pacientes que presentaban dos ó más componentes del síndrome metabólico (King *y cols.*, 2005).

Los resultados que relacionan el consumo de fibra y la adiponectina no están claros. En un ensayo randomizado a corto plazo realizado durante tres días en pacientes con sobrepeso u obesos, no se encontraron diferencias entre los niveles de adiponectina y el consumo de fibra insoluble (Weickert *y cols.*, 2006). En cambio, dos estudios transversales realizados respectivamente en hombres y mujeres diabéticos, mostraron que dietas con bajo índice glucémico y alto contenido en fibra de cereal estaban asociadas con un incremento en las concentraciones circulantes de adiponectina (Qi *y cols.*, 2005; 2006). Investigaciones en ratas Zucker obesas han demostrado que la ingesta de una dieta suplementada con cutículas de *P. ovata* durante 25 semanas reduce las concentraciones plasmáticas de TNF- $\alpha$  e incrementa los niveles circulantes de adiponectina (Galisteo *y cols.*, 2005). Es posible que las diferencias en los resultados obtenidos en los distintos estudios que han analizado la relación entre consumo de fibra y concentración de adiponectina se deban a la duración del período en el que se llevó a cabo el incremento en el consumo de fibra, ya que los ensayos en los que éste se realizó durante períodos largos de tiempo se observó un aumento en la concentración plasmática de adiponectina, mientras que cuando el incremento en el consumo de fibra tuvo lugar durante períodos cortos de tiempo no se apreció modificación en los niveles circulantes de esta adipocitoquina.



## *Objetivos*

---





En las últimas décadas la prevalencia del síndrome metabólico ha crecido de forma espectacular en todo el mundo, afectando no sólo a poblaciones de adultos y ancianos (Meigs *y cols.*, 2003; Ford *y cols.*, 2004), sino también a jóvenes y niños, experimentando un incremento paralelo a la presencia de obesidad y diabetes de tipo 2 (Cook *y cols.*, 2003; Weiss *y cols.*, 2004). Su elevada prevalencia unida al incremento del riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares y/o diabetes de tipo 2, hacen de este síndrome un importante problema de salud pública a nivel mundial que demanda una urgente intervención, tanto desde un punto de vista profiláctico como terapéutico.

La prevalencia del síndrome metabólico es diferente entre poblaciones debido a la influencia de numerosos factores como la raza, el sexo, la edad entre otros. De acuerdo con los criterios del ATP-III, la prevalencia media en EE.UU. se encuentra entre el 20-30% (Ford *y cols.*, 2002). También en España las dimensiones del problema son preocupantes, con unas estimaciones de su prevalencia que serían de aproximadamente un 25% según el informe del Spanish Insulin Resistance Study (Lorenzo *y cols.*, 2003), oscilando, de acuerdo con distintos estudios epidemiológicos, entre un 17% en Segovia (Martínez-Larrad *y cols.*, 2005), pasando por el 24,4% en Canarias (Álvarez León *y cols.*, 2003), y un 28,9% en Valencia (Ascaso *y cols.*, 2003). Las diferencias entre estos estudios pueden estar motivadas por la edad de los participantes, el IMC promedio de la muestra y la contribución porcentual de cada uno de los componentes al síndrome metabólico.

En la actualidad no se dispone en el mercado de fármacos que permitan de forma realmente eficaz el tratamiento de este síndrome. Aunque se habían depositado grandes esperanzas en el rimonobant, la Agencia Europea del Medicamento ha recomendado recientemente la "suspensión temporal" de su comercialización, ya que el tratamiento presenta algunos efectos secundarios graves, sobre todo de tipo psiquiátrico. El rimonabant se ha utilizado como adyuvante de la dieta y el ejercicio físico para el tratamiento de pacientes obesos (IMC > 30 kg/m<sup>2</sup>), o pacientes con sobrepeso (IMC > 27 kg/m<sup>2</sup>) con factores de riesgo asociados, tales como diabetes tipo 2 o dislipidemia. Se trata de un antagonista selectivo del receptor cannabinoide-1 (CB1) que inhibe los efectos farmacológicos de los agonistas cannabinoides tanto *in vitro* como *in vivo*. El sistema endocannabinoide es un sistema fisiológico presente en el cerebro y en tejidos periféricos, como el tejido adiposo, que afecta al balance energético, al metabolismo de la glucosa y los lípidos, y a la regulación del peso corporal. Concretamente, en las neuronas del sistema mesolímbico modula la ingesta de alimentos altamente apetecibles, como los ricos en azúcar o grasas.

Sin duda, el mejor tratamiento del síndrome metabólico consistiría en la modificación de los hábitos de vida, combinando el ejercicio físico moderado con una alimentación adecuada. Una posible contribución a dicha alimentación puede basarse en la inclusión de alimentos funcionales que aporten mejoras sustanciales a las alteraciones funcionales y metabólicas características de este síndrome. Este podría ser el caso de las fibras dietéticas, que, de forma general, han manifestado numerosas acciones beneficiosas para la salud, entre las que se encuentran interesantes efectos metabólicos.

En investigaciones previas, nuestro grupo puso de manifiesto que la ingesta de una dieta suplementada en un 3,5% con cutículas de *P. ovata* durante 25 semanas, prevenía o disminuía la aparición de hipertensión, dislipemia, obesidad e hiperinsulinemia en ratas Zucker obesas de 6 semanas en las que las alteraciones características del síndrome metabólico aún no se habían desarrollado en su totalidad (Galisteo *y cols.*, 2005). Por esta razón, el objetivo general de esta Tesis Doctoral ha sido evaluar la capacidad de esta fibra dietética administrada en la dieta, en la misma proporción empleada en nuestros estudios previos, para revertir las alteraciones metabólicas y funcionales plenamente desarrolladas en el modelo experimental de síndrome metabólico de ratas Zucker obesas adultas, y profundizar en los mecanismos responsables de sus posibles efectos. Para el desarrollo de este estudio y la consecución de este objetivo general, nos planteamos los siguientes, más concretos:

1. Analizar los efectos de la ingesta durante 10 semanas de dietas suplementadas al 3,5% con diferentes fibras dietéticas, concretamente celulosa microcristalina, metilcelulosa y cutículas de *P. ovata* (fibra insoluble, fibra soluble no fermentable y fibra soluble fermentable, respectivamente) en ratas Zucker obesas de 15 semanas de edad, en las que las alteraciones metabólicas y funcionales ya estaban plenamente instauradas, con objeto de analizar su posible capacidad para revertir dichas alteraciones.

2. Mediante la comparación de los efectos de las distintas dietas, profundizar en el mecanismo de acción por el que la ingesta de la dieta suplementada con cutículas de *P. ovata* durante 10 semanas puede ejercer sus efectos beneficiosos en ratas Zucker obesas de 15 semanas de edad, analizando al final del tratamiento vías de transcripción implicadas en el metabolismo sobre dos de los principales tejidos insulino-resistentes, como son el tejido adiposo visceral y el hígado.

## *Material y Métodos*

---



## 1. PREPARACIÓN DE LAS DIETAS Y REACTIVOS

La metilcelulosa y todos los reactivos fueron suministrados por la compañía Química Sigma (Madrid, España).

La celulosa microcristalina y las cutículas de *Plantago ovata* (*P. ovata*) (Plantabén), fueron proporcionadas por Madaus S.A. (Barcelona, España). Las dietas ensayadas fueron suplementadas con un 3,5 % de las distintas fibras dietéticas objeto de estudio. Las dietas suplementadas con celulosa y metilcelulosa fueron preparadas añadiendo 3,5g de estas fibras a 96,5 g de dieta estándar "Chow" pulverizada. Para la preparación de la dieta suplementada al 3,5 % en cutículas de *P. ovata* se utilizó Plantabén, que contiene un 70 % de esta fibra, por lo que la dieta se obtuvo añadiendo 5g de Plantabén a 95g de dieta estándar "Chow" pulverizada (Tabla 6).

## 2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

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

Las experiencias se han realizado con ratas Zucker macho obesas (*fa/fa*) y delgadas (*fa/-*) de 13 semanas de edad, suministradas por los laboratorios Charles River, Barcelona, España. Los animales se mantuvieron en el estabulario del laboratorio dos semanas antes de iniciar los experimentos, a una temperatura constante de  $22 \pm 2$  °C y con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas. Las ratas se alojaron en cubetas de makrolon, en grupos de 5 ratas por jaula y recibieron dieta y agua *ad libitum*.

Tabla 6. Composición de las dietas experimentales.

Composición química (%)	Dieta estándar <sup>a</sup>	Dieta suplementada celulosa	Dieta suplementada metilcelulosa	Dieta suplementada cutículas <i>P. ovata</i>
<b>Proteínas</b>	17,2	16,6	16,6	16,3
<b>Grasa</b>	2,7	2,6	2,6	2,6
<b>Carbohidratos</b>	59,7	57,6	57,6	56,7
<b>Fibra</b>	3,9	3,8	3,8	3,7
<b>Minerales<sup>b</sup></b>	4,5	4,3	4,3	4,3
<b>Agua</b>	12	11,6	11,6	11,4
<b>Plantabén<sup>c</sup></b>	0	0	0	5
<b>Celulosa</b>	0	3,5	0	0
<b>Metilcelulosa</b>	0	0	3,5	0
<b>Calorías (Kcal/100g)</b>	331,9	320,2	320,2	322,9

<sup>a</sup> La dieta estándar usada fue Panlab A04, suministrada por Panlab S. L (Barcelona, España). 1Kg de dieta contiene las siguientes vitaminas: Vitamina A, 15000 UI; Vitamina D<sub>3</sub>, 1500 UI; Vitamina E, 20 mg; Ácido pantoteico, 15 mg; Piridoxina, 4 mg; Biotina, 0,1 mg; Ácido fólico, 1 mg; Cianocobalamina, 20 mg; Choline, 500 mg.

<sup>b</sup> Minerales incluidos en la dieta (g/Kg): Calcio, 8,80; Fósforo, 5,9; Magnesio, 1,40; Sódio, 2,5; Cloruro, 3,1.

<sup>c</sup> El Plantabén contiene un 30% de excipientes (sacarina sódica, bicarbonato sódico, ácido tartárico amarillo, esencia de naranja, colorante naranja Pal super (E-110)) y un 70% de cutículas de *P. ovata*. El 60% del contenido total de Plantabén consiste en fibra soluble, conteniendo (%): ramnosa (0,98), arabinosa (24,42), xilosa (62,21), manosa (0,86), galactosa (4,46), glucosa (0,96), ácido úrico (6,42).

### 3. GRUPOS EXPERIMENTALES

En el diseño de este experimento usamos 10 ratas Zucker delgadas, como grupo blanco (control sano) y 40 ratas Zucker obesas que se distribuyeron aleatoriamente en otros 4 grupos experimentales, como se detalla a continuación:

**-GRUPO CONTROL-delgadas (LB) (n=10).** Ratas delgadas que fueron alimentadas con dieta estándar.

**-GRUPO CONTROL-obesas (OB) (n=10).** Ratas obesas que fueron alimentadas con una dieta estándar.

**-GRUPO CELULOSA-obesas (OC) (n=10).** Ratas obesas que fueron alimentadas con una dieta suplementada con celulosa microcristalina al 3,5%.

**-GRUPO METILCELULOSA-obesas (OM) (n=10).** Ratas obesas que fueron alimentadas con una dieta suplementada con metilcelulosa al 3,5%.

**-GRUPO PLANTABÉN-obesas (OP) (n=10).** Ratas obesas que fueron alimentadas con una dieta suplementada con cutículas de *P. ovata* al 3,5%.

El período experimental fue de 10 semanas, se inició cuando las ratas contaban con 15 semanas de edad, durante las cuales se realizó un seguimiento diario del consumo de comida y de bebida, también se determinó semanalmente la evolución del peso de cada animal.

### 4. MÉTODOS EXPERIMENTALES

#### 4.1. SACRIFICIO DE LOS ANIMALES Y RECOGIDA DE MUESTRAS

Al finalizar el período experimental, y antes del sacrificio los animales se mantuvieron en ayunas durante 24 h, con su correspondiente agua de bebida *ad libitum* y posteriormente se obtuvo sangre de la vena de la cola. Mediante centrifugación a 4000 r.p.m. 10 minutos se obtuvo el plasma, que fue alicuotado y congelado a -80°C. En el momento del sacrificio, las ratas fueron anestesiadas por vía intraperitoneal con una dosis de 2,5 ml/kg de equitesina. Se



realizó una incisión en el abdomen hasta visualizar la arteria aorta descendente donde se procedió a la extracción de sangre, utilizando una jeringa previamente heparinizada. Posteriormente, se obtuvo el plasma mediante centrifugación de la sangre a 4000 r.p.m durante 10 minutos. El plasma obtenido fue alicuotado y congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis para la determinación de distintos parámetros.

A continuación, se procedió, rápidamente, a la extracción de tejido adiposo visceral (TAV), tejido adiposo epididimal, riñón, corazón, e hígado para el estudio de los cambios ponderales de dichos órganos, mediante el análisis de la relación del peso del órgano y peso corporal del animal. Los órganos fueron lavados con solución de buffer fosfato salino (PBS) (composición: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). Después fueron secados y pesados, para el estudio de sus cambios morfológicos, mediante el análisis de la relación del peso del órgano y peso corporal del animal, calculado dividiendo el peso del órgano entre el peso corporal del animal en el momento de la muerte. Finalmente, los órganos fueron divididos en varios fragmentos destinados a distintas determinaciones bioquímicas, congelados en nitrógeno líquido y mantenidos a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

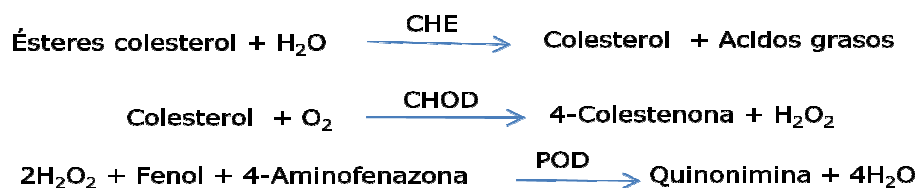
## 4.2. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS PLASMÁTICOS

### 4.2.1. LÍPIDOS PLASMÁTICOS

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

#### 4.2.1.a. COLESTEROL PLASMÁTICO.

Determinación cuantitativa de colesterol: Principio del método: El colesterol presente en la muestra origina un compuesto coloreado según la reacción siguiente:



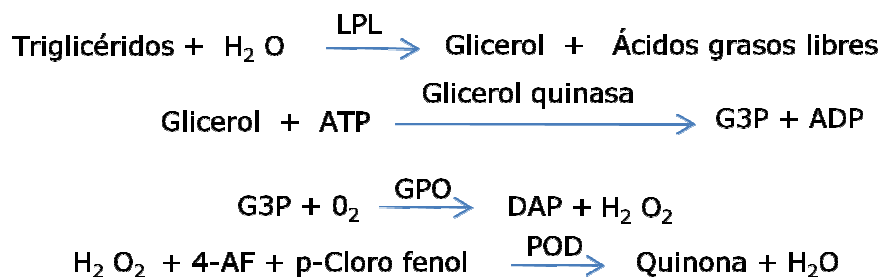
Reactivos:

- CHE: Colesterol esterasa
- CHOD: Colesterol oxidasa
- POD: Peroxidasa

La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra ensayada.

#### 4.2.1.b. TRIGLICÉRIDOS PLASMÁTICOS.

Determinación cuantitativa de triglicéridos: Los triglicéridos incubados con lipoproteínas (LPL) liberan glicerol y ácidos grasos libres. El glicerol es fosforilado por glicerolfosfato deshidrogenasa (GPO) y ATP en presencia de glicerol quinasa (GK) para producir glicerol-3-fosfato (G3P) y adenosina-5-difosfato (ADP). El G3P es entonces convertido a dihidroxiacetona fosfato (DAP) y peróxido de hidrógeno H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por GPO. Al final, el peróxido de hidrogeno H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reacciona con 4-aminofenazona (4-AF) y p-clorofenol, reacción catalizada por la peroxidasa (POD) dando una coloración roja:



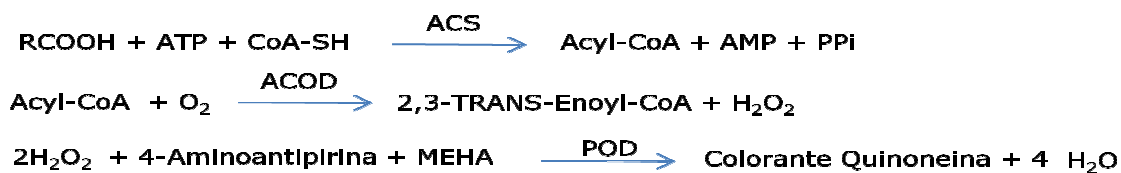
Reactivos:

- LPL: Lipoprotein lipasa
- GPO: Glicerol-3-oxidasa
- POD: Peroxidasa
- 4-AF: 4-Aminophenazone

La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de triglicéridos presentes en la muestra ensayada.

#### 4.2.1.c. ÁCIDOS GRASOS LIBRES PLASMÁTICOS.

Determinación cuantitativa de AGL:



Reactivos:

-ACS: Acetil-CoA-Sintetasa

-ACOD: Acyl- CoA-Oxido

-POD: Peróxido

La intensidad del pigmento rojo es proporcional a la concentración de AGL de la muestra. El ácido ascórbico se elimina de la muestra mediante el óxido de ascorbato.

#### 4.2.2. PARÁMETROS PLASMÁTICOS RELACIONADOS CON LA RESISTENCIA A LA INSULINA

Para evaluar el grado de resistencia a la insulina en nuestro estudio determinamos la concentración plasmática de glucosa e insulina en ayunas, y determinamos el índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR).

##### 4.2.2.a. GLUCOSA

Las concentraciones plasmáticas de glucosa fueron medidas por técnicas colorimétricas usando un kit Spinreact (Spinreact, S.A., España).

Determinación cuantitativa de glucosa: Principio del método: La glucosa oxidasa (GOD) cataliza la oxidación de glucosa a ácido glucónico. El peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), producido se detecta mediante un aceptor cromogénico de oxígeno, fenol-ampirona en presencia de peroxidasa (POD):



Reactivos:

-GOD: Glucosa oxidasa

-POD: Peroxidasa

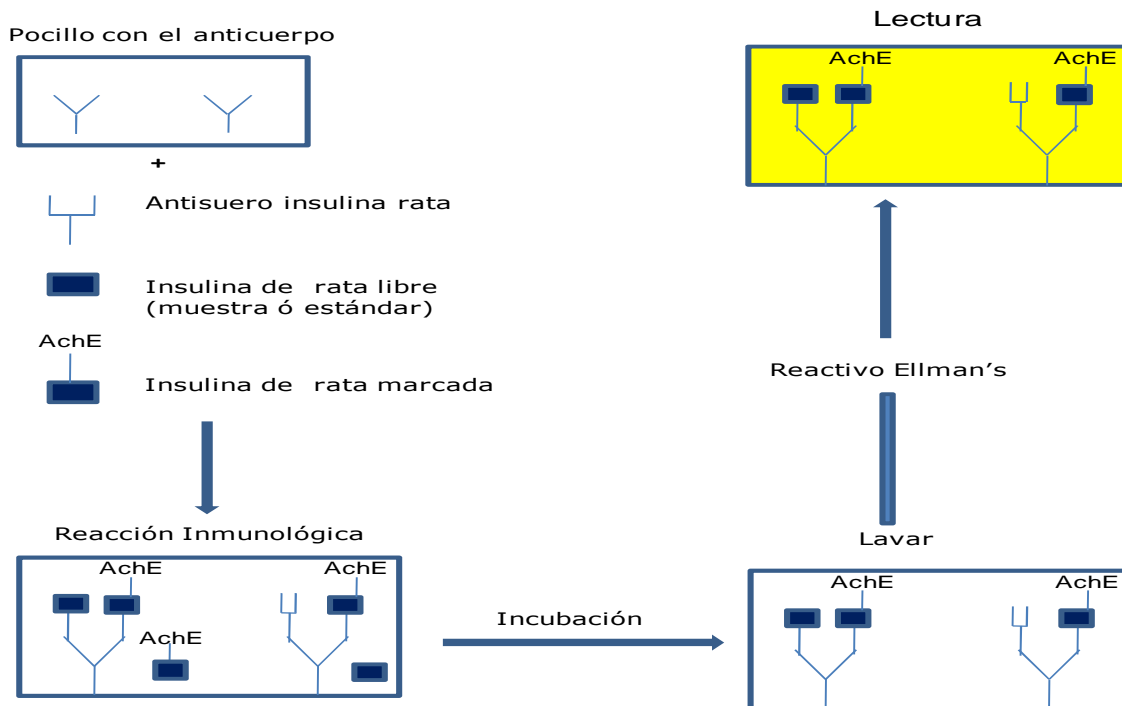
-4-AF: 4-Aminofenazona

La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra ensayada.

#### 4.2.2.b. INSULINA

Las concentraciones plasmáticas de insulina fueron cuantificadas mediante el uso de un kit de ELISA, (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). Los resultados se expresan como ng/ml.

Principio del método: La técnica de ELISA es un procedimiento de ensayo inmunoenzimático. De un modo general se procede a la fijación de uno de los componentes de la reacción inmunológica (antígeno o anticuerpo) a un soporte sólido, poniendo luego ese sistema en contacto con una fase fluida que contiene el reactivo complementario. El complejo inmunológico formado es enfrentado luego a las moléculas capaces de reconocer a sus componentes más superficiales, marcadas con una enzima; agregándose posteriormente un sustrato cromogénico de la enzima marcadora. La existencia de una reacción inmunológica se demuestra y se cuantifica midiendo espectrofotométricamente la cantidad de producto enzimático resultante.



**Figura 8.** Principio del ensayo de determinación de insulina en plasma por ELISA, basado en la competición entre la insulina no marcada de la muestra y una cantidad fija de insulina marcada, por una cantidad limitada de anticuerpo específico. Así la intensidad de color producida es inversamente proporcional a la cantidad de insulina (no marcada) de la muestra.

#### 4.2.2.c. INDICE DE RESISTENCIA A LA INSULINA HOMA (HOMA-IR)

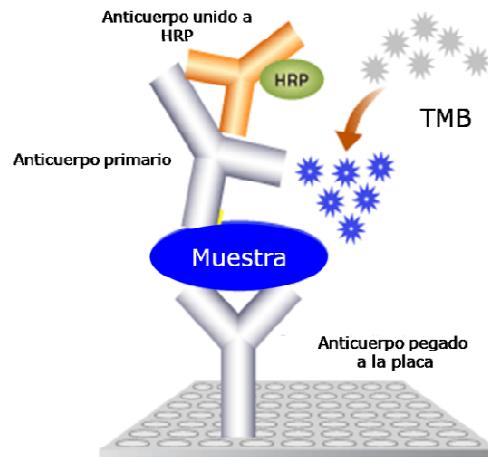
El HOMA (*Homeostasis Model Assessment*) es un modelo matemático que permite realizar estimaciones de resistencia insulínica y función de las células beta mediante las concentraciones de la glucosa y la insulina plasmáticas en ayunas (Matthews y cols. 1985). Este índice de resistencia a la insulina se calcula utilizando la fórmula siguiente:

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

Donde la insulina se expresa en  $\mu\text{U/ml}$  y la glucosa en  $\text{mmol/L}$ . De acuerdo con este modelo matemático, un elevado valor de HOMA-IR es indicativo de una baja sensibilidad a la insulina.

### 4.2.3. LEPTINA

La leptina plasmática fue determinada mediante un kit de enzimoimmunoensayo (Assay Designs, Inc., Ann Arbor, MI, USA). Los resultados se expresan como ng/ml.



**Figura 9.** Principio del ensayo de determinación del ensayo de leptina en plasma por ELISA, donde la placa está recubierta por el anticuerpo donde adicionamos la muestra y el estándar. Incubamos durante un período de tiempo determinado y se le añade un marcador enzimático, incubamos un determinado tiempo y una vez transcurrido lavamos la placa y adicionamos un sustrato enzimático y un cromógeno, que permitirá una reacción de color, la cual cuantificamos.

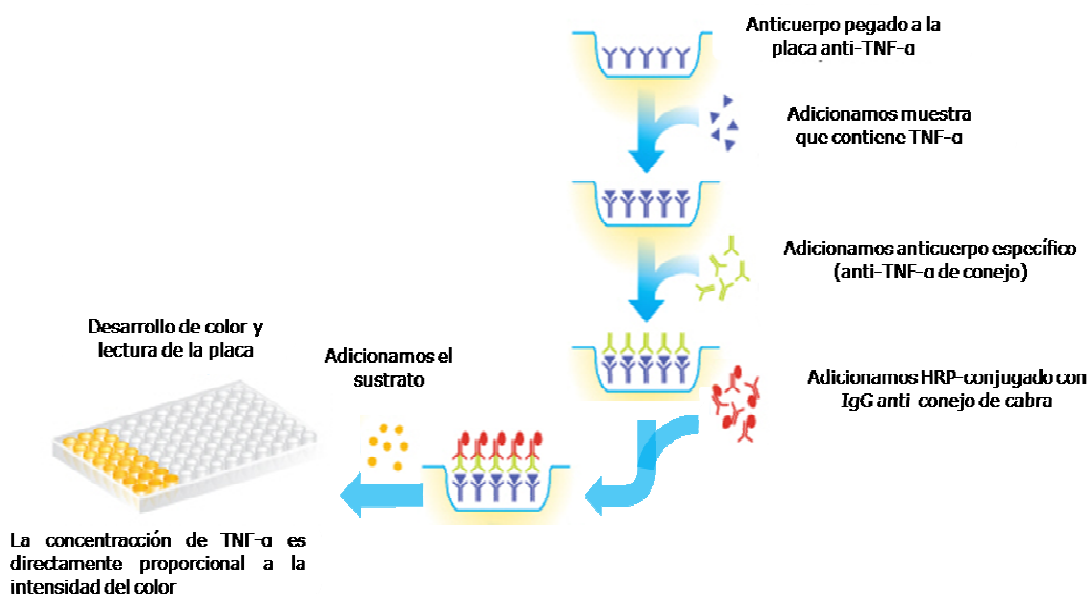
## 4.3. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS TISULARES

### 4.3.1. PRODUCCIÓN DE TNF- $\alpha$ POR EL TEJIDO ADIPOSO VISCERAL

#### Preparación de la muestra:

El TAV obtenido de cada rata fue homogenizado en PBS 1X en proporción 1:1 (p/v), usando un homogenizador Heidolph polytron. El homogenado fue incubado a 37°C durante 20 min en agitación y centrifugado a 15.000 g durante 15 min a 4°C, finalmente se recogió el sobrenadante.

La concentración de TNF- $\alpha$  en el sobrenadante del TAV se determinó mediante Kit de ELISA TNF- $\alpha$  (Diacclone, Inc., Besancon, France).



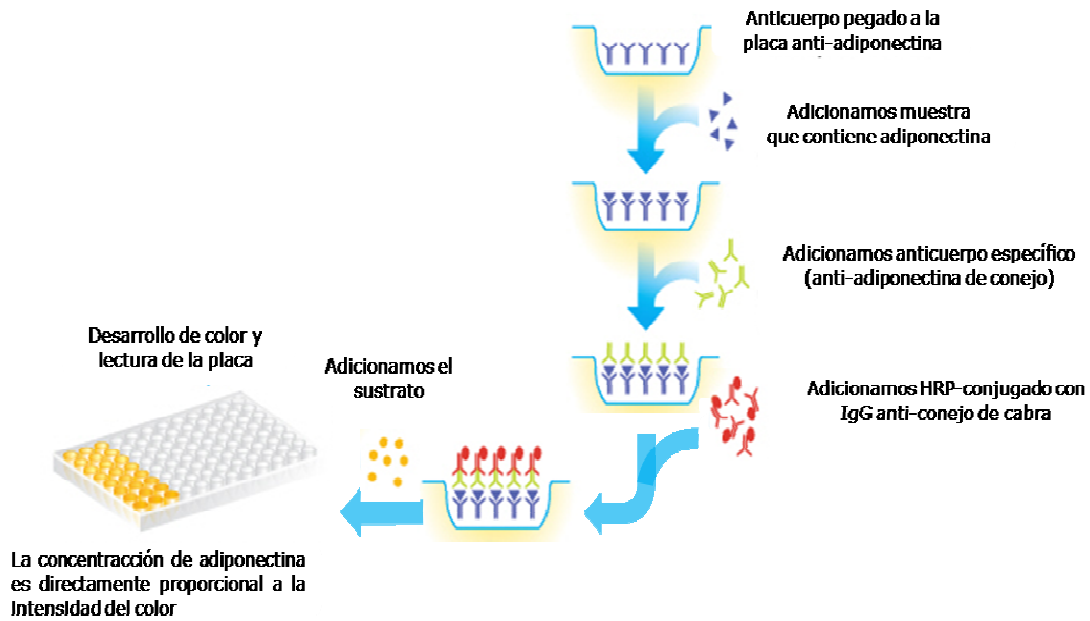
**Figura 10.** Principio del ensayo de determinación de TNF- $\alpha$  en tejido adiposo.

#### 4.3.2. PRODUCCIÓN DE ADIPONECTINA POR EL TEJIDO ADIPOSO VISCERAL

##### Preparación de la muestra:

El TAV obtenido de cada rata fue homogenizado en PBS 1X, usando un homogenizador Heidolph polytron. Los homogenados se centrifugaron a 15.000 g durante 15 min a 4°C, finalmente se recogió el sobrenadante.

La concentración de Adiponectina en el sobrenadante del TAV se determinó mediante Kit de ELISA Adiponectina (B-Bridge International, Inc., CA, USA).



**Figura 11.** Principio del ensayo de determinación de adiponectina en tejido adiposo.

### 4.3.3. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO LIPÍDICO EN HÍGADO

La extracción de lípidos totales se llevó a cabo mediante el método de Bligh y Dyer (Bligh *y cols.*, 1959).

#### Preparación de la muestra:

Cortamos 1,25 g de tejido hepático, que homogenizamos con 3,75 ml de la mezcla cloroformo-metanol (1:2). El homogenado fue agitado vigorosamente en un vortex durante 15 minutos y posteriormente añadimos 1,25 ml de cloroformo y 1,25 ml de agua destilada, centrifugamos a 3000 r.p.m. para separar las fases. La fase inferior fue transferida a otro ependorff, mientras que, a la fase superior se volvió a lavar con 1,88 ml de cloroformo, agitamos y centrifugamos de nuevo a 3000 r.p.m. De nuevo recogimos la fase inferior y la transferimos al ependorff anterior que contenía la fase inferior de la primera extracción. Evaporamos con nitrógeno gas a 55°C y el extracto lipídico fue disuelto en 2 ml de 2-propanol. La determinación cuantitativa de triglicéridos y colesterol fue realizada mediante



métodos colorimétricos descritos anteriormente en los parámetros plasmáticos (apartado 3.B.1.1 y 3.B.1.2).

### 4.3.4. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS EN TEJIDOS

La cuantificación de las proteínas en muestras homogeneizadas de los distintos tejidos se realizó mediante la técnica del ácido bicinónico (D8284-5G sigma-aldrich). Cuando la sal disódica de este ácido reacciona con las proteínas de un tejido, forma un complejo con iones  $\text{Cu}^{+2}$  de color púrpura intenso cuya absorbancia puede medirse espectrofotométricamente a 540nm.

#### Reactivos:

-A) Solución de ácido bicinónico en medio alcalino (pH=11,25):

- Ácido bicinónico 25  $\mu\text{M}$
- $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,16 M
- Tartrato sódico 5,7  $\mu\text{M}$
- NaOH 0,1 M
- $\text{NaHCO}_3$  0,1 M

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

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

Principio de la técnica: Se procede mezclando los reactivos A+B en proporción 50:1 (v/v) respectivamente. En una placa de ELISA se cargan 5  $\mu\text{l}$  de cada muestra o curva patrón, a los que se le añaden 200  $\mu\text{l}$  de la mezcla A+B y se incuba la placa a 37°C durante 30 min hasta que se desarrolle el color púrpura. Posteriormente se procede a su determinación espectrofotométrica a 540nm. La cantidad de proteína se obtiene por interpolación de los valores de las muestras en la curva patrón.

### 4.3.5. EXPRESIÓN PROTEICA DE LOS RECEPTORES DE ADIPONECTINA POR WESTERN BLOT EN TEJIDOS

#### Preparación de las muestras:

La determinación se realizó en tejido adiposo visceral e hígado que se homogenizaron, en una proporción 1:1 (p/v) en el tejido adiposo y 1:10 (p/v) en el hígado, con un homogenizador Heidolph en frío. Los homogenados se centrifugaron a 10.000 r.p.m. durante 5 minutos a 4°C y se recogió el precipitado al cual le adicionamos 100 µl del tampón de homogenización, centrifugamos a 13.000 r.p.m. durante 20 min a 4°C y recogimos el sobrenadante. La concentración de proteínas en el sobrenadante fue determinada por el método del ácido bicinchonínico.

#### Reactivos:

##### 1. Tampón de homogenización en los distintos tejidos:

Las muestras se homogenizaron en tampón RIPA modificado:

- 50 mM Tris-HCl
- 1 mM EDTA       $\Longrightarrow$       pH 6,8
- 1% Triton x-100
- 0,2% deoxicolato sódico
- 0,2% SDS
- 1 mM PSMF
- 5 µg/ml leupeptina
- 5 µg/ml aprotinina

##### 2. Tampón de carga:

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

## Material y métodos

---

### 3. Tampón de lavado (TBS-T):

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

### 4. Tampón de bloqueo: Solución de leche desnatada en polvo al 5% en TBS-T. En ésta se disolvieron los siguientes anticuerpos (1:200):

- Anticuerpo policlonal de conejo anti-adipoR1 (Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Belmont, CA, USA).
- Anticuerpo policlonal de conejo anti-adipoR2 (Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Belmont, CA, USA).

### Principio de la técnica:

Cantidades equivalentes de proteína (10 µg) de cada muestra para el tejido adiposo visceral y 20 µg de cada muestra para el hígado fueron suspendidas en tampón de carga y desnaturalizadas mediante ebullición durante 5 minutos. Posteriormente fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10 %. Tras su separación, las proteínas fueron transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF, previamente activada con metanol) a voltaje constante de 35 mV toda la noche a 4°C. A continuación las membranas se incubaron en tampón de bloqueo durante 2 horas a temperatura ambiente. Seguidamente se lavaron con tampón TBS-T 3 veces cambiando dicha solución cada 5 minutos y después se incubaron con el anticuerpo primario anti-adipoR1 y anti-adipoR2 (1/200) por un período de 2 horas a temperatura ambiente. Se lavaron de nuevo 3 veces durante 5 minutos en TBS-T y se incubaron con anticuerpo secundario de cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa, dilución 1/2000 (SantaCruz Biotechnology, Santa Cruz, EE.UU) en TBS-T con leche en polvo desnatada al 5% durante otras 2 horas a temperatura ambiente. Tras lavar de nuevo las membranas 3 veces durante 5 minutos en TBS-T, la unión al anticuerpo se detectó mediante una incubación con ECL (PerkinElmer Life Sciences, Boston) de 1 minuto y se expusieron a una película autoradiográfica para detectar la quimioluminiscencia.

#### 4.3.6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD AMPK EN TEJIDOS

##### Preparación de las muestras:

La determinación se realizó en hígado y TAV.

##### **Hígado:**

El hígado se homogenizó en tampón específico, en una proporción 1:20 (p/v) con un homogenizador Heidolph, en frío. Los homogenados de hígado se centrifugaron a 8.000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C y se tomó el sobrenadante.

##### **Tejido adiposo visceral:**

Los homogenados de TAV se obtuvieron por homogenización en otro tampón específico para dicho tejido en una proporción de 1:1 (p/v) manteniendo las mismas condiciones descritas anteriormente. Los homogenados se centrifugaron a 15.000 r.p.m. durante 30 min a 4°C y se tomó el sobrenadante.

La concentración de proteínas en todos los sobrenadantes obtenidos fue determinada por el método del ácido bicinchonínico.

##### Reactivos:

##### 1. Tampón de homogenización de hígado:

- Tris-Hcl 20 mM pH 8.0
- IGEPAL 1%
- EDTA 1mM  $\longrightarrow$  pH 6,8
- EGTA 1mM
- Ortovanadato sódico 1mM
- DTT 1mM
- PMSF 1mM
- Aprotinina 2µg/ml
- Leupeptina 2µg/ml

## Material y métodos

---

2. Tampón de homogenización de TAV (RIPA modificado) descrito en el apartado 4.3.5.
3. Tampón de lavado:
  - 0,2 M Tris pH=7,6
  - 1,37 M NaCl
  - 0,1% Polioxietilensorbitan-monolaurto (Tween-20)
4. Tampón de bloqueo: Solución de leche desnatada en polvo al 5% en TBS-T.
5. Tampón de anticuerpo primario: Solución de albúmina sérica bovina (BSA) al 5% en TBS-T. En ésta se disolvieron los siguientes anticuerpos (1:1000):
  - Anticuerpo policlonal de conejo anti-AMPK- $\alpha$  (Cell Signling Technology, Inc).
  - Anticuerpo policlonal de conejo anti-fosfo-AMPK- $\alpha$  (Cell Signling Technology, Inc).

### Principio de la técnica:

Cantidades equivalentes de proteína (30  $\mu$ g) de cada muestra fueron suspendidas en tampón de carga y desnaturalizadas mediante ebullición durante 5 minutos, fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10 %. Tras su separación, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa a voltaje constante de 100 mV durante 1 hora a 4°C. A continuación las membranas se incubaron en tampón de bloqueo durante 2 horas a temperatura ambiente. Seguidamente se lavaron con tampón TBS-T 3 veces cambiando dicha solución cada 5 minutos y después se incubaron con el anticuerpo primario anti-AMPK- $\alpha$  y anti-fosfo-AMPK- $\alpha$  (1/1000) durante toda la noche a 4°C. Se lavaron de nuevo 3 veces durante 5 minutos en TBS-T y se incubaron con anticuerpo secundario de cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa, dilucción 1/2000 (SantaCruz Biotechnology, Santa Cruz, EE.UU) en TBS-T con leche en polvo desnatada al 5% durante otras 2 horas a temperatura ambiente. Tras lavar de nuevo las membranas 3 veces durante 5 minutos en TBS-T, la unión al anticuerpo se detectó mediante una incubación con ECL (PerkinElmer Life Sciences, Boston) de 1 minuto y se expusieron a una película autoradiográfica para detectar la quimioluminiscencia.

#### **4.3.7. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ACC EN TEJIDOS**

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

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

#### **4.3.8. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTÉICA DE FAS EN TEJIDOS POR WESTERN BLOT**

Siguiendo el mismo procedimiento de preparación de muestras de hígado y TAV y la misma técnica de western blot que para la AMPK, se procedió a determinar la expresión proteica de FAS con el siguiente anticuerpo en una dilución (1:1000):

- Anticuerpo policlonal de conejo anti-FAS (Cell Signling Technology, Inc).

#### **4.3.9. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA AKT EN EL HÍGADO**

La determinación se realizó en hígado. El hígado se homogenizo en tampón específico, en una proporción 1:6 (p/v) y con un homogenizador Heidolph, en frío. Los homogenados se centrifugaron a 15.000 r.p.m. durante 30 min a 4°C y se recogió el sobrenadante, donde se determinó la concentración de proteínas mediante la técnica del ácido bicincónico.

##### Reactivos:

##### 1. Tampón de homogenización de hígado:

- 50 mM HEPES pH=7,0
- 100 mM Pirofosfato sódico
- 10 mM EDTA-2 Na

## Material y métodos

---

- 50 mM  $\beta$ -glicerofosfato
- 1% triton x-100
- 100 mM NaF
- 10 mM Vanadato sódico
- 2 mM PMSF
- 0,1 mg/ml Aprotinina

### 2. Tampón de lavado:

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

### 3. Tampón de bloqueo: Solución de leche desnatada en polvo al 5% en TBS-T.

### 4. Tampón de anticuerpo primario: Solución de albúmina sérica bovina (BSA) al 5% en TBS-T.

En ésta se disolvieron los siguientes anticuerpos (1:1000):

- Anticuerpo policlonal de conejo anti-AKT (Cell Signling Technology, Inc).
- Anticuerpo policlonal de conejo anti-fosfo-AKT (Cell Signling Technology, Inc).

### Principio de la técnica:

Cantidades equivalentes de proteína (50  $\mu$ g) de cada muestra fueron suspendidas en tampón de carga y desnaturalizadas mediante ebullición durante 5 minutos, fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10 %. Tras su separación, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa a voltaje constante de 100 mV durante 1 hora a 4°C. A continuación las membranas se incubaron en tampón de bloqueo durante 2 horas a temperatura ambiente. Seguidamente se lavaron con tampón TBS-T 3 veces cambiando dicha solución cada 5 minutos y después se incubaron con el anticuerpo primario anti-AKT y anti-fosfo-AKT (1/1000) durante toda la noche a 4°C. Se lavaron de nuevo 3 veces durante 5 minutos en TBS-T y se incubaron con anticuerpo secundario de cabra anti-conejo conjugado

con peroxidasa, dilución 1/2000 (SantaCruz Biotechnology, Santa Cruz, EE.UU) en TBS-T con leche en polvo desnatada al 5% durante otras 2 horas a temperatura ambiente. Tras lavar de nuevo las membranas 3 veces durante 5 minutos en TBS-T, la unión al anticuerpo se detectó mediante una incubación con ECL (PerkinElmer Life Sciences, Boston) de 1 minuto y se expusieron a una película autoradiográfica para detectar la quimioluminiscencia.

#### **4.3.10. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN PROTÉICA DE LAS ISOFORMAS DE SREBP EN EXTRACTOS NUCLEARES HEPÁTICOS**

##### Preparación de las muestras:

La determinación se realizó en hígado. El hígado se homogenizó en tampón hipotónico específico, en una proporción 1:5 (p/v) y con un homogenizador Heidolph, en frío. Los homogenizados se centrifugaron a 15.000 r.p.m. durante 30 min a 4°C y se recogió el precipitado. Dicho precipitado fue resuspendido en un tampón con elevada salinidad, durante 30 min en hielo con ayuda de un agitador. Los lisados obtenidos se centrifugaron a 15.000 r.p.m. durante 30 min a 4°C y se recogió el sobrenadante (extractos nucleares) donde se determinó la concentración de proteínas mediante la técnica del ácido bicinónico.

##### Reactivos:

###### 1. Tampón de homogenización hipotónico:

- 10 mM HEPES
- 10 mM KCl
- 0,1 mM EDTA
- 0,1 mM EGTA
- 1 mM DTT
- 1 mM PMSF
- 2 µg/ml Aprotinina



## Material y métodos

---

- 2 µg/ml Leupeptina
- 0,5 mg/ml Benzamidina

### 2. Tampón de homogenización salino:

- 20 mM HEPES
- 400 mM PMSF
- 2 µg/ml Aprotinina
- 2 µg/ml Aprotinina
- 0,5 mg/ml Benzamidina

### 3. Tampón de lavado:

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

### 4. Tampón de bloqueo: Solución de leche desnatada en polvo al 5% en TBS-T.

### 4. Tampón de anticuerpo primario: Solución de albúmina sérica bovina (BSA) al 5% en TBS-T.

En ésta se disolvieron los siguientes anticuerpos (1:1000):

- Anticuerpo policlonal de conejo anti-SREBP-1c (Santa Cruz Biotechnology, Inc).
- Anticuerpo monoclonal de ratón anti-SREBP-2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc).

### Principio de la técnica:

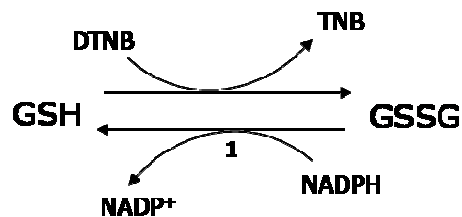
Cantidades equivalentes de proteína (50 µg) de cada muestra fueron suspendidas en tampón de carga y desnaturalizadas mediante ebullición durante 5 minutos, fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10 %. Tras su separación, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa a voltaje constante de 100 mV durante 1 hora a 4°C. A continuación las membranas se incubaron en tampón de bloqueo durante 2 horas a temperatura ambiente. Seguidamente se lavaron con tampón TBS-T 3 veces cambiando dicha solución cada 5 minutos y después se incubaron con el anticuerpo primario anti-SREBP-1c y anti-SREBP-2 (1/1000) durante toda la noche a 4°C. Se lavaron de nuevo 3 veces durante 5 minutos en TBS-T y se incubaron respectivamente con anticuerpo secundario de cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa o con anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado

con peroxidasa, dilución 1/2000 (SantaCruz Biotechnology, Santa Cruz, EE.UU) en TBS-T con leche en polvo desnatada al 5% durante otras 2 horas a temperatura ambiente. Tras lavar de nuevo las membranas 3 veces durante 5 minutos en TBS-T, la unión al anticuerpo se detectó mediante una incubación con ECL (PerkinElmer Life Sciences, Boston) de 1 minuto y se expusieron a una película autoradiográfica para detectar la quimioluminiscencia.

### 4.3.11. ESTADO OXIDATIVO HEPÁTICO

#### 4.3.10.a. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE GLUTATION TOTAL

La determinación del contenido de glutatión (GSH) total se llevó a cabo mediante el método de la reducción cíclica DTNB-GSSG descrito por Anderson en 1985 (Anderson, 1985) (Figura 12). Este método se basa en la oxidación total del glutatión reducido (GSH) presente en la muestra, a su forma oxidada (GSSG) por el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) con formación estequiométrica del ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB). El GSSG es reducido por la acción altamente específica de la glutatión reuctasa (GRD) en presencia de NADPH. La velocidad de formación de TNB, con el consiguiente incremento de absorbancia a 412 nm, es proporcional a la cantidad de GSH total (GSH + GSSG).



**Figura 12.** Fundamento de la determinación del glutatión total por el método de Anderson (1985). 1: GRD.

#### Preparación de las muestras:

Para realizar el ensayo las muestras se homogeneizaron en frío en TCA 5 % con un homogeneizador Heidolph, en proporción 1:6 (p/v). Después el homogenado se centrifugó a

## Material y métodos

---

4000 r.p.m. durante 10 minutos a 4 °C, utilizando el sobrenadante, convenientemente diluido, para la determinación de GSH total.

### Reactivos:

- 1.-Solución de ácido tricloroacético (TCA) al 5 % (p/v).
- 2.-Tampón: solución de fosfato sódico 143 mM y ácido etilen-diamino-tetraacético (EDTA) 6,3 mM (pH = 7,5).
- 3.-Solución de  $\beta$ -NADPH 300  $\mu$ M en el tampón.
- 4.-Solución de DTNB 6 mM en el tampón.
- 5.-Solución de GRD en el tampón (15  $\mu$ l/ml).
- 6.-Curva patrón: se preparó una solución madre de GSH 5 mM, en TCA 5 % y se hicieron diluciones hasta obtener las concentraciones deseadas para la curva.

### Principio de la técnica:

En una placa de Elisa, se adicionó a cada pocillo 5  $\mu$ l de tampón, 20  $\mu$ l de muestra o de patrón, 20  $\mu$ l de DTNB, 140  $\mu$ l de NADPH y se incubó la mezcla 10 minutos a 30 °C. A continuación se añadieron 15  $\mu$ l de la solución enzimática de GRD y se procedió a realizar un seguimiento espectrofotométrico de la variación de la absorbancia a 412 nm cada 20 segundos durante 3 minutos en Microplate Reader de Benchmark. La concentración de GSH total se calcula por interpolación en la pendiente de la curva patrón previamente obtenida, y los resultados se expresan como nmol GSH total/g tejido.

### **4.3.11.b. DETERMINACIÓN DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA**

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

Preparación de las muestras:

El tejido se homogeneizó, en frío, en KCl 1,15 % en proporción 1:5 (p/v), con un homogenizador Heidolph. Tras centrifugar las muestras a 2500 r.p.m. durante 5 minutos, se utilizó el sobrenadante para la determinación de MDA.

Reactivos:

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

Principio de la técnica:

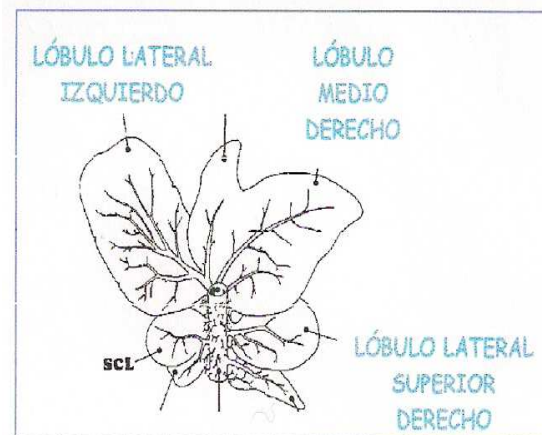
Preparar la mezcla de reacción en tubos de vidrio con tapón de rosca. En cada tubo se añadieron 750  $\mu$ l de ácido acético glacial 20 %, 750  $\mu$ l de TBA, 350  $\mu$ l de agua destilada, 100  $\mu$ l de la solución de SDS y 50  $\mu$ l del sobrenadante de la muestra o de la solución patrón. Cada tubo fue agitado, cerrado con su tapón e incubado durante 1 hora en un baño a 95 °C. La reacción se detuvo colocando los tubos en un baño de agua-hielo y posteriormente el contenido de estos tubos se traspasó a tubos eppendorf que se centrifugaron a 3000 g durante 10 min. Finalmente, el sobrenadante obtenido, se midió espectrofotométricamente a 532 nm en un lector de placas Microplate reader (Benchmarck). El cálculo de MDA contenido en las muestras, se realizó por interpolación en la curva patrón. Los resultados se expresaron como  $\mu$ M MDA/100 mg tejido.

## 5. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO DEL HÍGADO

### 5.1. TÉCNICAS REALIZADAS

Inmediatamente después del sacrificio de los animales, se recogieron muestras tisulares de 3 lóbulos hepáticos:

- lateral izquierdo
- medio derecho
- lateral superior derecho



Una muestra de cada lóbulo hepático se sumergió en formol tamponado al 10% y, una vez fijados los tejidos, se embebieron en parafina. Se obtuvieron secciones tisulares de 3 micrómetros que se tiñeron con las siguientes tinciones histológicas:

- Reacción de **ácido peryódico-Schiff (PAS)**, para valorar la presencia de glucógeno que toma un color magenta.
- **Tricrómico de Masson**, tinción que nos permite valorar la fibrosis: el tejido conjuntivo adquiere color verde.

Igualmente, muestras tisulares de cada lóbulo hepático se sumergieron en Tissue-Teck O.C.T. compound y se congelaron a  $-40^{\circ}$  C. Del lóbulo hepático lateral izquierdo se obtuvieron secciones tisulares por congelación que fueron sometidas a una postfijación corta con formol-calcio y, posteriormente, se tiñeron con dos técnicas para identificar lípidos:

- Tinción de **SUDÁN NEGRO ESTÁNDAR**, permite la identificación de ésteres de colesterol insaturados y triglicéridos, que toman un color negro-azulado.
- Tinción de **SUDÁN NEGRO con un pretratamiento con BROMO**, para identificar lípidos observados con el método estándar, lecitinas, ácidos grasos libres y colesterol libre, que adquieren un color negro-azulado.

## 5.2. SISTEMA DE GRADUACIÓN HISTOLÓGICA

El estudio histopatológico de los hígados se basó en el Sistema de graduación histológica (Histological Scoring System) que Kleiner *y cols.* 2005 describieron como válido para la evaluación de la enfermedad del hígado graso no-alcohólico. Las características histológicas examinadas hacen referencia a la esteatosis, inflamación, daño hepatocelular, fibrosis y contenido de glucógeno intracitoplasmático en hepatocitos. El sistema de evaluación se detalla a continuación:

### A) GRADO DE ESTEATOSIS

- < 5% hepatocitos con lípidos en citoplasma: NO ESTEATOSIS
- 5-33% de hepatocitos con lípidos en citoplasma: ESTEATOSIS LEVE
- > 33-66% de hepatocitos con lípidos en citoplasma: ESTEATOSIS MODERADA
- > 66%de hepatocitos con lípidos en citoplasma: ESTEATOSIS INTENSA

### B) INFLAMACIÓN LOBULILLAR:

- < 2 focos inflamatorios: INFLAMACIÓN LEVE
- 2-4 focos inflamatorios: INFLAMACIÓN MODERADA

### C) VALORACIÓN DE GLUCÓGENO EN CITOPLASMA DE HEPATOCITOS:

- < 5% de hepatocitos: AUSENCIA/ESPORÁDICO
- 5-33% de hepatocitos: LEVE
- >33-66% de hepatocitos: MODERADA
- >66% de hepatocitos: INTENSA

## 6. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Todos los resultados se expresan como media aritmética  $\pm$  error estándar de la media (E.E.M) de un determinado número (n) de animales. El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante el cálculo de la varianza utilizando un ANOVA de una vía, seguido del test de Bonferroni, donde  $p < 0,05$  se consideró diferencia significativa estadísticamente. Para llevar a cabo este análisis se empleó el programa estadístico SIGMA STAT.

## *Resultados*

---





## A) EFECTO DE LA INGESTA PROLONGADA DE DISTINTAS FIBRAS DIETÉTICAS EN RATAS ZUCKER OBESAS

Las ratas Zucker obesas son homocigóticas para el alelo *fa*, (*fa/fa*), lo que va a dar lugar a un receptor no funcional de la leptina responsable del desarrollo de obesidad, hiperlipidemia, hiperinsulinemia e hiperleptinemia, las principales alteraciones funcionales características de este modelo experimental genético de síndrome metabólico. En cambio, las ratas heterocigóticas (*fa/+*), en las que el receptor de leptina es funcional, son delgadas y mantienen perfiles lipídico, insulínico y leptinémico normales, que hacen adecuado su uso como control sano en este modelo.

### 1. VARIABLES MORFOLÓGICAS

#### 1.1. PESO CORPORAL E INGESTA DIETÉTICA

En el modelo experimental de rata Zucker, los animales (*fa/fa*), presentan obesidad manifiesta desde la 3ª a la 5ª semana de vida. Hacia la semana 14, su composición corporal consta de más de un 40% de lípidos y además desarrollan hipertrofia e hiperplasia adipocitaria, semejándose a la obesidad humana, por ello la rata Zucker es el modelo más conocido y usado de obesidad genética humana de comienzo precoz (Chen *y cols.*, 2005).

Al comienzo del período experimental, con 15 semanas de edad, las ratas obesas presentaban un peso 23% mayor que el de las ratas delgadas (Tabla 7). Tras 10 semanas de tratamiento, el peso corporal de las ratas (*fa/fa*) era 26% mayor que ratas (*fa/+*). No se observaron diferencias en el peso corporal entre las ratas obesas del grupo control y del grupo alimentado con dieta suplementada con celulosa (Tabla 7). Las ratas OM presentaban un 4% menos de peso comparado con los grupos OB y OC, llegando a ser significativo ( $p < 0,05$ ). Las ratas OP presentaban una disminución en su peso corporal comparado con el resto de grupos de ratas obesas, del 10% frente a OB, 9% respecto a OC y 6% comparado con OM ( $p < 0,05$  vs. OB, OC y OM) (Tabla 7).

## Resultados

En este modelo experimental los animales obesos se caracterizan además por presentar hiperfagia. Al cuantificar la ingesta dietética diaria en los animales obesos, se observó que ésta era significativamente mayor en relación a la de las ratas delgadas ( $p < 0,05$ ). Los animales obesos alimentados con las dietas enriquecidas en las distintas fibras mostraron una menor ingesta con respecto a la de los animales obesos control ( $p < 0,05$ ) (Tabla 7).

**Tabla 7.** Efectos de las diferentes dietas en la ingesta y en el peso corporal de las ratas Zucker obesas.

Grupos Experimentales	LB	OB	OC	OM	OP
Ingesta (g/rata/día)	21,70±0,76 <sup>c</sup>	25,67±0,60 <sup>a</sup>	24,05±0,31 <sup>b</sup>	23,83±0,43 <sup>b</sup>	23,67±0,51 <sup>b</sup>
Peso corporal inicial (g)	323,1±7,7 <sup>b</sup>	397,4±6,7 <sup>a</sup>	398,0±7,0 <sup>a</sup>	397,8±5,6 <sup>a</sup>	397,4±6,9 <sup>a</sup>
Peso corporal final (g)	388,7±6,5 <sup>d</sup>	490±7,4 <sup>a</sup>	486,5±6,5 <sup>a</sup>	472,3±6,3 <sup>b</sup>	440,8±9,1 <sup>c</sup>

Grupos experimentales: LB, ratas delgadas control; OB, ratas obesas control; OC, ratas obesas alimentadas con una dieta suplementada con celulosa; OM, ratas obesas alimentadas con una dieta suplementada con metilcelulosa; OP, ratas obesas alimentadas con una dieta suplementada con cutículas de *P. ovata* durante 10 semanas. Los valores están expresados como media  $\pm$  EEM (n=10). Entre los valores que presentan letras distintas, existe diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).

## 1.2. PESO RELATIVO DE LOS ÓRGANOS

Otra de las características de este modelo de síndrome metabólico es la presencia de hepatomegalia (el aumento del tamaño del hígado, sobrepasando los límites estimados como normales para cada grupo de edad). En nuestro experimento, las ratas obesas control presentaron un incremento en el peso del hígado de aproximadamente un 40% en relación a las ratas delgadas ( $p < 0,001$ ) (Tabla 8). La ingesta de dieta suplementada con celulosa durante 10 semanas no alteró el peso del hígado de las ratas obesas. Las ratas obesas alimentadas con dieta enriquecida en metilcelulosa mostraron una reducción significativa tanto

en el valor del peso del hígado como en el de su peso relativo, comparado con los de las ratas OB y OC ( $p < 0,05$ ) El grupo de ratas OP presentó un menor peso del hígado y un menor peso relativo del mismo en relación con los demás grupos de ratas obesas ( $p < 0,01$ ).

Debido a la obesidad que presentan estos animales, el peso del TAV en las ratas OB está aumentado en un 80%, y su peso relativo en un 77%, con respecto al de las ratas delgadas (Tabla 8). Únicamente las ratas que fueron alimentadas con la dieta suplementada con cutículas de *P. ovata*, mostraron una disminución significativa en estos parámetros con respecto a los demás grupos de ratas obesas (Tabla 8). Las ratas obesas control mostraban un mayor peso del corazón así como una reducción en los pesos relativos del corazón y del riñón comparados con las ratas delgadas ( $p < 0,001$ ), estos parámetros morfológicos no se vieron afectados por la suplementación de la dieta con las distintas fibras dietéticas.

**Tabla 8.** Peso de los órganos y peso relativo de los mismos con respecto al peso corporal de las ratas que fueron alimentadas con distintos tipos de fibras.

Grupos Experimentales	LB	OB	OC	OM	OP
Peso hígado (g)	12,3 ± 0,6 <sup>d</sup>	21,7 ± 0,7 <sup>a</sup>	21,3 ± 0,7 <sup>a</sup>	18,9 ± 0,5 <sup>b</sup>	16,2 ± 0,6 <sup>c</sup>
PR hígado	3,15 ± 0,10 <sup>d</sup>	4,41 ± 0,12 <sup>a</sup>	4,27 ± 0,10 <sup>a</sup>	4,01 ± 0,08 <sup>b</sup>	3,68 ± 0,11 <sup>c</sup>
Peso TAV (g)	2,53 ± 0,08 <sup>c</sup>	12,97 ± 0,60 <sup>a</sup>	13,10 ± 0,59 <sup>a</sup>	12,14 ± 0,56 <sup>a</sup>	10,85 ± 0,32 <sup>b</sup>
PR TAV	0,59 ± 0,02 <sup>c</sup>	2,64 ± 0,05 <sup>a</sup>	2,67 ± 0,04 <sup>a</sup>	2,57 ± 0,05 <sup>a,b</sup>	2,49 ± 0,05 <sup>b</sup>
Peso riñón (g)	1,09 ± 0,03 <sup>a</sup>	1,13 ± 0,03 <sup>a</sup>	1,09 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,90 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,05 ± 0,03 <sup>a</sup>
PR riñón	2,53 ± 0,04 <sup>a</sup>	2,09 ± 0,03 <sup>b</sup>	2,04 ± 0,04 <sup>b</sup>	1,96 ± 0,02 <sup>b</sup>	2,05 ± 0,03 <sup>b</sup>
Peso corazón (g)	0,99 ± 0,01 <sup>b</sup>	1,08 ± 0,03 <sup>a</sup>	1,06 ± 0,03 <sup>a</sup>	1,04 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,04 ± 0,02 <sup>a</sup>
PR corazón	2,30 ± 0,04 <sup>a</sup>	1,99 ± 0,03 <sup>b</sup>	2,00 ± 0,06 <sup>b</sup>	2,15 ± 0,02 <sup>b</sup>	1,95 ± 0,03 <sup>b</sup>

Grupos experimentales: LB, ratas delgadas control; OB, ratas obesas control; OC, ratas obesas alimentadas con una dieta suplementada con celulosa; OM, ratas obesas alimentadas con una dieta suplementada con metilcelulosa; OP, ratas obesas alimentadas con una dieta suplementada con cutículas de *P. ovata* durante 10 semanas. Los valores están expresados como media ± EEM (n=10). Entre los valores que presentan letras distintas, existe diferencia significativa ( $p < 0,05$ ). PR: Peso relativo; TAV: tejido adiposo visceral.

## 2. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS PLASMÁTICOS

### 2.1. LÍPIDOS PLASMÁTICOS

La rata Zucker obesa presenta una importante dislipidemia, manifestada por hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia y elevados niveles plasmáticos de AGL. Para determinar los efectos de las distintas dietas sobre esta alteración se analizaron las concentraciones plasmáticas de colesterol total, triglicéridos y AGL en el plasma en ayunas de los animales de los distintos grupos experimentales.

#### 2.1.1. TRIGLICÉRIDOS

Al final del experimento, las ratas obesas control presentaban un incremento de un 76% en los niveles plasmáticos de triglicéridos con respecto a las ratas delgadas ( $p < 0,001$ ). En el grupo OC, no se observaron diferencias con respecto al grupo de ratas obesas control. Tanto los grupos de ratas OP como OM, mostraron una reducción en sus niveles plasmáticos de triglicéridos de aproximadamente un 28%, con respecto al grupo OC ( $p < 0,01$ ) (Figura 14A).

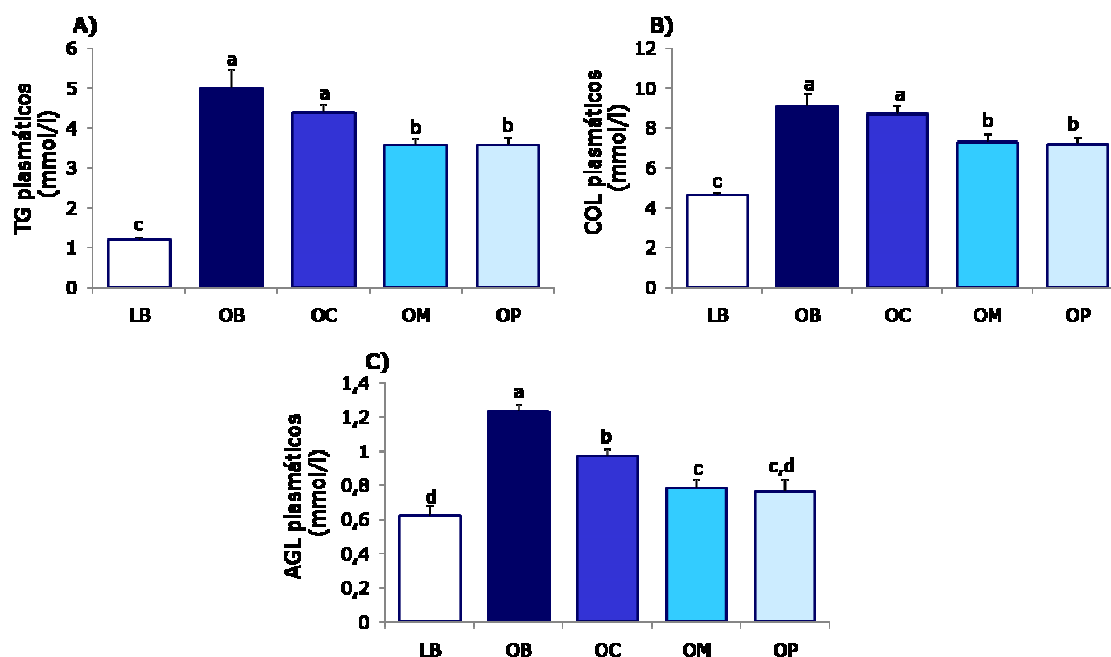
#### 2.1.2. COLESTEROL TOTAL

En las ratas obesas control observamos que las concentraciones plasmáticas de colesterol eran el doble que las encontradas en las ratas delgadas ( $p < 0,001$ ). En el grupo de ratas alimentadas con celulosa no se produjeron modificaciones en los niveles plasmáticos de colesterol total (Figura 14B). Las ratas alimentadas con fibras solubles (OM y OP), presentaron una disminución de un 20% ó de un 21% respectivamente, comparadas con el grupo de ratas OB ( $p < 0,01$ ) (Figura 14B).

#### 2.1.3. ÁCIDOS GRASOS LIBRES

La liberación de AGL desde el tejido adiposo está generalmente incrementada durante la obesidad. Como consecuencia, las ratas obesas control mostraron un incremento del 50% en sus niveles plasmáticos de este parámetro con respecto a las ratas delgadas ( $p < 0,001$ ). La ingesta de las dietas suplementadas con los tres tipos de fibra (celulosa, metilcelulosa y cutículas de *P. ovata* produjo una reducción (de 21%, 38% y 38% respectivamente) en los niveles plasmáticos de AGL, comparado con las ratas obesas control ( $p < 0,05$ ), siendo mayor

la disminución de este parámetro en las ratas OP y OM comparadas con las ratas OC ( $p < 0,001$ ) (Figura 14C).



**Figura 14.** Concentración plasmática de triglicéridos (TG) (A), colesterol total (COL) (B) y ácidos grasos libres (AGL) (C) en ratas delgadas y obesas alimentadas con dieta control (LB y OB) y en ratas obesas alimentadas con dietas suplementadas con celulosa (OC), metilcelulosa (OM), o cutículas de *P. ovata* (OP) durante 10 semanas. Los valores están expresados como media  $\pm$  EEM ( $n=10$ ). Entre los valores que presentan letras distinta existe diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).

## 2.2. PARÁMETROS RELACIONADOS CON LA RESISTENCIA A LA INSULINA

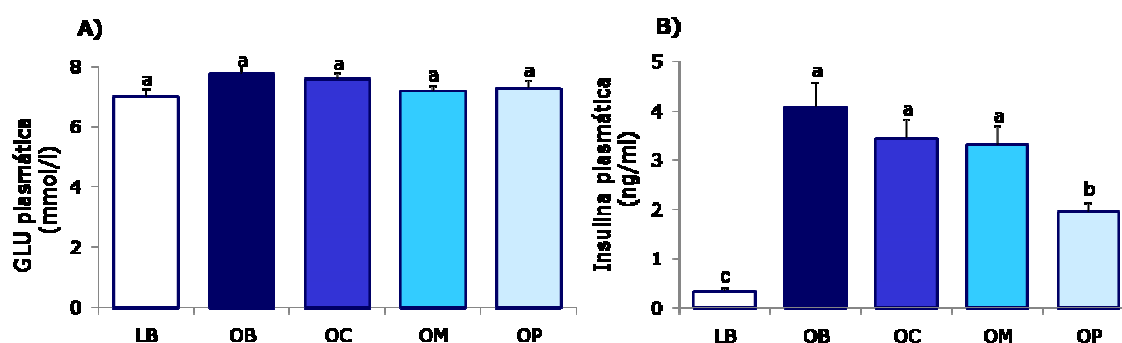
Las ratas Zucker obesa, presentan resistencia a la acción de la insulina, que se manifiesta por elevados niveles de insulina plasmática. Dependiendo de las colonias, pueden presentar, eventualmente, una hiperglucemia moderada (Muller y cols., 1988).

### 2.2.1. GLUCOSA PLASMÁTICA

Nuestros resultados mostraron concentraciones de glucosa plasmática similares en todos los grupos de ratas, tanto delgadas como obesas, al final del período experimental (Figura 15A).

### 2.2.2. INSULINA PLASMÁTICA

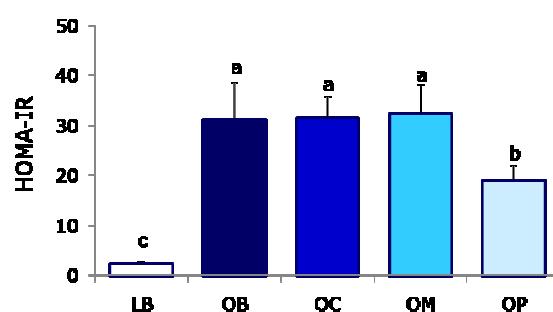
Todos los grupos de ratas obesas mostraron elevadas concentraciones plasmáticas de insulina comparada con las ratas delgadas ( $p < 0,01$ ), como consecuencia de la resistencia a la insulina que padecen (Figura 15B). Solamente en las ratas obesas que recibieron la fibra fermentable y soluble, OP, se observó una disminución del 52% en los niveles de insulina plasmática con respecto al grupo de ratas obesas alimentadas con dieta control ( $p < 0,001$ ). La alimentación con dietas enriquecidas en las otras fibras no produjo variación en este parámetro.



**Figura 15.** Concentraciones plasmáticas de glucosa (GLU) (A), Insulina (B), en ratas delgadas y obesas alimentadas con dieta control (LB y OB) y en ratas obesas alimentadas con dietas suplementadas con celulosa (OC), metilcelulosa (OM), o cutículas de *P. ovata* (OP) durante 10 semanas. Los valores están expresados como media  $\pm$  EEM ( $n=10$ ). Entre los valores que presentan letras distinta existe diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).

### 2.2.3. ÍNDICE DE RESISTENCIA A LA INSULINA HOMA

El índice HOMA-IR es un modelo matemático que se emplea como medida de resistencia a la insulina. La figura 16 muestra los valores de este índice en los distintos grupos experimentales. Las ratas obesas manifestaron valores mayores de HOMA-IR en relación con las ratas delgadas ( $p < 0,0001$ ). Las ratas obesas alimentadas con celulosa y metilcelulosa mostraron valores de HOMA-IR similares a los de las ratas obesas control. En cambio, el grupo de ratas alimentadas con cutículas de *P. ovata* redujo este parámetro en un 39% con respecto al grupo de ratas obesas control ( $p < 0,05$ ).



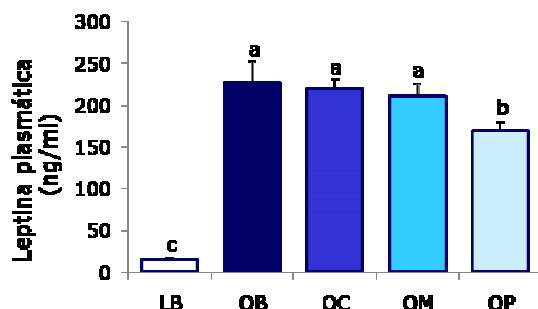
**Figura 16.** Índice de resistencia a la insulina HOMA (HOMA-IR) en ratas delgadas y obesas alimentadas con dieta control (LB y OB) y en ratas obesas alimentadas con dietas suplementadas con celulosa (OC), metilcelulosa (OM), o cutículas de *P. ovata* (OP) durante 10 semanas. Los valores están expresados como media  $\pm$  EEM ( $n=10$ ). Entre los valores que presentan letras distinta existe diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).

### 2.3. LEPTINA PLASMÁTICA

Por la expresión homocigótica del alelo *fa* y el receptor defectuoso de leptina resultante, las ratas Zucker obesas presentan resistencia a la leptina, que se manifiesta con una marcada hiperleptinemia.



En nuestro experimento los valores plasmáticos de leptina en las ratas OB eran aproximadamente 15 veces superiores a los de las ratas delgadas ( $p < 0,001$ ). La ingesta de las dietas suplementadas con celulosa o metilcelulosa no afectó a este parámetro en las ratas obesas con respecto al grupo OB. En cambio, en las ratas OP la leptinemia disminuyó ligera pero significativamente con respecto al resto de grupos de ratas obesas ( $p < 0,05$  vs. OB, OC y OM) (Figura 17).



**Figura 17.** Concentraciones plasmáticas de leptina, en ratas delgadas y obesas alimentadas con dieta control (LB y OB) y en ratas obesas alimentadas con dietas suplementadas con celulosa (OC), metilcelulosa (OM), o cutículas de *P. ovata* (OP) durante 10 semanas. Los valores están expresados como media  $\pm$  EEM ( $n=10$ ). Entre los valores que presentan letras distinta existe diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).

### 3. MARCADORES BIOQUÍMICOS EN TEJIDOS INSULINO-RESISTENTES

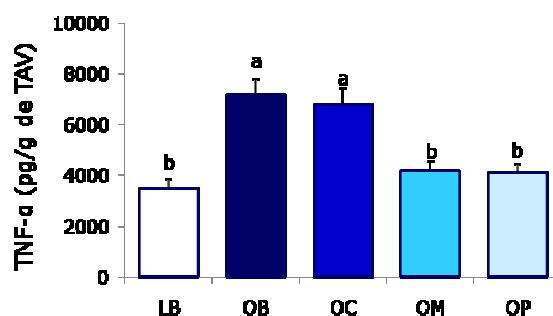
#### 3.1. TEJIDO ADIPOSO VISCERAL

El tejido adiposo desempeña un papel crucial en la regulación de la sensibilidad a la insulina a través de la liberación de AGL. En la obesidad se produce un importante incremento

y la expansión del tejido adiposo. Esta hipertrofia provoca una alteración en el patrón de secreción del adipocito, que implica por un lado, el aumento de factores proinflamatorios como el TNF- $\alpha$ , que disminuye la sensibilidad a la insulina, y por otro lado la disminución de la liberación de factores antiinflamatorios, entre los que se encuentra la adiponectina, la cual aumenta la sensibilidad a la insulina. Para valorar los efectos de la ingesta de las dietas suplementadas con las distintas fibras sobre el TAV analizamos, entre otros parámetros, la producción de estas dos adipocitoquinas por este tejido.

### 3.1.1. PRODUCCIÓN DE TNF- $\alpha$ POR EL TEJIDO ADIPOSO VISCERAL

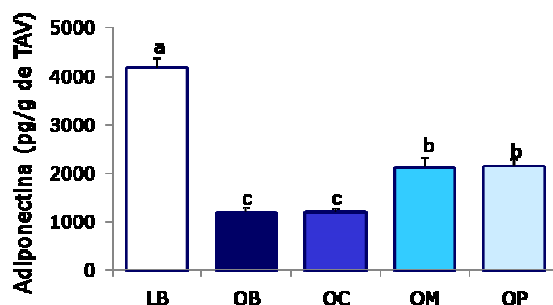
Los resultados obtenidos en el presente estudio confirman que las ratas obesas control presentan valores que duplican a los encontrados en las ratas delgadas ( $p < 0,001$ ). La producción de esta citoquina proinflamatoria por el TAV es reducida hasta valores similares a los de las ratas delgadas, en los grupos de ratas alimentados con metilcelulosa y cutículas de *P. ovata* ( $p < 0,01$  vs. OB), mientras que en las ratas que recibieron celulosa, no se observaron diferencias en este parámetro en relación con las ratas OB (Figura 18).



**Figura 18.** Niveles de TNF- $\alpha$  en tejido adiposo visceral (TAV) en ratas delgadas y obesas alimentadas con dieta control (LB y OB) y en ratas obesas alimentadas con celulosa (OC), metilcelulosa (OM) o cutículas de *P. ovata* (OP) durante 10 semanas. Los valores están expresados como media  $\pm$  EEM ( $n=10$ ). Entre los valores que presentan letras distinta existe diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).

### 3.1.2. PRODUCCIÓN DE ADIPONECTINA POR EL TEJIDO ADIPOSO VISCERAL

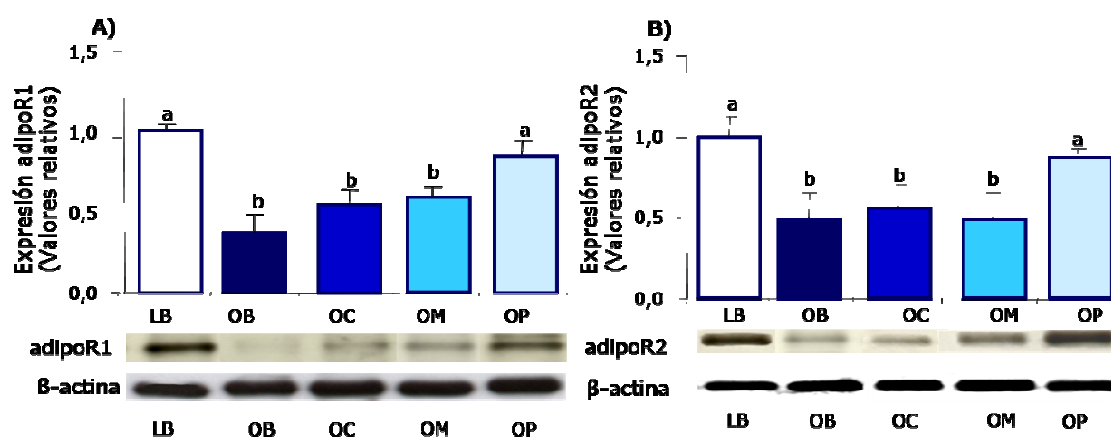
La adiponectina se encuentra disminuida en individuos que presentan obesidad y en situaciones de resistencia a la insulina. En este sentido la adiponectina secretada por el tejido adiposo en las ratas obesas control fue 4 veces menor que la producida por las ratas delgadas ( $p < 0,001$ ). Las ratas obesas alimentadas con dieta enriquecida en celulosa no mostraron diferencias con respecto a las ratas obesas control en este parámetro. En cambio, se observó un aumento del 44% en la producción de adiponectina por dicho tejido en los grupos de ratas OM y OP ( $p < 0,001$  vs. OB) (Figura 19).



**Figura 19.** Niveles de adiponectina en el tejido adiposo visceral (TAV) de ratas delgadas y obesas alimentadas con dieta control (LB y OB) y en ratas obesas alimentadas con dietas suplementadas con celulosa (OB), metilcelulosa (OM) o cutículas de *P. ovata* (OP) durante 10 semanas. Los valores relativos están expresados como media  $\pm$  EEM ( $n=10$ ). Entre los valores que presentan letras distintas existe diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).

### 3.1.3. EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE ADIPONECTINA, ADIPOR1 Y ADIPOR2, EN EL TEJIDO ADIPOSEO VISCERAL

Los receptores de adiponectina, adipoR1 y adipoR2, son los que median las acciones fisiológicas de esta adipocitoquina. Analizamos su expresión proteica en el TAV mediante western blot y nuestros resultados nos indican, que la expresión proteica de ambos receptores está regulada negativamente en las ratas obesas control, en relación con el grupo de ratas delgadas. Sólo en las ratas alimentadas con cutículas de *P. ovata* durante 10 semanas, se observó un aumento significativo en la expresión de ambos receptores, siendo éstas similares a las encontradas en el TAV de las ratas LB ( $p < 0,01$  vs. OB, OC y OM) (Figuras 20A, 20B).



**Figura 20.** Expresión proteica de los receptores de adiponectina, adipoR1 (A) y adipoR2 (B) en el tejido adiposo visceral de ratas delgadas y obesas alimentadas con dieta control (LB y OB) y en ratas obesas alimentadas con dietas suplementadas con celulosa (OC), metilcelulosa (OM), o cutículas de *P. ovata* (OP) durante 10 semanas. Los valores relativos están expresados como media  $\pm$  EEM ( $n=10$ ) y proceden del análisis densitométrico en relación a la  $\beta$ -actina, asignando el valor 1,0 al grupo LB. Entre los valores que presentan letras distintas existe diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).

## 3.2. HÍGADO

Uno de los principales órganos implicados en la regulación del metabolismo tanto glucídico como lipídico es el hígado, lo que lo convierte en otro de los tejidos diana afectados por la resistencia a la insulina.

### 3.2.1. LÍPIDOS HEPÁTICOS

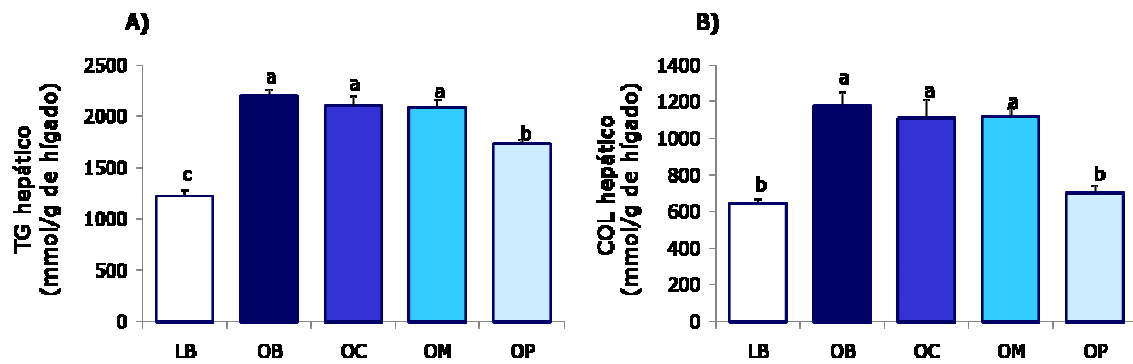
La acumulación de lípidos fuera del TAV, particularmente dentro del hígado, está directamente relacionada con el desarrollo de resistencia a la insulina en este órgano. Por ello analizamos el contenido lipídico en muestras hepáticas procedentes de los distintos grupos experimentales.

#### 3.2.1.1. COLESTEROL TOTAL

El contenido hepático de colesterol en las ratas obesas control fue 2 veces mayor que el de las delgadas ( $p < 0,001$ ). La ingesta prolongada de las dietas suplementadas con celulosa y metilcelulosa no mejoró este parámetro con respecto a las ratas obesas control. Las ratas obesas alimentadas con cutículas de *P. ovata*, mostraron una disminución del 41%, comparada con las ratas obesas control ( $p < 0,001$  vs. OB) (Figura 21A).

#### 3.2.1.2. TRIGLICÉRIDOS HEPÁTICOS

Las ratas obesas control presentaron un incremento del 44% en los niveles de triglicéridos hepáticos con respecto a las ratas delgadas ( $p < 0,001$ ). Solamente las ratas alimentadas con cutículas de *P. ovata*, presentaron una reducción de un 22% en este parámetro en relación con los valores de las ratas obesas control ( $p < 0,0001$  vs. OB, OC y OM) (Figura 21B).



**Figura 21.** Contenido de colesterol total (COL) (A) y triglicéridos (TG) (B) en el hígado de ratas delgadas y obesas alimentadas con dieta control (LB y OB) y en ratas obesas alimentadas con dietas suplementadas con celulosa (OC), metilcelulosa (OM), o cutículas de *P. ovata* (OP) durante 10 semanas. Los valores están expresados como media  $\pm$  EEM (n=10). Entre los valores que presentan letras distintas existe diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

## B) EFECTOS DE LA INGESTA PROLONGADA DE UNA DIETA SUPLEMENTADA CON CUTÍCULAS DE *P. OVATA* EN ÓRGANOS INSULINO-RESISTENTES

Una vez analizados los resultados obtenidos en el primer tratamiento, observamos una mejora en todos los parámetros analizados en el grupo de ratas alimentadas con cutículas de *P. ovata*. Dado que los resultados observados mostraban un aumento en la expresión proteica de los receptores de adiponectina, adipoR1 y adipoR2 en el TAV, participando a mejorar la resistencia a la insulina y una disminución en el contenido de lípidos hepáticos, decidimos profundizar en estos resultados estudiando los principales órganos insulino-resistentes.

### 1. VARIABLES PONDERALES

Podemos observar que tanto los datos derivados del peso corporal de los animales, la ingesta y el peso relativo de los órganos analizadas ponen de manifiesto las características de este modelo y confirman los resultados obtenidos en el experimento anterior en el grupo de ratas alimentadas con cutículas de *P. ovata* (Tabla 9). El aspecto macroscópico de los hígados de los distintos grupos experimentales se muestra en la figura 22.

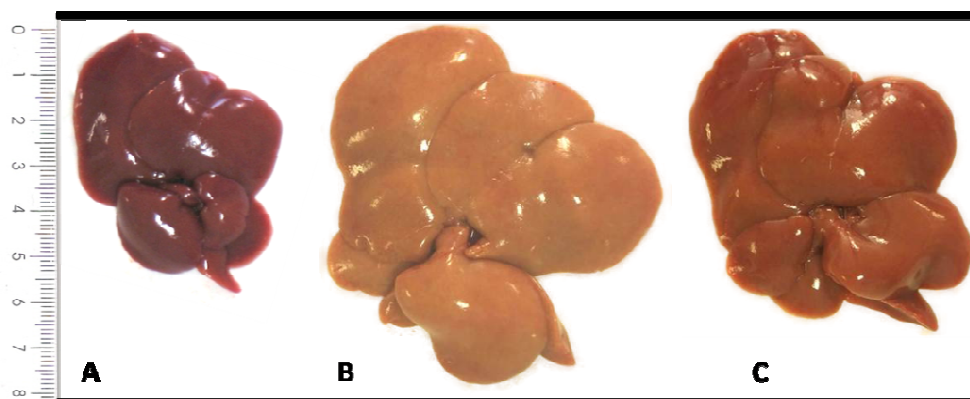


Figura 22. Fotografía ilustrativa del aspecto y tamaño del hígado de las ratas de los distintos grupos experimentales. A, rata delgada control; B, rata obesa control; C, rata obesa alimentada con una dieta suplementada con cutículas de *P. ovata* durante 10 semanas.

**Tabla 9.** Efectos de la ingesta de cutículas de *P. ovata* en la ingesta, peso corporal, peso de los órganos y peso relativo de los mismos con respecto al peso corporal de las ratas Zucker obesas.

Grupos Experimentales	LB	OB	OP
Ingesta (g/rata/día)	20,71 ± 0,76 <sup>c</sup>	24,97 ± 0,52 <sup>a</sup>	22,69 ± 0,46 <sup>b</sup>
Peso corporal inicial (g)	326,6 ± 7,7 <sup>b</sup>	420,6 ± 7,6 <sup>a</sup>	422,6 ± 4,9 <sup>a</sup>
Peso corporal final (g)	426,6 ± 4,8 <sup>c</sup>	537,8 ± 16,1 <sup>a</sup>	495,8 ± 10,1 <sup>b</sup>
Peso hígado (g)	13,06 ± 0,31 <sup>c</sup>	21,85 ± 0,92 <sup>a</sup>	18,61 ± 0,28 <sup>b</sup>
Peso relativo hígado	3,06 ± 0,06 <sup>c</sup>	4,03 ± 0,12 <sup>a</sup>	3,65 ± 0,12 <sup>b</sup>
Peso TAV (g)	2,53 ± 0,08 <sup>c</sup>	14,53 ± 0,60 <sup>a</sup>	12,76 ± 0,52 <sup>b</sup>
Peso relativo TAV	0,59 ± 0,02 <sup>c</sup>	2,68 ± 0,04 <sup>a</sup>	2,48 ± 0,05 <sup>b</sup>

Grupos experimentales: LB, ratas delgadas control; OB, ratas obesas control; OP, ratas obesas alimentadas con una dieta suplementada con cutículas de *P. ovata* durante 10 semanas. Los valores están expresados como media ± EEM (n=10). Entre los valores que presentan letras distintas, existe diferencia significativa (p < 0,05). TAV: tejido adiposo visceral.

## 2. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS

Las medidas realizadas en plasma demuestran los efectos beneficioso de la fibra soluble y fermentable, cutículas de *P. ovata*, sobre los niveles de triglicéridos, colesterol total, AGL, glucosa, insulina y leptina plasmáticos. El desequilibrio en la producción de adiponectina y TNF- $\alpha$  por el TAV que encontramos en las ratas obesas control se encuentra reestablecido en las ratas OP, reafirmando los datos obtenidos en el tratamiento anterior (Tabla 10).



## Resultados

**Tabla 10.** Efectos de la ingesta de cutículas de *P. ovata* en los parámetros bioquímicos de las ratas Zucker obesas.

Grupos Experimentales	LB	OB	OP
Triglicéridos (mmol/l)	0,9 ± 0,07 <sup>c</sup>	4,63 ± 0,59 <sup>a</sup>	2,52 ± 0,18 <sup>b</sup>
Colesterol (mmol/l)	2,23 ± 0,17 <sup>c</sup>	6,37 ± 0,56 <sup>a</sup>	4,89 ± 0,36 <sup>b</sup>
AGL (mmol/l)	0,65 ± 0,07 <sup>c</sup>	1,19 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,77 ± 0,07 <sup>b</sup>
Glucosa (mmol/l)	9,07 ± 0,25 <sup>a</sup>	9,27 ± 0,24 <sup>a</sup>	9,17 ± 0,39 <sup>a</sup>
Insulina ng/ml	0,63 ± 0,22 <sup>c</sup>	3,10 ± 0,61 <sup>a</sup>	1,88 ± 0,19 <sup>b</sup>
Leptina (ng/ml)	7,23 ± 0,89 <sup>c</sup>	93,40 ± 5,89 <sup>a</sup>	76,13 ± 3,22 <sup>b</sup>
Adiponectina (pg/g)	4615 ± 474,39 <sup>c</sup>	1686 ± 161,24 <sup>a</sup>	2317 ± 138,27 <sup>b</sup>
TNF- $\alpha$ (pg/g)	3502,5 ± 355,51 <sup>c</sup>	6994,9 ± 633,89 <sup>a</sup>	4702,1 ± 396,85 <sup>b</sup>

Grupos experimentales: LB, ratas delgadas control; OB, ratas obesas control; OP, ratas obesas alimentadas con una dieta suplementada con cutículas de *P. ovata* durante 10 semanas. AGL, ácidos grasos libres; TNF- $\alpha$ , factor de necrosis tumoral- $\alpha$ . Los valores están expresados como media  $\pm$  EEM (n=10). Entre los valores que presentan letras distintas, existe diferencia significativa (p<0,05).

### 3. EFECTOS DE LAS CUTÍCULAS DE *P. OVATA* EN ÓRGANOS INSULINO-RESISTENTES

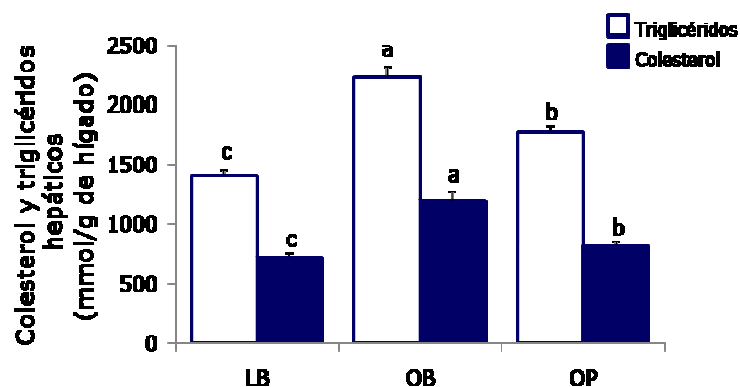
Vamos a profundizar en el efecto de las cutículas de *P. ovata* sobre la resistencia a la insulina, para ello nos centramos en el estudio de los principales órganos insulino-resistentes: hígado y TAV.

#### 3.1. HÍGADO

##### 3.1.1. LÍPIDOS HEPÁTICOS

###### 3.1.1.1. COLESTEROL TOTAL Y TRIGLICÉRIDOS HEPÁTICOS

La disminución en el contenido de lípidos, tanto de colesterol total como de triglicéridos, a nivel hepático se pone de manifiesto nuevamente con la ingesta prolongada de cutículas de *P. ovata* en las ratas Zucker obesas en relación con las ratas OB ( $p < 0,01$ ) (Figura 23).



**Figura 23.** Contenido de colesterol total y triglicéridos en el hígado de ratas delgadas y obesas alimentadas con dieta control (LB y OB) y en ratas obesas alimentadas con cutículas de *P. ovata* (OP) durante 10 semanas. Los valores están expresados como media  $\pm$  EEM ( $n=10$ ). Entre los valores que presentan letras distintas existe diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

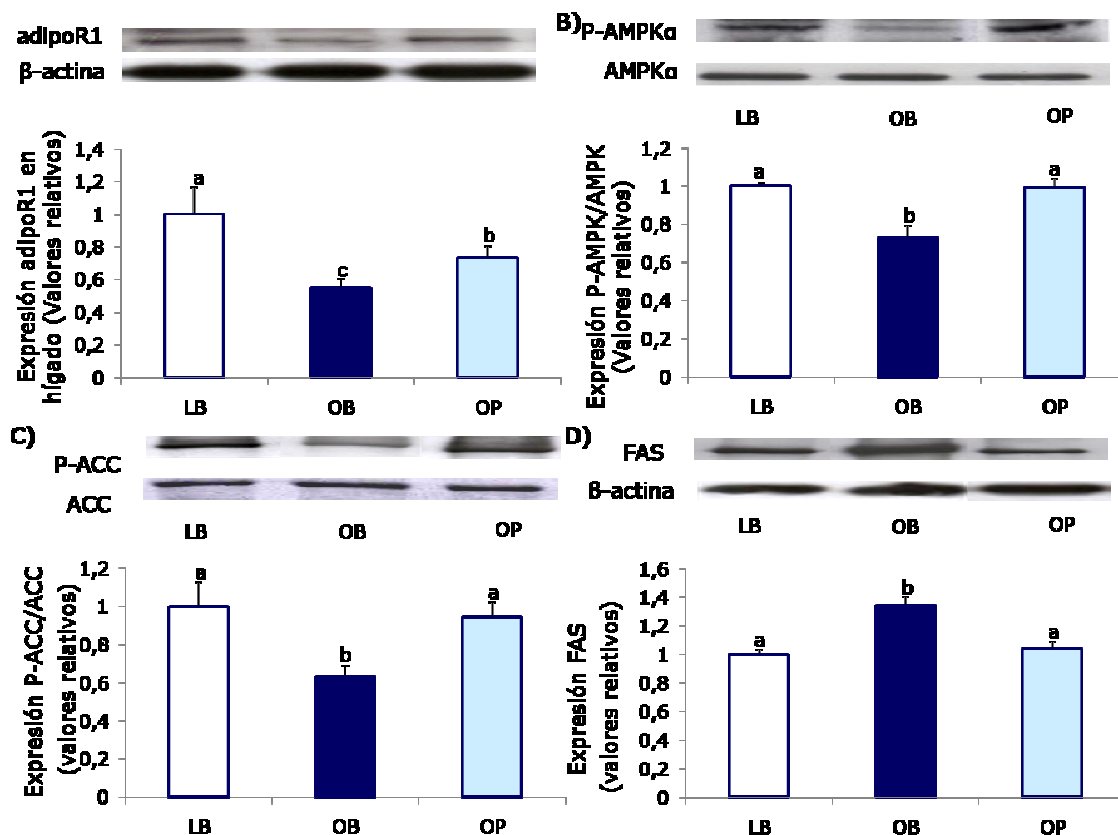
### 3.1.2. EXPRESIÓN HEPÁTICA DE ADIPOR1 Y DE LAS ENZIMAS AMPK, ACC Y FAS

La adiponectina actúa a través de sus receptores adipoR1 y adipoR2. Cuando la adiponectina se une al receptor adipoR1 en el hígado, da lugar a la activación de la AMPK, reduciendo por tanto las moléculas implicadas en la gluconeogénesis y aumentando la fosforilación de ACC y en consecuencia la oxidación de ácidos grasos, a la vez que disminuye la síntesis de ácidos grasos a través de la ácido graso sintasa (FAS). Todo ello conduce a una disminución en el contenido de triglicéridos hepáticos y al aumento de la sensibilidad a la insulina.

Para valorar la implicación del receptor de adiponectina, adipoR1, en la reducción del contenido lipídico en el hígado, cuantificamos la expresión proteica de este receptor mediante western blot. Observamos que la expresión proteica de adipoR1 en las ratas OB está regulada negativamente comparada con el grupo de ratas delgadas. En las ratas alimentadas con cutículas de *P. ovata* se apreció un aumento significativo en la expresión de dicho receptor ( $p < 0,05$  vs. OB) (Figura 24).

La AMPK es una de las principales enzimas involucradas en el metabolismo glucídico y lipídico. Analizamos el estado de activación de esta enzima y de su ruta metabólica. La activación de esta enzima en el hígado limita el depósito de grasa y mantiene la respuesta a la insulina en este órgano.

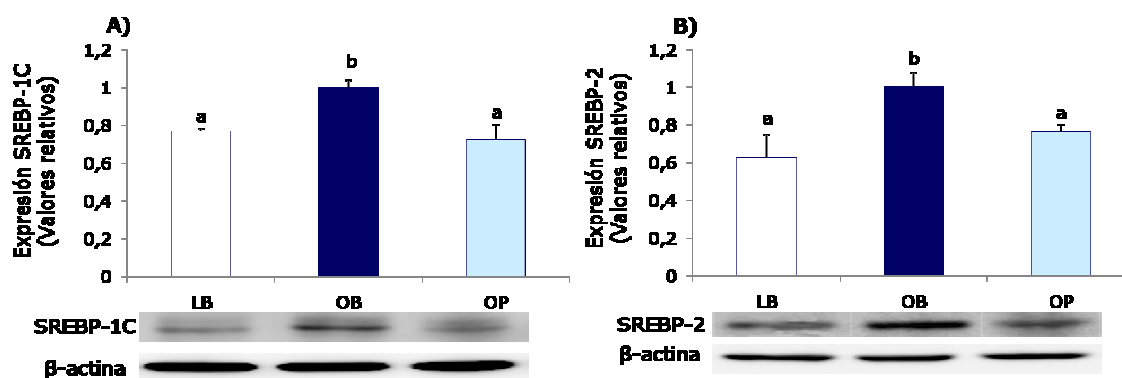
Analizamos de la misma forma la expresión de las enzimas AMPK y ACC total y de sus formas fosforiladas, así como de la enzima FAS. Observamos que no había diferencias entre los grupos experimentales en la expresión de la enzima AMPK y ACC en su forma total. La fosforilación en el residuo de Thr<sup>172</sup> de la subunidad  $\alpha$  (forma activada) de la AMPK está disminuida en las ratas obesas control aproximadamente en un 20% comparado con las ratas delgadas ( $p < 0,01$ ). Del mismo modo la inhibición de la activación de la AMPK fue confirmada por la disminución en la fosforilación de la ACC en el hígado de las ratas OB ( $p < 0,01$ ) y con la siguiente aumento en la expresión de FAS con respecto a las ratas delgadas ( $p < 0,001$ ). En el grupo de ratas OP vimos que la fosforilación de AMPK y ACC fue significativamente incrementada con respecto a las ratas OB ( $p < 0,01$ ) y la expresión de la FAS fue regulada negativamente hasta valores de las ratas delgadas ( $p < 0,01$  vs. OB).



**Figura 24.** Expresión proteica del receptor de adiponectina, adipor1 (A), AMPK- $\alpha$ , p-AMPK- $\alpha$  (B), ACC, P-ACC (C) y FAS (D) en el hígado de ratas delgadas y obesas alimentadas con dieta control (LB y OB) y en ratas obesas alimentadas con dieta suplementada al 3,5 % con cutículas de *P. ovata* (OP) durante 10 semanas. En (B) y (C) los valores relativos están expresados como media  $\pm$  EEM (n=7) y reflejan la relación densitométrica entre la fracción fosforilada de AMPK- $\alpha$  y p-ACC y el total de la proteína AMPK y ACC respectivamente, asignando el valor de 1,0 al grupo LB. En (A) y (D) los valores relativos están expresados como media  $\pm$  EEM (n=7) y proceden del análisis densitométrico en relación a la  $\beta$ -actina, asignando el valor 1,0 al grupo LB. Entre los valores que presentan letras distintas existe diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).

### 3.1.3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN SREBP-1C Y SREBP-2

Las proteínas transportadoras del elemento regulador de esteroides (SREBP-1c y SREBP-2) son los factores de transcripción más importantes en la lipogénesis *de novo* a nivel hepático. Juegan un papel muy importante en el desarrollo del hígado graso. Quisimos comprobar la expresión de ambos factores en nuestro modelo experimental de síndrome metabólico, ya que los niveles de estas proteínas se encuentran sobre-expresados en modelos de animales con resistencia a la insulina (Shimomura *y cols.*, 1999; Yahagi *y cols.*, 2002). Observamos que la expresión hepática de SREBP-1c y SREBP-2 se encuentra aumentada en las ratas obesas control con respecto a las ratas delgadas ( $p < 0,05$ ). Las ratas alimentadas con la dieta suplementada con cutículas de *P. ovata* presentaron un descenso importante en la expresión de estos factores de transcripción con respecto a las ratas OB, alcanzando un perfil similar al de las ratas LB (Figura 25).

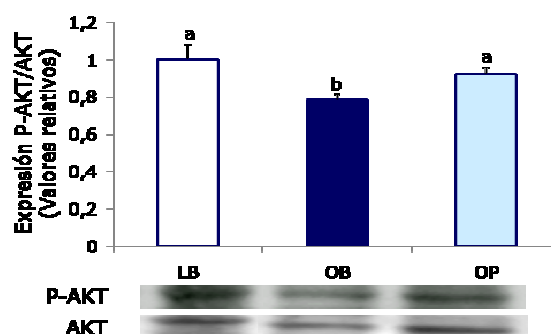


**Figura 25.** Expresión proteica de las proteínas transportadoras del elemento regulador de esteroides, SREBP-1c (A) y SREBP2 (B) en el hígado de ratas delgadas y obesas alimentadas con dieta control (LB y OB) y en ratas obesas alimentadas con dieta suplementada al 3,5 % con cutículas de *P. ovata* (OP) durante 10 semanas. Los valores relativos están expresados como media  $\pm$  EEM (n=7) y proceden del análisis densitométrico en relación a la  $\beta$ -actina, asignando el valor 1,0 al grupo OB. Entre los valores que presentan letras distintas existe diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).

### 3.1.4. EXPRESIÓN PROTEICA DE LA ENZIMA AKT

Otra enzima implicada en el metabolismo de la glucosa es la enzima AKT, que participa en muchas acciones de la insulina a nivel intracelular. Pretendimos estudiar si existía alguna alteración en el hígado a nivel de la vía de señalización de la insulina que pudiera estar implicada en la esteatosis hepática, ya que varios experimentos en modelos animales han identificado cambios en la expresión ó la actividad de moléculas relacionadas con la cascada de señalización de la insulina en el hígado como consecuencia de una administración aguda de lípidos (Ye *y cols.*, 2002).

Medimos los niveles de la expresión de la proteína AKT en su forma total y fosforilada (activa). La expresión de AKT total en el hígado de las ratas OB es similar a la que presentan las ratas delgadas (Figura 26). En cambio, observamos una disminución de un 15% en la forma fosforilada de las ratas OB comparado con las LB. En las ratas obesas alimentadas con cutículas de *P. ovata* durante 10 semanas observamos un aumento en los niveles de la expresión de la proteína p-AKT, alcanzando prácticamente los niveles encontrados en las ratas delgadas ( $p < 0,05$ ) (Figura 26).

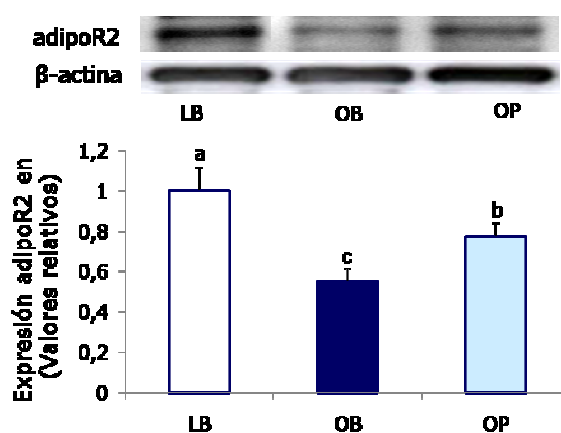


**Figura 26.** Expresión hepática de la proteína AKT y de la fracción fosforilada de la misma (p-AKT) en ratas delgadas y obesas alimentadas con dieta control (LB y OB) y en ratas obesas alimentadas con dieta suplementada al 3,5 % con cutículas de *P. ovata* (OP) durante 10 semanas. Los valores relativos están expresados como media  $\pm$  EEM ( $n=7$ ) y reflejan la relación densitométrica entre la fracción fosforilada de AKT y el total de la proteína, asignando el valor de 1,0 al grupo LB. Entre los valores que presentan letras distintas existe diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

### 3.1.5. EXPRESIÓN DE ADIPOR2

El receptor adipoR2 en el hígado, mediante la adiponectina, se ha visto que activa al receptor activador de proliferación de los peroxisomas  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ), el cual incrementa la oxidación de ácidos grasos e inhibe el estrés oxidativo a nivel hepático. Para evaluar la participación del adipoR2 en las alteraciones hepáticas de este modelo experimental, cuantificamos su expresión mediante western blot.

La expresión de adipoR2 en las ratas OB está regulada negativamente comparada con el grupo de ratas delgadas. En las ratas alimentadas con cutículas de *P. ovata* se apreció un aumento significativo en la expresión de dicho receptor ( $p < 0,05$  vs. OB) (Figura 27).

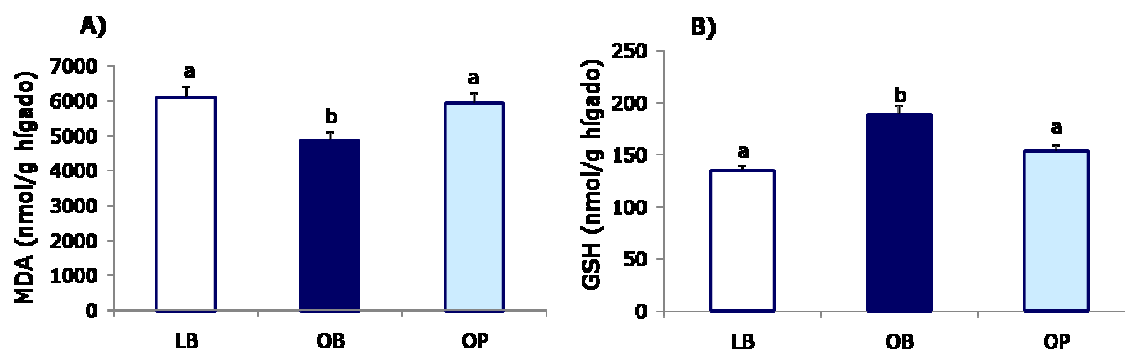


**Figura 27.** Expresión proteica del receptor de adiponectina, adipoR2 en el hígado de ratas delgadas y obesas alimentadas con dieta control (LB y OB) y en ratas obesas alimentadas con una dieta suplementada al 3,5 % con cutículas de *P. ovata* (OP) durante 10 semanas. Los valores relativos están expresados como media  $\pm$  EEM ( $n=7$ ) y proceden del análisis densitométrico en relación a la  $\beta$ -actina, asignando el valor 1,0 al grupo LB. Entre los valores que presentan letras distintas existe diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).

### 3.1.6. MARCADORES DEL ESTADO OXIDATIVO HEPÁTICO

Dada la relación entre la expresión de adipor2 y el estrés oxidativo, analizamos la cantidad del antioxidante endógeno GSH y los niveles hepáticos de TBARS, expresado como MDA, como indicador de peroxidación lipídica.

El contenido hepático de GSH fue significativamente disminuido en las ratas OB comparado con las ratas delgadas ( $p < 0,0001$ ) (Figura 28A). La ingesta dietética de cutículas de *P. ovata* produce un incremento significativo en este parámetro comparado con las ratas obesas control, llegando a concentraciones similares a las encontradas en las ratas delgadas (Figura 28A). Las ratas obesas presentaron una peroxidación lipídica expresada como concentración de MDA un 29% superior a la de las ratas delgadas ( $p < 0,05$ ). En las ratas alimentadas con cutículas de *P. ovata* se observa una reducción de un 19% en las concentraciones hepáticas de MDA comparado con las ratas obesas control (Figura 28B).



**Figura 28.** Contenido de glutatión (GSH) (A) y concentración de malondialdehído (MDA) (B) en hígado en ratas delgadas y obesas alimentadas con dieta control (LB y OB) y en ratas obesas alimentadas con dieta suplementada al 3,5 % con cutículas de *P. ovata* (OP) durante 10 semanas. Los valores se expresan como media  $\pm$  EEM ( $n=7-8$ ). Entre los valores que presentan letras distintas existe diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).

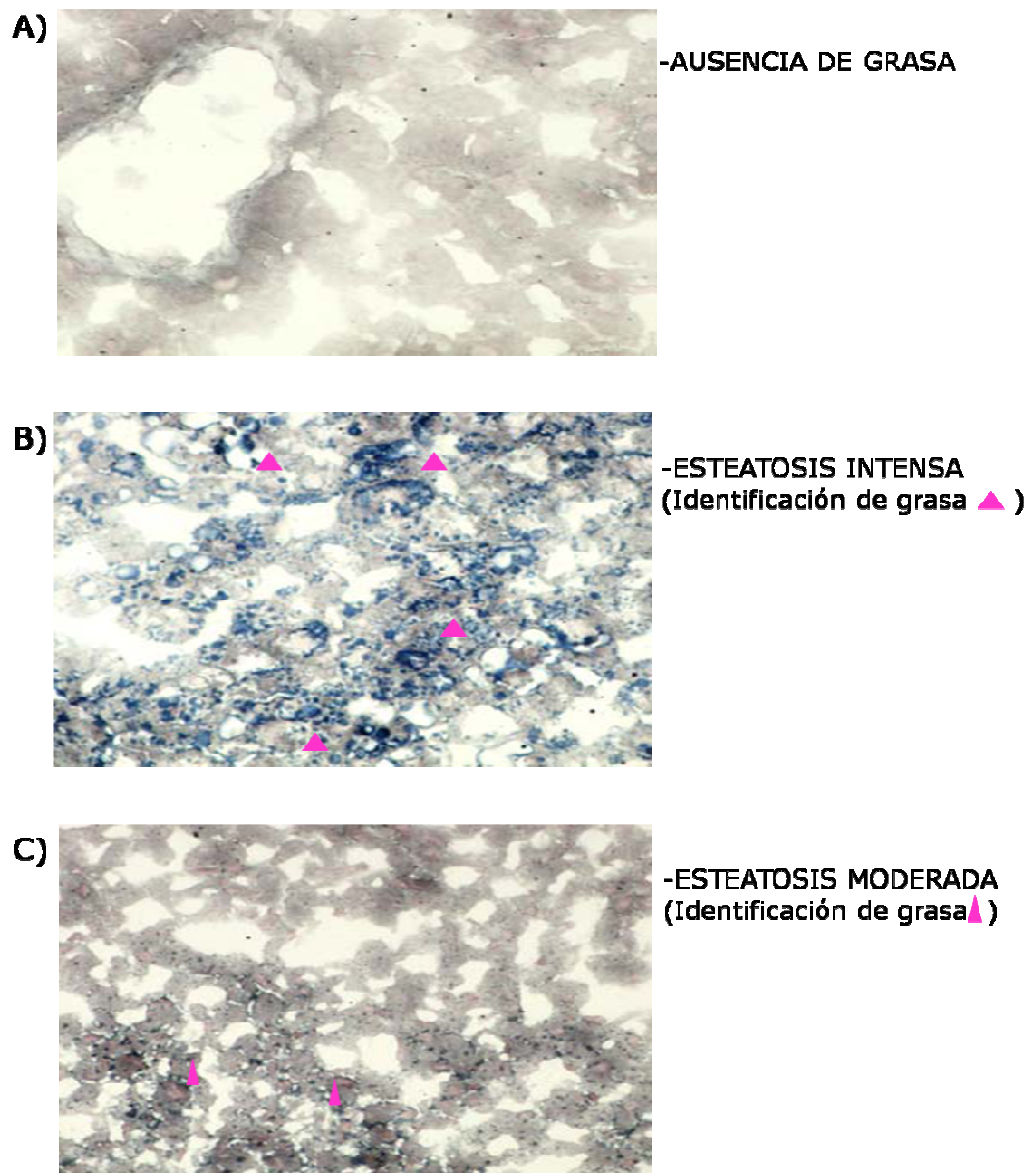


### 3.1.7. ESTUDIO HISTOLÓGICO

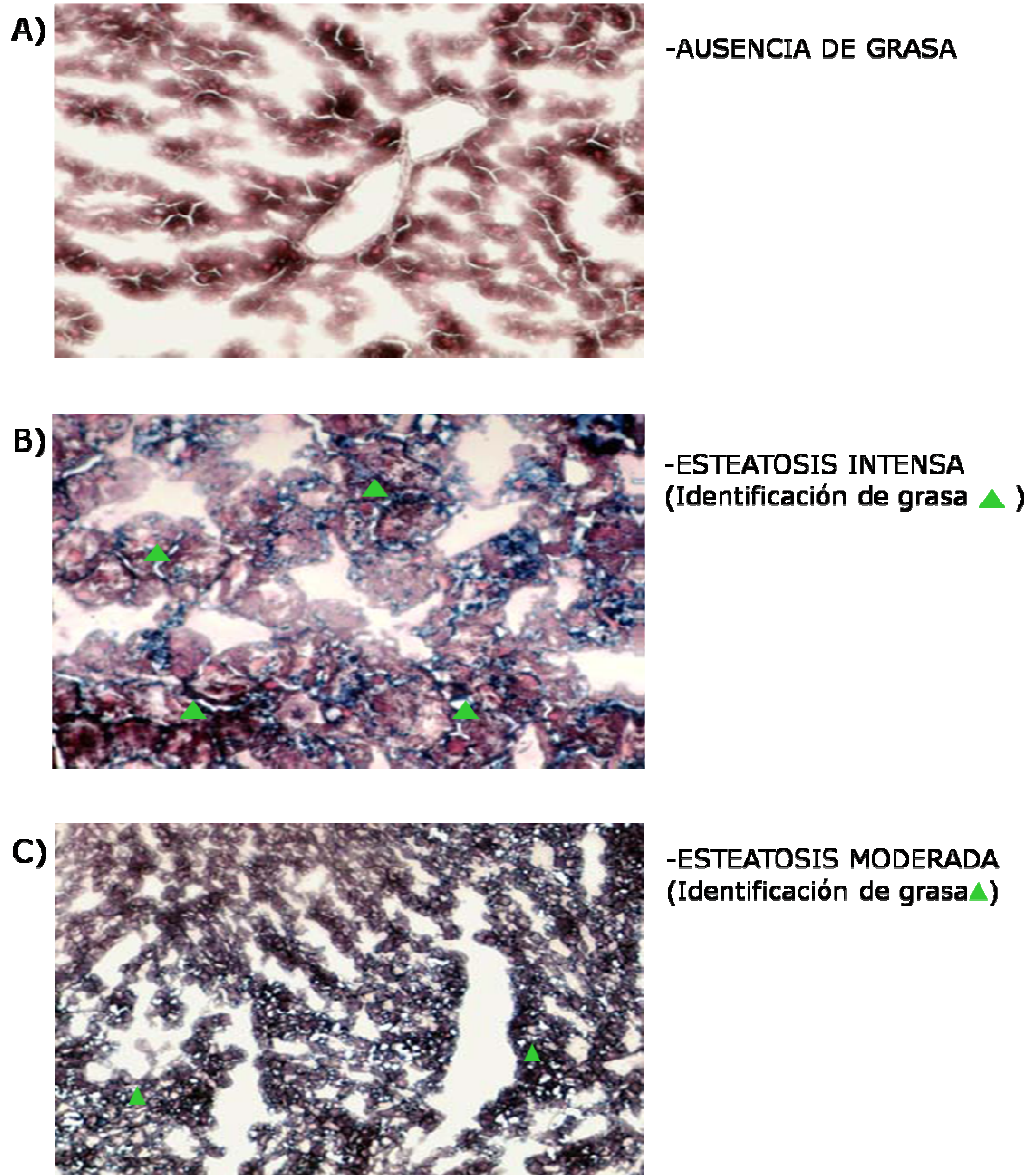
Se analizó el daño hepático y la acumulación de lípidos en las muestras de hígados de los grupos de ratas OB y OP, en relación con la histología normal que presentaban las ratas delgadas para poner de manifiesto el grado de esteatosis y daño hepático en la rata Zucker obesa y el efecto de la ingesta de la dieta suplementada con cutículas de *P. ovata*. En la tabla 11 se resumen los resultados de las distintas características histopatológicas examinadas.

#### **ESTEATOSIS HEPÁTICA**

Con la tinción de sudán negro estándar la grasa adquiere un color negro-azulado, que nos permite evaluar el grado de esteatosis hepática en cada grupo de ratas. En el grupo de ratas delgadas no se observa presencia de grasa, siendo esta muy abundante en el grupo de ratas obesas control. La esteatosis en las ratas OP fue moderada, encontrando menor número de hepatocitos con lípidos en el citoplasma respecto a las ratas OB (Figura 29). Estos resultados se confirman en la tinción de sudán negro con pretratamiento con bromo (Figura 30).



**Figura 29.** Imágenes de microscopía óptica representativos de rata delgada (LB 100X) (A), rata obesa control (OB 100X) (B), y rata obesa alimentada con dieta suplementada al 3,5 % con cutículas de *P. ovata* durante 10 semanas. (OP 76X) (C). Esteatosis hepática (▲). (Tinción Sudán-negro).



**Figura 30.** Imágenes de microscopía óptica representativos de rata delgada (LB 50X) (A), rata obesa control (OB 37X) (B), y rata alimentada con dieta suplementada al 3,5 % con cutículas de *P. ovata* durante 10 semanas. (OP 30X) (C). Esteatosis hepática (▲). (Tinción Sudán-negro con pretratamiento con bromo).

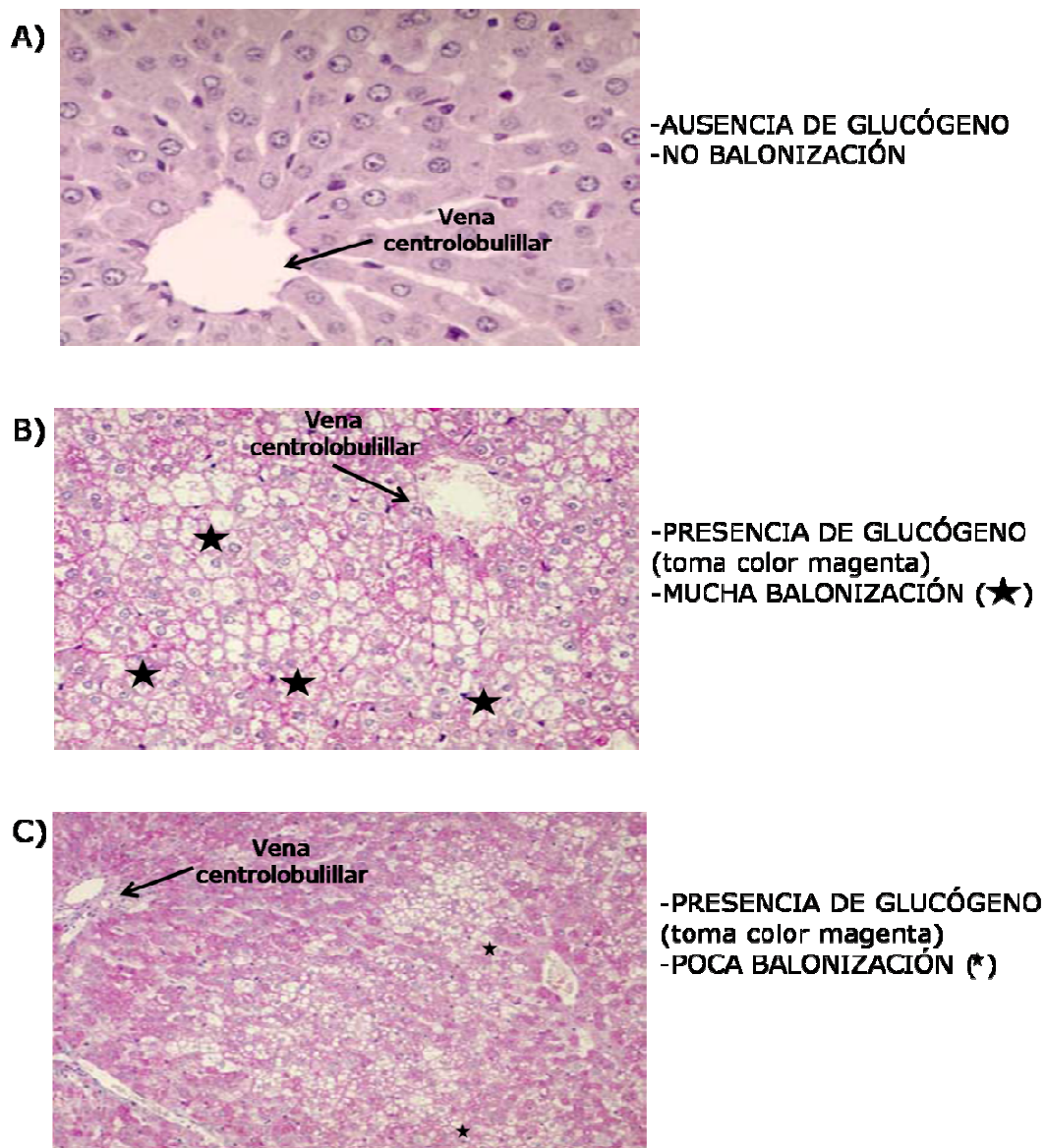
## **DAÑO HEPÁTICO**

El daño hepático de las muestras de hígado procedentes de los distintos grupos experimentales se ha valorado atendiendo a dos parámetros:

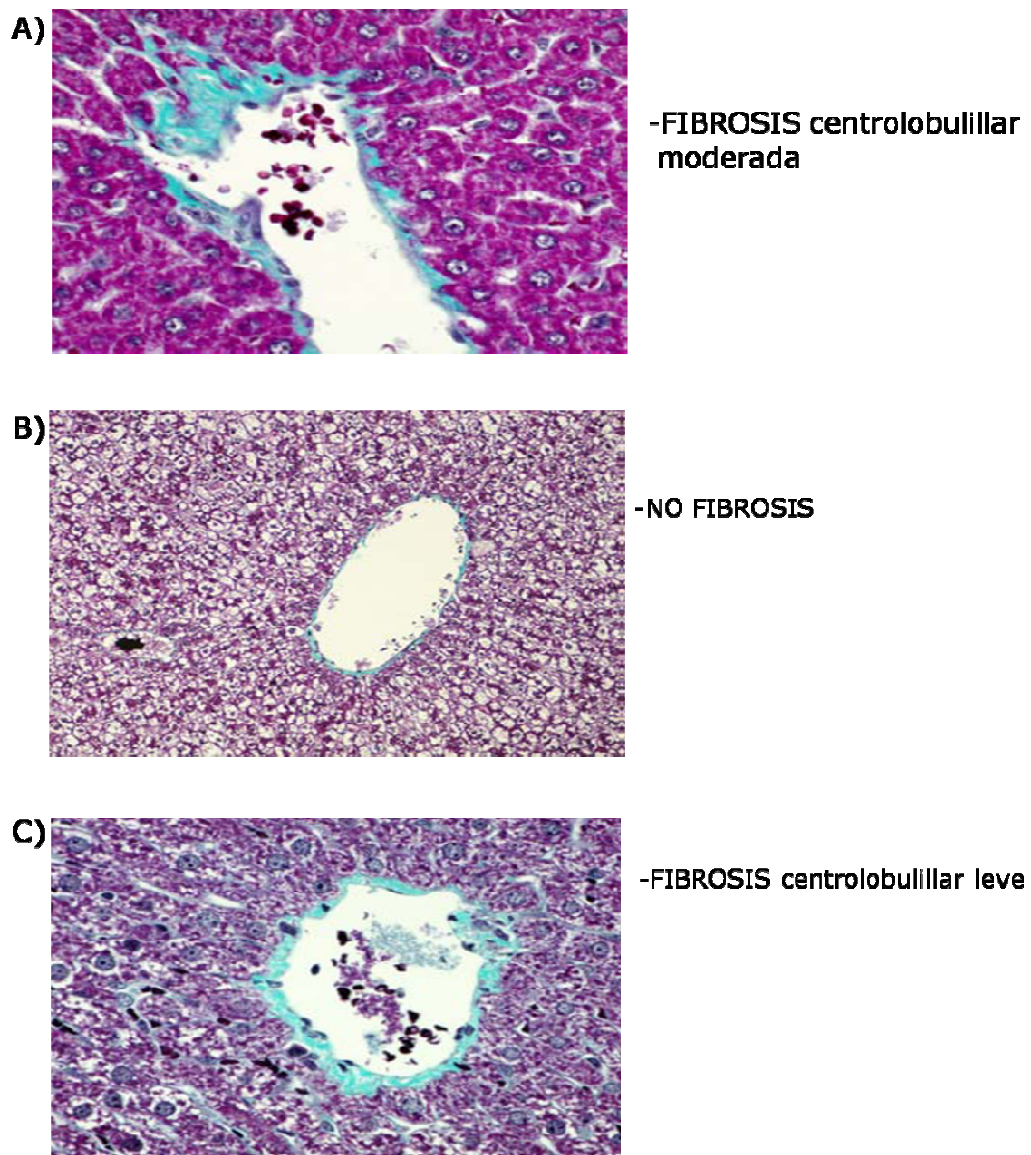
- Balonización de los hepatocitos
- Fibrosis (componente de un daño hepático crónico)

La tinción PAS, permitió detectar la presencia de glucógeno y la balonización de los hepatocitos, indicativas del daño hepático. Frente a las ratas LB, en las que no había daño hepático según este parámetro (ausencia de glucógeno y nula balonización de los hepatocitos), los hígados de las ratas OB se caracterizaron por una presencia leve de glucógeno acompañada de un importante grado de balonización. Ésta afectó a una menor proporción de los hepatocitos de los hígados de las ratas OP, que además mostraron una menor acumulación de glucógeno en comparación con los de las ratas OB (Figura 31).

La tinción de tricrómico de Masson, se empleó para valorar la fibrosis hepática. El grupo de ratas delgadas mostró un daño hepático crónico valorado por una lesión con intensidad moderada (fibrosis perisinusoidal y fibrosis centrololulillar). Los hígados de las ratas OB se caracterizaron por ausencia de fibrosis, mientras que en los hígados de las ratas alimentadas con cutículas de *P. ovata* la fibrosis fue leve (fibrosis perisinusoidal y fibrosis centrolobulillar) (Figura 32).



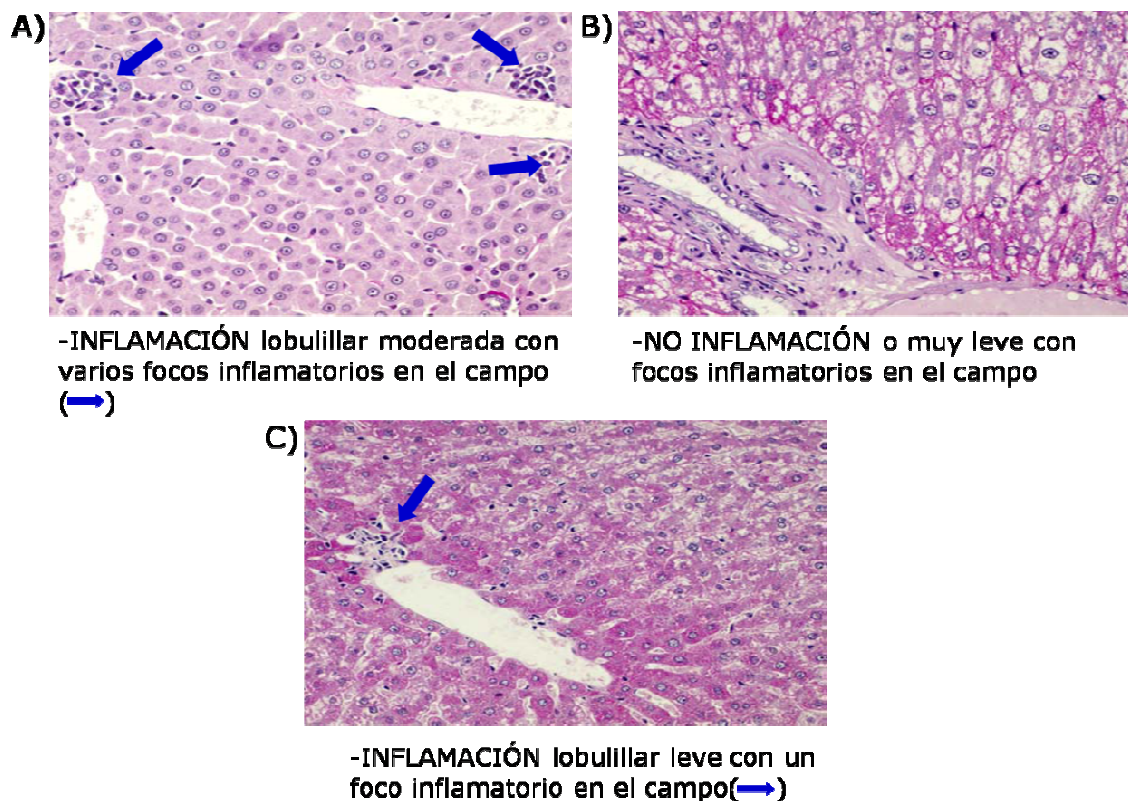
**Figura 31.** Imágenes de microscopía óptica representativos de rata delgada (LB 100X) (A), rata obesa control (OB 30X) (B), y rata obesa alimentada con dieta suplementada al 3,5 % con cutículas de *P. ovata* durante 10 semanas (OP 25X) (C). Balonización hepatocitaria (★), Acumulación de glucógeno. (Tinción PAS).



**Figura 32.** Imágenes de microscopía óptica representativos de rata delgada (LB 100X) (A), rata obesa control (OB 25X) (B), y rata obesa alimentada con dieta suplementada con cutículas de *P. ovata* durante 10 semanas (OP 100X) (C). Fibrosis hepática. (Tinción Tricrómico de Masson).

## **INFLAMACIÓN**

La inflamación hepática (lobulillar y portal) estaba presente en todos los grupos experimentales, mostrando una intensidad muy leve (0-2 focos inflamatorios (flechas) en los hígados de las ratas obesas control. Esta inflamación fue crónica-moderada, con 2-4 focos inflamatorios, en las ratas delgadas control, mientras que en las ratas OP el grado de la inflamación fue leve (> 2 focos inflamatorios) (Figura 33).



**Figura 33.** Imágenes de microscopía óptica representativos de rata delgada (LB 60X) (A), rata obesa control (OB 67X) (B), y rata obesa alimentada con dieta suplementada al 3,5 % con cutículas de *P. ovata* durante 10 semanas (OP 50X) (C). Inflamación hepática. Focos inflamatorios (→). (Tinción PAS).

**Tabla 11.** Porcentaje de animales que presentaban características histológicas relacionadas con esteatosis y daño hepático en los distintos grupos experimentales.

		% de animales que presentan la característica			
	Graduación	LB	OB	OP	
<b>Grado de esteatosis</b>	<5%	100	0	16,7	
	5-33%	0	0	33,3	
	>33-66%	0	16,7	50	
	>66%	0	83,3	0	
<b>Balonización (injuria hepatocito)</b>	No	66,7	0	50	
	Pocos	33,3	0	0	
	Muchos	0	100	50	
<b>Fibrosis</b>	Ausente	0	100	50	
	Presente	100	0	50	
<b>Inflamación lobulillar</b>	No focos	0	0	16,7	
	<2 focos	100	33,3	83,3	
	2-4 focos	0	66,7	0	
	>4 focos	0	0	0	
<b>Glucógeno</b>	Ausente	100	0	0	
	Leve	0	16,7	50	
	Moderado	0	83,3	50	
	Intenso	0	0	0	

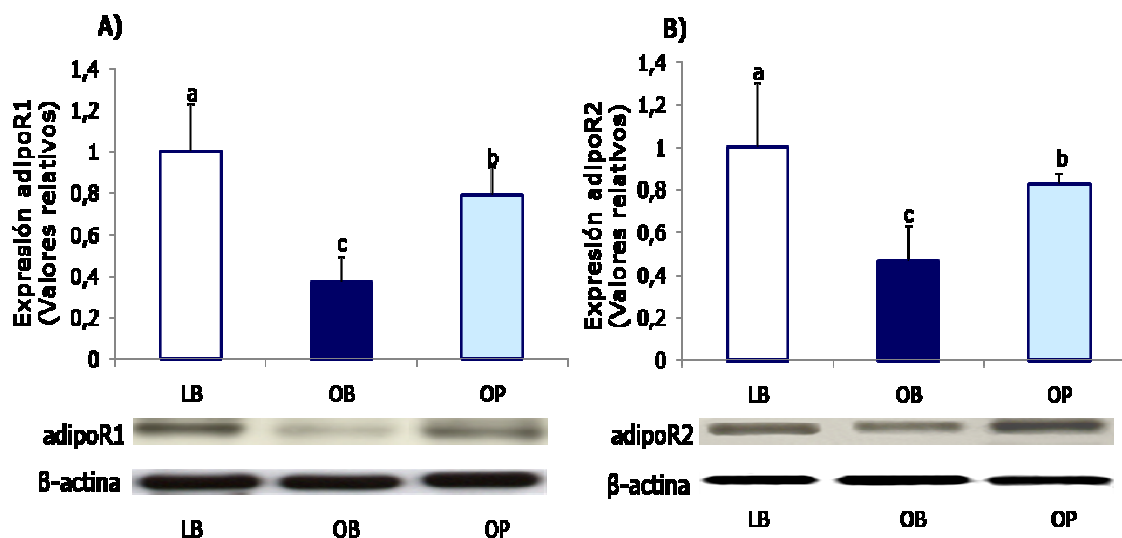
Grupos experimentales: LB, ratas delgadas control; OB, ratas obesas control; OP, ratas obesas alimentadas con una dieta suplementada con cutículas de *P. ovata* durante 10 semanas.



## 3.2. TEJIDO ADIPOSO VISCERAL

### 3.2.1. EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE ADIPONECTINA, ADIPOR1 Y ADIPOR2, EN EL TEJIDO ADIPOSO VISCERAL

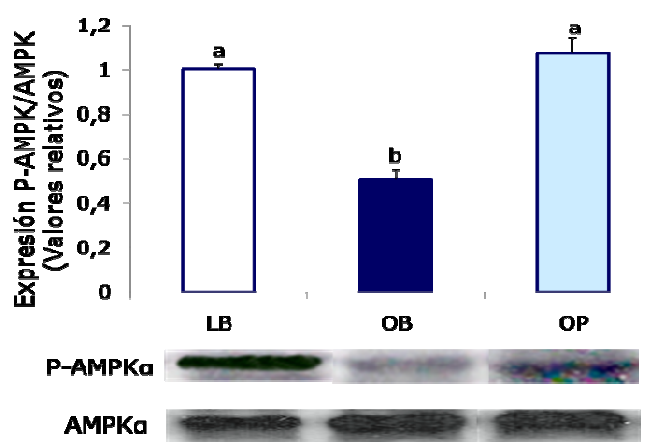
Los resultados obtenidos en el tratamiento anterior se confirmaron nuevamente en este tratamiento (Figura 34).



**Figura 34.** Expresión proteica de los receptores de adiponectina, adipoR1 (A) y adipoR2 (B) en el tejido adiposo visceral de ratas delgadas y obesas alimentadas con dieta control (LB y OB) y en ratas obesas alimentadas con dieta suplementada al 3,5 % con cutículas de *P. ovata* (OP) durante 10 semanas. Los valores relativos están expresados como media  $\pm$  EEM (n=10) y proceden del análisis densitométrico en relación a la  $\beta$ -actina, asignando el valor 1,0 al grupo LB. Entre los valores que presentan letras distintas existe diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).

### 3.2.2. EXPRESIÓN DE AMPK TOTAL Y FOSFORILADA

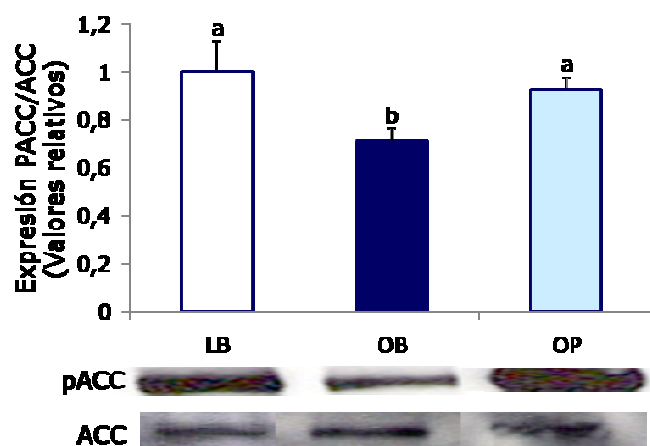
Para valorar la activación de esta enzima en el TAV, analizamos tanto la expresión total de la subunidad  $\alpha$  como la de su fracción fosforilada en Thr<sup>172</sup> (activada), mediante western blot. Se observó una reducción significativa en la fosforilación de la AMPK en las ratas obesas control comparadas con los niveles que presentan las ratas delgadas ( $p < 0,05$  vs. OB), mientras que la expresión total de la misma permaneció constante. Las ratas Zucker obesas alimentadas con cutículas de *P. ovata*, mostraron un aumento en la fosforilación de la AMPK del 52% con respecto a las ratas obesas control ( $P < 0,01$ ) restaurándose la activación de esta vía (Figura 35).



**Figura 35.** Expresión proteica de la enzima AMPK en su forma constitutiva y en su forma fosforilada en el TAV de ratas delgadas y obesas alimentadas con dieta control (LB y OB) y en ratas alimentadas con una dieta suplementada al 3,5 % con cutículas de *P. ovata* (OP) durante 10 semanas. Los valores relativos están expresados como media  $\pm$  EEM ( $n=10$ ) y reflejan la relación densitométrica entre la fracción fosforilada de la AMPK y el total de la proteína, asignando el valor 1,0 al grupo LB. Entre los valores que presentan letras distintas existe diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).

### 3.2.3. EXPRESIÓN DE ACC TOTAL Y FOSFORILADA

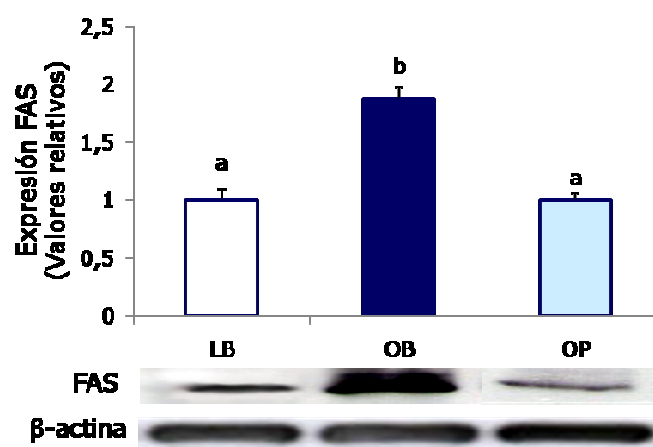
La expresión de la enzima en su forma constitutiva, permaneció constante, en todos los grupos experimentales. Las ratas obesas control presentaron un menor grado de fosforilación comparado con el de las ratas delgadas ( $p < 0,05$ ). Los valores de p-ACC en las ratas OP presentaron un aumento de un 23% en relación con las ratas OB ( $p < 0,05$ ) (Figura 36).



**Figura 36.** Expresión proteica de la enzima ACC en su forma constitutiva y en su forma fosforilada en el TAV de ratas delgadas y obesas alimentadas con dieta control (LB y OB) y en ratas obesas alimentadas con una dieta suplementada al 3,5 % con cutículas de *P. ovata* (OP) durante 10 semanas. Los valores relativos están expresados como media  $\pm$  EEM ( $n=10$ ) y reflejan la relación densitométrica entre la fracción fosforilada de la ACC y el total de la proteína, asignando el valor 1,0 al grupo LB. Entre los valores que presentan letras distintas existe diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).

### 3.2.4. EXPRESIÓN DE FAS EN TEJIDO ADIPOSO VISCERAL

Con los resultados obtenidos para las enzimas AMPK y ACC, cabía esperar que la expresión de la FAS en el TAV de las ratas obesas control se encontrara aumentada con respecto a la de las ratas delgadas control, y efectivamente, se observó incremento de la expresión de la FAS en TAV de ratas OB en un 47% con respecto a las LB ( $P < 0,01$ ). La expresión de esta proteína en el TAV de las ratas alimentadas con cutículas de *P. ovata*, disminuyó significativamente con respecto a la de las ratas OB ( $p < 0,001$ ), siendo similar a la encontrada en las ratas delgadas (Figura 37).



**Figura 37.** Expresión proteica de la enzima FAS en el tejido adiposo visceral de ratas delgadas y obesas alimentadas con dieta control (LB y OB) y en ratas obesas alimentadas con una dieta suplementada al 3,5 % con cutículas de *P. ovata* (OP) durante 10 semanas. Los valores relativos están expresados como media  $\pm$  EEM ( $n=10$ ) y proceden del análisis densitométrico en relación a la  $\beta$ -actina, asignando el valor 1,0 al grupo LB. Entre los valores que presentan letras distintas existe diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).



*Discusión*

---



Promover un estilo de vida saludable, con la práctica periódica de una actividad física moderada y el consumo de una dieta equilibrada, supone una aproximación alternativa en la prevención y el tratamiento no farmacológico del síndrome metabólico (Cereal Foods World 2001; Jones *y cols.*, 2006; Cummings *y cols.*, 2009; Codex Alimentarius Commission 2008; Aleixandre *y cols.*, 2008; Galisteo *y cols.*, 2008). Entre las recomendaciones dietéticas promovidas para controlar las alteraciones metabólicas encuadradas dentro de este síndrome destaca la ingesta de una dieta rica en fibra dietética, ya que este componente alimentario reduce la ganancia de peso, disminuye la dislipidemia y la hipertensión y mejora la sensibilidad a la insulina.

En investigaciones previas, nuestro grupo puso de manifiesto que la ingesta de una dieta suplementada en un 3,5% con cutículas de *P. ovata* durante 25 semanas, prevenía o disminuía la aparición de hipertensión, dislipidemia, obesidad e hiperinsulinemia en ratas Zucker obesas de 6 semanas en las que las alteraciones características del síndrome metabólico aún no se habían desarrollado en su totalidad. Observamos además una mejoría importante en el desequilibrio en la producción de adipocitoquinas por el tejido adiposo propio de este modelo, al encontrar una menor producción de citoquinas inflamatorias como el TNF- $\alpha$  y un aumento en la secreción de adiponectina (Galisteo *y cols.*, 2005). Tratando de ahondar en las propiedades beneficiosas de esta fibra (constituida por polisacáridos complejos como arabinosa, manosa y ácidos urónicos, y que contiene mayoritariamente fibra soluble y fermentable), nos propusimos analizar sus posibles efectos beneficiosos en un modelo de síndrome metabólico con alteraciones claramente establecidas. Además, para arrojar luz sobre los posibles mecanismos implicados en las acciones de esta fibra sobre la homeostasis energética y las alteraciones metabólicas presentes en este modelo experimental, decidimos comparar sus efectos con los producidos por la ingesta de dietas suplementadas con otras fibras dietéticas dotadas de propiedades diferentes de solubilidad y fermentabilidad. Concretamente, realizamos estudios con dietas suplementadas al 3,5% en celulosa microcristalina, el compuesto más abundante de las paredes celulares de las plantas y considerado fibra insoluble, o en metilcelulosa, una fibra dietética obtenida por alteración química de la celulosa mediante la sustitución de átomos de H por radicales CH<sub>3</sub>, con propiedades de fibra soluble y no fermentable.



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

Seleccionamos para nuestras investigaciones la rata Zucker obesa (*fa/fa*) como modelo de síndrome metabólico, pues presenta las alteraciones propias de este síndrome en humanos. Utilizamos ratas Zucker macho (*fa/fa*) de 15 semanas de edad, en las que ya estaban instaurados desórdenes metabólicos como obesidad, hiperlipidemia, resistencia a la insulina e hipertensión moderada en relación con las ratas delgadas (*fa/+*) de la misma edad. La mayor parte de estas alteraciones se incrementaron a lo largo de las 10 semanas de período experimental.

## 1.1. PESO CORPORAL E INGESTA

Al iniciar nuestros experimentos, las ratas (*fa/fa*) ya eran manifiestamente obesas con un peso corporal entre un 21-23% superior al de las ratas (*fa/+*), valor que al final del período experimental se incrementó hasta un 26-27%. La rata Zucker obesa (Zucker Fatty Rat) surge como resultado de cruzar ratas de las cepas Merck Stok M y Sherman, y se caracteriza por presentar un fenotipo obeso vinculado a la mutación heredada con carácter autosómico recesivo "fatty" (*fa*) (Zucker y Zucker, 1968), que afecta al receptor para la leptina Ob-R, en el que el resto de glutamina de la posición 268 es sustituido por otro de prolina (Chua y cols., 1996). Como consecuencia de esta mutación, el receptor Ob-R experimenta una disfunción que se traduce tanto en una disminución en el número de receptores expresados en la superficie celular como en la alteración en la cascada de señalización intracelular mediada a través de su activación, dando lugar a una marcada resistencia a la acción de la leptina, aunque dicha mutación no implica una ausencia total del efecto de esta molécula (Crouse y cols., 1998; Da Silva, y cols., 1998). Los animales homocigotos para el alelo *fa* (*fa/fa*) muestran obesidad manifiesta entre la 3ª y la 5ª semana de vida. Cuando alcanzan las 14 semanas de edad su contenido lipídico supone más del 40% de su composición corporal. En cambio, las ratas con genotipo dominante (*+/+*) y heterocigótico (*fa/+*) no presentan obesidad, y se consideran controles sanos (Arias-Díaz y cols., 2007). Las ratas Zucker obesas desarrollan procesos de hiperplasia e hipertrofia adipocitaria (Johnson y cols., 1971), dando lugar a un crecimiento anormal del tejido adiposo desde su primera semana de vida, antes de que se produzca ningún exceso en la ingesta. Este

hecho es indicativo de una alteración en los mecanismos de homeostasis energética en estos animales desde su nacimiento (Boulangé *y cols.*, 1979), y que se agrava con la edad. La hiperfagia es uno de los principales factores para la formación de depósitos lipídicos en las ratas (*fa/fa*), si bien no es el único que interviene (Argiles *y cols.*, 1989). Así, se ha observado que aunque la restricción de comida durante toda la vida consigue reducir el peso corporal de estos animales, las ratas Zucker obesas conservan siempre una proporción de lípidos aproximadamente del 50% del peso corporal, frente al 20% que presentan las ratas Zucker delgadas de la misma camada (Cleary *y cols.*, 1980), lo que apunta a la contribución de otros mecanismos en el desarrollo de la obesidad en este modelo.

En nuestros experimentos observamos que la ingesta dietética de los animales obesos fue desde el inicio un 15% superior a la de las ratas delgadas, diferencia que se mantuvo estable durante las 10 semanas del período experimental. Este hecho se puede atribuir a la hiperfagia propia de este modelo experimental, que es más notoria durante las primeras semanas de vida, estabilizándose aproximadamente hacia la semana 10. En ese momento cobran mayor importancia otros mecanismos en el desarrollo de la obesidad (Vasselli *y cols.*, 1985). Dado que en nuestros estudios empleamos animales de 15 semanas, la mayor ingesta en las ratas obesas con respecto a las ratas delgadas responde al comportamiento hiperfágico, que sigue siendo patente a esta edad, si bien el hecho de que se mantuviera estable durante todo el período experimental encaja con la estabilización de esta alteración al alcanzar la edad adulta. Esta hiperfagia tiene su origen en el deterioro de las acciones de la leptina (por la mutación genética de su receptor) y el control de la ingesta, que es uno de sus principales efectos, resulta comprometido (Niswender *y cols.*, 2001).

## 1.2 ALTERACIONES BIOQUÍMICAS EN PLASMA

Como era de esperar teniendo en cuenta la mutación que presentan en el receptor Ob-R, los niveles plasmáticos de leptina en las ratas obesas eran unas 15-20 veces superiores a los encontrados en las ratas delgadas. Este aumento en la producción de leptina en las ratas obesas se produce para compensar su defecto funcional en el receptor Ob-R, aunque, pese a producirse, la leptina no llega a ejercer de forma eficaz sus efectos (Houseknecht *y cols.*, 1998). La función principal de esta molécula consiste en regular el balance energético (Zang *y cols.*, 1994), controlando la secreción de insulina desde las células  $\beta$ -pancreáticas e inhibiendo su síntesis y liberación en función de las necesidades determinadas por la cantidad de grasa

almacenada. A su vez, la insulina estimula la síntesis y secreción de leptina por el tejido adiposo (Seufert *y cols.*, 2004). El defecto en la señalización de la leptina sobre las células  $\beta$ -pancreáticas da lugar a una mayor secreción de insulina, que estimula la liberación de leptina, provocando un agravamiento de la resistencia a esta última (Seufert *y cols.*, 2004). El aumento en la secreción de insulina origina un incremento de la lipogénesis en el tejido adiposo y de la actividad enzimática lipoproteinlipasa (LPL), promoviendo una acumulación lipídica intracelular y el crecimiento de este tejido. El aumento en la síntesis lipídica, junto con el excesivo aporte exógeno de nutrientes a través de la dieta, acarrea la aparición de lipotoxicidad, que determina que en los tejidos insulino-dependientes se reduzca la acción de la insulina provocando resistencia a la misma (Argiles *y cols.*, 1989; Unger *y cols.*, 2003). Esta resistencia promueve de forma compensatoria una mayor liberación de insulina, lo que acompañado por un menor aclaramiento de la hormona a nivel hepático, da lugar a hiperinsulinemia. La aparición de altos niveles plasmáticos de insulina en la rata Zucker obesa ocurre alrededor de la 3ª semana de vida. Otros estudios han puesto de manifiesto que a la edad del inicio de nuestros experimentos (15 semanas), las ratas Zucker obesas presentan una marcada hiperinsulinemia, con valores plasmáticos de esta hormona en ayunas 8 veces superiores a los de las ratas delgadas (Rivera *y cols.*, 2008; 2009). Esos elevados valores de insulinemia se incrementaron con la edad, pues al finalizar el período experimental de nuestros estudios eran unas 12 veces más altos que los de las ratas delgadas.

También comprobamos que el plasma de las ratas (*fa/fa*) presentaba un contenido en AGL, triglicéridos y colesterol muy superior al de las ratas (*fa/+*), lo que le confería en muchas ocasiones un aspecto lechoso. Existe un desequilibrio entre la síntesis y la oxidación de lípidos en el hígado de estos animales (Chanussot *y cols.*, 1983), acompañado de una menor oxidación de AGL en los tejidos (Wang *y cols.*, 1984). El agravamiento de la hiperlipidemia con la edad es el resultado de una ingesta elevada de nutrientes de forma crónica en el marco de la resistencia a la leptina y a la insulina. Para favorecer la captación de glucosa, la insulina induce en las células de tejidos insulino-resistentes la expresión de enzimas lipogénicas mediante la activación del factor de transcripción lipogénico SREBP-1c, dotando a la célula de la maquinaria necesaria para la síntesis *de novo* de lípidos. Estas enzimas lipogénicas se encuentran sobre-expresadas en casos de resistencia a la insulina, con lo que la lipogénesis aumenta de forma considerable. Los nuevos lípidos sintetizados, más los aportados por la dieta, circulan en grandes cantidades por el torrente sanguíneo. Además, al existir resistencia a la leptina, el papel protector que esta molécula ejerce sobre el proceso favoreciendo la oxidación de los AGL (Unger *y cols.*, 2003) a través del incremento de la actividad de la AMPK,

e inhibiendo la expresión de los factores de transcripción lipogénicos (principalmente SREBP-1c) queda anulado, lo que determina un aumento de la acumulación de lípidos en tejidos no adiposos, como hígado y músculo esquelético, contribuyendo a las alteraciones metabólicas del síndrome (Kakuma y cols., 2000).

La concentración plasmática de glucosa en ayunas de las ratas Zucker (*fa/fa*) fue similar o ligeramente superior a la que presentaban las ratas (*fa/+*) dependiendo de las investigaciones realizadas. La hiperglucemia que presentan estos animales, a diferencia de otros como los ratones (*db/db*) y (*ob/ob*), es discreta o inexistente, variando según las camadas. Esto hace que su utilidad como modelo experimental de diabetes de tipo 2 sea cuestionable. Sin embargo, presenta, como se ha descrito anteriormente, otras complicaciones metabólicas similares a las descritas en el síndrome metabólico humano, como la hiperinsulinemia secundaria a la resistencia periférica a la insulina, que va a afectar a otros tejidos dependientes de esta hormona como músculo esquelético e hígado (Argilés y cols., 1989).

### 1.3 ALTERACIONES EN TEJIDOS INSULINO-RESISTENTES

Una de las principales consecuencias de la resistencia a la leptina en este modelo es el importante crecimiento del tejido adiposo visceral. En nuestros experimentos, como era de esperar, al final del período experimental, el peso de este tejido en las ratas obesas fue un 80% superior al de las delgadas. Hoy se conoce que además de la tradicional función de depósito de energía en forma de triglicéridos y la consecuente producción de AGL, el adipocito posee actividad de célula secretora, con la producción de numerosas moléculas hormonales llamadas adipocitoquinas que intervienen en la regulación de la homeostasis energética y la sensibilidad a la insulina (Mora y cols., 2002). En la obesidad existe un desequilibrio en la producción de estas adipocitoquinas que desempeña un importante papel en el desarrollo de las alteraciones que se manifiestan en los tejidos insulino-resistentes. En nuestros experimentos observamos que existe una importante alteración en el patrón de secreción de dos adipocitoquinas muy relacionadas con la sensibilidad a la insulina en las ratas Zucker (*fa/fa*). La producción de TNF- $\alpha$  por el tejido adiposo visceral de las ratas obesas duplicaba a la encontrada en las ratas delgadas, mientras que la secreción de adiponectina disminuía considerablemente. La secreción de TNF- $\alpha$  está correlacionada positivamente con la obesidad

y la resistencia a la insulina (Ruan *y cols.*, 2003; Hotamisligil *y cols.*, 1993; Hotamisligil *y cols.*, 2003). El TNF- $\alpha$  deteriora la señalización de la insulina alterando el estado de fosforilación de los sustratos de su receptor, IRS-1 e IRS-2 (Hotamisligil *y cols.*, 2003) bien de forma directa o indirecta, a través del incremento de AGL (Ruan *y cols.*, 2003). La menor producción de adiponectina también está asociada con un incremento en la resistencia a la insulina, y se acompaña además por defectos en el metabolismo glucídico y lipídico. La adiponectina mejora la resistencia a la insulina por incrementar la oxidación de los ácidos grasos (Berg *y cols.*, 2002; Yamauchi T *y cols.*, 2001) y por suprimir la producción de glucosa a nivel hepático (Combs *y cols.*, 2001; Berg *y cols.*, 2001), acciones que desencadena a través de sus receptores (Wu *y cols.*, 2003). En las muestras de tejido adiposo de las ratas obesas control de nuestro estudio, observamos una disminución en la expresión proteica de los receptores para adiponectina con respecto a las ratas delgadas, lo que da lugar a acciones menos eficaces de esta adipocitoquina, como se pone de manifiesto con una menor activación de la enzima AMPK, con la consecuente disminución en la fosforilación e inhibición de la ACC y una mayor expresión de la FAS frente al grupo de ratas delgadas, una secuencia de acontecimientos que contribuye a explicar la mayor producción de AGL en este modelo de rata Zucker obesa y su liberación e incremento en el torrente circulatorio, participando en el agravamiento de la resistencia a la insulina.

El hígado es otro tejido con una gran implicación en los desórdenes metabólicos que ocurren en el síndrome metabólico. Desempeña un papel importante en la homeostasis energética, interviniendo en el control del metabolismo glucídico y lipídico. En nuestros estudios el peso hepático de los animales obesos fue un 43% superior al de los delgados, confirmando la hepatomegalia que ha sido descrita en este modelo experimental por otros autores (Bach *y cols.*, 1981; Galisteo *y cols.*, 2005; Rivera *y cols.*, 2008; 2009). Además, por técnicas tanto bioquímicas como histológicas observamos que las ratas Zucker obesas presentaban un contenido hepático de triglicéridos y colesterol muy superior al de las ratas delgadas. La esteatosis hepática está relacionada con la resistencia a la leptina y con la pérdida de las funciones de esta molécula (Zhang *y cols.*, 1994). De hecho, en modelos experimentales de obesidad inducida por una dieta rica en grasa en roedores sanos, el crecimiento de la masa de tejido adiposo conduce a un aumento en la producción de leptina (Zhang *y cols.*, 2002) y de su concentración plasmática, aunque esta molécula ejerce sus efectos de forma normal y el depósito ectópico de lípidos es mínimo. Por el contrario, en animales resistentes a la leptina, el depósito de lípidos en el hígado es mucho mayor, incluso

cuando son alimentados con una dieta baja en grasa (Lee *y cols.*, 2001). Este hecho indica que la leptina es determinante en el destino del exceso de grasa aportado por la dieta.

Otro parámetro que encontramos notablemente alterado en el hígado de las ratas Zucker obesas fue la expresión de los receptores adipoR1 y adipoR2, que se encontraban disminuidas con respecto a la de las ratas delgadas. Estos receptores juegan un importante papel en el metabolismo glucídico y lipídico a nivel hepático. Existen estudios en humanos donde la expresión de este receptor se encuentra disminuida en pacientes con hígado graso (Shimizu *y cols.*, 2007). Se ha visto que la interacción de la adiponectina con adipoR1 conduce a la activación de la AMPK (Yamauchi *y cols.*, 2002). La actividad de esta enzima se encuentra disminuida en tejidos de ratas que presentan un defecto en la funcionalidad del receptor de la leptina (Yu *y cols.*, 2004). En el hígado de las ratas Zucker obesas observamos, junto a la menor expresión de adipoR1, una disminución en la activación de la AMPK, con la consiguiente menor fosforilación/inhibición de la ACC y un aumento considerable de la expresión de la FAS con respecto a las ratas delgadas. Esta secuencia de efectos contribuye a justificar la elevada concentración de lípidos existente en este órgano en las ratas obesas de nuestros estudios. A estas observaciones, tenemos que añadir que las ratas Zucker obesas presentaban un aumento en la expresión hepática de SREBP-1c y SREBP-2 con respecto a las ratas delgadas. En estos tejidos insulino-resistentes, para favorecer la captación de glucosa, la insulina induce en las células la expresión de enzimas lipogénicas mediante la activación de los factores de transcripción SREBP-1c (regulador de la expresión de la mayoría de genes implicados en la síntesis de triglicéridos) y SREBP-2 (involucrado en la regulación de la expresión de la mayoría de genes que intervienen en la síntesis de colesterol), dotando a la célula de la maquinaria enzimática necesaria para la síntesis *de novo* de lípidos. Estas enzimas lipogénicas se encuentran sobre-expresadas en casos de resistencia a la insulina, con lo que la lipogénesis aumenta de forma considerable (Shimomura *y cols.*, 1999; 2000). En nuestros experimentos, este aumento de la expresión hepática de los factores lipogénicos SREBP-1c y SREBP-2 en las ratas obesas control transcurre de forma paralela a la disminución de la activación por fosforilación de la AKT, lo que conlleva un alteración de la capacidad de la insulina por suprimir la gluconeogénesis en el hígado en estos animales. En este sentido, no hay que olvidar la estrecha correlación que existe entre resistencia a la insulina y esteatosis. Incluso, se ha sugerido que en distintos tipos de resistencia a la insulina en humanos existe una resistencia insulínica parcial a nivel hepático que tiene lugar a nivel post-receptorial, con alteraciones en las vías de señalización activadas por la unión de la insulina a sus receptores en el hígado (Semple *y cols.*, 2009). De hecho, paradójicamente, en ratones con resistencia a

la insulina se ha observado que tras la unión de esta hormona a sus receptores hepáticos se ha producido una estimulación de la lipogénesis *de novo*, con la sobre-expresión de factores lipogénicos como SREBP-1c, mientras tenía lugar una disminución de la activación por fosforilación de AKT, responsable de la regulación de la gluconeogénesis hepática, pese a que ambas vías de señalización se encuentran asociadas a la unión de la insulina a sus receptores en este órgano (Brown y Goldstein, 2008).

Por otro lado, en la obesidad y el síndrome metabólico, el desequilibrio energético y el aumento de la acumulación de grasa en el hígado generan ROS e inducen estrés oxidativo en este tejido (Sarafidis y Nilsson, 2006; Mantena *y cols.*, 2008). En nuestros experimentos, las ratas Zucker obesas mostraban una disminución en la concentración hepática del antioxidante endógeno GSH, indicativo de una situación de estrés oxidativo. Además, la acumulación hepática de lípidos proporciona un sustrato adecuado que favorece la peroxidación, como pone de manifiesto la elevada proporción de TBARS en el hígado de las ratas Zucker (*fa/fa*) en relación con las (*fa/+*). La presencia de abundantes lípidos, unido a la menor protección ejercida por la adiponectina, al disminuir la expresión de sus receptores en este órgano, y por lo tanto la activación de las vías de señalización desencadenadas a través de los mismos, promueven un ambiente oxidativo en el hígado, que a su vez contribuye a la lipotoxicidad anteriormente descrita.

## 2. EFECTOS COMPARATIVOS DE LA INGESTA PROLONGADA DE DISTINTAS FIBRAS DIETÉTICAS EN RATAS ZUCKER OBESAS

La ingesta de dietas suplementadas con un 3,5% en cada una de las fibras objeto de estudio durante 10 semanas arrojó distintos efectos en las ratas obesas Zucker que se alimentaron con ellas. Así, observamos una mejora significativa de los principales desórdenes metabólicos característicos de este síndrome en los animales alimentados con la dieta suplementada con cutículas de *P. ovata*, encontrando un menor incremento del peso corporal, una reducción de la concentración plasmática de lípidos, insulina y leptina, un aumento en la secreción de adiponectina y una reducción en la de TNF- $\alpha$  en el tejido adiposo, junto con una menor acumulación de lípidos a nivel hepático. La dieta suplementada con metilcelulosa redujo el peso corporal y la hiperlipidemia y mejoró la secreción de adiponectina y TNF- $\alpha$  por

el tejido adiposo en las ratas obesas. La alimentación con celulosa microcristalina sólo redujo de forma significativa los niveles circulantes de AGL.

En los tres grupos de ratas obesas que recibieron durante 10 semanas las dietas suplementadas con los distintos tipos de fibra se observó un descenso de la ingesta con respecto al grupo de ratas obesas control. Este efecto puede ser atribuido al hecho de que la fibra dietética ejerce una acción central sobre la saciedad. Los alimentos ricos en fibra necesitan más tiempo para ser masticados, con lo que se produce más saliva, llevando a una disminución en el tiempo entre la ingesta y la sensación de saciedad. Este efecto es más intenso en el caso de las fibras solubles, pues al formar soluciones viscosas producen un retraso del paso de la comida desde el estómago al duodeno, contribuyendo a incrementar la saciedad y una disminución en la energía consumida, lo que puede repercutir, como de hecho observamos, en nuestros experimentos, en una reducción en la ganancia de peso corporal en las ratas obesas de los grupos OM y OP.

## 2.1. EFECTOS DE LA DIETA SUPLEMENTADA CON CUTÍCULAS DE *P. OVATA* EN RATAS ZUCKER OBESAS

La ingesta crónica de la dieta suplementada con cutículas de *P. ovata* produjo al finalizar el tratamiento una reducción del 11% en la ganancia de peso corporal en las ratas OP con respecto a las ratas obesas control, existiendo, de hecho, diferencias significativas en el peso corporal entre ambos grupos. Este efecto se puede explicar en parte por la acción saciante de esta fibra. Además del mecanismo general por el que las distintas fibras dietéticas producen saciedad, se ha demostrado que la fibra fermentable puede modular los niveles de distintas incretinas (Reimer y cols., 1996; Wang y cols., 2007). Uno de los productos de su fermentación en el colon, el butirato, incrementa la expresión de ARNm del péptido YY y del proglucagon (gen precursor del GLP-1) de manera dosis dependiente *in vitro* (Lin y cols., 2001; Zhou y cols., 2006), y el aumento en la secreción de péptido YY y GLP-1 resulta en un efecto saciante (Zhou y cols., 2006). En desórdenes metabólicos como la obesidad (VilSBoll y cols., 2001; Ranganath y cols., 1996; Verdich y cols., 2001; Mannucci y cols., 2000) y la resistencia a la leptina (Anini y cols., 2003), la secreción del péptido GLP-1 (Anini y cols., 2003) se encuentra disminuida, lo que compromete la sensación de saciedad. La administración de GLP-1 disminuye la ingesta y consecuentemente el peso corporal en animales y humanos (Orskov y cols., 1989; Elint y cols., 1998; Naslund y cols., 1999; Meier y



*cols.*, 2002; Zander *y cols.*, 2002). Otro péptido que interviene en la regulación de la homeostasis energética es la grelina, una hormona secretada por el estómago, cuyos niveles plasmáticos se encuentran elevados en las ratas Zucker obesas (Beck *y cols.*, 2003). La ingesta durante 25 semanas de dieta suplementada con cutículas de *P. ovata* a ratas obesas Zucker disminuyó los niveles circulantes de esta hormona, efecto que se acompañó de una disminución de la ingesta y del peso de estos animales (Galisteo *y cols.*, 2005). Aparte de este efecto saciante, se produce una disminución en la ingesta calórica en este grupo de ratas obesas con respecto a las alimentadas con dieta control, debido a la dilución de nutrientes por la incorporación de la fibra, que también podría repercutir en la menor ganancia de peso observada en nuestras ratas OP.

La ingesta de la dieta suplementada con cutículas de *P. ovata* produjo una mejora de la resistencia a la leptina en las ratas Zucker (fa/fa), puesta de manifiesto por una pequeña pero significativa reducción de los niveles plasmáticos de esta hormona en comparación con los de las ratas obesas del grupo control. Este descenso en la hiperleptinemia puede ser atribuido a la reducción de masa que experimenta el tejido adiposo visceral de las ratas OP, dado que dicho tejido es el principal órgano secretor de esta hormona, cuya producción es directamente proporcional a la cantidad de tejido adiposo (Simón *y cols.*, 2002).

Los niveles circulantes de triglicéridos y colesterol de las ratas alimentadas con dieta suplementada con cutículas de *P. ovata* disminuyeron de forma drástica. Otros estudios en cerdos, hámsteres y en ratas Zucker obesas de 6 semanas, han puesto de manifiesto el importante efecto hipotrigliceridémico e hipocolesterolemiantes del *psyllium* (Horton *y cols.*, 1994; Fernández *y cols.*, 1995; Galisteo *y cols.*, 2005). Sus propiedades de fibra soluble contribuyen a explicar el efecto reductor de triglicéridos plasmáticos, pues la masa viscosa que forma impide la absorción intestinal de macronutrientes como grasas y azúcares. Asimismo, va a ocasionar una disminución en la absorción de los ácidos biliares ya que estos se unen a los residuos urónicos que contiene esta fibra. Como consecuencia de la depleción de ácidos biliares pueden disminuir los niveles de colesterol, al utilizarse éste en la síntesis *de novo* de nuevos ácidos biliares (Trantwein *y cols.*, 1999). Además, al tratarse de una fibra muy fermentable, va a dar lugar en el colon a la producción de AGCC que también pueden contribuir a este efecto. Se ha observado que el propionato, tras ser absorbido desde el colon a la circulación portal, llega al hígado donde actúa inhibiendo a la HMG-CoA reductasa, disminuyendo así la síntesis endógena de colesterol (Chen *y cols.*, 1984).

Tras 10 semanas de tratamiento, las ratas que recibieron la dieta suplementada con cutículas de *P. ovata*, presentaban una mejoría sustancial en la resistencia a la insulina, como muestra el descenso de los niveles plasmáticos de AGL y de insulina. La capacidad de las cutículas de *P. ovata* para reducir la resistencia a la insulina ha sido demostrada en varios estudios que atribuyen dicho efecto a la liberación de péptidos intestinales y la formación de mezclas viscosas que retrasan el vaciamiento gástrico mejorando la homeostasis de la glucosa (Holst *y cols.*, 1997; Anderson *y cols.*, 1994; Salmeron *y cols.*, 1997a; Salmeron *y cols.*, 1997b; Chandalia *y cols.*, 2000). La disminución de los niveles plasmáticos de AGL conlleva un menor depósito de los mismos en forma de triglicéridos en otros órganos como hígado y músculo esquelético, mejorando la esteatosis típica de este modelo. Este efecto se corrobora con la regulación que ejercen los AGCC producidos por la fermentación de esta fibra, sobre el metabolismo lipídico hepático, como hemos descrito anteriormente, disminuyendo la síntesis de HMG-CoA reductasa (Aleixandre *y cols.*, 2009). A esta mejoría también pudo contribuir el hecho de que el peso del tejido adiposo visceral de los animales alimentados con cutículas de *P. ovata* fue menor que el encontrado en las ratas alimentadas con dieta control. Esta disminución puede ser consecuencia de la disminución del peso corporal de estos animales, en los que además, observamos una disminución en la producción de TNF- $\alpha$  y un incremento de la producción de adiponectina por el tejido adiposo, señal de una mejor función endocrina del adipocito, y que contribuye a incrementar la sensibilidad a la insulina y la inhibición de la lipólisis, contribuyendo a una menor liberación de AGL al plasma. En humanos obesos y ratones *ob/ob* que presentan hiperinsulinemia y dislipidemia la expresión de los receptores para adiponectina, adipoR1 y adipoR2 se encuentra disminuida (Nannipieri *y cols.*, 2007; Kadowaki *y cols.*, 2005). Nuestros resultados muestran un patrón similar en la expresión de estos receptores en el tejido adiposo visceral en las ratas obesas control. En las ratas obesas que ingirieron la dieta suplementada con cutículas de *P. ovata* no sólo aumentó la producción de adiponectina sino que también se incrementó la expresión de sus receptores, contribuyendo a una mejoría en la resistencia a la insulina. La adiponectina al unirse a sus receptores en el tejido adiposo visceral promovió la activación de la AMPK mediante fosforilación, promoviendo así la fosforilación/inhibición de la ACC y en consecuencia la disminución de la expresión de FAS, con lo que aumentó la oxidación de ácidos grasos en la mitocondria y se redujo su síntesis (Hardie *y cols.*, 2003). Se ha propuesto que la AMPK antagoniza la lipólisis en el adipocito (Sullivan *y cols.*, 1994), disminuyendo la disponibilidad de ácidos grasos en el plasma pudiendo contribuir de este modo a atenuar el desarrollo de la resistencia a la insulina (Daval *y cols.*, 2006).

En los estados de resistencia a la insulina, el tejido adiposo falla en su función de almacenar la grasa. Otros tejidos, como el hígado y el músculo esquelético, son expuestos a unos altos niveles de AGL a los que almacenan en forma de triglicéridos para compensar la disfunción del tejido adiposo (Raz *y cols.*, 2005). La hepatomegalia y la esteatosis hepática de las ratas Zucker obesas mejora significativamente en ratas alimentadas con dieta suplementada con cutículas de *P. ovata*. El grado de esteatosis se valoró por medidas bioquímicas que mostraron una menor acumulación de triglicéridos y colesterol en el hígado de estas ratas. Además, este efecto puede explicarse por el aumento en la secreción de adiponectina y la mayor expresión de sus receptores, adipoR1 y adipoR2 en este órgano en las ratas OP. El descenso en los niveles de adiponectina se ha relacionado con un aumento en el contenido de triglicéridos hepáticos y musculares (Fruebis *y cols.*, 2001; Yamauchi *y cols.*, 2001). El incremento de la expresión de adipoR1 está asociado con una mayor oxidación de AGL y una menor síntesis de lípidos en el hígado, ya que este receptor media la activación de la AMPK (Yamauchi *y cols.*, 2002). La expresión de este receptor se encuentra disminuida en estados de resistencia a la insulina y obesidad (Tsuchida *y cols.*, 2004). Por tanto, la mejora en la obesidad y en la resistencia a la insulina que presentan las ratas Zucker obesas alimentadas con dieta suplementada con esta fibra soluble y fermentable podría estar relacionada con el aumento de la expresión de este receptor, puesto que estos animales también presentan una mayor activación de la AMPK, con la consiguiente inhibición de la ACC y una menor expresión de la FAS, lo que se traduce en una sustancial disminución de la acumulación de lípidos, mejorando tanto el metabolismo lipídico como la resistencia a la insulina. De hecho, un estudio reciente describe que el consumo de una dieta rica en cutículas de *P. ovata* regula la expresión de genes hepáticos que codifican para enzimas involucradas en la regulación de los pasos claves en el metabolismo lipídico, como FAS, en ratones C57BL/6J (Chan *y cols.*, 2008). Investigaciones en cultivos primarios de hepatocitos han demostrado que el acetato, producto de la fermentación de la fibra dietética fermentable, promueve la activación de la AMPK (Kawaguchi *y cols.*, 2002; Sakakibara *y cols.*, 2006). Igualmente, la administración oral de acetato durante 8 semanas reduce la hepatomegalia y el contenido hepático de triglicéridos en ratones diabéticos KK-A(y) a través de un mecanismo que implicaría la activación de la AMPK a nivel hepático (Sakakibara *y cols.*, 2006). De hecho, también se ha observado que la suplementación dietética con acetato aumenta la fosforilación de ACC en los hígados de ratones ICR, acción que estaría mediada por la activación de la AMPK (Sakakibara *y cols.*, 2006). También hay investigaciones recientes con butirato, tanto *in vivo* como *in vitro*, que demuestran que también este AGCC activa la AMPK (Gao *y cols.*, 2009; Peng *y cols.*, 2009).

La suplementación dietética con butirato puede prevenir y tratar la obesidad y la resistencia a la insulina inducidas por el consumo de una dieta rica en grasa en ratones C57BL/6, a través de un mecanismo relacionado con la promoción del gasto energético y la inducción de la función mitocondrial en el hígado y el músculo esquelético, en el que estaría implicada la activación de la AMPK (Gao *y cols.*, 2009).

Por otra parte, a través de su interacción con el adipoR2, la adiponectina activa al factor de transcripción PPAR- $\alpha$  (Fruebis *y cols.*, 2001; Yamauchi *y cols.*, 2002; Kadowaki *y cols.*, 2003; Yamauchi *y cols.*, 2003a; Yamauchi *y cols.*, 2003b) que actúa incrementando la oxidación de AGL y además inhibe el estrés oxidativo (Yamahuchi *y cols.*, 2007). La expresión hepática de este receptor también se incrementó en las ratas OP, lo que podría justificar además el menor grado de estrés oxidativo encontrado en el hígado de estos animales, con mayores niveles de GSH y un menor contenido de TBARS que los de las ratas obesas control. La disminución en el contenido lipídico supone una menor concentración de sustrato para la peroxidación. También contribuye a este efecto la menor expresión de los factores de transcripción, SREBP-1c y SREBP-2, que observamos en los extractos nucleares procedentes de muestras hepáticas de ratas alimentadas con la dieta suplementada con las cutículas de *P. ovata*. Se ha descrito que la transcripción de estos factores es reprimida por la activación de la AMPK (Zhou *y cols.*, 2001), que, como hemos descrito anteriormente, también se observa en el hígado de las ratas OP. En esta acción de las cutículas de *P. ovata* también podrían intervenir activamente algunos de los productos de su fermentación. En este sentido, se ha demostrado que el AGCC acetato reduce los niveles de ARNm de SREBP-1 en los hígados de ratones KK-A(y) por un mecanismo que podría implicar a la AMPK (Sakakibara *y cols.*, 2006).

Por otra parte, las ratas Zucker obesas alimentadas durante 10 semanas con la dieta suplementada con cutículas de *P. ovata* además de presentar una menor expresión de los factores de transcripción SREBP-1c y SREBP-2, muestra una mayor activación por fosforilación de la AKT, lo que confirma una mejora en la resistencia a la insulina post-receptoral que parece confirmarse en este modelo, y que corre paralela a la disminución de la esteatosis hepática.

El estudio histológico de los hígados de estos animales nos permitió corroborar la mejoría de la esteatosis característica de este modelo en las ratas alimentadas con cutículas de *P. ovata*. Se observó un menor número de hepatocitos con lípidos en el citoplasma respecto a las ratas obesas control, a la vez que existía una menor balonización de los mismos y una menor acumulación de glucógeno, representativo del daño hepático. Un resultado

llamativo aunque contradictorio en las ratas Zucker obesas, fue la ausencia de fibrosis y una inflamación muy leve en el hígado de estos animales, manifestaciones que aparecen en el grupo de ratas delgadas, mientras que los hígados de las ratas alimentadas con la dieta suplementada con cutículas de *P. ovata*, presentaban un estado intermedio entre ambos grupos. Se ha visto que la leptina actúa como una citoquina profibrogénica en el hígado, estando considerada como uno de los mediadores clave para la progresión de fibrosis hepática en pacientes con enfermedad del hígado graso no alcohólico (Honda *y cols.*, 2002). Los ratones con deficiencia en la producción de leptina (*ob/ob*) y las ratas Zucker (*fa/fa*), ejercen una menor respuesta fibrogénica en el hígado cuando se le induce daño hepático con agentes químicos como la tioacetamida o el tetracloruro de carbono (Honda *y cols.*, 2002; Ikejima *y cols.*, 2001; Ikejima *y cols.*, 2002; Leclercq *y cols.*, 2002; Potter *y cols.*, 1998; Saxena *y cols.*, 2002; Potter *y cols.*, 2003). La leptina es esencial para la progresión del hígado fibrótico pues regula la deposición de colágeno por las células estrelladas hepáticas (Wang *y cols.*, 2009). Esto representa una limitación para considerar a las ratas Zucker como un modelo no alcohólico de esteohepatitis. Esto nos lleva a pensar que las ratas Zucker obesas alimentadas con cutículas de *P. ovata* van a presentar mayor grado de inflamación y fibrosis que las ratas obesas control como consecuencia de la menor resistencia a la leptina que manifiestan.

## 2.2 EFECTOS DE LA DIETA SUPLEMENTADA CON METILCELULOSA EN RATAS ZUCKER OBESAS

Las ratas obesas alimentadas con la dieta suplementada con metilcelulosa durante 10 semanas presentaron al final del tratamiento una reducción significativa en el peso corporal y en el peso relativo del hígado, así como una disminución en las concentraciones circulantes de triglicéridos, colesterol total y AGL. También se observó una disminución en la producción de TNF- $\alpha$  y un aumento en la secreción de adiponectina por el tejido adiposo. Sin embargo, a diferencia de los efectos producidos por la ingesta de la dieta suplementada con la fibra soluble fermentable, cutículas de *P. ovata*, no se apreció variación en la hiperinsulinemia y la hiperleptinemia características del modelo, ni tampoco se modificó la menor expresión de los receptores de adiponectina en el tejido adiposo con respecto a las ratas obesas del grupo control.

El descenso observado en el peso corporal de las ratas OM, podría atribuirse a la menor ingesta dietética así como al contenido calórico de la dieta como consecuencia de la dilución de los nutrientes por la incorporación de la fibra. Sin embargo esta disminución es significativamente menor a la experimentada por las ratas OP, lo que nos sugiere que otras propiedades y/o efectos de las cutículas de *P. ovata* deben contribuir a sus efectos en la reducción del peso corporal de las ratas obesas. Una justificación de esta menor disminución en la ganancia de peso en las ratas OM puede relacionarse con el hecho de que la ingesta de la dieta suplementada con metilcelulosa no mejoró la resistencia a la leptina, como podemos deducir por la persistencia de la hiperleptinemia, ni disminuyó la masa del tejido adiposo, efectos que sí que se observaron en las ratas OP.

Como fibra soluble que es, la metilcelulosa forma soluciones viscosas y enlentece el tiempo de tránsito en el intestino delgado, y además aumenta el espesor de la capa de agua que han de atravesar los solutos para alcanzar la membrana del enterocito, reduciendo la absorción de grasa y azúcares procedentes de la dieta (Cherbut, 1998), lo que puede justificar el importante descenso en las concentraciones plasmáticas de lípidos. Este hecho puede contribuir además al menor peso relativo del hígado de las ratas obesas que ingirieron esta dieta, así como a la mejoría en el desequilibrio de la producción de adipocitoquinas por el tejido adiposo de las ratas Zucker obesas.

Sin embargo, pese a todas estas mejoras metabólicas en las ratas obesas, a diferencia de lo que observamos en las ratas OP, la ingesta de la dieta suplementada con metilcelulosa durante 10 semanas no redujo la hiperinsulinemia ni la concentración hepática de lípidos, característicos de este modelo. La ausencia de efecto sobre estas alteraciones se puede relacionar con la falta de modificación en la expresión de los receptores para adiponectina en el tejido adiposo de las ratas OM que se mantuvo disminuida, al igual que ocurre en las ratas obesas control. Dado que la adiponectina ejerce un papel protector frente a la resistencia a la insulina y la acumulación ectópica de lípidos a través de sus receptores, el hecho de que la expresión de los mismos esté disminuida puede explicar que la metilcelulosa, pese a incrementar la producción de esta adipocitoquina por el tejido adiposo, no alcance a producir esos efectos. Además, las muestras de hígado de este grupo de ratas obesas no presentaron una mayor activación de la AMPK con respecto a la de las ratas obesas control, lo que justifica que no disminuya la acumulación de lípidos hepáticos tras la ingesta de la dieta suplementada con metilcelulosa durante 10 semanas. La ausencia de estos efectos en las ratas Zucker obesas que recibieron esta suplementación de fibra soluble no fermentable, en comparación con su clara manifestación en las ratas alimentadas con la dieta suplementada con cutículas

de *P. ovata*, nos sugieren una gran implicación en los mismos de los productos derivados de la fermentación de esta fibra soluble y fermentable.

### 2.3 EFECTOS DE LA DIETA SUPLEMENTADA CON CELULOSA EN RATAS ZUKER OBESAS

Los efectos de la ingesta de la dieta suplementada con esta fibra insoluble sobre las alteraciones de las ratas Zucker obesas fueron mucho menos llamativos que los descritos en el caso de la ingesta de las dietas solubles empleadas en nuestros estudios. Concretamente, el único efecto a destacar en las ratas OC fue una reducción ligera pero significativa de los niveles circulantes de AGL al finalizar el período experimental. Esto sugiere una acción beneficiosa de la suplementación con celulosa sobre la resistencia a la insulina. De hecho, no se descarta que con la prolongación de dicha ingesta este efecto pudiera verse acompañado de una reducción en la ganancia de peso corporal, que no se ha observado al final de las 10 semanas de nuestro período experimental. Aunque las fibras insolubles son principalmente no viscosas y ejercen efectos casi inapreciables sobre la respuesta a la glucosa postprandial y mínimos sobre la absorción de macronutrientes (Jenkins *y cols.*, 1982), se ha puesto de manifiesto que el aumento en el consumo de fibra insoluble de cereal y grano entero mejora la sensibilidad a la insulina y reduce las concentraciones plasmáticas de esta hormona (Ylonen *y cols.*, 2003; Pereira *y cols.*, 2002; Esposito *y cols.*, 2003). Los mecanismos por los que ejerce esta acción se desconocen, pero parecen ser distintos a los que conducen a los efectos de las fibras solubles. Un estudio reciente en ratones C57BL/6J alimentados con una dieta rica en grasas, destaca que la suplementación de la dieta con fibra insoluble de cereal durante un período mucho más prolongado al de nuestros experimentos, da lugar a una disminución significativa en la ganancia de peso de los animales y mejora su sensibilidad a la insulina (Isken *y cols.*, 2010). Además de estos efectos se observó una modificación en el patrón de expresión de genes hepáticos orientada hacia la oxidación de ácidos grasos (Isken *y cols.*, 2010).

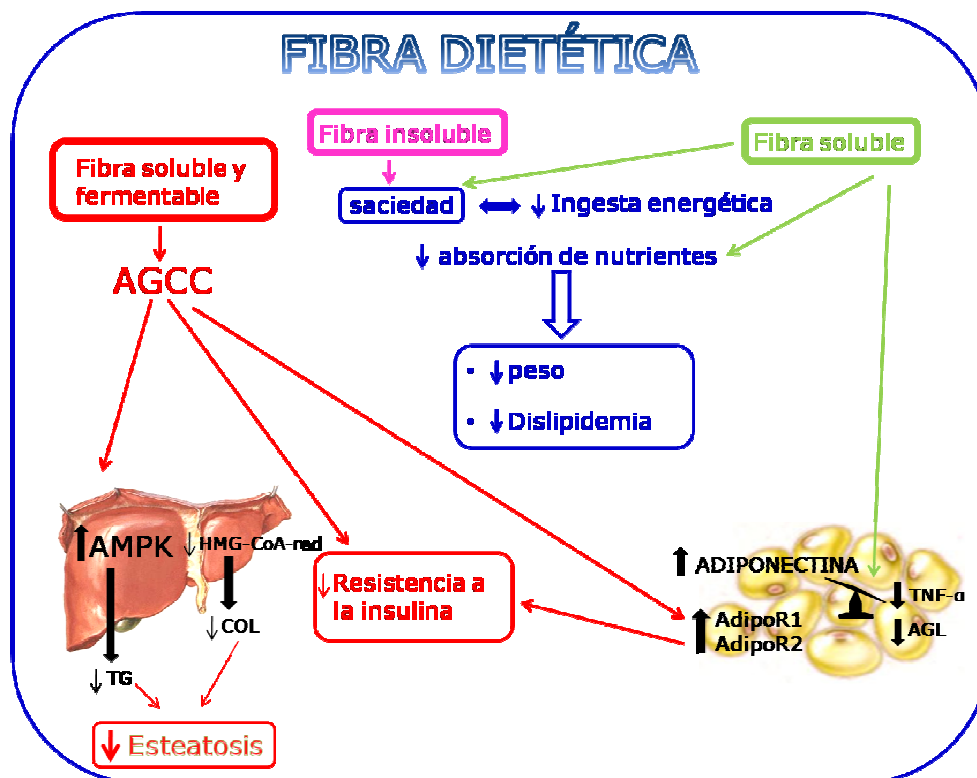
Comparando los efectos obtenidos en el modelo de síndrome metabólico de rata Zucker obesa tras la ingesta de las dietas suplementadas con las distintas fibras dietéticas empleadas en nuestros estudios, podemos concluir que la suplementación de la dieta con los tres tipos de fibra ensayados reduce la hiperfagia característica de este modelo, efecto que podemos atribuir a la saciedad que produce la ingesta de fibra dietética de forma general. Sólo las fibras solubles producen una disminución en la ganancia de peso en las ratas Zucker obesas, debido, probablemente, a que reducen la absorción de macronutrientes a nivel intestinal, mediante la formación de soluciones viscosas. Sin embargo, esta disminución es considerablemente mayor en el caso de la ingesta de la fibra soluble y fermentable, lo que nos sugiere que otras propiedades y/o efectos de las cutículas de *P. ovata* deben contribuir a sus efectos en la reducción del peso corporal de las ratas obesas. Este hecho se puede deber a la menor resistencia a la leptina que produce exclusivamente la fibra soluble y fermentable, haciendo que la leptina ejerza de forma más eficaz su función central de incrementar el gasto energético.

La reducción de la hiperlipidemia sólo se observa en la ingesta de dietas suplementadas con las fibras solubles, efecto atribuible a una menor absorción de grasas y azúcares procedentes de la dieta. Este efecto, asociado a la reducción de peso corporal ya mencionada, da lugar a un mejor funcionamiento del tejido adiposo visceral, disminuyendo la producción de citoquinas proinflamatorias como el TNF- $\alpha$  y aumentando la secreción de adiponectina. Sólo la fibra soluble y fermentable produce una reducción de los elevados niveles plasmáticos de insulina característicos del modelo, lo que refleja una menor resistencia a la insulina. Este efecto podría deberse a que es la única que da lugar a una mayor expresión de los receptores de adiponectina adipoR1 y adipoR2 en dos de los principales tejidos insulino-resistentes, tejido adiposo e hígado, lo que conduce a la activación de la AMPK en dichos tejidos dirigiendo la actividad metabólica hacia el consumo de energía. Con ello contribuye a una menor acumulación lipídica y a un menor estado oxidativo a nivel hepático.

Analizando todos estos resultados de forma conjunta, podemos decir que la dieta suplementada con cutículas de *P. ovata*, fibra mayoritariamente soluble y fermentable, es la que mayores beneficios aporta en el tratamiento de este modelo experimental de síndrome metabólico de las tres ensayadas. Su actuación de mejora de las alteraciones existentes en este síndrome se podría explicar mediante los siguientes mecanismos:



- ✚ Como cualquier otra fibra dietética, soluble o insoluble, presenta acción saciante, con la consiguiente disminución de la ingesta, lo que puede contribuir a una menor ganancia de peso.
- ✚ Como otras fibras solubles, forma una masa viscosa que impide la absorción de nutrientes, favoreciendo la menor ganancia de peso y la disminución de la hiperlipidemia. Sin embargo, a diferencia de la metilcelulosa, las cutículas de *P. ovata*, además disminuyen la cantidad de tejido adiposo visceral, lo que puede justificar que también tenga lugar una menor producción de leptina. La inducción de la expresión de los receptores de adiponectina en tejidos insulino-resistentes como tejido adiposo e hígado, puede estar implicada también en este efecto. El hecho de que este efecto no se manifieste en el caso de la metilcelulosa, sugiere la implicación en estos efectos de otras propiedades de las cutículas de *P. ovata*, como puede ser su elevada fermentabilidad a nivel intestinal.
- ✚ La producción de AGCC como resultado de la fermentación bacteriana de esta fibra en el colon puede justificar gran parte de todos estos efectos, ya que además de actuar como factores saciantes regulando la secreción de hormonas y péptidos intestinales, ejercen una regulación a nivel hepático tanto sobre el metabolismo glucídico como lipídico, reduciendo la síntesis endógena del colesterol –acción inhibitoria del propionato sobre la HMG-CoA reductasa- y de los triglicéridos. En este sentido, uno de los mecanismos más importantes por los que actuarían AGCC como acetato y butirato es mediante la activación de la vía de la AMPK (Sakakibara *y cols.*, 2006; Gao *y cols.*, 2009; Peng *y cols.*, 2009), lo que conduce a una reducción en la producción y acumulación de lípidos hepáticos, lo que también contribuye a disminuir la resistencia a la insulina.



**Figura 1.** Posibles mecanismos por los que la fibra dietética ejerce sus efectos en el síndrome metabólico. Los 3 tipos de fibra dietética ensayados presentan una acción saciante. Las fibras solubles reducen la ganancia de peso y la hiperlipidemia, dando lugar a una mejora en el funcionamiento del tejido adiposo visceral. Solo la fibra soluble y fermentable, debido a la producción de AGCC a nivel intestinal, produce una disminución de la resistencia a la insulina, ya que es la única que da lugar a una mayor expresión de los receptores de adiponectina en tejido adiposo visceral e hígado, lo que conduce a la activación de la AMPK en dichos tejidos, reduciendo la producción y acumulación de lípidos hepáticos. AMPK, protein kinasa activada por AMP; TNF- $\alpha$ , factor de necrosis tumoral- $\alpha$ ; adipoR1, receptor de adiponectina 1; adipoR2, receptor de adiponectina 2; AGL, ácidos grasos libres; TG, triglicéridos; COL, colesterol; HMG-CoA-red, Hidroximetil-glutaril-CoA reductasa.



*Conclusiones*

---



1. La ingesta durante 10 semanas de dietas suplementadas con un 3,5% de fibras dietéticas dotadas de características diferentes de solubilidad y fermentabilidad, ejercen distintos efectos sobre el modelo experimental de síndrome metabólico de ratas Zucker obesas adultas. La dieta suplementada con celulosa, fibra insoluble, sólo disminuye la concentración de AGL. Los efectos de las dietas suplementadas con las fibras solubles, metilcelulosa y cutículas de *P. ovata*, presentan mayores beneficios pues disminuyen la ganancia de peso corporal y las concentraciones plasmáticas de triglicéridos, colesterol y AGL. Estos efectos se acompañan de una menor producción de TNF- $\alpha$  y una mayor secreción de adiponectina por el tejido adiposo visceral. Finalmente, de las fibras solubles, sólo la fermentable produce además una disminución de la hiperinsulinemia y de la hiperleptinemia, características de este modelo experimental.
2. En los posibles mecanismos implicados en los efectos beneficiosos de la dieta suplementada con cutículas de *P. ovata* destaca un aumento en la expresión de los receptores de adiponectina, adipoR1 y adipoR2, en tejidos insulino-resistentes como el hígado y el tejido adiposo. Estos efectos se asocian a la activación de la AMPK, con la consecuente inhibición por fosforilación de la ACC y la reducción de la expresión de FAS en dichos tejidos, lo que justifica la menor producción y acumulación de lípidos, con la consecuente disminución de su peso relativo. A nivel hepático, a esta acción también contribuye la menor expresión hepática de los factores de transcripción lipogénicos SREBP-1c y SREBP-2.
3. A la vista de los resultados de este estudio, los AGCC derivados de los procesos de fermentación de la fibra dietética fermentable pueden tener una aplicación potencial en la prevención y el tratamiento de las anomalías características del síndrome metabólico en humanos.



## *Bibliografía*

---





- Ahima RS, Osei SY. Leptin signalling. *Physiol behav* 2004; 81:223-241.
- Ahmed RL, Schmitz KH, Anderson KE, Rosamond WD, Folsom AR. The metabolic syndrome and risk of incident colorectal cancer. *Cancer* 2006; 107:28-36.
- Ajani UA, Ford ES, Mokdad AH. Dietary Fiber and C- Reactive Protein: Findings from National Health and Nutrition Examination Survey Data. *J Nutr* 2004; 134:1181-5.
- Alan R, Satiel and Ronald Kahn. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 2001; 414:799-806.
- Alberti G, Zimmet P, Shaw J, Bloomgarden Z, Kaufman F, and Silink M: Type 2 diabetes in the young: the evolving epidemic: the international diabetes Federation consensus workshop. *Diabetes care* 2004; 27:1798-1811.
- Aldoori W. A prospective study of dietary fiber types and symptomatic diverticular disease in men. *J Nutr* 1998; 128:714-719.
- Aleixandre A, Miguel M. Dietary fiber in the prevention and treatment of metabolic syndrome: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2008; 48:905-12.
- Aljada A, Ghanim H, Mohanty P, Kapur N, Dandona P. Insulin inhibits the pro-inflammatory transcription factor early growth response gene-1 (Erg) expression in mononuclear cells (MNC) and reduces plasma a tissue factor (TF) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:1419-1422.
- Aljada A, Ghanim H, Mohanty P, Tufail S, Bandyopadhyay A, Dandona P. Glucosa intake induces an increase in AP-1 and Erg-1 binding activities and tissue factor and matrix metalloproteinase concentrations. *Am J Clin Nutr* 2004a; 80:51-57.
- Aljada A, Mohanty P, Ghanim H, Abdo T, Tripathy D, Chaudhuri A, Dandona P. Increase in intranuclear nuclear factor kappaB and decrease in inhibitor kappaB in mononuclear cells after a mixed meal: evidence for a proinflammatory effect. *Am J Clin Nutr* 2004b; 79:682-690.
- Aller R, de Luis DA, Izaola O, La Calle F, del Olmo L, Fernández L, y col. Effect of soluble fiber intake in lipid and glucose levels in heathly subjects: a randomized clinical trail. *Diabetes Res Clin Pract* 2004; 65:7-11.

## Bibliografía

---

Álvarez León EE, Ribas Barba L, Serra Majem L. Prevalencia del síndrome metabólico en la población de la Comunidad Canaria. *Med Clin* 2003; 120:172-4.

American Association of Cereal Chemists. The definition of dietary fiber. *Cereal Foods World* 2001; 46:112-29.

American Gastroenterology Association (AGA). AGA technical review: impact of dietary fiber on colon cancer occurrence. *Gastroenterology* 2000; 118:1235-1257.

American Heart Association; National Heart, Lung, and Blood Institute, Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, Gordon DJ, Krauss RM, Savage PJ, Smith Jr SC, Spertus JA, Costa F. Diagnosis and management of the metabolic syndrome. An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. Executive summary. : *Cardiol Rev* 2005; 13:322-7.

Anderson J, Smith B, Gustafson N. Health benefits and practical aspects of higher-fiber diets. *Am J Clin Nutr* 1994; 59:1245-1275.

Anderson JW, Allgood LD, Turner J, oeltgen PR, Daggy BP. Effects of psyllium on glucose and serum lipid responses in men with type 2 diabetes and hypercholesterolemia. *Am J Clin Nutr* 1999; 70:466-73.

Anderson JW, Story L, Seiling B, Chen WJ, Petro MS, Story J. Hypocholesterolemic effects of oat-bran or bean intake for hypercholesterolemic men. *Am J Clin Nutr* 1984; 40:1146-1155.

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

Anderson JW, Zeigler JA, Deakins DA et al. Metabolic effects of high-carbohydrate, high-fiber diets for insulin-dependent diabetic individuals. *Am J Clin Nutr* 1991; 54:936-943.

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

Anini Y, Brubaker PL. Role of leptin in the regulation of glugacon-like peptide-1 secretion. *Diabetes* 2003; 52:252-9.

Aprikian O, Busserolles J, Manach C, Mazur A, Morand C, Davicco MJ, y col. Lyophilized apple counteracts the development of hypercholesterolemia, oxidative stress, and renal dysfunction in obese Zucker rats. *J Nutr* 2002; 132:1969-76.

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

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

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

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

Arner P. Insulin resistance in type 2 diabetes: role of fatty acids. *Diabetes Metab Res Rev* 2002; 18:55-59.

Asakawa A, Inui A, Kaga T, Yuzuriha H, Naga T, Ueno N, et al. Ghrelin is an Appetite Stimulatory Signal from Stomach with structural Resemblance to Motilin Gastroenterology 120: 337-347, 2001.

Ascaso JF, Romero P, Real JT, Lorente RI, Martínez-Valls J, Carmena R. Abdominal obesity, insulin-resistance, and metabolic syndrome in a southern European population. *Eur J Intern Med* 2003; 14:101-6.

Ascherio A, Hennekens C, Willet WC et al. Prospective study of nutritional factors, blood pressure and hypertension among US women. *Hypertension* 1996; 27:1065-1072.

Avruch J. Insulin signal transduction through protein kinase cascades. *Mol Cell Biochem* 1998; 182:31-48.

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

- Bajaj M, Defronzo RA. Metabolic and molecular basis of insulin resistance. *J Nucl Cardiol* 2003; 10:311-323.
- Balkau B, Charles MA. Comment on the provisional report from the who consultation. European Group for the study of insulin resistance (EGIR). *Diabet Med* 1999; 16:442-3.
- Barzilai N, She L, Liu BQ, Vuguin P, Cohen P, Wang J, Rossetti L. Surgical removal of visceral fat reverses hepatic insulin resistance. *Diabetes* 1999; 48:94-98.
- Bates SH, Myers MG Jr. The role of leptin receptor signaling in feeding and neuroendocrine function. *Trends Endocrinol Metab* 2003; 14:447-452.
- Beck B, Richy S, Stricker-Krongrad A. Ghrelin and body weight regulation in the obese Zucker rat in relation to feeding state and dark/light cycle. *Exp Biol Med* 2003; 228:1124-1131.
- Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med* 2000; 17:947-53.
- Berg AH, Combs TP, Scherer PE. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2002; 13:84 -9.
- Bjørnbæk C, Uotani S, da Silva B, Flier JS. Divergent signalling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. *J Biol Chem* 1997; 272:32686-32695.
- Bjørnbæk C, Lavery HJ, Bates SH, Olson RK, Davis SM, Flier JS, Myers Jr MG. SOCS3 mediates feedback inhibition of the leptin receptor via Tyr985. *J Biol Chem* 2000; 275:40649-40657.
- Bjørnbæk C, Kahn BB. Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Rec Prog Horm Res* 2004; 59:305-331.
- Bjorntorp P. The regulation of adipose tissue distribution in humans. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1996; 20:291-302.
- Blackwood AD, Salter J, Dettmar PW et al. Dietary fibre, physicochemical properties and their relationship to health. *J Royal Soc Prom Health* 2000; 120:242-247.
- Blight EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Med Sci* 1959; 37:911-917.

- Bluher M, Bullen JW Jr, Lee JH, *et al.*. Circulating adiponectin and expression of adiponectin receptors in human skeletal muscle: Associations with metabolic parameters and insulin resistance and regulation by physical training. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 6:2310-2316.
- Bluher M, Fasshauer M, Kralisch S, Schon MR, Krohn K, Paschke R. Regulation of adiponectin receptor R1 and R2 gene expression in adipocyte of C57BL/6 mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 329:1127-1132.
- Boden G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes* 1997; 46:3-10.
- Boden G and Shulman GI. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and  $\beta$ -cell dysfunction. *Eur J Clin Invest* 2002; 32:14-23.
- Borst SE, Conover CF, Bagby GJ. Association of resistin with visceral fat and muscle insulin resistance. *Cytokine* 2005; 32:39-44.
- Boulange A, Planché E, Gasquet P. Onset of genetic obesity in the absence of hyperphagia during the first week of life in the Zucker rat (*fa/fa*). *Journal of Lipid Research* 1979; 20:857-864.
- Bourdon I, Yokoyama W, Davis P, Hudson C, Backus R, Richter D, *et al.* Postprandial lipid, glucose, insulin and cholecystokinin responses in men fed barley pasta enriched with beta-glucan. *Am J Clin Nutr* 1999; 69:55-63.
- Brooks BJ, Arch JR, Newsholme EA. Effect of some hormones on the rate of the triacylglycerol/fatty-acid substrate cycle in adipose tissue of the mouse *in vivo*. *Biosci Rep* 1983; 3:263-267.
- Brown DC, Rosner B, Willet W, Sacks F. Cholesterol-lowering effects of dietary fiber: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 1999; 69:20-42.
- Brown MS, Goldstein JL. Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox. *Cell Metab* 2008; 7:95-96.

Brussaard JH, Raaij JM van, Stasse-Wolthuis M et al. Blood pressure and diet in normotensive volunteers: absence of an effect of dietary fiber, protein or fat. *Am J Clin Nutr* 1981; 34:2023-2029.

Burkitt DP, Trowell HC. Refined carbohydrate foods and disease: implications of dietary fibre. London: *Academic Press*; 1975:335-42.

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

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

Cani PD, Dewever C, Delzenne NM. Inulin-type fructans modulate gastrointestinal peptides involved in appetite regulation, glucagon-like peptide-1, and ghrelin, in rats. *Br J Nutr* 2004; 92:521-6.

Cani PD, Neyrinck AM, Maton N, Delzenne NM. Oligofructose promotes satiety in rats fed a high-fat diet: involvement of glucagon-like peptide-1. *Obes Res* 2005; 13:1000-7.

Carey AL, Steinberg GR, Macaulay SL, Thomas WG, Holmes AG, Ramm G et al. Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMP-activated protein kinase. *Diabetes* 2006; 55:2688-2697.

Carvalho JBC, Torsoni MA, Ueno M, Amaral ME, Araujo EP, Velloso LA et al. Cross-Talk between the Insulin and Leptin Signaling Systems in Rat Hypothalamus. *Obesity Research* 2005; 13:48-57.

Carvalho E, et al. Low cellular IRS-1 gene and protein expression predict insulin resistance and NIDDM. *FASEB J* 1999; 13:2173-2178.

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

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

Cereal Foods World. The Definition of dietary fiber: report of the dietary fiber definition committee to the Board of Directors of the American Association of Cereal Chemists 2001; 46:112-29.

Chan M, Hen C. Sequential effects of a high-fiber diet with psyllium husk on the expression levels of hepatic genes and plasma lipids. *Basic nutritional investigation* 2008; 24:57-66.

Chandalina M, Garg A, Lutjohann D, von Bergmann K, Grundy SM, Brinkley LJ. Beneficial effects of high dietary fiber intake in patients with type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 2000; 342:1440-1441.

Chaplin MF. Fibre and water binding. *Proc Nutr Soc* 2003; 62:223-7.

Chaudhuri A, Janicke D, Wilson MF, Tripathy D, Garg R, Bandyo padhyay A, *et al.* Anti-inflammatory and profibrinolytic effect of insulin in acute ST-segment-elevation myocardial infarction. *Circulation* 2004; 109:849-854.

Chen D, Wang MW. Development and application of rodent models for type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 2005; 7:307-317.

Chen W-JL, Anderson JW, Jennings D. Propionate may mediate the hypocholesterolemic effects of certain soluble plant fibres in cholesterol-fed rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1984; 175:215.

Chen J, He J, Wildman RP, Reynolds K, Streiffer RH, Whelton PK. A randomized controlled trial of dietary fiber intake on serum lipids. *Eur J Clin Nutr* 2006; 60:62-8.

Cheng HH, Lai MH. Fermentation of resistant rice starch produces propionate reduced serum and hepatic cholesterol in rats. *J Nutr* 2000; 130:1991-1995.

Cherbut CH. Fibres alimentaires: que deviant l'hypothèse de Burkitt? *Cah Nutrition Diététique* 1998; 33:95-104.

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



## Bibliografía

---

Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res* 2005; 46:2347-55.

Civitarese AE, Jenkinson CP, Richardson D, Bajaj M, Cusi K, Kashyap S, et al. Adiponectin receptors gene expression and insulin sensitivity in non-diabetic Mexican Americans with or without a family history of type 2 diabetes. *Diabetologia* 2004; 47:816-820.

Cleary MP, Vasselli JR, Greenwood MRC. Development of obesity in Zucker obese (fa/fa) rat in absence of hyperphagia. *Am J Physiol* 1980; 238:284-92.

Codex Alimentarius Commission, Report of the 30th session of the Codex Committee on Nutrition and Foods for Special Dietary Uses, <<http://www.codexalimentarius.net/web/archives.jsp?year=09>>; 2008 (November), p. 46, para 27-54.

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

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

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

Crook MA, Tutt P, Pickup JC. Elevated serum sialic acid concentration in NIDDM and its relationship to blood pressure and retinopathy. *Diabetes Care* 1993; 16:57-60.

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

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

Cummings J, Edmond LM, Magee A. Dietary carbohydrates and health: do we still need the fibre concept?. *Clin Nutr Suppl* 2004; 1:5-17.

Cummings JH, Mann JI, Nishida C, Vorster HH. Dietary fibre: an agreed definition. *Lancet* 2009; 373:365-6.

D, and Wang M. Development and application of rodent models for type 2 diabetes. *Diabetes obesity and Metabolism* 2005; 7:307-317.

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

Damcott CM, Ott SH, Pollin TI, Reinhart LJ, Wang J, O'connell JR, *et al.* Genetic variation in adiponectin receptor 1 and adiponectin receptor 2 is associated with type 2 diabetes in the Old Order Amish. *Diabetes* 2005; 54:2245-2250.

Dandona P, Aljada A, Mahanty P, Ghanim H, Hamouda W, Assian E, *et al.* Insulin inhibits intranuclear nuclear factor kappaB and stimulates IκB in mononuclear cells in obese subjects: evidence for an anti-inflammatory effect?. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:3257-3265.

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

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

Danforth E Jr. Failure of adipocyte differentiation causes type II diabetes mellitus? *Nat Genet* 2000; 26:13.

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

## Bibliografía

---

Daval M, Foufelle F, Ferre P. Functions of AMP-activated protein kinase in adipose tissue. *J Physiol* 2006; 574:55-62.

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

De Leeuw JA, Jongbloed AW, and Verstegen MW. Dietary fiber stabilizes blood glucose and insulin levels and reduces physical activity in sows (*Sus scrofa*). *J Nutr* 2004; 134:1481-1486.

De Leo V, Musacchio MC, Palermo V, Di Sabatino A, Morgante G, Petraglia F. Polycystic ovary syndrome and metabolic comorbidities: Therapeutic options. *Drugs today* 2009; 45:763-75.

Debard C, Laville M, Berbe V, Loizon E, Guillet C, Morio-Liondore B *et al.* Expression of key genes of fatty acid oxidation, including adiponectin receptor, in skeletal muscle of type 2 diabetic patients. *Diabetologia* 2004; 47:917-925.

DeFronzo R, Ferrannini E. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia and a the atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes care* 1991; 14:173-194.

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

Djurhuus, C, Hansen T, Gravholt C, Orskov L, Hosoda H, Kangawa K, *et al.* Circulating levels of ghrelin and GLP-1 are inversely related during glucose ingestion. *Metab Res* 2002; 34:411-413.

Donahue RP, Abbott RD, Bloom E, Reed DM, Yano k. Central obesity and coronary heart disease in men. *Lancet* 1987; 1:821-824.

Ducimetière P, Richard J, Cambien F. The pattern of subcutaneous fat distributions in middle-aged men and risk of coronary heart disease: the Paris prospective study. *Int J Obes* 1986; 10:229-240.

Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* 2005; 365:1415-28.

Einstein FH, Fishman S, Muzumdar RH, Yang XM, Atzmon G, Barzilai N. Accretion of visceral fat and hepatic insulin resistance in pregnant rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 294:451-455.

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

Everson GT, Daggy BP, McKinley C, Story JA. Effects of psyllium hydrophilic mucilloid on LDL-cholesterol and bile acid synthesis in hypercholesterolemic men. *J Lipid Res* 1992; 33:1183-1192.

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

Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP). *JAMA* 2001; 285:1486-2497.

Fasshauer M, Klein J, Kralisch S, Klier M, Lossner U, Bluher M, *et al.* Growth hormone is a positive regulator of adiponectin receptor 2 in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett* 2004; 558:27-32.

Fernández ML, Ruiz LR, Conde AK, Sun DM, Erickson SK, McNamara DJ. Psyllium reduces plasma LDL in guinea pigs by altering hepatic cholesterol metabolism. *J Lipid Res* 1995 a; 36:1128-38.

Fernández ML. Distinct mechanisms of plasma LDL lowering by dietary fiber in the guinea pig: specific effects of pectin, guar gum, and psyllium. *J Lipid Res* 1995 b; 36:2394-404.

Fernández ML. Soluble fiber and nondigestible carbohydrate effects on plasma lipids and cardiovascular risk. *Curr Opin Lipidol* 2001; 12:35-40.

Ferrannini E, Buzzigoli G, Bonadonna R, Giorico MA, Oleggini M, Graziadei L, *et al.* Insulin resistance in essential hypertension. *N Engl J Med* 1987; 317:350-357.

## Bibliografía

---

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

Flint A, Raben A and Holst JJ. Glucagon-like peptide-1 promotes satiety and suppresses energy intake in humans. *J Clin Invest* 1998; 101:515-520.

Ford ES, Giles WH, Dietz WH. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA* 2002; 287: 356-59.

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

Foretz M, Carling D, Guichard C, Ferre P & Foufelle F. AMPactivated protein kinase inhibits the glucose-activated expression of fatty acid synthase gene in rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1998; 273:14767-71.

Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. Omental and subcutaneous adipose tissue of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:847-50.

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

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

Fukagawa NK, Anderson JW, Hageman G, Young VR, Minaker KL. High-carbohydrate, high fiber diets increase peripheral insulin sensitivity in healthy young and old adults. *Am J Clin Nutr* 1990; 52:524-528.

Gabriely L, Ma XH, Yang XM, Atzmon G, Rajala MW, Berg AH, *et al*. Removal of visceral fat prevents insulin resistance and glucose intolerance of aging: an adipokine-mediated process? *Diabetes* 2002; 51:2951-2958.

Galisteo, M, Sánchez M, Vera R, González M, Anguera A, Duarte J, *et al.* A diet supplement with husk of *Plantago ovata* reduces the development of endothelial dysfunction, hypertension, and obesity by affecting adiponectin and TNF- $\alpha$  in obese Zucker rats. *J Nutr* 2005; 16:2399-2404.

Galisteo M, Duarte J, Zarzuelo A. Effects of dietary fibers on disturbances clustered in the metabolic syndrome. *J Nutr Biochem* 2008; 19:61-84.

Gallaher CM, Munion J, Hesslink, Wise J, Gallaher DD. Cholesterol reduction by glucomannan and chitosan is mediated by changes in cholesterol absorption and bile acid and fat excretion in rats. *J Nutr* 2000; 130:2753-2759.

Gao Z, Yin J, Zhang J, Ward RE, Martin RJ, Lefevre M, *et al.* Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice. *Diabetes* 2009; 58:1509-1517.

Garaulet M, Hernández-Morante JJ, Lujan J, Tebar FJ, Zamora S, *et al.* Relationship between fat cell size and number and fatty acid composition in adipose tissue from different fat depots in overweight/obese humans. *Int J Obes (Lond)* 2006; 30:899-905.

García AL, Otto B, Reich SC, Weickert MO, Steiniger J, Machowetz A, *et al.* Arabinoxylan consumption decreases postprandial serum glucose, serum insulin and plasma total ghrelin response in subjects with impaired glucose tolerance. *Eur J Clin Nutr* 2007; 61:334-341.

García Peris P, Bretón Lesmes I, De la Cuerda, Compes C, Cambor Álvarez M: Metabolismo colónico de la fibra. *Nutr Hosp* 2002; 17:11-16.

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

Gee JM, Lee-Finglas W, Wortley GW, Johnson IT, *et al.* Fermentable carbohydrates elevate plasma enteroglucagon but high viscosity is also necessary to stimulate small bowel mucosal cell proliferation in rats. *J Nutr* 1996; 126:373-9.

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

## Bibliografía

---

Greenwald P, Lanza E, Eddy GA. Dietary fiber in the reduction of colon cancer risk. *J Am Diet Assoc* 1987; 87: 1178-1188.

Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW, Bell K, Barucci N, Lee D, *et al.* Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activity of protein kinase C and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes* 1999; 48:1270-1274.

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

Gutwiller JP, Goke B, Drewe J, Hildebrand P, Ketterer S, Handschin D, *et al.* Glucagon-like peptide-1: a potent regulator of food intake in humans. *Gut* 1999; 44:81-8.

Hacken NM. Physical inactivity and obesity: relation to asthma and chronic obstructive pulmonary disease? *Proc Am Thorac Soc* 2009; 6:663-667.

Hagander B, Asp N, Efendic S, Nilsson-Ehle P, Lungquist I, and Schersten B. Reduced glycemic response to beet-fibre meal in non-insulindependent diabetics and its relation to plasma levels of pancreatic and gastrointestinal hormones. *Diabetes Res* 1986; 3:91-96.

Hanai H, Ikuma M, Sato Y, Iida T, Hosoda Y, Matsushita I, *et al.* Long-term effects of water-soluble corn bran hemicellulose on glucose tolerance on obese and non-obese patients: improved insulin sensitivity and glucose metabolism in obese subjects. *Biosci Biotechnol Biochem* 1997; 61:1358-61.

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

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

Harris PJ, Ferguson LR. Dietary fibres may protect or enhance carcinogenesis. *Mutat Res* 1999; 443:95-110.

- Havel PJ. Control of energy homeostasis and insulin action by adipocyte hormones: leptin, acylation stimulating protein, and adiponectin. *Curr Opin Lipidol* 2002; 13:51-59.
- Hegyí K, Fülöp K, Kovács K, Tóth S, Faláus A. Leptin-induced signal transduction pathways. *Cell Biol Int* 2004; 28:159-169.
- Hill JO, Peters JC. Environmental contributions to the obesity epidemic. *Science* 1998; 280:1371-1374.
- Hipsley EH. Dietary fibre and pregnancy toxæmia. *BMJ* 1953; 2:420.
- Hofmann C, Lorenz K, Braithwaite SS, Colca JR, Palazuk BJ, Hotamisligil GS, *et al.* Altered gene expression for tumor necrosis factor- $\alpha$  and its receptors during drug and dietary modulation of insulin resistance. *Endocrinology*. 1994; 134:264-70.
- Holst JJ. Enteroglucagon. *Annu Rev Physiol* 1997; 59:257-271.
- Holt S, Brand J, Soveny C, Hansky J. Relationship of satiety to postprandial glycemic, insulin and cholecystokinin responses. *Appetite* 1992; 18:129-41.
- Honda H, Ikejima K, Hirose M, Yoshikawa M, Lang T, Enomoto N, *et al.* Leptin is required for fibrogenic responses induced by thioacetamide in the murine liver. *Hepatology* 2002; 36:12-21.
- Horton JD, Cuthbert JA, Spady DK. Regulation of hepatic 7( $\alpha$ )-hydroxylase expression by dietary psyllium in the hamster. *J Clin Invest* 1994; 93:2084-92.
- Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM, *et al.* Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993; 259:87-91.
- Hotamisligil GS, Murray DL, Choy LN, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor  $\alpha$  inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1994a; 91:4854-4858.
- Hotamisligil GS, Budavari A, Murray D, Spiegelman BM. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J Clin Invest* 1994b; 94:1543-1549.



## Bibliografía

---

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

Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- $\alpha$  and obesity-induced insulin resistance. *Science* 1996; 271:665-8.

Hotamisligil GS. Inflammatory pathways and insulin action. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003; 27:53-5.

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

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

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

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

Howarth NC, Saltzman E, Roberts SB. Dietary fiber and weight regulation. *Nutr Rev* 2001; 59:129-39.

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

Hwang JH, Pan JW, Heydari S, Hetherington HP, Stein DT. Regional differences in intramyocellular lipids in humans observed by in vivo <sup>1</sup>H-MR spectroscopic imaging. *J Appl Physiol* 2001; 90:1267-1274.

Ikejima K, Honda H, Yoshikawa M, Hirose M, Shimizu H, Kitamura T, *et al.* Leptin augments inflammatory and profibrogenic responses in the murine liver induced by hepatotoxic chemicals. *Hepatology* 2001; 34: 288–97.

Ikejima K, Takei Y, Honda, Hirose M, Yoshikawa M, Zhang YJ H, *et al.* Leptin receptor-mediated signaling regulates hepatic fibrogenesis and remodeling of extracellular matrix in the rat. *Gastroenterology* 2002; 122:1399–410.

Illman RJ. Hypocholesterolaemic effects of dietary propionate studies in whole animals and perfused rat liver. *Ann Nutr Metabol* 1988; 32:97-107.

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

Isken F, Klaus S, Osterhoff M, Pfeiffer A, Weickert M. Effects of long-term soluble vs. insoluble dietary fiber intake on high-fat diet-induced obesity in C57BL/6J mice. *J Nutr Biochem* 2010; 21:278-84.

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

James SL, Muir JG, Curtis SL, Gibson PR. Dietary fibre: a roughage guide. *Intern Med J* 2003; 33:291-6.

Jaswinder K, Sethi and Antonio J. Vidal-Puig. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *Journal of lipid research* 2007; 48:1253-1262.

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

Jenkins DJ. Lente carbohydrate: a newer approach to the dietary management of diabetes. *Diabetes Care* 1982; 5:634-41.

Jenkins DJ, Wolever TM, Jenkins A *et al.* Specific types of colonic fermentation may raise low-density-lipoprotein-cholesterol concentrations. *Am J Clin Nutr* 1991; 54:141-147.

Jenkins DJA. Fibre in the treatment of hyperlipidemia. In: Handbook of Dietary Fibre in Human Nutrition. *Spiller GA, ed. Florida, CRC Press* 1993:19-38.

Jeon BS, Park JW, Kim BK, Kim HK, Jung TS, Hahm JR, *et al.* Fermented mushroom milk-supplemented dietary fibre prevents the onset of obesity and hypertriglyceridaemia in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. *Diabetes Obes Metab* 2005; 7:709-15.

Johnson PR, Zucker LM, Cruce JA, Hirsch J. Cellularity of adipose depots in the genetically obese Zucker rat. *J Lipid Res.* 1971; 12:706-14.

Jones PJ, Leitch CA, Pederson RA. Meal frequency effects on plasma hormone concentrations and cholesterol synthesis in humans. *Am J Clin Nutr* 1993; 57:868-874.

Jones JR, Lineback DM, Levine MJ. Dietary reference intakes: implications for fiber labeling and consumption: a summary of the International Life Sciences Institute North America Fiber Workshop, 1-2 June 2004, Washington, DC. *Nutr Rev* 2006; 64:31-8.

Kadowaki T, Hara K, Yamauchi T, Terauchi Y, Tobe K, Nagai R. Molecular mechanism of insulin resistance and obesity. *Exp Biol Med (Maywood)* 2003; 228:1111-7.

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

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

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

Kakuma T, Lee Y, Higa M, Wang Z, Pan W, Shimomura I, *et al.* Leptin, troglitazone, and the expression of sterol regulatory element binding proteins in liver and pancreatic islets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:8536-41.

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

Kaplan N. The deadly quarter: Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridaemia, and, hypertension. *Arah Int Med* 1989; 149:1514-520.

Karroubi I, Rasschaert J, Eizirik DL, Cnop M. Expression of adiponectin receptors in pancreatic beta cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 312:1118-1122.

Kawaguchi T, Osatomi K, Yamashita H, Kabashima T, Uyeda K. Mechanism for fatty acid "sparing" effect on glucose-induced transcription: regulation of carbohydrate-responsive element-binding protein by AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 2002; 277:3829-35.

Kay RM, Truswell AS. Effects of citrus pectin on blood lipids and fecal steroid excretion in man. *Am J Clin Nutr* 1977; 30:171-175.

Kelley DE. Skeletal muscle triglycerides: an aspect of regional adiposity and insulin resistance. *Ann New York Acad Sci* 2002; 967:135-145.

Kelsay JL, Behall KM, Prather ES. Effect of fiber from fruits and vegetables on metabolic responses of human subjects. Bowel transit time, number of defecations, fecal weight, urinary excretions of energy and nitrogen and apparent digestibilities of energy, nitrogen and fat. *Am J Clin Nutr* 1978; 31:1149-1153.

Kern PA, Saghizadeh M, Ong JN, Bosch RJ, Deem R, Simsolo RB. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest* 1995; 95:2111-2119.

Keys A, Grande F, Anderson JT. Fibre and pectin in the diet and serum cholesterol concentration in man. *Proc Soc Esp Biol* 1961; 106: 555-8.

Kim YW, Kim JY, Lee SK. Surgical removal of visceral fat decreases plasma free fatty acid and increase insulin sensitivity on liver and peripheral tissue in monosodium glutamate (MSG)-obese rats. *J Korean Med Sci* 1999; 14:539-545.

King DE, Egan BM, Geesey ME. Relation of dietary fat and fiber to elevation of C-reactive protein. *Am J Cardiol* 2003; 92:1335-9.

King DE, Mainous AG, Egan BM, Woolson RF, Geeset ME. Fiber and C-Reactive Protein in diabetes, hypertension, and obesity. *Diabetes Care* 2005; 28:1487-9.

Kirilmaz B, Asgun F, Alioglu E, Ercan E, Tengiz I, Turk U, *et al.* High inflammatory activity related to the number of Metabolic syndrome components. *J Clin Hypertens* 2010; 12:136-44.

Kivipelto M, Solomon A. Cholesterol as a risk factor for Alzheimer's disease - epidemiological evidence. *Acta Neurol Scand Suppl.* 2006; 185:50-7.

Kleiner D, Brunt E, Van Natta M, Behling C, Contos M, Cummings W. Design and Validation of a Histological Scoring System for Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatology* 2005; 41:1313-1321.

Kojima M, and Kangawa K. Ghrelin, an orexigenic signaling molecule from the gastrointestinal tract. *Curr Opin Pharmacol* 2002; 2:665-668.

Kok N, Roberfroid M, Robert A, Delzenne N. Involvement of lipogénesis in the lower VLDL secretion induced by oligofructose in rats. *Br J Nutr* 1996; 76:880-91.

Kok NN, Morgan LM, Williams CM, Roberfroid MB, Thissen J-P, Delzenne NM. Insulin, glucagon-like peptide 1, glucose- dependent insulinotropic polypeptide and insulin-like growth factor I as putative mediators of the hypolipidemic effect of oligofructose in rats. *J Nutr* 1998; 128:1099-103.

Kok NN, Morgan LM, Williams CM, Roberfroid MB, Thissen J-P, Delzenne NM. Insulin, glucagon-like peptide 1, glucose- dependent insulinotropic polypeptide and insulin-like growth factor I as putative mediators of the hypolipidemic effect of oligofructose in rats. *J Nutr* 1998; 128:1099-103.

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

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

Kreier F, Yilmaz A, Kalsbeek A, Romijh JA, Sauerwein H, Fliers E, *et al.* Hypothesis: shifting the equilibrium from activity to food leads to autonomic unbalance and the Metabolic syndrome. *Diabetes* 2003; 52:2652-6.

Kritchevsky D, Davidson LM, Shapiro IL, Kim HK, Kitagawa M, Malhotra S, *et al.* Lipid metabolism and experimental atherosclerosis in baboons: influence of cholesterol-free, semi-synthetic diets. *Am J Clin Nutr* 1974; 27: 29-50.

Kromhout D, Bloemberg B, Seidell JC, Nissinen A, Menotti A. Physical activity and dietary fiber determine population fat levels: the Seven Countries Study. *Int J Obes* 2001; 25:301-6.

Kvale D, Brandzaeg P. Constitutive and cytokine induced expression of HLA molecules, secretory component, and intracellular adhesion molecule-1, is modulated by butyrate in the colonic epithelial cells line HT-29. *Gut* 1995; 36:737-42.

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

Mora S, Pessin JE. An adipocentric view of signaling and intracellular trafficking. *Diabetes Metab Res Rev* 2002; 18:345-356.

Lapidus L, Bengtsson C, Larsson B, Pennert K, Rybo E, Sjöström L. Distribution of adipose tissue and risk of cardiovascular disease and death: a 12 years follow-up of participants in the population study of women in Gothenburg, Sweden. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1984; 289:1257-1261.

Larsson B, Svärdsudd KI, Welin L, Wilhelmsen L, Björntorp P, Tibblin G. Abdominal adipose tissue distribution obesity and risk of cardiovascular disease and death: 13 year follow-up of participants in the study of men born in 1913. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1984; 288:1401-1404.

Leclercq IA, Farrell GC, Schriemer R, Robertson GR. Leptin is essential for the hepatic fibrogenic response to chronic liver injury. *J Hepatol* 2002; 37:206-13.

Leclere CL, Champ M, Boillot J, Guille G, Lecannu G, Molis C, *et al.* Role of viscous guar gums in lowering the glycemic response after a solid meal. *Am J Clin Nutr* 1994; 59:914-21.

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

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

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

Lee JM, Kim SR, You SJ, Hong OK, Son HS, Chang SA. The relation ship between adipokines, metabolic parameters and insulin resistance in patients with metabolic syndrome and type 2 diabetes. *J Int Med Res* 2009; 37:1803-1812.

Li J, Wang J, Kancko T, Qin LQ, Sato A. Effects of fiber intake on the blood pressure, lipids, and heart rate in Goto Kakizaki rats. *Nutrition* 2004; 20:1003-7.

Liddle RA. Cholecystolin cells. *Annu Rev Physiol* 1997; 59:221-42.

Lidfeldt J, Nyberg P, Nerbrand C, Samsiose G, Shersten B, Agardh CD. Socio-demographic and psychological factor are associated with features of the metabolic syndrome: the Women´s Health in the Lund Area (WHILA) study. *Diab Obes Metab* 2003; 5:106-112.

Liese AD, Mayer-Davis EJ, Haffner SM. Development of the multiple metabolic sundrome: an epidemiologic perspective. *Epidemid Rev* 1998; 20:157-172.

Liew CF, Seah ES, Yeo KP, Lee KO, Wise SD. Lean, nondiabetic Asian Indians have decreased insulin sensitivity and insulin clearance, and raised leptin compared to Caucasians and Chinese subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003; 27:784–789.

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

Lilja M, Rolandsson O, Shaw JE, Pauvaday V, Cameron AJ, Toumilento J, *et al.* Higer leptin levels in Asian Indians than Creoles and Europids: a potential explanation for increased metabolic risk. *Interntional Journal of obesity* 2010; doi:10.1038.

Limb BO, Yamada K, Nonaka M, Kuramoto Y, Hung P, Sugano M. Dietary fibers modúlate índices of intestinal inmune function in rats. *J Nutr* 1997; 127:663-7.

Lin L, Martin R, Schaffhauser AO, York DA. Acute changes in the response to peripheral leptin with alteration in the diet composition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; 280:504-509.

Lippl F, Kircher F, Erdmann J, Allescher H and Schusdziarra, V. Effect of GIP, GLP-1, insulin and gastrin on ghrelin release in the isolated rat stomach. *Regul Pept* 2004; 119:93-8. 2004.

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

Lorenzo C, Serrano-Ríos M, Martínez-Larrad MT, Gabriel R, Williams K, Gómez-Gerique JA, *et al.* Central adiposity determines prevalence differences of the metabolic syndrome. *Obes Res* 2003; 11:1480-7.

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

Ma Y, Griffith JA, Chasan-Taber L, Olendzki BC, Jackson E, Stanek EJ 3rd, *et al.* Association between dietary fiber and serum C-reactive protein. *Am J Clin Nutr* 2006; 83:760-6.

Machann J, Haring H, Schick F, and Stumvoll M. Intramyocellular lipids and insulin resistance. *Diabetes* 2004; 6:239-48.

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

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

Mannucci E, Ognibene A, Cremasco F, Bardini G, Mencucci A, Pierazzuoli E, *et al.* Glucagon-like peptide (GLP)-1 and leptin concentrations in obese patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med* 2000; 17:713-719.



Mantena S, King A, Andringa K, Eccleston H, Bailey S. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of alcohol and obesity-induced fatty liver disease. *Free Radic Biol Med* 2008; 44:1259-1272.

Marchesni G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, *et al.* Non alcoholic fatty liver disease. A feature of the Metabolic syndrome. *Diabetes* 2001; 50:1844-1850.

Marlett JA, Hosig KB, Vollendorf NW, Shinnick FL, Haack VS, Story JA. Mechanism of serum cholesterol reduction by oat bran. *Hepatology* 1994; 20:1450-1457.

Marlett JA, McBurney MI, Slavin JL. American Dietetic Association. Position of the American Dietetic Association: Health implications of dietary fiber. *J Am Diet Assoc* 2002; 102:993-1000.

Martínez-Larrad MT, Fernández-Pérez C, Sánchez JL, López A, Fernández-Álvarez J, Riviriego J, *et al.* Prevalencia del síndrome metabólico (criterios ATP-III). Estudio de base poblacional en áreas rural y urbana de la provincia de Segovia. *Med Clin (Barc)* 2005; 125:481-6.

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

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

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

Mazur A, Remesy C, and Demigne C. The effect of high-fibre diet on plasma lipoproteins and hormones in genetically obese Zucker rats. *Eur J Clin Invest* 1990; 20:600-606.

McKeown NM, Meigs JB, Liu S, Saltzman E, Wilson PW, Jacques PF. Carbohydrate nutrition, insulin resistance, and the prevalence of the metabolic syndrome in the Framingham Offspring Cohort. *Diabetes Care* 2004; 27:538-46.

Meier JJ, Gallwitz B, Schmidt WE, and Nauck MA. Glucagon-like peptide-1 as a regulator of food intake and body weight: therapeutic perspectives. *Eur J Pharmacol* 2002; 440:269-279.

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

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

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

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

Mohanty P, Hamouda W, Garg R, Aljada A, Ghanim H, Dandona P. Glucose challenge stimulates reactive oxygen species (ROS) generation by leucocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:2970-2973.

Mokdad AH, Ford ES, Bauman BA, Dietz WH, Vinicor F, Bales VS, *et al.* Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factor, 2001. *JAMA* 2003; 289:76-9.

Mora S, Pessin JE. An adipocentric view of signaling and intracellular trafficking. *Diabetes Metab Rev* 2002; 18:345-56.

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

Muller S, Cleary MP. Glucose metabolism in isolated adipocytes from ad Libitum- and restricted-fed lean and obese Zucker rats at two different ages. *Proc Soc Exp Biol Med* 1988; 187:398-407.

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

Musi N, Goodyear LJ. Targeting the AMP-activated protein kinase for the treatment of type 2 diabetes. *Curr Drg Targets Immune Endrocr Metabol Disord* 2002(a); 2:119-27.

Musi N, Hirshman MF, Nygren J, Svanfeldt M, Bavenholm P, Rooyackers O, *et al.* Metformin increases AMP-activated protein kinase activity in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes. *Diabetes* 2002(b); 51:2074-81.

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

Myers MG Jr, White MF. The Molecular Basis of Insulin Action: Insulin Signaling: From cultured cells to animal models. Edit: Gruenberg G, Zick Y. Taylor and Francis, *New York* 2002:55-87.

Nannipieri M, Bonotti A, Anselmino M, Cecchetti F, Madec S, Mancini E, *et al.* Pattern of expression of adiponectin receptors in human adipose tissue depots and its relation to the metabolic state. *Int J Obes* 2007; 31:1843-8.

Naslund E, Gryback P, Backman L, Jacobsson H, Holst JJ, Theodorsson E, *et al.* Distal small bowel hormones: correlation with fasting antroduodenal motility and gastric emptying. *Dig Dis Sci* 1998; 43:945-52.

Naslund E, Barkeling B, King N, Gutniak M, Blundell JE, Holst JJ, *et al.* Energy intake and appetite are suppressed by glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in obese men. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999; 23:304-311.

Nieto FJ, Peppard PE, Young TB. Sleep disordered breathing and metabolic syndrome. *WMJ* 2009; 108:263-5.

Barzilai N, She L, Liu B, Vuguin P, Cohen P, Wang J, *et al.* Surgical removal of visceral fat reverse hepatic insulin resistance. *Diabetes* 1999; 48:94-98.

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

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

Norrelund H, Hansen K, Orskov H, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, *et al.* Ghrelin immunoreactivity in human plasma is suppressed by somatostatin. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2002; 57:539-546.

Noshiro M, Okuda K. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA encoding human cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase. *FEBS* 1990; 268:237-240.

Obata K, Ikeda K, Yamasaki M, Yamori Y. Dietary fiber, psyllium, attenuates salt-accelerated hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 1998; 16:1959-64.

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

Oku T, Konishi F, Hosoya N. Mechanism of inhibitory effect of unavailable carbohydrate on intestinal calcium absorption. *J Nutr* 1982; 112:410-415.

Onning G, Wallmark A, Persson M, Akesson B, Elmståhl S, Oste R. Consumption on oat milk for 5 weeks lowers serum cholesterol and LDL cholesterol in free-living men with moderate hypercholesterolemia. *Ann Nutr Metab* 1999; 43:301-309.

Orskov C, Bersani M, Johnsen AH, Hojrup P y Holst JJ. Complete sequences of glucagon-like peptide-1 from human and pig small intestine. *J Biol Chem* 1989; 264:12826-12829.

Park KS, Ciaraldi TP, Lindgren K, Abrams-Carter L, Mudaliar S, Nikoulina SE, *et al.* Troglitazone effects on gene expression in human skeletal muscle of type II diabetes involve up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:2830-5.

Park YW, Zhu S, Palaniappan L, Llehka S, Carnethon MR, Heymsfield SB. The Metabolic syndrome prevalence and associated risk factor findings in the US population from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arch Intern Med* 2003; 163:427-36.

Pastors JG, Blaisdell PW, Balm TK, Asplin CM, Pohl SL. Psyllium fiber reduces rise in postprandial glucose and insulin concentrations in patients with non-insulin-dependent diabetes. *Am J Clin Nutr* 1991; 53:1431-5.

Patty M, Kahn CR. The insulin receptor—a critical link in glucose homeostasis and insulin action. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 1998; 9: 89-109.

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

Peng L, Li ZR, Green RS, Holzman IR, Lin J. Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers. *J Nutr* 2009; 139:1619-1625.

Pereira MA, Jacobs DR Jr, Pins JJ, Raatz SK, Gross MD, Slavin JL, *et al.* Effect of whole grains on insulin sensitivity in overweight hyperinsulinemic adults. *Am J Clin Nutr* 2002; 75: 848-55.

Pérez-Bravo F, Albala C, Santos JL, Yañez M, Carrasco E. Leptin levels distribution and ethnic background in two populations from Chile: Caucasian and Mapuche groups. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1998; 22:943-948.

Petersen KF, Shulman GI. Pathogenesis of skeletal muscle insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 2002; 90:11-18.

Phillips C, Lopez Miranda J, Perez Jimenez F, Mamanus R, Roche HM. Genetic and nutrient determinants of the Metabolic syndrome. *Curr opin Cardiol* 2006; 21:185-93.

Pickup JC, Mattock MB, Chusney GD, Burt D. NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. *Diabetología* 1997; 40:1286-92.

Pickup JC. Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27:813.

Pico C, Sanchez J, Oliver P, Palou A. Leptin production by the stomach is upregulated in obese (fa/fa) Zucker rats. *Obes Res* 2002; 10: 932-8.

Pitcher MC, Cummings JH. Hydrogen sulphide: a bacterial toxin in ulcerative colitis?. *Gut* 1996; 39: 1-4.

Pitombo C, Araujo EP, De Souza CT, Pareja JC, Geloneze B, Velloso LA. Amelioration of diet-induced diabetes mellitus by removal of visceral fat. *J Endocrinol* 2006; 191:699-706.

- Pittler MH, Ernst E. Guar gum for body weight reduction: meta-analysis of randomized trial. *Am J Med* 2001; 110:724-30.
- Pittler MH, Ernest E. Dietary supplements for body-weight reduction: a systematic review. *Am J Clin Nutr* 2004; 79:529-536.
- Platz EA, Giovannucci EL, Rimm EB, Rockett HR, Stampfer MJ, Colditz GA, *et al.* Dietary fiber and distal colorectal adenoma in men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997; 6:661-670.
- Plomgaard P, Bouzakri K, Krogh-Madsen R, Mittendorfer B, Zicrath JR, Pedersen BK. Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces skeletal muscle insulin resistance in healthy human subjects via inhibition of akt substrate 160 phosphorylation. *Diabetes* 2005; 54:2939-2945.
- Potter JD, Slattery ML, Bostick RM, Gapstur SM. Colon cancer: a review of the epidemiology. *Epidemiol Rev* 1993; 15:499-545.
- Potter JJ, Womack L, Mezey E, Anania FA. Transdifferentiation of rat hepatic stellate cells results in leptin expression. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 244:178-82.
- Potter JJ, Rennie-Tankesley L, Mezey E. Influence of leptin in the development of hepatic fibrosis produced in mice by *Schistosoma mansoni* infection and by chronic carbon tetrachloride administration. *J Hepatol* 2003; 38:281-8.
- Qi L, Rimm E, Liu S, Rifai N, Hu FB. Dietary glycemic index, glycemic load, cereal fiber, and plasma adiponectin concentration in diabetic men. *Diabetes Care* 2005; 28:1022-8.
- Qi L, van Dam RM, Lui S, Franz M, Mantzoros C, Hu FB. Whole-grain, bran, and cereal fiber intakes and markers of systemic inflammation in diabetic women. *Diabetes Care* 2006; 29:207-211.
- Randle P, Garland C, Hales C, Newsholme E. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1963; 1:785-789.
- Ranganath LR, Beety JM, Morgan LM, Wright JW, Howland R, Marks V. Attenuated GLP-1 secretion in obesity: cause or consequence? *Gut* 1996; 38:916-9.

Rasmussen M, Lihn A, Pedersen S, Bruun J, Rasmussen M, and Richelsen B. Adiponectin Receptors in Human Adipose Tissue: Effects of Obesity, Weight Loss, and Fat Depots. *Obesity* 2006; 14:28-35.

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

Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988; 37:1595-1607.

Reimer RA, McBurney MI. Dietary fiber modulate intestinal proglucagon messenger ribonucleic acid and postprandial secretion of glucagon-like peptide-1 and insulin in rats. *Endocrinology* 1996; 137:3948-56.

Rigaud D, Rytting KR, Angel LA, Apfelbaum M. Overweight treated with energy restriction and a dietary fibre supplement: a 6-month randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Int J Obes* 1990; 14:763-9.

Ritchie SA, Connell JM. The link between abdominal obesity, Metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2007; 17:319-326.

Rivera L, Morón R, Sánchez M, Zarzuelo A, Galisteo M. Quercetin ameliorates metabolic syndrome and improves the inflammatory status in obese Zucker rats. *Obesity* 2008; 16:2081-7.

Rivera L, Morón R, Zarzuelo A, Galisteo M. Long-term resveratrol administration reduces metabolic disturbances and lowers blood pressure in obese Zucker rats. *Biochem Pharmacol* 2009; 77:1053-63.

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

Roediger WE. The colonic epithelium in ulcerative colitis: an energy deficiency disease? *Lancet* 1980; 2: 712-15.

Roediger WE. The effect of bacterial metabolites on nutrition and function of the colonic mucosa symbiosis between man and bacteria. Kasper H, Goebell H: Falk Symposium Colon and nutrition. *Lancaster: MTP Press Limited* 1982; 32: 11-24.

Rossner S, von Zweigbergk D, Ohlin A, Ryttig K. Weight reduction with dietary fibre supplements. Results of two double-blind randomized studies. *Acta Med Scand* 1987; 222:83-8.

Ruan H, Lodish HF. Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor. *Cytokine Growth factor Rev* 2003; 14:447-55.

Ruderman NB, Cacicedo JM, Itani S, Yagihashi N, Saha AK, Ye JM, *et al.* MalonylCoA and AMPK activated protein kinase (AMPK): possible links between insulin resistance in muscle and early endothelial cell damage in diabetes. *Biochem Soc Trans* 2003; 31:202-206.

Ruhl CE, Everhart JE. Leptin concentrations in the United States: relations with demographic and anthropometric measures. *Am J Clin Nutr* 2001; 3:295-301.

Ruhl CE, Everhart JE, Ding J, Goodpaster BH, Kanaya AM, Simonsick EM, *et al.* Serum leptin concentrations and body adipose measures in older black and white adults. *Am J Clin Nutr* 2004; 80:576-583.

Ryttig KR, Tellnes G, Haegh L, Boe E, Fagerthun H. A dietary fibre supplement and weight maintenance after weight reduction: a randomized, double-blind, placebo-controlled long-term trial. *Int J Obes* 1989; 13:165-71.

Sacks FM, Kass EH. Low blood pressure in vegetarians: effect of specific foods and nutrients. *Am J Clin Nutr* 1988; 48:795-800.

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

Sakakibara S, Yamauchi T, Oshima Y, Tsukamoto Y, Kadowaki T. Acetic acid activated hepatic AMPK and reduces hyperglycemia in diabetic KK-A(y) mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 344:597-604.

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

Salmeron J, Acherio A, Rimm E, Colditz G, Spiegelman D, Jenkins D, *et al.* Dietary fiber, glycemic load, and risk of NIDDM in men. *Diabetes Care* 1997a; 20:545-550.



Salmeron J, Manson J, Stampfer M, Colditz G, Wing A, Willett WC. Dietary fiber, glycemic load, and risk of non-insulin dependent diabetes mellitus in women. *J Am Med Assoc* 1997b; 277:472-477.

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

Saltzman E, Das SK, Lichtenstein AH, Dallal GE, Corrales A, Schaefer EJ, *et al.* An oat-containing hypocaloric diet reduces systolic blood pressure and improves lipid profile beyond effects of weight loss in men and women. *J Nutr* 2001; 131:1465-1470.

Sarafidis P, Nilsson P. The metabolic syndrome: a glance at its history. *J Hypertens* 2006; 24:621-626.

Sastre Gallego A: Fibra y prebióticos: conceptos y perspectivas. *Gastroenterol Hepatol* 2003; 26:6-12.

Saxena NK, Ikeda K, Rockey DC, Friedman SL, Anania FA. Leptin in hepatic fibrosis: Evidence for increased collagen production in stellate cells and lean littermates of ob/ob mice. *Hepatology* 2002; 35: 762-71.

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

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

Semple RK, Sleigh A, Murgatroyd PR, Adams CA, Bluck L, Jackson S, *et al.* Postreceptor insulin resistance contributes to human dyslipidemia and hepatic steatosis. *J Clin Invest* 2009; 119:315-322.

Seppala-Lindroos A, Vehkavaara S, Häkkinen AM, Goto T, Westerbacka J, Sovijärvi A, *et al.* Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:3023-28.

- Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D, Koo SH, Bardeesy N, Depinho RA, *et al.* The kinase LKB1 mediates glucosa homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science* 2005; 310:1642-1646.
- Shimada M, Date Y, Mondal M, Toshinai K, Shimbara T, Fukunaga K, *et al.* Somatostatin suppresses ghrelin secretion from the rat stomach. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 302:520-525.
- Shimizua A, Takamura T, Matsuzawaa N, Nakamura S, Nabemotoa S, Takeshitaa Y, *et al.* Regulation of adiponectin receptor expression in human liver and a hepatocyte cell line 2007. *Metabolism Clinical and Experimental*; 56:1478-1485.
- Shimomura I, Bashmakov Y, Horton J. Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus. *J Biol Chem* 1999; 274:30028-32.
- Shimomura I, Matsuda M, Hammer RE, Bashmakov Y, Brown MS, Goldstein JL. Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. *Mol Cell* 2000; 6:77-86.
- Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 2000; 106:171-76.
- Sierra M, García JJ, Fernández N, Diez MJ, Calle AP, Sahagun AM, *et al.* Effects of ispaghula husk and guar gum on postprandial glucose and insulin concentrations in healthy subjects. *Eur J Clin Nutr* 2001; 55:235-43.
- Sierra M, García JJ, Fernández N, Diez MJ, Calle AP, Farmafibra Group. Therapeutic effects of psyllium in type 2 diabetic patients. *Eur J Clin Nutr* 2002; 56:830-42.
- Simón E, Del barrio AS. Leptina y obesidad. *Anales sis San Navarra* 2002; 25:53-64.
- Solum TT, Rytting KR, Solum E, Larsen S. The influence of a high-fibre diet on body weight, serum lipids and blood pressure in slightly overweight persons. A randomized, double-blind, placebo-controlled investigation with diet an fibre tablets. *Int J Obes* 1987; 11:67-71.
- Song YJ, Sawamura M, Ikeda K, Igawa S, Yamori Y. Soluble dietary fibre improves insulin sensitivity by increasing muscle GLUT-4 content in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2000; 27:41-5.

Spiller RC. Impact of dietary fiber on absorption in the small intestine. *Curr Opin Gastroenterology* 1999; 15:100-2.

Staiger H, Kaltenbach S, Staiger K, Stefan N, Fritsche A, Guirguis A, *et al.* Expression of adiponectin receptor mRNA in human skeletal muscle cells is related to in vivo parameters of glucose and lipid metabolism. *Diabetes* 2004; 53:2195-2201.

Stefan N, Vozarova B, Funahashi T, Matsuzawa Y, Weyer C, Lindsay RS, *et al.* Plasma adiponectin concentration is associated with skeletal muscle insulin receptor tyrosine phosphorylation, and low plasma concentration precedes a decrease in whole-body insulin sensitivity in humans. *Diabetes* 2002; 51:1884-1888.

Stefan N, Machicao F, Staiger H, Machann J, Schick F, Tschritter O, *et al.* Polymorphisms in the gene encoding adiponectin receptor 1 are associated with insulin resistance and high liver fat. *Diabetologia* 2005; 48:2282-2291.

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

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

Sullivan JE, Brocklehursts KJ, Marley AE, Carey F, Carling D, Beri RK. Inhibition of lipolysis and lipogenesis in isolated rat adipocytes with AICAR, a cell-permeable activator of AMP-activated protein kinase. *FEBS Lett* 1994; 353:33-6.

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

Tang W, Hong Y, Province MA, Rich SS, Hopkins PN, Arnett DK, *et al.* The national heart, lung, and blood institute (NHLBI) family heart study. Familial clustering for features of the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2006; 29:631-636.

Thacker PA, Solomon MO, Aherne FX, Milligan LP, Bowland JP. Influence of propionic acid on the cholesterol metabolism of pigs fed hypercholesterolemic diets. *Can J Anim Sci* 1981; 61:969-975.

- Todesco T. Propionate lowers blood glucose and alters lipid metabolism in healthy subjects. *Am J Clin Nutr* 1991; 54:860-865.
- Toeddiger WE. The colonic epithelium in ulcerative colitis, an energy-deficiency disease? *Lanxet* 1980; 2:712-15.
- Tomas E, Lin YS, Dagher Z, Saha A, Luo Z, Ido Y, *et al.* Hyperglycemic and insulin resistance: possible mechanisms. *Ann NY Acad Sci* 2002a; 967:43-51.
- Tomas E, Tsao TS, Saha AK, Murrey HE, Zhang Cc C, Itani SI, *et al.* Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002b; 10:16309-163.
- Trantwein EA, Kunath-Ran A, Erbersdobler HF. Increased fecal bile acid excretion and changes in the circulating bile acid pool are involved in the hypocholesterolemic and gallstone preventive actions of psyllium in hamsters. *J Nutr* 1999; 129:896-902.
- Trautwein EA, Kunath-Rau A, Erbersdobler HF. Increased fecal bile acid excretion and changes in the circulating bile acid pool are involved in the hypocholesterolemic and gallstone-preventive actions of psyllium in hamsters. *J Nutr* 1999; 129:896-902.
- Treebak JT, Glund S, Deshmukh A, Klein DK, Long YC, Jensen TE, *et al.* AMPKmediated AS160 phosphorylation in skeletal muscle is dependent on AMPK catalytic and regulatory subunits. *Diabetes* 2006; 55:2051-058.
- Tripathy D, Mohanty P, Dhindsa S, Syed T, Ghanim H, Aljada A, *et al.* Elevation of free fatty acids induces inflammation and impairs vascular reactivity in healthy subjects. *Diabetes* 2003; 52:2882-2887.
- Trowell H. Crude fibre, dietary fibre and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1972(a); 16:138.
- Trowell H. Isquemic heart disease and dietary fibre. *Am J Clin Nutr* 1972(b); 25:926-32.
- Tsubone T, Masaki T, Katsuragi I, Tanaka K, Kakuma T and Yoshimatsu H. Ghrelin regulates adiposity in white adipose tissue and UCP1mRNAexpression in brown adipose tissue in mice. *Regul Pept* 2005; 130:97-103.

Tsuchida A, Yamauchi T, Takekawa S, Hada Y, Ito Y, Maki T, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha activation increases adiponectin receptors and reduces obesity-related inflammation in adipose tissue: comparison of activation of PPAR alpha, PPAR gamma,, and their combination. *Diabetes* 2005; 54:3358-3370.

Tsuchida A, Yamauchi T, Ito Y, Hada Y, Maki T, Takekawa S, *et al.* Insulin/Foxo 1 pathway regulates expression levels of adiponectin receptors and adiponectin sensitivity. *J Biol Chem* 2004; 279:30817-30822.

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

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

Vague J. Sexual differentiation, a factor affecting the forms of obesity. *Pres Med* 1947; 30:339-40.

Van Beresteyn EC, Van Schaik M, and Mogot MF. Effect of brand and cellulose on lipid metabolism in obese females Zucker rats. *J Nutr* 1979; 109:2085-2097.

Van Itallie TB. Dietary fiber and obesity. *Am J Clin Nutr* 1978; 31: 43-52.

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

Vaxillarie M, Dechaume A, Vasseur-Delannoy V, Lahmidi S, Vatin V, Leprêtre F, *et al.* Genetic analysis of ADIPOR1 and ADIPOR2 candidate polymorphisms for type 2 diabetes in the Caucasian population. *Diabetes* 2006; 55:856-861.

Venter CS, Vorster HH, Cummings JH. Effects of dietary propionate on carbohydrate and lipid metabolism in man. *Am J Gastroenterol* 1989; 85:549-553.

Verdich C, Toubro S, Buemann B, Lysgard MJ, Juul HJ, Astrup A. 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* 2001; 25:1206-1214.

Vilsboll T, Krarup T, Deacon CF, Madsbad S, Holst JJ. Reduced postprandial concentrations of intact biologically active glucagon-like peptide 1 in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 2001; 50:609-613.

Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the Metabolic syndrome. *Endocr Rev* 2000; 21:697-738.

Wang Z, Zuberi A, Zhang X, Macgowan J, Qin J, Ye X, *et al.* Effects of dietary fibers on weight gain, carbohydrate metabolism, and gastric ghrelin gene expression in mice fed a high-fat diet. *Metabolism Clinical and Experimental* 2007; 56:1635-1642.

Wang J, Leclercq J, Brymora N, Xu M. Kupffer Cells Mediate Leptin- Induced Liver Fibrosis. *J Gastroenterology* 2009; 137:713-23.

Weickert MO, Mohlig M, Schofl C, Arafat AM, Otto B, Viehoff H, *et al.* Cereal fiber improves whole-body insulin sensitivity in overweight and obese women. *Diabetes Care* 2006; 29:775-80.

Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RI, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003; 112:1796-808.

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

Whelton SP, Hyre AD, Pedersen B, *et al.* Effect of dietary fiber intake on blood pressure: a meta-analysis of randomized, controlled clinical trials. *J Hypertension* 2005; 23:475-81.

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

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

## Bibliografía

---

Wilson JN, Wilson SP, and Eaton RP. Dietary fiber and lipoproteins metabolism in the genetically obese Zucker rat. *Arteriosclerosis* 1984; 4:147-153.

Winder WW, Hardie DG. The AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in Type 2 diabetes. *Am J Physiol* 1999; 277:1-10.

Wolever TMS, Spadafora PJ, Cunnane SC, et al. Propionate inhibits incorporation of colonic acetate into plasma lipids in humans. *Am J Clin Nutr* 1995; 61:1241-1247.

World Health Organization. Fact sheet: obesity and overweight. Internet: [http:// www. Who.int/dietphysicalactivity/publications/facts/obesity/en/](http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/facts/obesity/en/)(accessed 3 January 2005).

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

Wright RS, Anderson JW, Bridges SR. Propionate inhibits hepatocyte lipid synthesis. *Proc Soc Exp Biol Med* 1990; 195:26-29.

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

Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tang G, Yang D, Chou CJ, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 2003; 112:1821-30.

Yahagi N, Shimano H, Hasty A, Matsuzaka T, Ide T, et al. Absence of sterolregulatory element-binding protein-1 (SREBP-1) ameliorates fatty livers but not obesity or insulin resistance in Lepob/Lepob Mice *J Biol Chem* 2002; 277:19353-19357.

Yamauchi T, Kamon J, Waki H, et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med*. 2001;7:941- 6.

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

- Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Imai Y, Shimozawa N, Hioki K, *et al.* Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and ApoE-deficient mice from atherosclerosis. *J Biol Chem* 2003a; 278:2461–8.
- Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, *et al.* Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 2003b; 423:762–9.
- Yamauchi T, Nio Y, Maki T, Kobayashi M, Takazawa T, Iwabu M, *et al.* Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat Med* 2007; 13:332–339.
- Ye J, Frangioudakis G, Iglesias M, Furler S, Ellis B, Dzamko N, *et al.* Prior Thiazolidinedione Treatment Preserves Insulin Sensitivity in Normal Rats during Acute Fatty Acid Elevation: Role of the Liver. *Endocrinology* 2002; 143:4527–4535.
- Ylonen K, Saloranta C, Kronberg-Kippila C, Groop L, Aro A, Virtanen M. Botnia Dietary Study. Associations of dietary fiber with glucose metabolism in nondiabetic relatives of subjects with type 2 diabetes: the Botnia Dietary Study. *Diabetes Care* 2003; 26:1979–85.
- Yu X, McCorkle S, Wang M, Lee Y, Li J, Saha AK, *et al.* Leptinomimetic effects of the AMP kinase activator AICAR in leptin-resistant rats: prevention of diabetes and ectopic lipid deposition. *Diabetologia* 2004; 47:2012–2021.
- Zander M, Madsbad S, Madsen JL, and Holst JJ. Effects of 6-week course of glucagon-like peptide-1 on glycaemic control, insulin sensitivity, and beta-cell function in type 2 diabetes: a parallel-group study. *Lancet* 2002; 359:824–830.
- Zarzuelo A, Galv ez J. Fibra dietética. En: Gil A, ed. *Tratado de Nutrici n*. Madrid: Acción M dica 2005:337–68.
- Zarzuelo A. Fibra dietetic. En: Aranceta ed. *Gu as alimentarias para la población española*. Madrid 2001:277–87.
- Zhang HH, Halbleib M, Ahmad F, Manganiello VC, Greenberg AS. Tumor necrosis factor-alpha stimulates lipolysis in differentiated human adipocytes through activation of extracellular signal-related kinase and elevation of intracellular cAMP. *Diabetes* 2002; 51:2929–2935.



## Bibliografía

---

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

Zhou J, Hegsted M, McCutcheon KM, Keenan MJ, Xi X, Raggio AM, *et al.* Peptide YY and proglucagon mRNA expression patterns and regulation in the gut. *Obesity* 2006; 14:683-9.

Zhou G, *et al.* Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* 2001; 108:1167-74.

Zhu S, St-onge MP, Heshka S, Hegmsfield SB. Lifestyle behaviors associated with lower risk of having the metabolic syndrome. *Metabolism* 2004; 53:1503-11.

Zierath JR, Krook A, Wallberg-Henriksson H. Insulin action and insulin resistance in human skeletal muscle. *Diabetologia* 2000; 43:821-35.

Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 2001; 414:782-87.

Zimmet P, Magliano D, Matsuzawa Y, Alberi G and Shawj. The metabolic syndrome: a global public health problem and a new definition. *J Artheroscler Thromb* 2005; 12:295-300.

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

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