



Universidad de Santiago de Compostela
Facultad de Medicina
Departamento de Fisiología

PROGRAMA INTERUNIVERSITARIO DE DOCTORADO EN ENDOCRINOLOGÍA

**“Influencia de la alimentación neonatal, dietas con diferente contenido graso
y cirugía bariátrica en la homeostasis energética”**

Trabajo para obtener el grado de Doctor que presenta

Hugo Mendieta Zerón

Directores:

Dr. Carlos Diéguez González

Dr. Miguel A. López Pérez



Universidad de Santiago de Compostela
Facultad de Medicina
Departamento de Fisiología

Dr. Carlos Diéguez González, Catedrático del Departamento de Fisiología y Dr. Miguel A. López Pérez, Investigador del Programa Ramón y Cajal del Departamento de Fisiología,

Certifican:

Que la presente Tesis Doctoral titulada **“Influencia de la alimentación neonatal, dietas con diferente contenido graso y cirugía bariátrica en la homeostasis energética”**, elaborada por Hugo Mendieta Zerón, ha sido realizada bajo su dirección, en el Departamento de Fisiología de la Universidad de Santiago de Compostela, estimando que se encuentra concluida y en condiciones de ser presentada para optar al grado de Doctor.

Y para que conste, firmo la presente autorización en Santiago de Compostela, junio 2008.

Fdo. Carlos Diéguez González

Fdo. Miguel A. López Pérez

Fdo. Hugo Mendieta Zerón

Volcán Xinantécatl, conocido como el “Nevado de Toluca”



Agradecimientos

En España agradezco de manera preponderante al Dr. Carlos Diéguez, quien me incorporó a su grupo de trabajo, con el cual tuve la oportunidad de entender el proceso científico diario además de haber conocido a un gran español en sabiduría y calidad humana.

Al Dr. Miguel López, quien desde su incorporación procedente de Inglaterra contribuyó ampliamente a la diversificación de mis actividades, y que ejemplifica la visión de científico estricto, meticoloso y de una impresionante capacidad de trabajo.

Al Dr. Víctor Arce, quien atendió muy amablemente mis llamadas telefónicas desde la Ciudad de México y Toluca, cuando aún estaba yo terminando mi especialidad de Medicina Interna y mi Maestría en Ciencias Médicas con el interés de venir a la Universidad de Santiago de Compostela y que conseguí después de exhaustivos trámites.

Siempre valoraré al Departamento de Fisiología sostenido en la calidad académica de sus investigadores: Anxo, Carmen, Celia, Chito, Clara, Costoya, Francisco Domínguez, Luis Lima, María García, Rosa Señarís, etc.

Al Dr. Álvaro Larrad, de Madrid, modelo de cirujano académico y a la Dra. Gema Frühbeck de la Universidad de Navarra, a quienes tuve la fortuna de conocer personalmente para la parte experimental de las cirugías bariátricas.

Al Dr. Javier Gómez-Ambrosi de la Universidad de Navarra, Pamplona, por su desinteresado apoyo en la realización de microarrays, así como a la Dra. María Ángela Burrell del Departamento de Histología y Patología, también de la Universidad de Navarra, por su gran atención y ayuda con los estudios histológicos.

A la amistad brindada por Leonor Hernández Yáñez, Martha Liliana Trujillo, Katia Martinello, Eva Amanda, Luis Jaime Castro (emigrado a Francia), Adenis, Paty Pasos, etc.

A Rubén Nogueiras y Ruth González por haberle explicado a un lego en la experimentación como yo, la extracción de ARN y diversas técnicas durante mi estancia

en el laboratorio.

Agradezco la colaboración en la realización de los RIAs a María Jesús Vázquez y Sulay Tovar, a Luis Varela con los Westerns y a Ricardo Lage en la solución de múltiples dificultades cotidianas de las técnicas realizadas.

Me quedaré con lo mejor de Adriana, Antía, Daniel, Gloria, Gonzalo, Isa, Marcos, María, Martha, Miguel, Milo, Montse, Omar, Pablo, Pili, Roberto, Susana, etc.

A Marisol quien siempre fue un respaldo importante para resolver problemas diarios del laboratorio.

A Luz Casas por su muy amable ayuda cuando tenía dudas y problemas con la hibridación in situ.

A Ana, Marga y Sigrid, quienes siempre me ayudaron en todos los trámites administrativos de manera excepcional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), de México por haberme becado durante mi formación investigadora (2 años en México y 3 y medio en España, incluyendo una estancia de dos meses en el laboratorio de la Dra. Claudine Junien del Hospital Necker de París, Francia).

A la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMEX) por haberme financiado en mi primer viaje de México a España y considerarme en su programa de Jóvenes Talentos para Repatriación.

A mi madre María Antonieta Zerón Rojas, médico dedicada a su familia, a mis hermanos, el ingeniero Carlos Mendieta, la dentista María Antonieta Mendieta y la pediatra Samara Mendieta, quienes me dan ánimos y confianza desde México. A mi gran padre Hugo Mendieta Rosas, médico anesthesiólogo, siempre presente en mis recuerdos.

ÍNDICE

| | |
|-----------------------------------------------------------------|----|
| 1. Introducción | 1 |
| 1.1. Generalidades | 3 |
| 1.2. Obesidad y salud cardiovascular | 6 |
| 1.3. Hipotálamo y homeostasis energética | 9 |
| 1.3.1. Neuronas de primer y segundo orden | 9 |
| 1.3.2. Regulación de la ingesta | 14 |
| 1.3.3. Programación perinatal de la regulación de la ingesta | 16 |
| 1.3.3.1. Etapa prenatal | 16 |
| 1.3.3.2. Etapa neonatal | 19 |
| 1.4. Adipoquinas | 21 |
| 1.4.1. Leptina | 21 |
| 1.4.2. Adiponectina | 24 |
| 1.4.3. Resistina | 27 |
| 1.4.4. Patogenia de la aterosclerosis | 29 |
| 1.5. Citoquinas proinflamatorias | 30 |
| 1.5.1. Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) | 30 |
| 1.5.2. Inhibidor tipo 1 del activador del plasminógeno (PAI-1) | 33 |
| 1.5.3. Interleuquina 1 beta (IL-1 β) | 34 |
| 1.5.4. Interleuquina 6 (IL-6) | 35 |
| 1.5.5. Proteína C reactiva (CRP) | 37 |
| 1.5.6. Proteína quimioatrayente tipo 1 de monocitos (MCP-1) | 38 |
| 1.5.7. Hepcidina y omentina | 39 |
| 1.5.8. Lipocortina | 40 |
| 1.6. Dieta y metabolismo | 42 |
| 1.6.1. Péptidos gastrointestinales en el metabolismo energético | 47 |
| 1.6.1.1. Ghrelin | 48 |
| 1.6.1.2. Péptido YY | 50 |
| 1.7. Genes de hipoxia | 51 |
| 1.8. Cirugía bariátrica | 53 |
| 2. Objetivos | 59 |
| 3. Materiales y métodos | 63 |
| 3.1. Animales de experimentación | 65 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.2. Modelo de nutrición neonatal | 65 |
| 3.3. Modelo de dieta alta/baja en grasa | 65 |
| 3.4. Modelo de cirugía bariátrica | 66 |
| 3.5. Radioinmunoensayos | 68 |
| 3.6. Separación de la fracción estroma-vascular (SVF) del tejido adiposo visceral | 71 |
| 3.7. Extracción de Ácido Ribonucleico (ARN) de la SVF de tejido adiposo visceral y síntesis de Ácido Desoxiribonucleico complementario (ADNc) | 72 |
| 3.8. Reacción en cadena de polimerasa (PCR) | 73 |
| 3.9. Reacción en cadena de polimerasa (PCR) en tiempo real | 75 |
| 3.10. Microarray | 77 |
| 3.11. Hibridación in situ | 79 |
| 3.12. Extracción de proteína y Western Blot | 81 |
| 3.13. Estudios histológicos | 83 |
| 3.14. Análisis estadístico | 85 |
| 4. Resultados | 87 |
| 4.1. Efecto del programming neonatal y de la dieta HF/LF hasta el día 90 + 4 semanas con dieta normal | 89 |
| 4.1.1. Masas e ingestas en machos | 89 |
| 4.1.2. Masas e ingestas en hembras | 96 |
| 4.1.3. Efecto del programming neonatal y de la dieta sobre los niveles plasmáticos de adiponectina, ghrelin, leptina e insulina | 98 |
| 4.1.4. Efecto del programming neonatal y de la dieta sobre la expresión génica en tejido adiposo visceral | 101 |
| 4.1.5. Efecto del programming neonatal y de la dieta sobre la expresión de citoquinas proinflamatorias en la fracción de estroma vascular | 104 |
| 4.1.6. Efecto del programming neonatal y de la dieta sobre la expresión de genes de hipoxia en SVF | 108 |
| 4.1.7. Efecto del programming neonatal y de la dieta sobre el metabolismo lipídico en hígado y tejido adiposo | 111 |
| 4.1.8. Efecto del programming neonatal y de la dieta sobre el metabolismo lipídico hipotalámico | 114 |
| 4.1.9. Efecto del programming neonatal y de la dieta sobre la expresión de neuropéptidos hipotalámicos | 118 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.2. Efectos del bypass biliopancreático + gastrectomía con anastomosis gastrointestinal en Y de Roux sobre el metabolismo | 121 |
| 4.2.1. Masas e ingestas | 121 |
| 4.2.2. Cambios histológicos en el tracto gastrointestinal tras la cirugía bariátrica | 124 |
| 4.3. Resumen de resultados | 127 |
| 4.3.1. Efecto del programming neonatal y de la dieta sobre la masa e ingesta | 127 |
| 4.3.2. Efecto del programming neonatal y de la dieta sobre los niveles de adipocinas y ghrelin | 127 |
| 4.3.3. Efecto del programming neonatal y de la dieta sobre la expresión génica | 127 |
| 4.3.3.1. Citoquinas en SVF | 127 |
| 4.3.3.2. Genes de hipoxia en SVF | 127 |
| 4.3.3.3. Enzimas metabólicas | 128 |
| 4.3.4. Efecto del programming neonatal y de la dieta sobre la expresión de neuropéptidos | 128 |
| 4.3.5. Cirugía bariátrica | 129 |
| 5. Discusión | 131 |
| 5.1. Masas e ingestas | 133 |
| 5.2. Inflamación | 135 |
| 5.3. Hipoxia | 137 |
| 5.4. Mecanismos metabólicos | 138 |
| 5.5. Cirugía bariátrica | 141 |
| 6. Conclusiones | 145 |
| 7. Referencias | 149 |

Abreviaturas¹

α -MSH: hormona melanocito estimulante alfa.
ACC: acetil-CoA carboxilasa.
AdipoR: receptor de adiponectina.
ADN: ácido desoxiribonucleico.
AgRP: péptido relacionado con agutí.
AMPK: *AMP activated protein kinase*.
APS: persulfato de amonio
ARC: núcleo arcuato del hipotálamo.
ARN: ácido ribonucleico.
BPBP-RYGB: bypass biliopancreático + gastrectomía con anastomosis gastrointestinal en Y de Roux.
BB: azul de bromofenol.
BSA: *Bovine serum albumin*.
Ca: calcio.
CART: transcrito regulado por cocaína y anfetamina.
CFI: *cumulative food intake*.
ChREBP *Carbohydrate Response Element-Binding Protein*.
CO: monóxido de carbono.
CPT-1: carnitina-palmitoil transferasa 1.
CRH: hormona liberadora de corticotropina.
CRP: proteína C reactiva.
cpm: cuentas por millón.
CVD: enfermedad cardiovascular.
CxB: Cirugía bariátrica.
DAB: 3,3'-diaminobencidina
DEPC: dietilpirocarbonato.
DIO: obesidad inducida con dieta.
DMN: núcleo dorsomedial del hipotálamo.
DM2: diabetes mellitus tipo 2.
DTT: ditioneitol
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.
eNOS: enzima óxido nítrico sintetasa.
FAS: sintasa de ácidos grasos.
FC: *fold change*.
FE: *food efficiency*.
FFAs: ácidos grasos libres.
RYGB: Bypass gástrico en Y de Roux.
GH: hormona de crecimiento.
GHS-R: receptor secretagogo de la hormona de crecimiento.

HBBS: *Hanks balanced buffer solution*.
HDL: lipoproteínas de alta densidad.
HF: dieta alta en grasa.
HIF: factor inducido por hipoxia.
HIS: hibridación in situ.
HO-1: heme oxigenasa 1.
HOMA: modelo homeostático de resistencia a insulina.
HPRT: *hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase*.
HRE: elemento de respuesta a hipoxia.
HTA: hipertensión arterial sistémica.
H₂O MQ: agua mili Q.
ICAM-1: molécula tipo 1 de adhesión intercelular.
ICV: intracerebroventricular.
IHQ: inmunohistoquímica.
IL-1 β : interleuquina 1 beta.
IL-6: interleuquina 6.
INSIG: gen inducido por insulina.
IMC: índice de masa corporal.
JNK: kinasa c-Jun N-terminal.
K: potasio.
LCFAs-CoA: ácidos grasos de cadena larga-CoA.
LDL: lipoproteínas de baja densidad.
LF: dieta baja en grasa.
LHA: hipotálamo lateral.
MC: melanocortina.
MCH: hormona concentradora de melanina.
MCP-1: proteína quimioatrayente tipo 1 de monocitos.
MC3-R: receptor 3 para melanocortina.
MC4-R: receptor 4 para melanocortina.
MHC: complejo principal de histocompatibilidad.
MMLV: *molony murine leukemia virus reverse transcriptase*.
mTOR: *mammalian target of rapamycin*.
NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.
NF- κ B: factor nuclear κ B.
NK: *natural killer*.
NL: *normal litters* (camadas normales).
NLHF: camadas normales alimentadas con HF.
NLLF: camadas normales alimentadas con LF.
NO: óxido nítrico.
NPY: neuropéptido Y.

¹ Para las unidades de medidas se utilizó el Sistema Internacional.

NTS: núcleo del tracto solitario.
OB-Rb: receptor hipotalámico largo de la leptina
OXs: orexinas.
PAI: inhibidor tipo 1 del activador del plasminógeno.
PAS: ácido periódico de Schiff.
PCR: reacción en cadena de la polimerasa.
PF: *paired*.
PFA: paraformaldehído.
PK: proteína kinasa.
POMC: proopiomelanocortina.
PP: polipéptido pancreático.
PPAR- γ : receptor gamma activador de la producción de peroxisomas.
prn: por razón necesaria.
pVHL: proteína de von Hippel-Lindau.
PVN: núcleo paraventricular del hipotálamo.
PYY: péptido YY.
RI: resistencia a la insulina.
RYGB: gastrectomía con anastomosis gastrointestinal en Y de Roux.
RT: reversotranscripción.
SCAP: SREBP *cleavage activation protein*.
SL: *small litters* (camadas pequeñas).
SLHF: camadas pequeñas alimentadas con HF.
SLLF: camadas SL alimentadas con LF.
SNC: Sistema nervioso central.
SNE: sistema nervioso entérico.
SNPs: *single nucleotide polymorphisms*.
SOCS3: proteína supresora de señal de citoquina tipo 3.
SPSS: *Statistical package for the social sciences*.
SREBP: proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides.
SVF: fracción de estroma vascular.
TEMED: N,N,N,N'-tetrametilenediamina
TGI: tracto gastrointestinal
TGF β : factor de crecimiento transformante beta
TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa.
TNFR: receptor del factor de necrosis tumoral.
TRH: hormona liberadora de tirotrófina.
TZD: tiazolidinedionas.
USA: Estados Unidos de América.

USC: Universidad de Santiago de Compostela.
VCAM-1: molécula vascular tipo 1 de adhesión celular.
VMN: núcleo ventromedial del hipotálamo.
vs: versus.
vWAT: tejido adiposo visceral.
w/v: *weight/volume*.

RESUMEN GALEGO

Introducción:

O tecido adiposo considérase actualmente coma un sistema hormonalmente activo para o control do metabolismo, existindo asociacións fisiopatolóxicas entre obesidade e inflamación. Tendo en conta que o tipo de dieta pode influír na expresión de citoquinas proinflamatorias, así coma incidir nos mecanismos de regulación da inxesta, o noso obxectivo foi comparar as masas, inxestas, expresión de citoquinas e neuropéptidos hipotalámicos tanto nun modelo de nutrición neonatal e dieta con diferente porcentaxe de graxa coma nun modelo de ciruxía bariátrica.

Material e métodos:

Despois de 24 días de alimentación en camadas de diferentes tamaños (SL=4 crías; NL=12), ratas macho Sprague-Dawley foron alimentadas con dous tipos de dieta, alto ou baixo contido graso ata os 90 días e outro grupo iniciouse en dieta normal ata os 122 días. Cada 72 h cuantificáronse masas e inxestas. A través do radioinmunoensaio (RIA) medimos en soro niveis de adipoquinas e ghrelin. Coa técnica da reacción en cadea da polimerasa en tempo real (RT-PCR) medíronse os niveis de expresión de xenes involucrados na inflamación, hipoxia e metabolismo lipídico na fracción do estroma vascular (SVF) do tecido adiposo visceral (vWAT), mentras que polo medio do Western Blot medíronse proteínas hipotalámicas implicadas nas vías lipoxénicas. Coa técnica da hibridación in situ (HIS) medimos no *núcleo arquatus* (ARC) do hipotálamo a expresión de neuropéptidos involucrados na inxesta. Un lote de ratas macho sometidas a ciruxía bariátrica (bypass biliopancreático + gastrectomía con anastomose gastrointestinal en Y de Roux, BPBP-RYGB) comparouse cun grupo control e cun grupo *pairfed*. Neste caso, ademáis de medir adipoquinas fixéronse estudos histolóxicos do tracto gastrointestinal.

Resultados:

As ratas SL alimentadas con dieta alta en graxa seguen sendo máis obesas incluso ó inicia-la dieta normal. O inhibidor do activador do plasminóxeno tipo 1 (PAI-1), a proteína quimioatraente tipo 1 de monocitos (MCP-1) e a proteína C reactiva (CRP), son as citoquinas proinflamatorias que máis se elevan coa dieta alta en graxa, á sua vez, con esta dieta, a nivel hipotalámico, a proteína relacionada con agutí (AgRP) atópase incrementada. As ratas sometidas a ciruxía bariátrica perden un 25% da súa masa ós 50 días de seguemento e teñen atrofia e alongamento das vellosidades intestinais.

Conclusións:

A sobrealimentación neonatal é moito máis importante que o exceso de calorías no estadio adulto para o desenrolo da obesidade. A alimentación neonatal inflúe de forma moi marcada nos niveis de adiponectina e leptina, pero non nos de ghrelin na vida adulta. A dieta rica en graxa estimula a expresión de neuropéptidos orexixénicos. A diminución ponderal coa ciruxía bariátrica non depende da inxesta.

Palabras clave: adiponectina, alimentación neonatal, ciruxía bariátrica, ghrelin, leptina, obesidade.

RESUMEN

Introducción:

El tejido adiposo se considera actualmente como un sistema hormonalmente activo para el control del metabolismo, existiendo asociaciones fisiopatológicas entre obesidad e inflamación. Teniendo en cuenta que el tipo de dieta puede influir en la expresión de citoquinas proinflamatorias, así como incidir en los mecanismos de regulación de la ingesta, nuestro objetivo fue comparar las masas, ingestas, expresión de citoquinas y neuropéptidos hipotalámicos tanto en un modelo de nutrición neonatal y dieta con diferente porcentaje de grasa como en un modelo de cirugía bariátrica.

Materiales y métodos:

Después de 24 días de alimentación en camadas de diferentes tamaños (SL=4 crías; NL=12), ratas macho Sprague-Dawley fueron alimentadas con dos tipos de dieta, alto o bajo contenido de grasa hasta los 90 días y otro grupo inició en dieta normal hasta los 122 días. Cada 72 h se cuantificaron masas e ingestas. A través de radioinmunoensayo (RIA) medimos en suero niveles de adipocinas y ghrelin. Con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) se midieron los niveles de expresión de genes involucrados en inflamación, hipoxia y metabolismo lipídico en la fracción de estroma vascular (SVF) del tejido adiposo visceral (vWAT), mientras que por medio de Western Blot se midieron proteínas hipotalámicas implicadas en vías lipogénicas. Con la técnica de hibridación in situ (HIS) medimos en el núcleo arcuato (ARC) del hipotálamo la expresión de neuropéptidos involucrados en la ingesta. Un lote de ratas macho sometidas a cirugía bariátrica (bypass biliopancreático + gastrectomía con anastomosis gastrointestinal en Y de Roux, BPBP-RYGB) se comparó con un grupo control y con un grupo *pairfed*. En este caso, además de medir adipocinas se hicieron estudios histológicos del tracto gastrointestinal.

Resultados:

Las ratas SL alimentadas con dieta alta en grasa siguen siendo más obesas incluso al iniciar a dieta normal. El inhibidor tipo 1 del activador del plasminógeno (PAI-1), la proteína quimioatrayente tipo 1 de monocitos (MCP-1) y la proteína C reactiva (CRP), son las citoquinas proinflamatorias que más se elevan con dieta alta en grasa, a su vez, con esta dieta, a nivel hipotalámico, el péptido relacionado con agutí (AgRP) se encuentra incrementado. Las ratas sometidas a cirugía bariátrica pierden 25% de su masa a 50 días de seguimiento y tienen atrofia y alargamiento de las vellosidades intestinales.

Conclusiones:

La sobrealimentación neonatal es mucho más importante que el exceso de calorías en el estado adulto para el desarrollo de obesidad. La alimentación neonatal influye de forma muy marcada en los niveles de adiponectina y leptina, pero no en los de ghrelin en la vida adulta. La dieta rica en grasa estimula la expresión de neuropéptidos orexigénicos. La disminución ponderal con la cirugía bariátrica no depende de la ingesta.

Palabras clave: adiponectina, alimentación neonatal, cirugía bariátrica, ghrelin, leptina, obesidad.

ABSTRACT

Introduction:

Adipose tissue is a very active hormonal system for metabolism control. Besides, there are similitudes between obesity and inflammation. Taking into account that the type of diet can influence proinflammatory cytokines expression, as well as control food intake mechanisms, our main objective was to compare body weight, food intake, cytokine expression and hypothalamic neuropeptides either after a neonatal nutrition model and different lipid percentage or after a bariatric surgery technique.

Materials and methods:

After weaning at 24 old days, male Sprague-Dawley rats were housed in groups according to the feeding model (SL=4, NL=12), and fed with High/Low Fat until day 90. Another group returned to normal diet. Weight and food intake were measured every 72 h. Through radioimmunoassay we measured serum levels of adipokines and ghrelin. With Real Time-PCR genes involved in inflammation, hipoxia and lipidic metabolism were quantified in the stromal vascular fraction (SVF) of visceral white adipose tissue (vWAT), while with Western Blot we analyzed the hypothalamic expression of proteins involved in lipogenic pathways. With the technique of in situ hibridization (HIS) we evaluated in the arcuate hypothalamic nucleus the expression of neuropeptides involved in food intake. One set of rats fed on normal diet was randomized to bariatric surgery (biliopancreatic bypass + gastrectomy en Y de Roux, BPBP-RYGB), control and paired. In this case, besides adipokines, we carried out histological studies of the gastrointestinal tract.

Results:

Rats fed on high fat diet are still the heaviest even after returning to normal diet. Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1), monocyte chemoattractive protein 1 (MCP-1) and C reactive protein (CRP) are the proinflammatory cytokines that increase the most with high fat diet, moreover, under this diet, hypothalamic agouti related protein (AgRP) is overexpressed. Bariatric surgery induces a weight loss of 25% after 50 days as well as intestinal villi atrophy and elongation.

Conclusions:

Neonatal overfeeding is more relevant in relation to the development of obesity than hypercaloric diets in adult stage. Neonatal diet determines adiponectin and leptin, but not ghrelin levels in adult stage. High fat diet stimulates hypothalamic orexigenic neuropeptides expression. Weight reduction with bariatric surgery does not depend on food intake.

Key words: adiponectin, bariatric surgery, ghrelin, leptin, neonatal feeding, obesity.

1. INTRODUCCIÓN

Introducción

Introducción

1.1. Generalidades

La dieta y los cambios en el estilo de vida durante el último siglo han llevado a una pandemia de obesidad tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo (Arrizabalaga-Amarelo R, 2007; Badman MK, 2007; Hayman LL, 2007; Mendieta-Zerón H, 2008a) y enfermedades metabólicas asociadas, incluyendo la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y la aterosclerosis (Mokdad AH, 2001; Tremblay MS, 2002; Ogden CL, 2003). Muchos individuos sufren de manera simultánea más de una de estas condiciones, y estudios epidemiológicos en humanos, así como estudios en modelos de animales, sugieren que la resistencia a la insulina (RI) relacionada a obesidad es un dato patogénico común (Flier JS, 2004). De hecho, la RI es piedra angular del síndrome metabólico, un factor de riesgo cardiovascular principal aún en ausencia de intolerancia a la glucosa demostrable o diabetes (Sowers JR, 2004). Más aún, la obesidad y RI están fuertemente asociadas con marcadores sistémicos de inflamación, que a su vez contribuyen a la RI (Haffner SM, 2003).

El tejido adiposo se considera actualmente como un sistema hormonalmente activo para el control del metabolismo y no solamente como un almacenamiento de exceso de energía (Trayhurn P, 2001; Badman MK, 2007). De hecho, el tejido adiposo y las células del sistema inmune expresan muchos genes comunes por lo que algunos han supuesto que el tejido adiposo también coordina respuestas inmunológicas (Rajala MW, 2003). El término “adipocitoquinas” fue acuñado para referirse a una serie de moléculas biológicamente activas derivadas de los adipocitos, las cuales pueden influir en la función así como en la integridad de otros tejidos (Díez JJ, 2003). Algunos ejemplos de estas sustancias son adiponectina, angiotensina, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), inhibidor tipo 1 del activador del plasminógeno (PAI-1), interleuquina 6 (IL-6) y leptina.

Introducción

Existen similitudes entre obesidad e inflamación; por ejemplo, se sabe que las citoquinas proinflamatorias IL-6 y TNF- α son producidas por los adipocitos así como por monocitos y macrófagos, y circulan con niveles incrementados en individuos con obesidad (Rajala MW, 2003; Hotamisligil GS, 2003). Además, los macrófagos derivados de médula ósea implantados en tejido adiposo de sujetos con obesidad (Weisberg SP, 2003; Xu H, 2003), y adipocitos y macrófagos pueden ser interconvertibles (Charriere G, 2003). De hecho, ya se reconoce cada vez más a la inflamación como un componente principal y predictor de enfermedad vascular aterosclerótica, una consecuencia clínica importante de la RI (Glass CK, 2001).

La enfermedad vascular aterosclerosa sigue siendo la principal causa de muerte en naciones industrializadas a pesar de los avances en su diagnóstico, tratamiento y prevención (Braunwald E, 1997). Además de ser un factor de riesgo independiente para enfermedad cardiovascular (Eckel RH, 1997), la obesidad también incrementa el riesgo de otros factores, principalmente diabetes, dislipidemia, hipertensión y estado protrombótico. Reaven postuló a la RI como la causa del síndrome X (Reaven GM, 1988), mejor conocido como síndrome metabólico, afectando a uno de cada 4 adultos y constituyéndose en el principal problema de salud asociado con el incremento en el riesgo cardiovascular (Ford ES, 2002). Las recomendaciones del *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (Expert Panel on Detection Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults, 2001)*, y del *Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure (Chobanian AV, 2003)*, son identificar y dar un tratamiento agresivo para reducir los riesgos asociados a enfermedad cardiovascular.

Coleman (Coleman DL, 1973) sugirió que debía existir un factor circulante adicional que participaba en la regulación homeostática de la masa corporal. Las teorías que ahora prevalecen reconocen que no se trata sólo de un factor u hormona, sino que diferentes

Introducción

factores son utilizados para proporcionar no sólo señales de retroalimentación negativas sino también positivas, y así mantener constante el balance energético y metabólico. Los estudios más recientes acerca de las bases genéticas de la obesidad también coinciden con este punto de vista. La mayoría de los pacientes obesos no parecen poseer un simple defecto genético, sino un gran número de defectos en diferentes genes susceptibles (Ravussin E, 2000). Algunos de estos genes pueden afectar al balance energético a cualquier nivel, desde los procesos metabólicos periféricos, hasta los procesos neuronales de señales metabólicas (de Castro JM, 2001; de Castro JM, 2002).

Además de factores genéticos, el ambiente juega un papel fundamental en el desarrollo del síndrome metabólico. Por ejemplo, la sobrealimentación perinatal predispone en humanos y ratas a obesidad y diabetes en una edad posterior. En roedores, las ratas que crecen en camadas pequeñas ganan más masa que las ratas que crecen en camadas normales y mantienen estos fenotipos en la edad adulta. Por el contrario, las ratas que crecen en camadas grandes muestran retraso en el crecimiento y en masa (Plagemann A, 1992; Plagemann A, 1999; López M, 2005a, López M, 2007b). Igualmente en humanos se ha demostrado ampliamente que el retraso en el crecimiento intrauterino está asociado a mayor predisposición a enfermedades cardiovasculares (Barker DJP, 2004; Stein AD, 2006; Meyer K, 2007) y metabólicas, por lo que se ha puesto énfasis en el control de enfermedades maternas durante la gestación para disminuir las consecuencias tanto inmediatas como a largo plazo sobre la descendencia (Agarwal MM, 2007; Amann-Gassner U, 2008)

Debido a la temática de esta tesis, la introducción ha sido enfocada en hacer una breve revisión bibliográfica de: a) obesidad y salud cardiovascular, b) hipotálamo y homeostasis energética, c) adipoquinas, d) citoquinas proinflamatorias, e) dieta y metabolismo, f) genes de hipoxia y g) cirugía bariátrica.

Introducción

1.2. Obesidad y salud cardiovascular

El tejido adiposo es un órgano endocrino y paracrino que libera citoquinas involucradas en inflamación, coagulación, fibrinólisis, RI, diabetes, aterosclerosis y algunas formas de cáncer (Kopelman PG, 2000).

El *Framingham Heart Study* fue uno de los primeros estudios epidemiológicos que demostraron que la obesidad está relacionada causalmente con enfermedad cardiovascular (CVD) (Hubert H, 1983); también hay datos prospectivos importantes del *Nurses Health Study* de que aún antes del diagnóstico de DM2, la obesidad y ganancia de peso están asociadas con aumento del riesgo coronario (Cho E, 2002). Esto junto con el aumento de riesgo de CVD antes del diagnóstico de DM2 (Hu FB, 2002), puntualizan la importancia de dilucidar los mecanismos por los cuales el exceso de grasa corporal predispone a los individuos a riesgo CVD en la etapa de RI antes de DM2.

El síndrome metabólico se asocia fuertemente con disfunción endotelial y riesgo incrementado de aterosclerosis (Tchernof A, 2002). A su vez, la RI que forma parte de los criterios diagnósticos del primero, se correlaciona con el grado de obesidad, principalmente obesidad abdominal y es predictor del desarrollo de DM2. Más aún, la epidemia dual de obesidad y DM2 sugiere que la RI es un eslabón entre ambas patologías.

En 1963 Randle planteó la hipótesis que el aumento de los ácidos grasos libres (FFAs, *free fatty acids*), productos de la degradación de los triglicéridos del tejido adiposo debido a la falta de insulina o de su acción, producirían RI; (Randle PJ, 1963); posteriormente, Unger en 1995 (Unger RH, 1995), en base a estudios en animales, da a conocer el concepto de lipotoxicidad, definiéndolo fundamentalmente como una inhibición de la secreción de insulina por el aumento crónico de los FFAs. Boden, estableció en 1997, en humanos, que la relación entre hiperinsulinemia y RI, es a través de los niveles

Introducción

aumentados de FFAs (Boden G, 1997). El aumento de FFAs, eleva su captación y oxidación, usándose éstos como fuente de energía en los distintos tejidos en competencia con la glucosa. Además, los FFAs reducen la afinidad insulina-receptor, disminuyendo la acción de la insulina en los tejidos insulinosensibles; favoreciendo así la RI. Se ha encontrado que a nivel de músculo se inhibe la captación y oxidación de glucosa con la consiguiente disminución de la síntesis de glucógeno. En el hígado se produce neoglucogénesis con mayor producción de glucosa. Como consecuencia de todo esto, habría elevación de los niveles de glucemia y aparecería la intolerancia a la glucosa (Unger RH, 1995; Boden G, 1997).

Actualmente se ha acumulado información de que la lipotoxicidad contribuye a perpetuar la RI (Mittra S, 2008). De hecho, las adipoquinas proinflamatorias que aumentan con la obesidad, pueden interaccionar con hepatocitos y miocitos llevando a RI (Wisse BE, 2004; Anghel SI, 2007). Existen suficientes evidencias, tanto en animales como en humanos, que permiten establecer que los niveles crónicamente aumentados de FFAs y triglicéridos, disminuyen la secreción de insulina al estímulo con glucosa (Boden G, 1999; Carpentier A, 1999). Si bien no se conoce el mecanismo mediante el cual los FFAs producen una menor secreción de insulina; se ha postulado que éste se debería a: 1) Menor actividad de los transportadores GLUT2 (Boden G, 1999; Carpentier A, 1999) y 2) Cambios en las vías metabólicas lipídicas. El aumento de los FFAs debido a una lipólisis exacerbada y la inhibición de acetil-CoA carboxilasa (ACC), tiene como consecuencia una disminución de malonil coenzima A. Por otra parte, la activación de carnitina palmitoil transferasa 1 (CPT-1) intensifica la beta oxidación con disminución de los derivados acilos de la CoA (metabolitos que estimulan la secreción de insulina), lo que se traduce en una menor liberación de insulina (Mason TM, 1999).

Además, los FFAs impiden la vasodilatación (Steinberg HO, 1997), reduciendo la biodisponibilidad de NO atenuando la actividad de la enzima óxido nítrico sintetasa

Introducción

(eNOS) (Inoguchi T, 2000). Se ha sugerido que los FFAs desempeñan un papel preponderante en el incremento de la gluconeogénesis hepática y sobreproducción de lipoproteínas de muy baja densidad las cuales llevan a mayores niveles de las pequeñas, densas y aterogénicas lipoproteínas de baja densidad (LDL) y disminución de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Lewis GF, 2002).

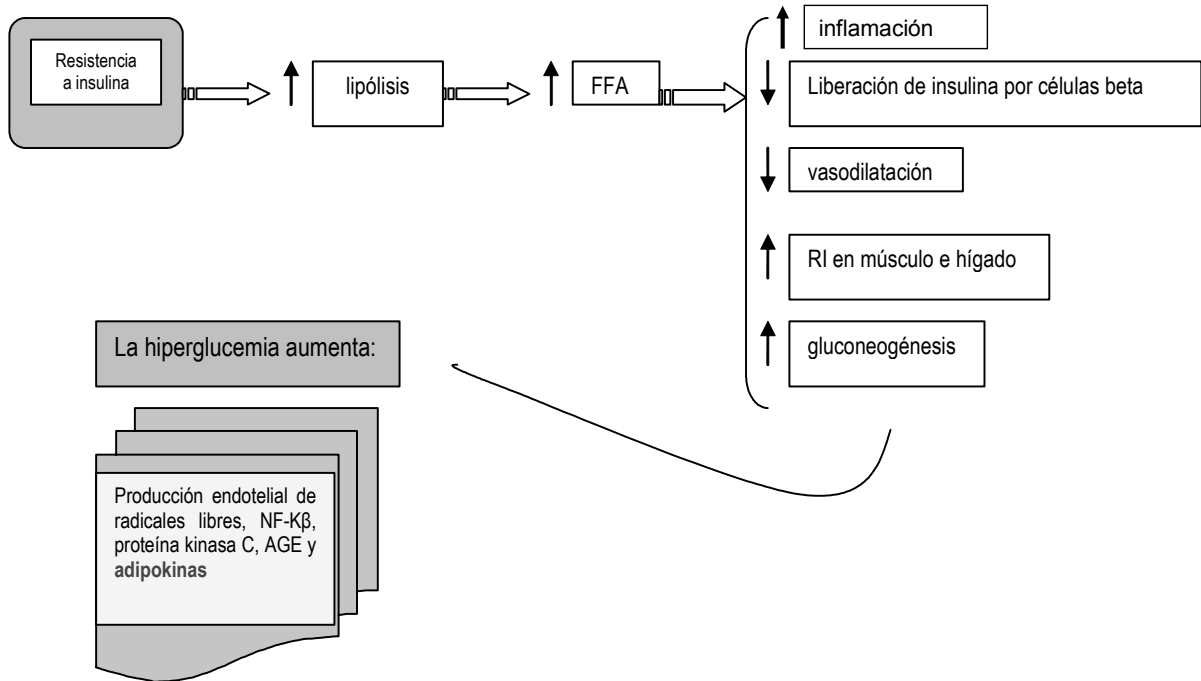
La hiperglucemia induce la producción endotelial de radicales libres, el estrés oxidativo (Marfella R, 2001) y activa al factor nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) y proteína kinasa (PK)-C, así como también incrementa la formación intracelular de productos avanzados de glicación (Brownlee M, 2001). Como resultado, la hiperglucemia estimula la oxidación no enzimática de lipoproteínas, las cuales contribuyen independientemente a la aterogénesis. También incrementa la expresión de adipoquinas (Kohler HP, 2000) (Figura 1).

En líneas generales, las principales adipoquinas proinflamatorias son angiotensinógeno, IL-6, leptina, PAI-1, proteína C reactiva (CRP), resistina y TNF- α . Por el contrario, el óxido nítrico (NO) (Yan H, 2002) y la adiponectina, confieren protección contra la inflamación y RI asociada a obesidad (Kubota N, 2002).

Probablemente las adipoquinas sean un eslabón entre síndrome metabólico y la disfunción endotelial que se presentan en la obesidad. Muchas de las adipoquinas proinflamatorias ejercen múltiples acciones en una amplia variedad de procesos celulares llevando a una compleja expresión de anormalidades.

Introducción

Figura 1. Consecuencias de la Obesidad-DM2-RI (síndrome metabólico).



AGE: productos avanzados de la glicación; FFA: ácidos grasos libres; RI: resistencia a la insulina; NF-K β : factor de transcripción nuclear K β .

1.3. Hipotálamo y homeostasis energética

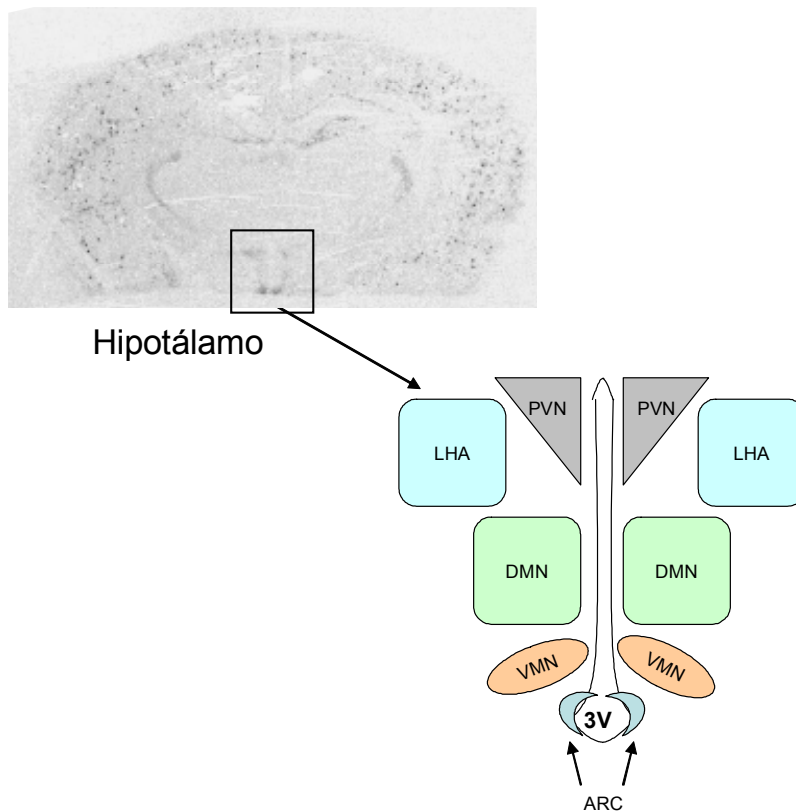
1.3.1. Neuronas de primer y segundo orden

El hipotálamo es una compleja zona del diencefalo que se extiende, en cada hemisferio, por debajo del tálamo; observado por la superficie inferior del cerebro, llega a comprender el quiasma óptico, por delante y los tubérculos mamilares, por detrás. Se divide en varios núcleos: núcleo paraventricular, núcleo preóptico, núcleo supraóptico, núcleo ventromedial (VMN), núcleo dorsomedial (DMN), hipotálamo lateral (LHA), núcleo del túbér, núcleo posterior y núcleo del cuerpo mamilar (Delmas A, 2005) (Figura 2). Estos

Introducción

núcleos están conectados mediante fibras, aferentes, o eferentes, con la corteza cerebral, la hipófisis, el tálamo y el tronco encefálico. El hipotálamo está considerado como un importante centro regulador de muchas funciones vegetativas.

Figura 2. Corte coronal del hipotálamo.



ARC: núcleo arcuato; DMN: núcleo dorsomedial; LHA: hipotálamo lateral; PVN: núcleo paraventricular; VMN: núcleo ventromedial; 3V: tercer ventrículo.

Las vías eferentes centrales que regulan la masa corporal en respuesta a la información aferente proveniente de las señales de adiposidad periféricas, tales como leptina e insulina, comprenden una red compleja de neuropéptidos hipotalámicos que pueden ser divididos en 2 categorías (Schwartz MW, 2000; Wynne K, 2005): a) neuropéptidos anorexigénicos, estimulados por leptina e insulina promueven la pérdida de peso

Introducción

mediante la disminución de la ingesta y el incremento en el gasto energético, b) neuropéptidos orexigénicos, inhibidos por leptina e insulina, promueven la ganancia de peso al aumentar la ingesta y disminuir el gasto energético. A su vez, estas 2 categorías pueden subdividirse en 2 clases: aquellos que se expresan en neuronas que son reguladas directamente por señales periféricas (neuronas de primer orden) y los que se expresan en neuronas reguladas principalmente por estímulos sinápticos por debajo de las neuronas de primer orden (neuronas de segundo orden) (Hillebrand JJ, 2002; Leibowitz SF, 2004).

Neuronas de primer orden

Hay dos tipos distintos de neuronas en el ARC que son importantes para la homeostasis energética 1) neuronas que expresan los péptidos orexigénicos: neuropéptido Y (NPY)/ péptido relacionado con agutí (AgRP) y 2) neuronas que expresan los péptidos anorexigénicos: proopiomelanocortina (POMC)/transcrito regulado por cocaína y anfetamina (CART) (Konturek PC, 2005). Sobre ambos grupos actúan la leptina e insulina (Hill JW, 2008; Valassi E, 2008).

Las neuronas anabólicas NPY/AgRP se concentran en el ARC ventromedial, adyacentes a las neuronas POMC, son inhibidas por leptina e insulina y activadas por los estados de equilibrio energético negativo o por deficiencias de leptina o insulina (Schwartz MW, 1996; Friedman JM, 1998; Elias CF, 1999; Korner J, 2001; López M, 2005a). La administración central de NPY aumenta la ingesta alimentaria y disminuye el gasto de energía en roedores y mamíferos, mientras que la infusión crónica promueve la ganancia de peso. De los cinco receptores conocidos de NPY, los principales son Y1 e Y5 (Kanatani A, 2001; Beck B, 2007). AgRP ejerce sus efectos anabólicos mediante el antagonismo competitivo de las melanocortinas en los receptores 3 y 4 de melanocortina (MC3-R, MC4-R). De este modo, las neuronas NPY/AgRP son las únicas capaces de activar simultáneamente una

Introducción

vía anabólica (por medio de los receptores NPY) e inactivar una catabólica (por los receptores de melanocortina) (Cone RD, 2001). Sin embargo, sus acciones anabólicas pueden ser diferenciadas no sólo sobre la base de los receptores sobre los que actúan, sino por su cinética orexígena. En efecto, después de una inyección única de NPY en los ventrículos cerebrales, la ingesta alimentaria se incrementa en forma marcada pero sólo por pocas horas, mientras que AgRP desencadena aumentos moderados pero por períodos más prolongados (Rossi M, 1998).

Neuronas de segundo orden y vías eferentes en la homeostasis de energía

Las neuronas POMC y NPY/AgRP se proyectan al LHA y al área adyacente perifornical, donde realizan conexiones monosinápticas con neuronas que expresan neuropéptidos anabólicos como la hormona concentradora de melanina (MCH) y orexinas (OXs) A y B (López M, 1999; López M, 2002, López M, 2007a). El LHA se conoce desde hace tiempo como "centro del hambre", ya que su estimulación eléctrica provoca hiperfagia y obesidad. Además, las neuronas POMC/CART y NPY/AgRP se proyectan al núcleo paraventricular (PVN). Esta área se comunica con la corteza cerebral y participa, junto con el LHA, en la transducción de la señal de leptina en la modulación del apetito (Elmqvist JK, 2001). A diferencia de la región anabólica LHA, el PVN envía estímulos predominantemente catabólicos que son retransmitidos en parte por neuronas hipofisotróficas que expresan hormona liberadora de tirotrófina (TRH), hormona liberadora de corticotropina (CRH) y oxitocina (Palkovits M, 1999).

Las neuronas POMC/CART y NPY/AgRP también comunican con áreas del tronco cerebral involucradas en el control de la ingesta alimentaria como el núcleo del tracto solitario (NTS), directamente por conexiones monosinápticas e indirectamente mediante el PVN y el LHA (Harding R, 1973; Appleyard SM, 2005). De manera general, el tronco cerebral caudal posee los circuitos neuronales básicos para estimular la ingesta, pero

Introducción

necesita las señales hipotalámicas para la regulación a largo plazo de la homeostasis energética (Schwartz MW, 2000; Hillebrand JJ, 2002; Berthoud HR, 2004). Por otra parte, para regular la ingesta alimentaria total, la leptina y la insulina afectan el tamaño y la frecuencia de las comidas individuales, quizá por medio de las conexiones desde el NTS, el núcleo motor dorsal del vago y el área postrema, que expresan los sustratos para responder a las señales de saciedad como los receptores de leptina e insulina, NPY, POMC y de melanocortina (MC) (Cummings DE, 2003).

Datos recientes apoyan la implicación de las vías de síntesis lipídicas hipotalámicas en la regulación de la ingesta.

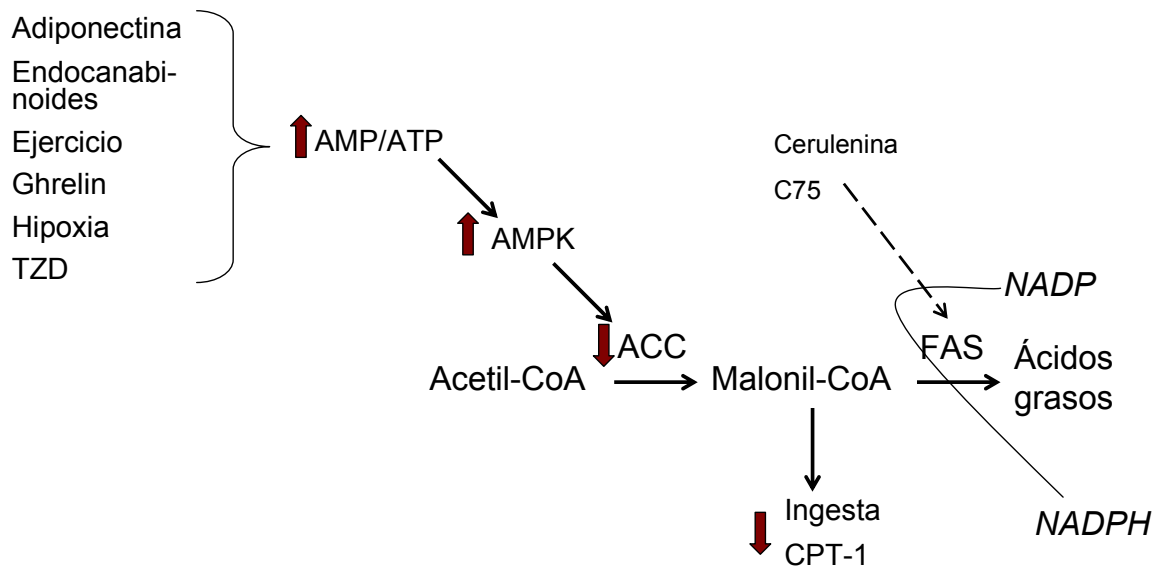
Hipótesis de malonil-CoA

La sintasa de ácidos grasos (FAS) regula la lipogénesis de novo a partir de acetil-CoA, malonil-CoA y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). Su regulación ocurre a nivel transcripcional donde inciden la mayoría de las señales metabólicas importantes tales como insulina y carbohidratos (Moustaid N, 1994; Ishii S, 2004), hormonas tiroideas (Xiong S, 1998), ácidos grasos (Clarke SD, 1990) y esteroides (Bennett MK, 1995). El malonil-CoA, actúa a su vez como inhibidor alostérico de la CPT-1, enzima que importa ácidos grasos de cadena larga (LCFAs-CoA) a la mitocondria, lo que regula la oxidación intracelular de ácidos grasos en diversos tejidos incluyendo el SNC (McGarry JD, 1997; Park H, 2002). El incremento a nivel hipotalámico de malonil-CoA, por ejemplo al inhibir FAS (Hu Z, 2005; López M, 2006) conduce a la supresión de la ingesta (Figura 3); por el contrario, el disminuir sus concentraciones con un inhibidor de la ACC o por la expresión ectópica de malonil-CoA decarboxilasa en el hipotálamo, aumenta la ingesta y revierte la acción de los inhibidores de FAS (Cha SH, 2005; López M, 2006). Fisiológicamente, el nivel de malonil-CoA hipotalámico está determinado a través de la fosforilación/defosforilación de ACC por la AMP kinasa (AMPK) en respuesta a cambios

Introducción

en la relación AMP/ATP, indicador del estado de energía (Andersson U, 2004; López M, 2007a; Martin TL, 2006; López M, 2008).

Figura 3. Hipótesis Malonil-CoA e ingesta.



Flechas continuas significan estímulo positivo; flechas discontinuas significan estímulo negativo. ACC: acetil-CoA carboxilasa; AMP: adenosín monofosfato; AMPK: AMP kinasa; ATP: adenosín trifosfato; CPT-1: carnitina palmitoil transferasa-1; FAS: sintetasa de ácidos grasos; NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; TZD: tiazolidinedionas.

1.3.2. Regulación de la ingesta

Los mecanismos fisiológicos que regulan la ingesta de alimentos pueden dividirse en tres grandes tipos (Halford JC, 2000):

1) Mecanismos relacionados con el acto de comer. Engloban las señales de saciedad que regulan la cantidad de alimento ingerido. Incluyen mecanismos preprandiales, como la sensación de hambre y la estimulación sensorial; mecanismos prandiales como el

Introducción

comportamiento alimentario y la elección de alimentos; y mecanismos postprandiales como la saciedad.

Durante las fases prandial y postprandial, el sistema nervioso central (SNC) recibe información sensorial, procedente del tubo digestivo, relativa a la cantidad de alimento ingerido y la composición de nutrientes del mismo (señales de saciedad) (Capasso R, 2008; Karhunen LJ, 2008). En el tubo digestivo existen mecanorreceptores, ya a nivel del esófago, que informan del grado de distensión y quimiorreceptores que informan de la presencia y naturaleza de los nutrientes. Esta información llega al SNC a través del nervio vago y del ganglio cervical superior (Halford JC, 2000). Por otra parte, el tubo digestivo secreta a la sangre hormonas que regulan la función digestiva y la motilidad gástrica y duodenal (Capasso R, 2008; Karhunen LJ, 2008; Mendieta-Zerón H, 2008b). La secreción de estas hormonas es estimulada por la presencia de comida. Así, el estómago produce gastrina (Robbins TW, 1986), ghrelin (Kojima M, 1999) y neuropéptido W (Caminos JE, 2007) y la mucosa duodenal colecistoquinina, OXs (Kirchgessner AL, 1999), bombesina, secretina, péptido-1 similar a glucagón y enterostatina (Halford JC, 2000).

2) Mecanismos metabólicos y energéticos. Están relacionados con los nutrientes absorbidos, su utilización y conversión en reservas. De éstas, la insulina fue la primera señal hormonal implicada en el control de la ingesta a través del SNC (Lotter EC, 1977).

El número de potenciales metabolitos y señales periféricas indicadoras del estado metabólico del animal se han multiplicado exponencialmente: sacietina (Knoll J, 1977), adiposina (Flier JS, 1979), leptina (Zhang Y, 1994), adiponectina (Maeda K, 1996), interleuquinas y TNF- α (Inui A, 1999), oleiletanolamida (Rodríguez DF, 2001), etc.

3) Mecanismos neurales. Interacciones de factores neuroquímicos y metabólicos en el SNC. El hipotálamo es el principal centro de integración de las señales nutricionales, como un paso crítico en la adaptación metabólica a los cambios en el balance energético

Introducción

(Adams KF, 2006). Algunos de los circuitos hipotalámicos que regulan el balance energético también sensan la disponibilidad de macronutrientes (Wortley KE, 2003; Lam TK, 2005) ajustando señales eferentes para modificar el metabolismo de la glucosa y lípidos (Yun R, 2005). De hecho, se ha demostrado que cada preferencia dietética se puede asociar a un perfil neuropeptidérgico específico (Beck B, 2001), por ejemplo, el NPY estimula preferentemente la ingesta de carbohidratos (Stanley BG, 1985) mientras que galanina, cuyo principal sitio de secreción es el PVN (Akabayashi A, 1994) y las OXs orientan la opción del alimento hacia lípidos (Clegg DJ, 2002; Chang GQ, 2004), siendo la relación carbohidrato:grasa un factor crítico en esta influencia (Leibowitz SF, 1998).

1.3.3. Programación perinatal de la regulación de la ingesta

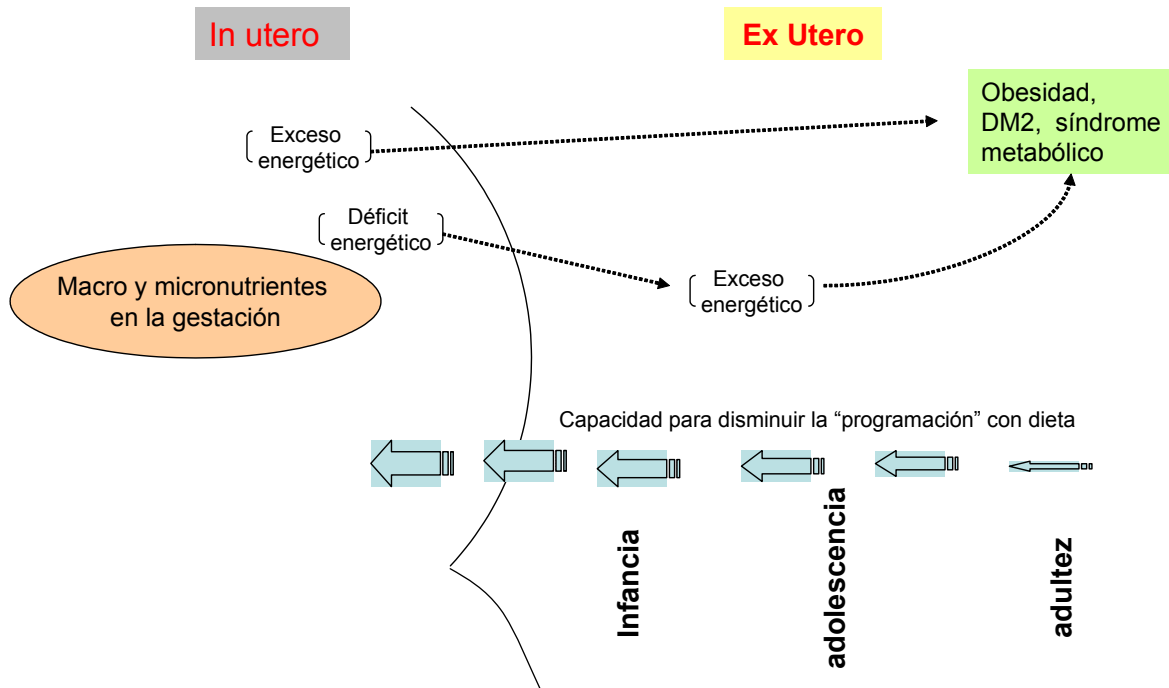
1.3.3.1. Etapa prenatal

Se ha reconocido que la programación fetal es una clave determinante para el fenotipo y enfermedades del adulto, postulándose que, una adecuada alimentación durante la gestación y la etapa perinatal es una estrategia efectiva para prevenir enfermedades de la etapa adulta (Gluckman PD, 2004).

Datos epidemiológicos y estudios experimentales en animales sugieren que las adaptaciones nutricionales fetales y postnatales tempranas persisten y están presentes en adultos aún en ausencia del estímulo de estrés que las hayan iniciado (Lucas A, 1998). Esto se explica, en parte, porque los períodos tempranos de la vida corresponden en gran parte al período de la diferenciación neuronal y de la maduración del SNC por lo que la nutrición perinatal tiene una influencia crítica en el desarrollo y la regulación de vías y redes involucradas en la regulación de la homeostasis energética (Figura 4).

Introducción

Figura 4. Programación perinatal de la dieta.



DM2: Diabetes mellitus tipo 2.

Hales y Barker (Hales CN, 2001) acuñaron el término "thrifty phenotype" (fenotipo ahorrador), relacionado a un fenotipo desnutrido atribuido a alteraciones nutricionales durante la gestación y lactancia. Conocemos ahora que los tejidos y órganos son sometidos a cambios genéticos y epigenéticos por medio de los ciclos de proliferación celular, diferenciación y apoptosis (Weaver IC, 2004). Los desequilibrios cualitativos y cuantitativos de los nutrientes y sus metabolitos en una relación espacio-temporal pueden desembocar en el desarrollo estructural y funcional defectuoso, e incluso la ausencia de ciertos tipos celulares especializados. En el caso de los fetos desnutridos funcionan de manera preferente la vías bioquímicas para aumentar las opciones de supervivencia en el período neonatal, pero, paradójicamente, pueden ser perjudiciales si la comida se vuelve

Introducción

más abundante (Ozanne SE, 2004). Se postula así, que algunos individuos con síndrome metabólico pudieron padecer una incorrecta programación epigenética durante el desarrollo fetal/postnatal por una nutrición materna inadecuada. Incluso estos individuos pueden tener “efectos transgeneracionales” por cambios epigenéticos que experimentaron primero sus abuelos y padres (Armitage JA, 2004; Waterland RA, 2004).

Los estudios en ratas han demostrado que el tamaño de la camada influye en la expresión de genes involucrados en la secreción de insulina (Waterland RA, 2002). También se ha demostrado en ratones que incluso en la etapa de destete, exposiciones nutricionales específicas pueden alterar de manera permanente la expresión de genes susceptibles de “imprinting” (Waterland RA, 2003).

De manera interesante, los experimentos que producen desnutrición fetal también provocan dislipidemia y predisposición a obesidad, es decir, los mismos efectos son producidos por causas opuestas (Wu G, 2004; Pinheiro AR, 2008).

Experimentos con animales knockout sugieren que modificaciones epigenéticas pueden alterar el fenotipo tanto de la madre como de las crías de acuerdo a la disponibilidad de alimento (Hiltunen MO, 2002; Luna G, 2004). Por ejemplo, la expresión con impronta de los genes paternos *Mest/Peg1* y *Peg3*, que se expresan fuertemente en regiones en las cuales se acumulan células androgénicas: el hipotálamo, área preóptica y septum (Curley JP, 2004). Dado el rol de las neuronas hipotalámicas en la regulación de la homeostasis energética, estos genes podrían desempeñar un papel importante en los mecanismos de programación neuronal.

Más aún, modelos experimentales que involucran restricción calórica en gestación han demostrado la influencia de la desnutrición materna sobre la programación de la RI, obesidad e hipertensión (Langley-Evans SC, 1996; Vickers MH, 2000). Los estudios de cohorte de la población sometida a la hambruna holandesa sugieren que el primer trimestre del embarazo representa un periodo crítico de vulnerabilidad para el desarrollo

Introducción

subsecuente de obesidad (Ravelli G, 1976). En esta misma cohorte se demostró que los hijos de madres sometidas a desnutrición durante la gestación tienen un riesgo tres veces mayor de enfermedad coronaria (Roseboom TJ, 2000a) un perfil lipídico más aterogénico (Roseboom TJ, 2000b) y más obesidad (Ravelli ACJ, 1999). Esto confirma la evidencia de investigación en animales donde se establece que los factores pre-implantación y pre-concepción desempeñan un rol muy importante en la salud del adulto (Fleming TP, 2004). La restricción férrica materna ocasiona hipertensión y dislipidemia en crías de rata (Lewis RM, 2001). Asimismo, la restricción mineral materna altera el contenido de grasa corporal, la concentración sérica de lípidos y aumenta el estrés oxidativo en las crías, predisponiéndolas a RI (Venu L, 2004). No obstante, los minerales de mayor importancia y su mecanismo de acción en este proceso no se conocen aún.

1.3.3.2. Etapa neonatal

Diversos estudios han aportado información valiosa acerca del desarrollo ontogénico normal de los circuitos hipotalámicos así como de la influencia del estado nutricional sobre el mismo con implicaciones importantes para la etiología de la obesidad. En el nacimiento, el hipotálamo está escasamente inervado por fibras NPY del ARC y el PVH no está inervado por NPY/AgRP hasta el día 15 postnatal (Bouret SG, 2004). Los ARNm de NPY y AgRP en el ARC se detectan desde el nacimiento, alcanzan su máximo a los 15 días y caen a niveles de adulto en el día 30 (Grove KL, 2003). Este desarrollo es paralelo a la maduración de la habilidad para regular la succión en respuesta a demandas calóricas (Cramer CP, 1985), en caso extremo de falta de desarrollo del ARC se presenta anorexia fatal (Broberger C, 1999).

La mayoría de los experimentos han estudiado los aspectos cuantitativos de la sobrenutrición a través de la manipulación del tamaño de camada (Plagemann A, 1999;

Introducción

López M, 2005a; López M, 2007b) o la restricción del alimento (Huizinga CT, 2001). Por ejemplo, se ha estudiado que las ratas que crecen en camadas pequeñas ganan más masa que las ratas que crecen en camadas normales y mantienen estos fenotipos en la edad adulta, por el contrario, las ratas que crecen en camadas grandes muestran retraso en el crecimiento y en masa (Knittle J, 1968; Miller DS, 1972; López M, 2005a; López M, 2007b).

En otros abordajes como el modelo de déficit de insulina en rata, las crías de madres tratadas con estreptozotocina, desarrollan hiperfagia y sobrepeso en edad adulta, demostrándose malformaciones perinatales adquiridas del VMN (Plagemann A, 1999), y particularmente, alteraciones de las neuronas hipotalámicas que expresan NPY en el ARC (Plagemann A, 1998). Incluso alteraciones sutiles en estos circuitos neuropeptidérgicos podrían iniciar un círculo vicioso (Lustig RH, 2001). De hecho, se ha demostrado que una sobrealimentación neonatal, con el modelo de camadas pequeñas en rata, produce un aumento de los niveles séricos de leptina (López M, 2007b), un estado de resistencia a leptina mediado por regulación a la baja del receptor hipotalámico largo de la leptina (OB-Rb) y aumento de la expresión de NPY y AgRP en el ARC posterior (López M, 2005a).

Tanto en rata como en humanos la diabetes y obesidad gestacionales están asociadas con obesidad en la descendencia (Levin BE, 1998; Dabelea D, 2000). Con relación a lo anterior se sabe que tanto la hiperinsulinemia como el déficit de insulina, así como también la sobrealimentación perinatal predisponen al desarrollo de obesidad y diabetes en la edad adulta (Plagemann A, 1992; Dorner G, 1994; López M, 2007b).

Se ha demostrado la interacción entre programación fetal y medio ambiente postnatal, con evidencia de que la dieta postnatal puede amplificar efectos deletéreos de la programación. En ratas, las crías de madres alimentadas con dietas ricas en carbohidratos o grasas durante los períodos de la gestación y de la lactancia exhiben alteraciones persistentes en el funcionamiento del sistema de NPY en la edad adulta

Introducción

(Kozak R, 2000; Kozak R, 2005) y después de la exposición temprana de la vida a las dietas ricas en grasas se sobreexpresan los péptidos hipotalámicos orexigénicos (Beck B, 2006).

La manipulación farmacológica postnatal puede atenuar los efectos adversos de la programación (Vickers MH, 2001), por ejemplo, en un modelo animal, la hipertensión inducida por una dieta hipoproteica puede ser evitada con una dieta baja en sodio o con inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina en una etapa neonatal temprana (Manning J, 2005), asimismo la hiperleptinemia e hipertensión postnatal programadas por exposición excesiva de glucocorticoide in útero se puede prevenir con una dieta postnatal rica en ácidos grasos n-3 (Wyrwoll CS, 2006).

1.4. Adipoquinas

1.4.1. Leptina

La leptina es un péptido no glucosilado de 16 kDa ligado a CVD. Se considera como una señal fundamental de saciedad para el cerebro (Casanueva FF, 1999; Ahima RS, 2000; Friedman JM, 2000) y tiene otras funciones como interferencia con la actividad simpática, hematopoyesis y función reguladora neuroendocrina de hormonas hipofisarias (Casanueva FF, 1999; Mantzoros CS, 1999; Ahima RS, 2000). Sus receptores son codificados por el gen de diabetes (db) y pertenecen a la superfamilia de receptores de citoquinas clase I (Tartaglia LA, 1995).

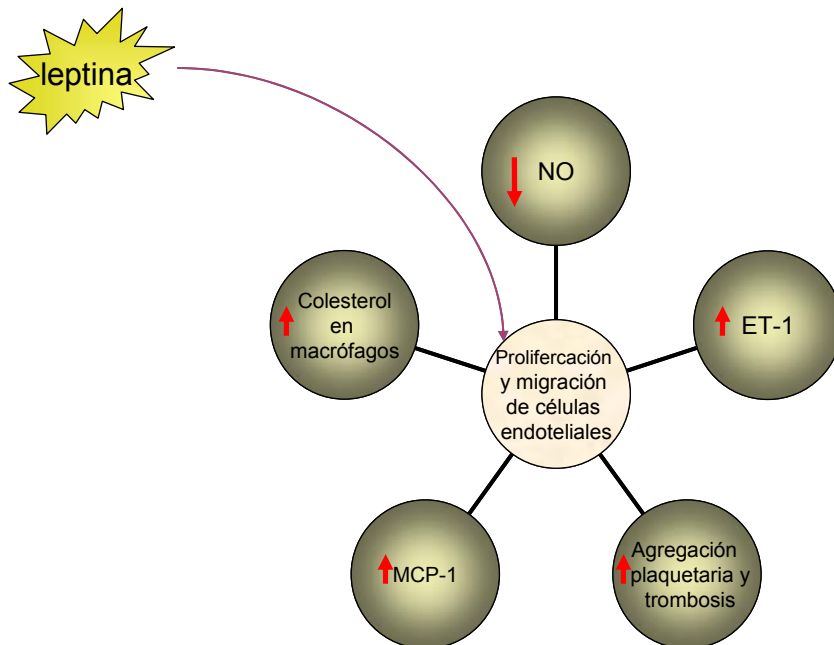
La leptina es una hormona clave en el control de la ingesta (Ahima RS, 2000; Jéquier E, 2002; Duan J, 2007; Ahima RS, 2008). Sus efectos en el SNC son la disminución de la expresión de ARNm de NPY (Mercer JG, 1997; Morrison CD, 2005) así como de AgRP (Korner J, 2001; Morrison CD, 2005) y en general de neuropéptidos orexigénicos o

Introducción

aumento de anorexigénicos. La respuesta neuronal a la vía de activación del receptor de leptina involucra la transducción de señal Janus-kinasa y activador de transcripción (Jak-STAT) (Bates SH, 2004). Entre las proteínas inducidas por la señal STAT mediada por leptina está la proteína supresora de señal de citoquina tipo 3 (SOCS3).

La leptina, como la CRP estimula la producción de endotelina 1 (ET-1) y eNOS en células endoteliales y promueve la acumulación de especies reactivas de oxígeno (Konstantinides S, 2001; Cooke JP, 2002), así como la proliferación y migración de células endoteliales (Park HY, 2001) y de células de músculo liso vascular (Artwohl M, 2002), también incrementa la expresión de proteína quimioatrayente de monocitos tipo 1 (MCP-1) en células endoteliales aórticas (Yamagishi SI, 2001) (Figura 5).

Figura 5. Leptina y sus principales efectos.



ET-1: endotelina-1; MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos tipo 1; NO: óxido nítrico.

Otras acciones de la leptina son incrementar la agregación plaquetaria y la trombosis arterial por medio de una vía dependiente de su receptor (Cooke JP, 2002), promover la

Introducción

acumulación de colesterol en los macrófagos bajo condiciones de hiperglucemia (O'Rourke L, 2002), estimular la angiogénesis (Sierra-Honigmann MR, 1998) y aumentar el tono simpático periférico.

La leptina influye en la estimulación del transporte de glucosa, síntesis de glucógeno, lipogénesis, inhibición de la lipólisis y de la activación de la PK-A, así como de la síntesis de proteína en células diana sensibles a insulina (Friedman JM, 2000).

Los niveles de leptina exhiben un dimorfismo sexual, mayor en hembras (Teichtahl AJ, 2005), y están directamente relacionados con la masa adiposa, además, el incremento de la producción de leptina que se da durante un proceso infeccioso o inflamatorio sugiere que es parte de las citoquinas que gobiernan la respuesta inflamatoria-inmunológica y los mecanismos de defensa del huésped. Al respecto, se ha demostrado que algunas de sus acciones directas sobre el sistema inmune son: estimular la función fagocítica (Zarkesh-Esfahani H, 2001), síntesis de eicosanoides (Mancuso P, 2004), óxido nítrico y diversas citoquinas proinflamatorias (Raso GM, 2002) en macrófagos y monocitos, estimula la proliferación, diferenciación, activación y citotoxicidad de las células asesinas naturales (*natural killer*, NK) (Tian Z, 2002), e induce la activación de células T predisponiendo hacia una diferenciación TH1 (Farooqi IS, 2002).

Ratones Db/db, que carecen de receptores de leptina, padecen atrofia tímica (Kimura M, 1998), y ratones ob/ob, que carecen de leptina, son inmunodeficientes. Diversos estudios han implicado a esta hormona en la patogénesis de condiciones inflamatorias autoinmunes tales como DM tipo 1, artritis reumatoide y enfermedad intestinal crónica inflamatoria. El estado de inflamación crónica que se da en la obesidad podría estar explicado significativamente por los niveles elevados de leptina que se dan en esta enfermedad (Otero M, 2006; Badman MK, 2007).

Por análisis de regresión múltiple se ha demostrado una asociación entre la leptina y una mayor adiposidad, niveles de insulina, colesterol y con el modelo homeostático de

Introducción

resistencia a insulina (HOMA) (Zamboni M, 2004). En el caso de la lipodistrofia, caracterizada por pérdida del tejido adiposo corporal, deficiencia de leptina y una forma única y severa de RI y diabetes (Joffe BI, 2001), la administración de la hormona deficiente mejora la sensibilidad a la insulina (Oral EA, 2002), así como lo hace el trasplante de tejido adiposo blanco en ratones totalmente lipodistróficos (Colombo C, 2002). Por otra parte, los niveles de leptina están relacionados de manera independiente con el síndrome metabólico, sugiriendo que la resistencia a esta hormona podría desempeñar un papel patogénico, como en otras condiciones en las que el síndrome metabólico aparece como un fenómeno secundario (Annaloro C, 2008).

Los niveles plasmáticos de esta hormona en pacientes con lupus eritematoso sistémico, artritis y afección del SNC están significativamente disminuidos en comparación de pacientes con lupus eritematoso sistémico sin artritis ni afección al SNC, lo que refuerza la idea de que una inflamación crónica activa disminuye los niveles de leptina (Wisłowska M, 2008).

1.4.2. Adiponectina

También referida como *gelatin-binding protein-28* (Maeda K, 1996; Nakano Y, 1996), adipoQ (Hu E, 1996) y proteína complementaria relacionada con el adipocito de 30 kDa (Scherer PE, 1995). Es una proteína de 244 aminoácidos, producto del gen apM1 el cual es específica y altamente expresada en células adiposas humanas (Maeda K, 1996). Tiene homología estructural con el colágeno VIII y X y el factor de complemento C1q (Scherer PE, 1995; Hu E, 1996; Maeda K, 1996; Kishore U, 2000; Takahashi M, 2000). Se le atribuyen propiedades anti-aterogénicas (Ouchi N, 1999) y anti-inflamatorias (Yokota T, 2000).

Introducción

En humanos, la adiponectina actúa a través de dos receptores, AdipoR1 y AdipoR2, que comparten 67% de identidad con el gen de ratón (Yamauchi T, 2003). AdipoR1 está expresado ampliamente en diversos tejidos, incluyendo músculo, hígado y páncreas y une la forma globular de la adiponectina con gran afinidad (Wu X, 2003). AdipoR2 se encuentra más abundantemente en hígado (Yamauchi T, 2003) y une principalmente la forma *full-length*. Más recientemente, ambos, AdipoR1 y AdipoR2 se encontraron expresados abundantemente en las células beta pancreáticas de humanos y rata (Kharroubi I, 2003). Por estudios de *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) se ha sugerido que mutaciones de AdipoR1 pudieran estar implicadas en el síndrome metabólico al disminuir la sensibilidad a insulina (Hua H, 2004).

Las concentraciones de adiponectina correlacionan negativamente con la glucosa plasmática, insulina, triglicéridos, índice de masa corporal (IMC) y positivamente con HDL (Hotta K, 2000). Se ha reforzado la evidencia de la relación entre hipoadiponectinemia y síndrome metabólico (Matsuzawa Y, 1999). También hay evidencia de que la pérdida de peso induce un incremento en los niveles de adiponectina (Yang WS, 2001).

Arita et al. (Arita Y, 1999) demostraron que los niveles promedio de adiponectina plasmática son de 3.7 mg/ml en pacientes obesos, mientras que en no obesos fueron de 8.9 mg/ml. Así como los niveles plasmáticos de leptina, las concentraciones de adiponectina parecen ser género-dependientes, siendo mayores en mujeres que en hombres (Hotta K, 2000; Nishizawa H, 2002; Yamamoto Y, 2002b). Además, familiares de primer grado de pacientes con DM2 tienen niveles reducidos de la expresión de ARNm de adiponectina en tejido adiposo comparados con controles, aunque tienen niveles circulantes de adiponectina normales (Lihn AS, 2003), lo que indica una desregulación de la expresión del gen de adiponectina en estos sujetos.

La hipoadiponectinemia también se relaciona con enfermedad arterial coronaria y con factores de riesgo cardiovascular tales como género masculino, HTA, obesidad y DM2

Introducción

(Kazumi T, 2002). Bajos niveles de adiponectina preceden y predicen a la DM2 (Spranger J, 2003), y el incremento de los niveles plasmáticos de adiponectina mejora la sensibilidad a la insulina (Yamauchi T, 2001), probablemente actuando a través de la AMPK para incrementar la oxidación de ácidos grasos (Tomas E, 2002; Yamauchi T; 2002).

La adiponectina recombinante reduce la glucosa sérica en roedores normales y diabéticos sin estimular la secreción de insulina (Berg AH, 2001) y una reducción en los niveles de adiponectina parece estar implicada en el desarrollo de RI en modelos murino de obesidad y lipoatrofia. Los datos disponibles sugieren que la adiponectina podría reducir la gluconeogénesis e incrementar la utilización de la glucosa en el músculo, quizás al aumentar la oxidación de los lípidos y por lo tanto reduciendo los niveles de ácidos grasos no esteroideos y su consecuente acumulación intramiocelular (Yang WS, 2001).

Datos recientes han demostrado que los ratones deficientes en adiponectina tienen engrosamiento severo de neoíntima y proliferación incrementada de células musculares de tipo liso en arterias lesionadas mecánicamente (Kubota N, 2002; Matsuda M, 2002). Más aún, la expresión reducida del gen apM1 del tejido adiposo y niveles reducidos de adiponectina han sido implicados en la patogénesis de la DM2 y obesidad (Statnick MA, 2000).

La infusión de adiponectina (Yamauchi T, 2001) y la sobreexpresión transgénica de especies mutantes con bioactividad incrementada (Combs TP, 2004) mejoran de manera notable la sensibilidad a insulina en ratones resistentes a insulina. Estos datos indican que la restitución de adiponectina pudiera ser una nueva herramienta terapéutica para la RI y DM2.

Por otra parte, se ha reportado que la RI en ratones lipoatróficos es revertida por la combinación de dosis fisiológicas de adiponectina y leptina, pero sólo parcialmente si se administra sólo una de las dos (Yamauchi T, 2001). Las tiazolidinedionas (TZD) aumentan los niveles de adiponectina. Por el contrario TNF- α reduce la expresión de adiponectina

Introducción

en adipocitos y las TZD suprimen este efecto inhibitor. Estudios recientes también han mostrado que los niveles plasmáticos de adiponectina también son afectados por un tratamiento con agonistas del receptor gamma activador de la producción de peroxisomas (PPAR- γ) tanto en ratones delgados como obesos (Maeda N, 2001; Combs TP, 2002). Es importante mencionar que PPAR- γ 2 es esencial para mantener la sensibilidad a insulina (Medina-Gómez G, 2005), por lo que la interacción con estos receptores repercute en el control glucémico, de hecho, datos de Combs et al. indican que ratones db/db sometidos a un tratamiento crónico con agonistas PPAR- γ tuvieron un incremento significativo de los niveles plasmáticos de adiponectina (Combs TP, 2002).

Recientes *genome-wide scans* han mapeado un locus de susceptibilidad a la DM2 en el cromosoma 3q27, donde está localizado el gen de adiponectina (apM1) (Kissebah AH, 2000; Takahashi M, 2000; Stumvoll M, 2002). Se ha reportado evidencia de una asociación entre DM2 y SNPs en la posición 45 y 276 (Hara K, 2002; Menzaghi C, 2002), y en el promotor proximal y exón 3 del gen de adiponectina (Vasseur F, 2002).

Los estudios en humanos han reproducido los resultados de aquellos en animales en los cuales el tratamiento con TZD aumenta los niveles de adiponectina (Maeda N, 2001), esto se ha visto en pacientes diabéticos así como en sujetos no diabéticos delgados y obesos (Yang WS, 2002; Yu JG, 2002). Se ha descrito que en caso de polimorfismo Pro12Ala del gen PPAR- γ 2, la adiponectina está disminuida aunque el IMC, glucosa plasmática, lípidos séricos e índice de RI no tengan diferencias (Yamamoto Y, 2002a).

1.4.3. Resistina

Un estudio con adipocitos 3T3-L1 llevó a la identificación de la resistina (Steppan CM, 2001), proteína de 12,5 kDa rica en residuos de cisteína, también identificada de manera independiente por dos grupos más (Holcomb IN, 2000; Kim KH, 2001). Esta hormona

Introducción

tiene capacidad de disminuir la sensibilidad a la insulina y la tolerancia a la glucosa en modelos murinos (Steppan CM, 2001), demostrándose que lleva a RI (Rajala MW, 2003; Banerjee RR, 2004). El gen homólogo que existe en humanos está expresado a mayores niveles en monocitos y macrófagos que en adipocitos (Savage DB, 2001; Patel L, 2003).

Recientemente diversos estudios han sugerido que anormalidades metabólicas están asociadas con polimorfismos en el gen humano de resistina (Degawa-Yamauchi M, 2003; Kaser S, 2003; Smith SR, 2003; Tan MS, 2003; Youn BS, 2004). Por otra parte, el incremento en la producción de resistina por la endotoxina lipopolisacárido es bloqueado por la aspirina y la rosiglitazona, fármacos que tienen acciones antiinflamatorias e insulino sensibilizantes y que antagonizan a NF- κ B (Lehrke M, 2004). De hecho, la activación de NF- κ B es suficiente para inducir la expresión de resistina.

El incremento en los niveles de resistina en humanos con obesidad es quizás un resultado indirecto de la elevación de citoquinas proinflamatorias características de estados de aumento de adiposidad. Los niveles de esta hormona se correlacionan negativamente con los de adiponectina (Wasim H, 2006). Por otra parte, en pacientes con DM2, los niveles de resistina se correlacionan con los niveles del receptor soluble del TNF- α (Lehrke M, 2004). No obstante, a pesar que ha disminuido el entusiasmo inicial como eslabón entre obesidad y RI debido a resultados contradictorios (Nogueiras R, 2005; Lago F, 2007), se siguen documentando posibles acciones de esta hormona, por ejemplo, en ratas podría desempeñar un papel integrador entre homeostasis y reproducción (Nogueiras R, 2004; Tovar S, 2005), además se ha demostrado que una administración intracerebroventricular (ICV) de esta hormona disminuye los niveles de ARNm de AgRP y NPY y aumenta los de CART (Vázquez MJ, 2008). En humanos disminuye en caso de llevar una dieta hipocalórica (Chiba T, 2008).

Introducción

1.4.4. Patogenia de la aterosclerosis

La aterosclerosis es un proceso inflamatorio que comienza con la disfunción endotelial (Libby P, 2002), la cual a su vez es un trastorno sistémico caracterizado por un desequilibrio entre la vasodilatación y vasoconstricción endotelial, así como también de los factores antitrombóticos y protrombóticos. El óxido nítrico mantiene las propiedades vasodilatadoras del endotelio y se opone a los efectos de vasoconstrictores de ET-1 y angiotensina-II (Verma S, 2002), también inhibe la activación y agregación de leucocitos y plaquetas y junto con las prostaglandinas ayuda a mantener al endotelio como una barrera lisa no trombótica. En respuesta a una agresión inflamatoria, el incremento en la adhesión endotelial y permeabilidad permite la entrada de leucocitos y la expresión de las moléculas tipo 1 de adhesión vascular celular (VCAM-1) e intercelular (ICAM-1) (Verma S, 2002). También se incrementa la expresión de P- y E-selectinas, involucradas en el reclutamiento leucocitario, MCP-1, que promueve la trasmigración leucocitaria, e integrinas que median la adherencia subsiguiente a la íntima (Libby P, 2002). La fagocitosis de partículas oxidadas de LDL por los monocitos lleva a la formación de células espumosas y al desarrollo de estrías grasas y placas, así como a la proliferación de células de músculo liso (Naito M, 2008). Las placas predisponen a la ruptura del vaso, espasmo, formación de trombos y eventualmente oclusión e infarto (Paoli G, 2005).

Se ha acumulado evidencia que refuerza la idea de las propiedades proinflamatorias sobre el endotelio que ejercen las adipoquinas. El incremento de riesgo de CVD por los productos secretados del tejido adiposo es independiente de sus efectos sobre RI y diabetes. En la tabla 1 se resume la acción de adipoquinas sobre la sensibilidad a insulina.

Introducción

Tabla 1. Efecto de adipocinas sobre la sensibilidad a insulina

| Proteína | Efecto sobre la sensibilidad a insulina |
|--------------------------------|-----------------------------------------|
| Apelin | No del todo claro |
| Adiponectina | Aumenta |
| Adipsina/ASP | Disminuye |
| Amiloide sérico A | Desconocido |
| Angiotensinógeno | Disminuye |
| CRP | Disminuye |
| FIAF | Disminuye |
| Glicoproteína ácida $\alpha 1$ | Desconocido |
| Hepcidina | Disminuye |
| IL-1 β | Disminuye |
| IL-6 | Disminuye |
| Leptina | Disminuye |
| MCP-1 | Disminuye |
| Omentina | Aumenta |
| PAI-1 | Disminuye |
| RBP4 | Aumenta |
| Resistina | Disminuye |
| TNF- α | Disminuye |
| Vaspin | Aumenta |

ASP: proteína estimulante de la acilación; CRP: proteína C reactiva; IL: interleuquina; FIAF: factor adiposo inducido por ayuno; MCP-1: proteína quimioatrayente de macrófagos y monocitos; PAI-1: inhibidor tipo 1 del activador de plasminógeno; RBP4: *retinol-binding protein 4*; TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa.

1.5. Citoquinas proinflamatorias

1.5.1. Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)

El TNF- α es una molécula no glicosilada, de 17 kDa, que deriva de una producida principalmente por macrófagos. Posee 2 receptores de membrana, uno de 55 kDa (TNFR1 ó p55R ó CD120a) y otro de 75 kDa (TNFR2 ó p75R ó CD120b), que estarían involucrados en la regulación de los niveles circulantes de esta citoquina. El TNF- α es un agente clave en la inmunidad del huésped, con actividad antitumoral, antiviral y antimicrobiana, induce crecimiento tisular, diferenciación de tejidos e inmunoregulación.

Introducción

En individuos sanos, sus niveles son variables, fluctuando entre 50 pg/ml y no detectables. Los niveles superiores a 100 pg/ml, en general, se asocian con morbilidad (Aguillón JC, 2001).

El TNF- α estimula la síntesis *de novo* de varios grupos de moléculas de adhesión celular, induce cambios vasculares, afectando la adhesión de leucocitos y promoviendo la actividad procoagulante (Hürlimann D, 2004; Sbarsi I, 2007). Si estos efectos ocurren a gran escala, pueden causar coagulación intravascular diseminada, como ocurre en el shock séptico. Algunos de los efectos tóxicos del TNF- α , tales como shock e inflamación, son mediados por la inducción de apoptosis, principalmente a través del TNFR1 (Beg AA, 1996).

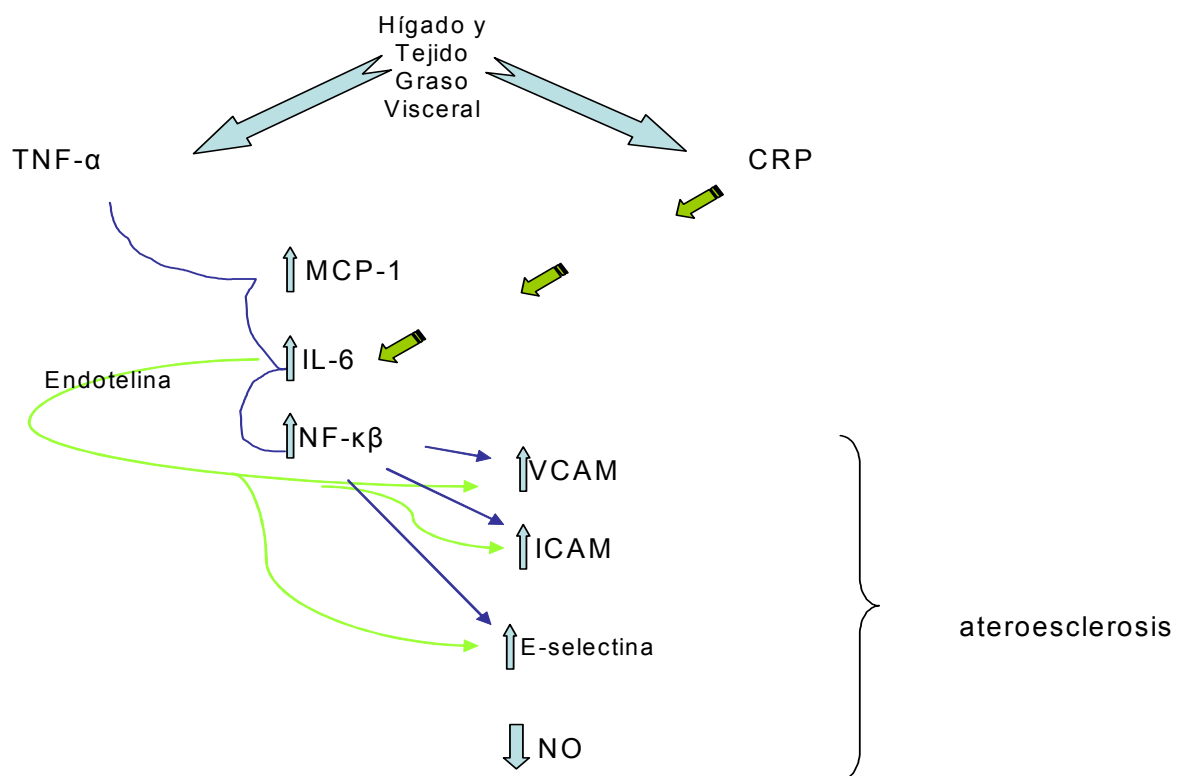
El aumento de sus niveles se ha relacionado con la patogénesis de enfermedades asociadas al complejo principal de histocompatibilidad (MHC), especialmente en aquellas con un componente inflamatorio y autoinmune, tales como artritis reumatoide (Breunan FM, 1992), lupus eritematoso sistémico (Jacob CO, 1990), diabetes mellitus tipo 1 (Pociot F, 1993), DM2 (Hotamisligil GS, 1994) y obesidad asociada a RI (Zinman B, 1999), procesos infecciosos agudos como síndrome de shock séptico (Tracey K, 1999) y crónicos como síndrome de inmunodeficiencia adquirida (Hober D, 1989). Esta citoquina interviene en las respuestas inmunomoduladoras e inflamatorias (Qi C, 2000) y ha sido implicada en la caquexia asociada al cáncer (Fortunati N, 2007; Krzystek-Korpacka M, 2008). El TNF- α actúa principalmente de manera autocrina/paracrina modulando en el tejido adiposo la síntesis de diversas adipoquinas tales como IL-6, MCP-1 y NGF (Fasshauer M, 2003; Peeraully MR, 2004), siendo además un potente inhibidor de la diferenciación adipocitaria, y regulador de diversas proteínas involucradas en el metabolismo de grasa y glucosa (Kahn BB, 2000).

La sobreproducción de TNF- α por el tejido adiposo está involucrada en la RI (Hotamisligil GS, 1996; Souza SC, 1998) y obesidad (Hotamisligil GS, 1993). Ratones *knockout* para

Introducción

TNF- α y para su receptor tienen mayor sensibilidad para la insulina en los modelos de obesidad inducida con dieta (DIO) y en el modelo de obesidad ob/ob (Uysal KT, 1997). También inicia y propaga la formación de la lesión aterosclerótica al activar la transcripción de NF- κ B que induce a su vez la expresión de ICAM-1, VCAM-1, MCP-1 y E-selectina en las células endoteliales aórticas y del músculo liso vascular (Ouchi N, 1999). Además reduce la biodisponibilidad de NO en las células endoteliales impidiendo la vasodilatación dependiente de endotelio (Bhagar K, 1997). También promueve la apoptosis en células endoteliales al defosforilar la PK-B o Akt (Choy JC, 2001) (Figura 6).

Figura 6. Efectos del TNF- α .



CRP: proteína C reactiva; ICAM-1: molécula tipo 1 de adhesión intercelular; IL-6: interleuquina 6; MCP-1: proteína quimioatrayente tipo 1 de monocitos; NF- κ B: factor nuclear κ B; NO: óxido nítrico; TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa; VCAM: molécula vascular de adhesión celular.

Introducción

1.5.2. Inhibidor tipo 1 del activador del plasminógeno (PAI-1)

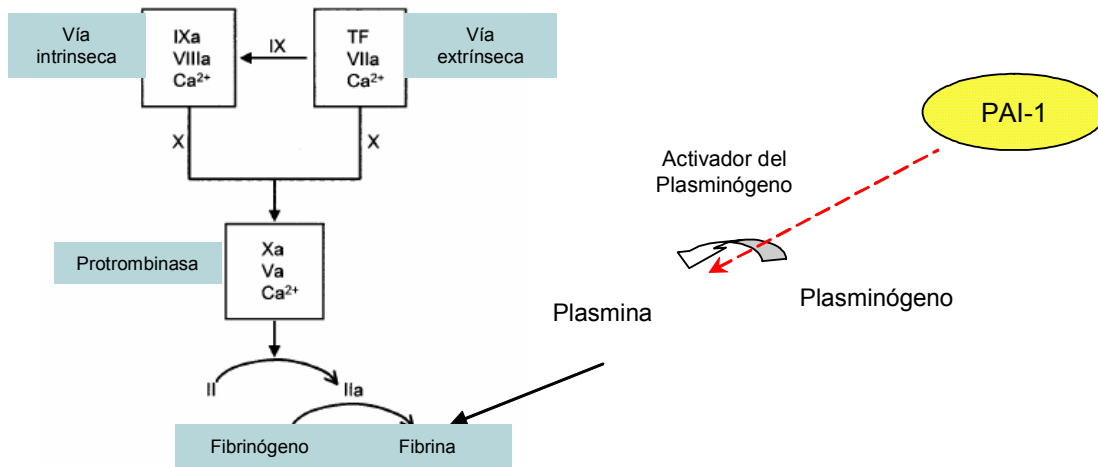
Es una proteína protrombótica de fase aguda que suprime la fibrinólisis al inhibir la activación del plasminógeno (Kohler HP, 2000) (Figura 7), su incremento es un factor de riesgo bien reconocido para trombosis vascular (Auwerx J, 1988) y ha sido implicado como un participante activo en la aterogénesis al promover la formación de trombos; sus niveles han sido correlacionados positivamente con riesgo cardiovascular y mortalidad, y recientemente con el desarrollo de diabetes (Kohler HP, 2000).

Personas con RI, que se acompaña de obesidad y DM2, tienen una actividad fibrinolítica deprimida como consecuencia de un incremento en la concentración de PAI-1 tanto en condiciones basales, como en estenosis vascular (Almer LO, 1990), lo que origina una alteración en el balance entre el activador del plasminógeno (t-PA) y su inhibidor, PAI-1 (relación t-PA/PAI-1) que aparece severamente dañada en la obesidad y DM2 (Jughan-Vague I, 1993).

Aunque la principal producción de PAI-1 proviene de las plaquetas y células endoteliales (Loskutoff DJ, 1998), el tejido adiposo, principalmente visceral (grasa omental), tiene la mayor capacidad biosintética en estados de obesidad. Estimulan su secreción TNF- α , TGF- β , angiotensina II, FFAs, hiperinsulinemia e hipertrigliceridemia (Kohler HP, 2000) y los niveles plasmáticos de esta citoquina disminuyen con la pérdida de peso (Mc Gill JB, 1994; Loskutoff DJ, 1998).

Introducción

Figura 7. PAI-1 y coagulación.



Ca²⁺: calcio; PAI-1: Inhibidor tipo 1 del activador del plasminógeno; TF: factor tisular.

1.5.3. Interleuquina 1 beta (IL-1 β)

Es una citoquina pleiotrópica proinflamatoria (Dinarello CA, 1996) y uno de los activadores celulares más frecuentes y multifuncionales. Está producida principalmente por monocitos/macrófagos, células NK y células B. Otras células como fibroblastos, queratinocitos y células endoteliales también pueden producirla. La actividad biológica de la IL-1 β es extremadamente diversa, activando proteínas en fase aguda, prostaglandinas, otras citoquinas, inducción de colágeno y síntesis de colagenasa, y reabsorción de calcio en el hueso (Del Carlo M, 2008; Furuyama A, 2008).

Esta citoquina está fuertemente asociada a obesidad (Lee JH, 2008; Tilg H, 2008), con algunos polimorfismos con una asociación más intensa (Strandberg L, 2008). Mujeres obesas en edad fértil presentan una respuesta inflamatoria proaterogénica, con incremento de IL-1 β como respuesta a la hiperglucemia (González F, 2007). Además, en células inmunocompetentes se hallan efectos estimuladores en la proliferación de

Introducción

linfocitos, inhibición de la síntesis de interferón y una elevada producción de linfoquinas de células T y de inmunoglobulinas de células plasmáticas. Esto conduce a una actividad proinflamatoria que regula y coordina el curso de la respuesta inmune pero podría también aumentar los efectos destructivos en sobrerreacciones. La liberación de IL-1 β es estimulada por numerosas sustancias, como linfocinas, otras citoquinas, prostaglandina E₂, factores del complemento y bacterias o lipopolisacáridos (Kunkel SL, 1985; Cavaillon JM, 1990).

Los ratones IL-1 β \neg se desarrollan normalmente y aparentemente son sanos y fértiles e incluso responden con normalidad en modelos de hipersensibilidad por contacto y retardada inducida por inflamación por lipopolisacáridos, no obstante, exhiben una respuesta inflamatoria aguda inhibida y son completamente resistentes al desarrollo de fiebre y anorexia, lo que muestra su papel como pirógeno y mediador de la respuesta aguda (Zheng H, 1995). Por otra parte, la administración de anakinra (antagonista del receptor de IL-1) mejora la glicemia, la función secretora de las células beta y disminuye marcadores de inflamación sistémica (Larsen CM, 2007).

1.5.4. Interleuquina 6 (IL-6)

La IL-6 es una citoquina pleiotrópica cuyas principales fuentes en el organismo humano son las células T y B, fibroblastos, y monocitos/macrófagos. La síntesis de IL-6 por células secretoras es compleja y depende de la interrelación celular. De esta manera, las células T requieren de la estimulación previa por monocitos para su secreción, mientras que los monocitos son capaces de sintetizar IL-6 sin la necesidad de otras células. La actividad biológica de esta citoquina es muy diversa: diferenciación de células B a células plasmáticas, activación de células T, liberación de proteínas de fase aguda por parte de los hepatocitos y activación de la cascada del complemento (Revel M, 1989).

Introducción

En individuos sanos aproximadamente el 30% de la IL-6 circulante se origina del tejido adiposo, y este porcentaje se incrementa con la obesidad (Bastard JP, 1999). Los niveles de IL-6 se correlacionan con el IMC (Fried SK, 1998) de manera similar a la leptina (Friedman JM, 1998), y de manera aguda puede aumentar los niveles de triglicéridos y glucosa (Tsigos, C, 1997). En cultivo puede bloquear la señal de transducción del receptor de insulina (Senn JJ, 2003), e inducir indirectamente RI *in vivo* al estimular la lipólisis (Nonogaki K, 1995).

El grupo de Jansson JO investigó el impacto de la pérdida de IL-6 sobre la composición corporal en ratones sin el gen codificante para IL-6 (*Il6^{-/-}*) y encontraron que desarrollaron obesidad de inicio en la adultez, lográndose la reversión parcial con la administración de esta citoquina (Wallenius V, 2002). Los ratones obesos *Il6^{-/-}* tuvieron un metabolismo alterado para carbohidratos y lípidos, niveles incrementados de leptina y respuesta disminuida a esta hormona. La administración ICV de IL-6 incrementó el gasto de energía y disminuyó la ingesta. En un estudio posterior publicaron que la producción aumentada de IL-6 durante el ejercicio es crucial para la resistencia física (Faldt J, 2004).

Se han encontrado elevados niveles de IL-6 en sangre en infecciones virales y bacterianas, neoplasia, trauma, y enfermedad crónica inflamatoria (Hirano T, 1990). Asimismo, se ha establecido una asociación entre elevados niveles sistémicos de IL-6, CRP y neutrófilos y aumento del riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares (Loos BG, 2000).

Se ha demostrado que el antiinflamatorio no esteroideo indometacina, inhibidor de la producción de PGE₂, puede inhibir la producción de IL-6 por parte de los fibroblastos (Czuszak CA, 1996), sugiriendo que la PGE₂ es un importante modulador endógeno de IL-6.

Introducción

1.5.5. Proteína C reactiva (CRP)

CRP es un reactante de fase aguda sintetizada principalmente por el hígado y regulada por los niveles circulantes de IL-6, seguida de IL-1 y TNF- α (Yudkin JS, 1999). Se considera uno de los más fuertes predictores de cardiopatía (Visser M, 1999; Ridker PM, 2003). Los niveles plasmáticos circulantes de CRP están elevados en obesos y están directamente relacionados con el IMC y perímetro de cintura (Ford ES, 2001; Pradhan AD, 2001; Ridker PM, 2003). Los niveles de ARNm de CRP en el tejido adiposo humano están inversamente relacionados con los del ARNm de adiponectina (Ouchi N, 2003) y en caso de obesidad predicen el desarrollo de diabetes (Festa A, 2002; Freeman DJ, 2002). La disminución de peso lleva a disminución de los niveles de CRP (Heilbronn LK, 2001; Tchernof A, 2002; Esposito K, 2003).

Esta citoquina participa en el proceso de aterogénesis al modular la función endotelial (Verma S, 2002; Pepys MB, 2003) induciendo la expresión de ICAM-1, VCAM-1, selectina y MCP-1 en cultivo de células endoteliales vía incremento de la secreción de ET-1, un potente vasoconstrictor endógeno, e IL-6 (Verma S, 2002). También atenúa el NO basal y el estimulado de endotelio al regular a la baja el ARNm de la eNOS y la expresión de su proteína y estimula la expresión de ARNm del receptor tipo 1 de angiotensina y de los niveles de su proteína así como la expresión de este receptor en la superficie celular (Wang CH, 2003). De manera interesante, el efecto de CRP en la disfunción endotelial es potenciado por la hiperglucemia y estos efectos son atenuados por rosiglitazona (Verma S, 2003).

CRP parece desempeñar un papel de coordinador al amplificar la actividad proinflamatoria de otras citoquinas; por ejemplo, incrementa la expresión y actividad de PAI-1, en células endoteliales (Devaraj S, 2003).

Introducción

1.5.6. Proteína quimioatrayente tipo 1 de monocitos (MCP-1)

Es una citoquina proinflamatoria producida principalmente por macrófagos y células endoteliales, asociada a enfermedad cardiovascular (de Lemos JA, 2003) e involucrada en la patogénesis de la aterosclerosis, esto último explicado porque las VLDL inducen su expresión en macrófagos (Wang GP, 1997) y células mesangiales (Lynn EG, 2000).

Aunque se eleva de manera directa al incremento en el IMC y disminuye conforme se baja de peso en humanos con obesidad mórbida (Troseid M, 2004; Christiansen T, 2005) también hay autores que han comunicado falta de asociación entre las concentraciones sistémicas de esta citoquina con el IMC, la relación cintura/cadera y la grasa corporal total, lo que indicaría poco aporte del tejido adiposo a los niveles circulantes de esta citoquina (Herder C, 2006).

En diferentes sistemas de cultivo incluyendo adipocitos 3T3-L1, adipocitos humanos diferenciados *in vitro* y modelos de tejido completo, se ha demostrado que la liberación de MCP-1 puede ser estimulada con mediadores asociados a la RI tales como TNF- α , IL-1 β , IL-6 y hormona de crecimiento (GH), mientras que agentes anti-diabéticos y antiinflamatorios como IL-10, metformin y TZD suprimen su liberación (Gerhardt CC, 2001; Fain JN, 2005).

En un modelo de DIO en ratones se encontró que MCP-1 aumenta su expresión en tejido adiposo visceral (vWAT) después de siete días de comenzar dieta alta en grasa y después de cuatro semanas a nivel sérico, de hecho el incremento de esta citoquina es previo al de TNF- α (Chen A, 2005).

Introducción

1.5.7. Hepcidina y omentina

La proteína antimicrobiana hepática, hepcidina, péptido implicado en el control de la absorción intestinal del hierro, fue así denominada en 2001 al aislarse en orina humana un péptido sintetizado por el hígado (hep-), con propiedades antimicrobianas (antifúngica y antibacteriana) *in vitro* (-cidin) (Park CH, 2001). Actualmente se la conoce también como HAMP (*hepcidin antimicrobial peptide*; OMIM 606464) (Merryweather-Clarke AT, 2003). El gen, localizado en el cromosoma 19, codifica un propéptido de 84 aminoácidos del que por acción enzimática derivan las formas activas C-terminal con 20, 22 y 25 aminoácidos que son ricos en cisteína. La hepcidina mayor es un péptido catiónico con 25 aminoácidos y 4 puentes disulfuro que unen los 8 residuos de cisteína y que determinan su actividad en los 17 aminoácidos que delimitan (Bridle KR, 2003).

Esta proteína es producida en el hígado y también en tejido adiposo. Se secreta a la circulación en respuesta a la inflamación o al aumento de las reservas de hierro (Pigeon C, 2001; Nicolas G, 2002) y tiene una corta vida media en plasma (Ajioka R, 2004). La secreción de esta adipoquina depende también de la oxemia y estado inflamatorio (Fleming RE, 2001; Nemeth E, 2003). Bekri et al. (Bekri S, 2006) demostraron la expresión de ARNm de hepcidina en tejido adiposo y que era aún mayor en sujetos obesos. Sus niveles en tejido adiposo se correlacionan con CRP y la IL-6 estimula su producción *in vitro* (Bekri S, 2006). La limitación en los niveles de hierro eventualmente limita la eritropoiesis y contribuye a la anemia asociada con infección e inflamación. Por el contrario, la limitación de hierro extracelular por efecto de hepcidina podría limitar el aporte de este elemento a los microorganismos y contribuir a la defensa del huésped.

La omentina es una hormona descubierta por Gong (Yang RZ, 2006), encontrándose principalmente en vWAT y que también se puede aislar de la sangre. Su gen se encuentra localizado en el cromosoma 1. Incrementa la sensibilidad a la insulina en los adipocitos

Introducción

humanos. La isoforma circulante más abundante en humanos es omentina-1, mucho más expresada en sujetos delgados que en obesos, además es más abundante en mujeres que en hombres. Sus niveles están inversamente correlacionados con el IMC, perímetro abdominal, leptina y RI medida como HOMA (*homeostasis model assessment*) y está directamente correlacionada con la adiponectina y HDL (de Souza Batista CM, 2007). La expresión de los genes de omentina 1 y 2 se encuentra disminuida en obesidad y están altamente relacionados mutuamente en el vWAT. Los niveles de omentina pudieran ser predictivos de las consecuencias metabólicas o co-morbilidades asociadas con obesidad.

1.5.8. Lipocortina

Un eslabón entre inflamación y diferenciación adipocitaria es la lipocortina I (annexin I, ANXA 1) (Kamal AM, 2005). Descrita inicialmente como una proteína de 37 kDa inducida por glucocorticoides, es un modulador endógeno de inflamación (Perretti M, 2003). Inhibe a la fosfolipasa A2, enzima que se encarga de liberar al ácido araquidónico de las membranas celulares y a partir de este se sintetizan las prostaglandinas y tromboxanos. Por esta razón, al inhibir a la fosfolipasa A2, disminuye la síntesis de prostaglandinas que intervienen en un gran número de mecanismos inmunológicos, como por ejemplo, el aumento de la permeabilidad vascular y la extravasación de células inmunitarias a los tejidos. La lipocortina I, puede inactivarse por un mecanismo de fosforilación que depende de una proteína calcio-dependiente. En la molécula de lipocortina hay dos lugares de fosforilación. Tanto la tirosinkinasa como la proteinkinasa C han demostrado fosforilar a la lipocortina in vitro. Se ha sugerido que la lipocortina I podría actuar como “freno” de la fosfolipasa A 2 en las células inflamatorias, haciendo que las células permanezcan en reposo y previniendo la formación de sistemas mediadores inflamatorios más poderosos

Introducción

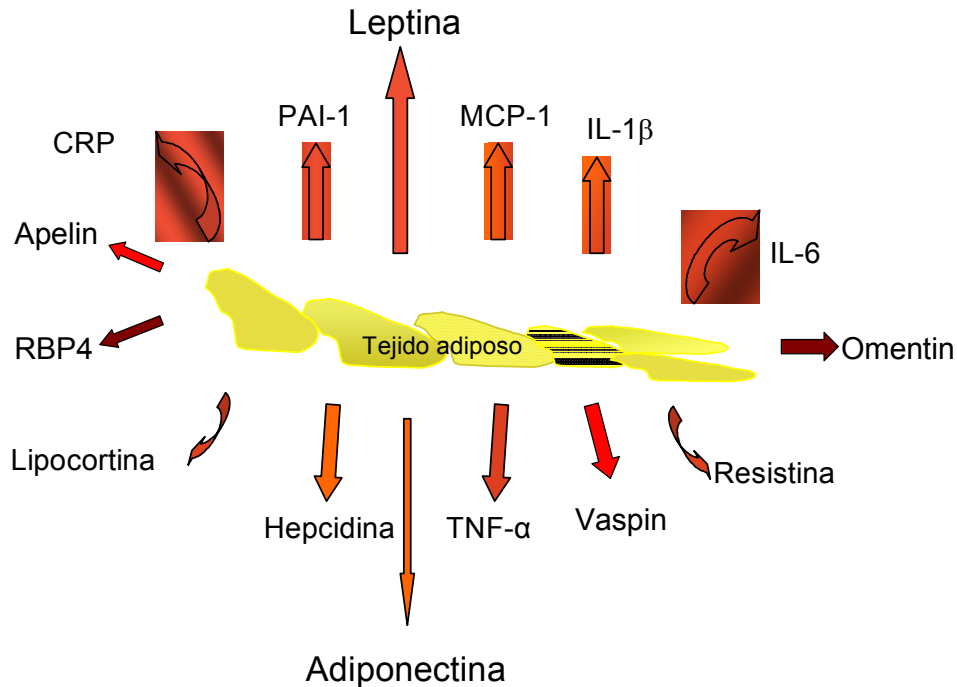
derivados de los fosfolípidos. Cuando la célula se activa durante la respuesta inflamatoria, la lipocortina es fosforilada, por lo que el freno desaparece.

Como otros miembros de la familia de las anexinas, se encuentra en tejido adiposo y hay evidencias de que en la fracción de estroma vascular (SVF) contribuiría a la diferenciación de los preadipocitos a adipocitos (MacDougald OA, 2002). Los ratones ANXA 1-null (carentes de lipocortina) son resistentes a las acciones antiinflamatorias de los glucocorticoides (Hannon R, 2003) y tienen niveles elevados de insulina pero no de glucosa (Warne JP, 2006), por lo que su ausencia o disminución podrían estar asociadas a RI.

La cantidad de hormonas secretadas por el adipocito continúa aumentando constantemente, aunque las acciones de muchas de ellas aún no están bien definidas (de Luis DA, 2008; Tan BK, 2008). En la figura 8 se concentran las adipoquinas más estudiadas.

Introducción

Figura 8. Adipoquinas más estudiadas.



CRP: proteína C reactiva; IL: interleuquina; MCP-1: proteína quimioatrayente de macrófagos y monocitos; PAI-1: inhibidor tipo 1 del activador de plasminógeno; RBP4: *retinol-binding protein 4*; TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa.

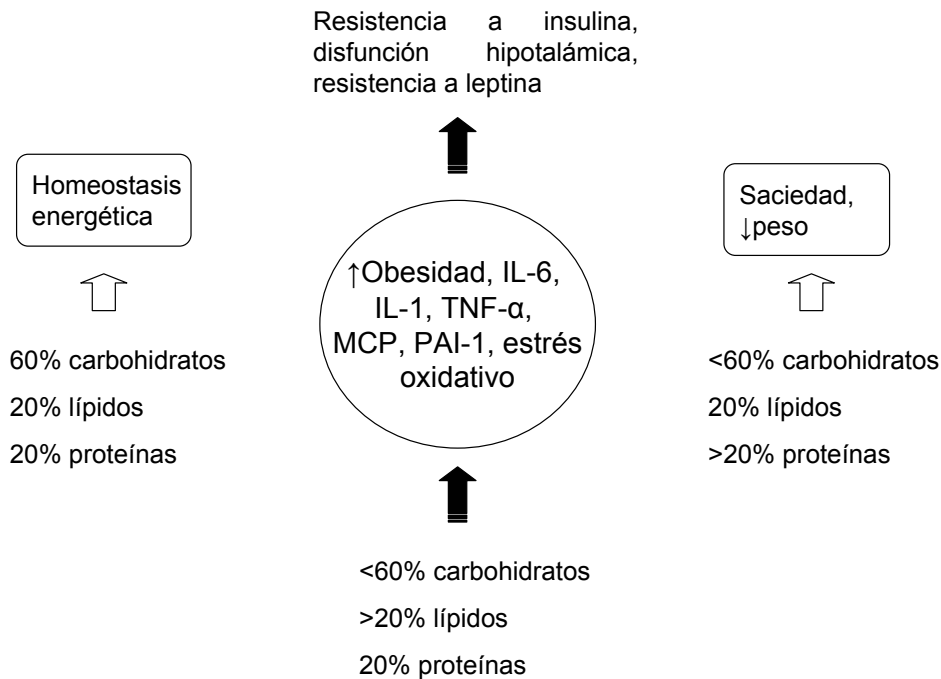
1.6. Dieta y metabolismo

Ante las diversas proporciones de los nutrientes en la dieta predominan diferentes vías metabólicas, cuyos productos finales repercuten tanto a nivel periférico como central. Generalmente se aconseja que los lípidos en la dieta aporten entre el 25 al 35% de las calorías diarias (limitando las grasas saturadas), los carbohidratos el 60% (limitando los azúcares refinados) y las proteínas el 20% (*Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*, 2003; Gidding SS, 2005). La modificación de la proporción de los macronutrientes en la alimentación tiene diversos efectos (Figura 9), por ejemplo, una dieta alta en proteínas y baja en carbohidratos produce disminución de la

Introducción

ingesta de calorías, y tiene efectos benéficos sobre el peso y la glucemia aunque no se conoce del todo la explicación a este evento, además la adherencia de los pacientes a largo plazo usualmente es pobre (Boden G, 2005).

Figura 9. Proporción de macronutrientes en la dieta y principales efectos.



IL-1: interleuquina 1; IL-6: interleuquina 6; MCP: proteína quimioatrayente de monocitos; PAI-1: inhibidor tipo 1 del activador del plasminógeno; TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa.

Carbohidratos

Una dieta alta en carbohidratos en ratas neonatales induce inmediatamente hiperinsulinemia, la cual persiste en animales adultos sin ningún otro estímulo agregado. Más aún, la impronta metabólica una vez establecida forma un círculo vicioso porque las madres transmiten el fenotipo alto en carbohidratos a su progenie (Srinivasan M, 2003). Por el contrario, hay evidencia que indica que una dieta baja en carbohidratos puede ser igualmente o más efectiva que una dieta baja en grasa para lograr una pérdida ponderal a corto plazo (Meckling KA, 2004; Lecheminant JD, 2008). Más aún, al comparar una dieta

Introducción

baja en carbohidratos vs una dieta baja en grasa, los niveles séricos de insulina disminuyen en el primer caso mas no en el segundo, y también disminuyen los niveles de triglicéridos, colesterol, HDL y LDL (Samaha FF, 2007), aunque en ambas situaciones disminuye la tensión arterial (Meckling KA, 2004).

Tanto la presencia de carbohidratos como lípidos en el lumen del íleo distal y colon estimulan la secreción de péptido YY₃₋₃₆ (PYY₃₋₃₆) (Adrian TE, 1987), miembro de la familia del péptido NPY, producido por las células enteroendocrinas (Lundberg JM, 1982), constituyéndose como una señal de *feedback* del intestino al hipotálamo, donde a su vez, el sistema de melanocortina, AgRP y hormona melanocito estimulante alfa (α -MSH) interviene en la homeostasis periférica de la glucosa (Obici S, 2001). Además, NPY interviene tanto en el metabolismo periférico de la glucosa como de lípidos (Zarjevski N, 1994).

A nivel experimental en animales, los ratones knockout ChREBP (*Carbohydrate Response Element-Binding Protein*), factor de transcripción que regula el metabolismo de carbohidratos en el hígado (Yamashita H, 2001), son intolerantes a la glucosa, insulino resistentes y tienen tasas disminuidas de glicólisis y lipogénesis; esto da lugar a alto contenido del glucógeno en hígado, bajos niveles de FFA en plasma y escaso tejido adiposo (Iizuka K, 2004).

Lípidos

Con una dieta alta en grasa los péptidos orexigénicos GAL y OXs son sobrerregulados a nivel central (Wortley KE, 2003; Chang GQ, 2004). La hiperlipidemia en ratones parece mediar una respuesta inflamatoria a través de la misma cascada por la que los lipopolisacáridos activan el sistema inmune (Bjorkbacka H, 2004), y los FFAs, probablemente a través de la PK-C, pueden activar IKK y kinasa c-Jun N-terminal (JNK) (Gao Z, 2004). En caso contrario, durante períodos de demanda energética, los

Introducción

triglicéridos pueden ser movilizados rápidamente por la acción hidrolítica de lipasas, liberando FFA que se oxidan para suplir los requerimientos energéticos del organismo. Por otra parte, el estrés oxidativo, estrechamente asociado con obesidad, hiperglicemia, y FFAs, no sólo conduce a disfunción mitocondrial sino que también puede inducir factores de transcripción redox-sensibles (NF- κ B y AP-1) implicados en la respuesta inmune innata; de hecho, la disrupción genética de estas vías mejora la RI (Hirosumi J, 2002).

Por lo antes dicho, el estrés oxidativo podría ser la causa que lleva a un estado proinflamatorio (Dandona P, 2001; Trayhurn P, 2004) ya que las especies reactivas de oxígeno dañan el ADN, lípidos, y proteínas, conduciendo a una disrupción en la homeostasis celular y a una acumulación de moléculas defectuosas, promoviendo la apoptosis, envejecimiento, y disfunción inflamatoria y degenerativa (Kohen R, 2002; Milagro FI, 2006). Por el contrario, la inhibición de la oxidación lipídica en el hipotálamo es suficiente para restaurar la sensibilidad a lípidos y suprimir la ingesta y la producción hepática de glucosa (Pocai A, 2006).

Vía lipogénica

El clivaje proteolítico intracelular de la proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides (SREBP) en la membrana del retículo endoplásmico y la subsecuente traslocación de la forma activa al núcleo lleva a la transcripción de genes lipogénicos (Horton JD, 2002). La forma predominante en roedores y humanos es SREBP-1c y une el elemento regulador esteroide (SRE) en los promotores génicos de diversas enzimas involucradas en lipogénesis, tales como ACC y FAS (Jump DB, 2004). Los estudios en ratones transgénicos sugieren que SREBP-1c está involucrado en la síntesis de ácidos grasos y metabolismo de glucosa inducido por insulina (particularmente lipogénesis) (Horton JD, 1998; Horton JD, 2002); a su vez se ha demostrado que se expresa en etapas tempranas de la diferenciación adipocitaria (Kim JB, 1996).

Introducción

El gen 1 inducido por insulina (INSIG-1), clonado por Peng et al. (Peng Y, 1997), se une al SREBP *cleavage activation protein* (SCAP) que impide la activación de SREBP, limitando entonces vías lipogénicas y de diferenciación adipocitaria. Por otra parte, se ha descrito que el ARNm de INSIG-1 aumenta con HF y disminuye en condiciones de restricción dietética (Li J, 2003).

Proteínas

De los principales macronutrientes, se considera que las proteínas son un inhibidor muy fuerte de la ingesta en los omnívoros y tienen el mayor efecto supresor del apetito (Bensaid A, 2002; Boden G, 2005). De hecho, al aumentar el porcentaje proteico de la dieta de 14 a 50% disminuye la ingesta en ratas con dieta ad libitum, y este efecto parece ser más de un refuerzo de la saciedad que a una aversión a la comida (Jean C, 2001). En humanos, en caso de estabilidad ponderal, una ingesta aumentada de proteínas se asocia a menores cifras de tensión arterial, y en pacientes diabéticos se asocia con disminución de la hemoglobina glucosilada (Clifton PM, 2007).

Se piensa que las proteínas de la dieta son monitorizadas en el hipotálamo, NTS (Näslund E, 2007) y la corteza piriforme anterior, regiones que controlan la ingesta (Olszewski PK, 2003), debido a que en estas mismas estructuras se inicia la saciedad, las proteínas pueden desencadenar el inicio de esta señal (Petrovich GD, 2002). El *mammalian target of rapamycin* (mTOR), integra diferentes señales que regulan la síntesis proteica y se ha implicado recientemente en el hipotálamo como punto clave en la regulación de la ingesta y peso corporal (Cota D, 2006; Woods SC, 2008).

En este sentido se ha demostrado que la dieta rica en proteínas induce cambios en varias zonas del SNC tales como en el NTS, la amígdala y el VMH. Considerando las características funcionales de estas áreas se ha sugerido: 1) la implicación del nervio vago en la transmisión de la información relacionada con la cantidad de proteínas

Introducción

ingeridas (Darcel N, 2005), 2) la implicación del PP pues su liberación es baja durante el ayuno y se incrementa durante todas las fases de la digestión (Konturek SJ, 1982). De este último, el principal estímulo de su secreción es la ingesta de proteínas y grasas, demostrándose que también es liberado por la acción de otras hormonas tales como ghrelin, motilina y secretina e inhibido por la somatostatina.

1.6.1. Péptidos gastrointestinales en el metabolismo energético

Cada vez se tiene más información acerca de la interacción entre el SNC y el tracto gastrointestinal (TGI), lo cual incluye a los péptidos liberados en éste último (Mendieta-Zerón H, 2008b). El TGI recibe una inervación dual, de la división parasimpática incluyendo los nervios vago y pélvico, y de la división simpática (Konturek SJ, 2004; Badman MK, 2005). Además, el TGI tiene su propia inervación, llamado sistema nervioso entérico (SNE) (Konturek SJ, 2004; Badman MK, 2005).

El SNE tiene dos componentes principales, el plexo submucoso y el mientérico. El primero está más involucrado en las respuestas a nutrientes, mientras que el segundo está más relacionado con los patrones de motilidad intestinal (Thompson DG, 2006).

El SNE, interconectado con el nervio vago y el sistema nervioso simpático, transmite información al SNC de los estímulos mecánicos (distensión, contracción), químicos (presencia de nutrientes en el lumen intestinal) y neurohumorales (hormonas intestinales, neurotransmisores y neuromoduladores) (Langley K, 1994; Konturek SJ, 2004).

La principal vía por la cual los contenidos intestinales interactúan con el SNC es a través de moléculas señalizadoras (péptidos y aminas) de las células enteroendócrinas de la mucosa intestinal. En la submucosa, donde se liberan estas sustancias, interactúan con las fibras nerviosas parasimpáticas terminales, y a través de estas llegan las señales al SNC.

Introducción

Algunas señales intestinales se transmiten del SNE a centros neurales superiores, como los núcleos PVH y ARC y el tálamo ventral (Berthoud HR, 1990). La integración de todas estas señales aferentes regula la cantidad y calidad de ingesta (Konturek SJ, 2004; Badman MK, 2005).

1.6.1.1. Ghrelin

Este péptido de 28 aminoácidos se produce principalmente en las células oxínticas del fondo gástrico y es la hormona periférica más importante en la estimulación del apetito. Ghrelin actúa sobre NPY en el hipotálamo (Kojima M, 1999; Seoane LM, 2003), además actúa sobre AgRP y neuronas productoras de somatostatina (Gracia-Navarro F, 2002; Seoane LM, 2003). En relación con sus acciones centrales, está documentado que estimula la expresión del factor de transcripción Pit-1 con crucial importancia para la diferenciación y proliferación de células somatotropas (García A, 2001), por lo que ghrelin podría desempeñar algún papel importante en la fisiología y fisiopatología de las células somatotropas (Gualillo O, 2003).

Debido a que es un ligando endógeno para el receptor secretagogo de la hormona de crecimiento (GHS-R) (Date Y, 2000), se ha descrito que el test de provocación de ghrelin+GHRH es un poderoso test diagnóstico de deficiencia de GH en adultos (Popovic V, 2000).

Las concentraciones de ghrelin se incrementan inmediatamente antes de comer y disminuyen en el postprandio (Cummings DE, 2001; Casanueva FF, 2002; Gualillo O, 2002; Seoane LM, 2007). Se le considera como un eslabón endocrino entre el estómago y el SNC involucrado en la regulación de la liberación de GH y el aporte de energía (Kojima, 1999; Date Y, 2000); de hecho influye en la liberación de GH en respuesta a cambios del estado nutricional (Inui A, 2004; Korbonits M, 2004; Lely AJ, 2004).

Introducción

Esta hormona también está involucrada en la regulación a largo plazo del peso corporal al inducir adiposidad (De Vriese C, 2007), aunque en personas con peso estable, los niveles circulantes de ghrelin se correlacionan negativamente con el IMC en un amplio rango (Tschop M, 2001; Shiiya T, 2002). En caso de llevar una dieta para bajar de peso, los niveles de ghrelin se incrementan (Cummings DE, 2002a), lo que podría explicar la recuperación ponderal a mediano plazo con este manejo médico. Por otra parte, los niveles de ghrelin se encuentran elevados en caso del síndrome de Prader Willi (Cummings DE, 2002b) que se caracteriza por obesidad extrema. Entre los mecanismos que se han propuesto para explicar la respuesta de ghrelin relacionada a los nutrientes están los mecanismos gastrointestinales (Le Roux C, 2005) y se ha propuesto recientemente que la fase cefálica mediada vagalmente juega un rol muy importante en iniciar la disminución postprandial de los niveles de ghrelin (Arosio M, 2004).

Los niveles de ghrelin persistentemente elevados podrían actuar como una señal de insuficiencia energética y operar como un modificador negativo clave de los mecanismos reproductores, tales como la gestación e inicio de pubertad (Fernández-Fernández R, 2005) y función testicular (Tena-Sampere, 2002). En un estudio en mujeres con síndrome de ovarios poliquísticos se ha demostrado que la hiperinsulinemia aguda, en contraste con la hiperinsulinemia crónica, reduce los niveles de ghrelin independientemente del grado de resistencia a insulina (Micic D, 2007).

Esta hormona ha servido para ejemplificar enfermedades con balance energético negativo (Popovic V, 2004), y por ser un péptido orexigénico se ha tratado de aplicar en la clínica con resultados dispares (Miljic D, 2006; Akamizu T, 2008). Finalmente, en ratas, al vacunar con inmunocóncavos de ghrelin se consiguió menos ganancia ponderal y reducción del tejido adiposo (Zorrilla EP, 2008).

Introducción

1.6.1.2. Péptido YY

El PYY es una hormona gastrointestinal de 36 aa aislada del intestino del cerdo por Tatemoto en 1980 (Tatemoto K, 1980), perteneciente a la familia del polipéptido pancreático (PP) y NPY. Es secretada por las células L del intestino (localizadas fundamentalmente en el intestino distal), páncreas y cerebro. Existen dos formas endógenas, la 1-36 y la 3-36, siendo la primera la más activa que se liga a receptores específicos de los que se han descrito 3 tipos (Y1, Y2, Y5), y de los que el Y2 es el más selectivo. En ayuno predomina la forma 1-36 mientras que después de una comida la mayor forma circulante es la 3-36, que aumenta a los 15 minutos, alcanza el pico secretor a los 90 y permanece elevada hasta 6 horas, reflejando el tamaño de la comida y su naturaleza pues la grasa es el secretagogo fundamental (Fu-Cheng X, 1995). Además, inhibe la secreción gástrica estimulada, la secreción pancreática exocrina, regula la secreción vegetativa de insulina y enlentece el vaciamiento gástrico (Batterham RL, 2003a).

PYY₃₋₃₆ reduce la ingesta, por lo menos en parte, a partir de la hiperpolarización de neuronas NPY/AgRP y la desinhibición subsecuente de neuronas POMC (Batterham RL, 2002). El receptor Y2, acoplado a proteínas G, se localiza en los núcleos ARC, preóptico, y DMN del hipotálamo, habiéndose descrito además en el hipotálamo posterior, núcleo medial de la amígdala, área parabranchial, sustancia nigra, PVN talámico, núcleo reticular posterior y NTS. En el ARC más del 80% de las neuronas de NPY coexpresan el ARNm del receptor Y2 lo que sugiere que éste receptor es un autoreceptor presináptico que regula la liberación de NPY.

La inyección de agonistas PYY en el ARC de ratas en el inicio de la fase oscura produce una reducción de la ingesta que persiste durante 8 horas, habiéndose demostrado que reduce la liberación de NPY e incrementa la de α -MSH a partir de POMC. De esta forma,

Introducción

tras ser liberado después de la ingesta, PYY disminuye la cantidad de comida ingerida de forma crónica y el peso corporal. La administración periférica de PYY₃₋₃₆ en ratones tiene un efecto supresor de la ingesta que puede durar hasta 24 h (Challis BG, 2004). En humanos, la inyección de PYY₃₋₃₆ disminuye en un 36% el volumen ingerido de forma inmediata y un 33% el volumen total de 24 h por lo que es considerado como el principal regulador de la ingesta en periodos de tiempo intermedios (Degen L, 2005; Sloth B, 2007). En los sujetos obesos el PYY reduce la ingesta en un 30%, reduce significativamente la secreción de ghrelin, sus concentraciones basales y estimuladas son significativamente menores que en los controles no obesos (por lo que no puede aceptarse que exista una resistencia como ocurre con la leptina) y se correlaciona negativamente con el IMC (Batterham RL, 2003b).

1.7. Genes de hipoxia

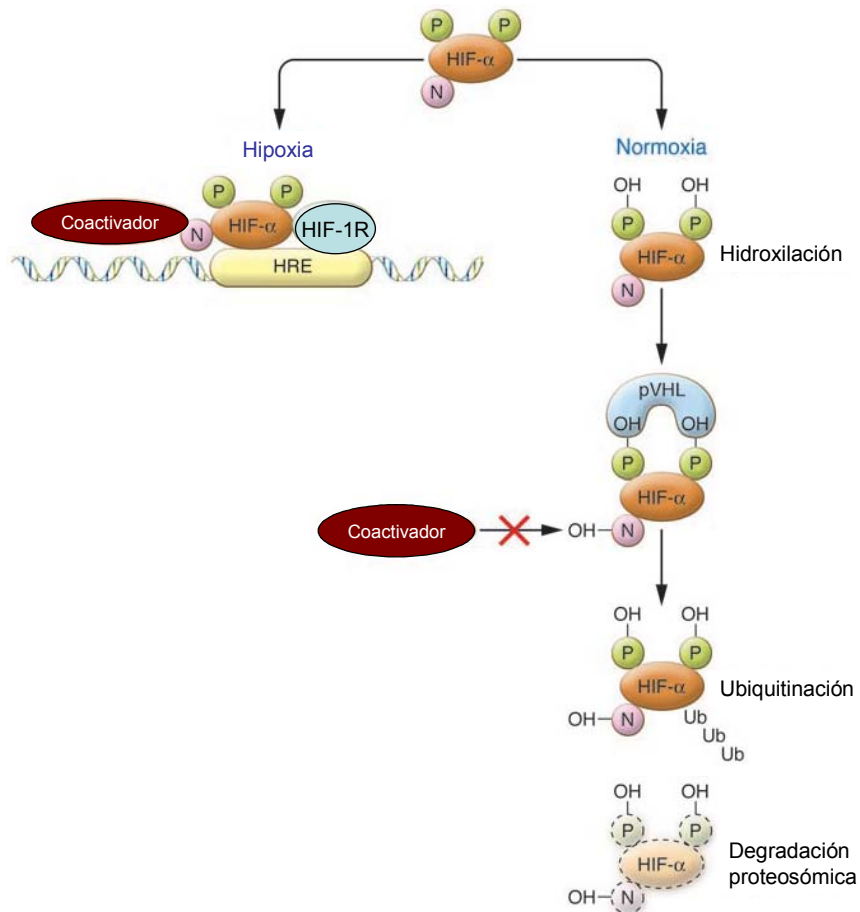
En 1992 se descubrió el “factor inducible por la hipoxia-1” (*Hypoxia Inducible Factor*, HIF-1) (Semenza GL, 1992). HIF es un heterodímero consistente de la subunidad regulada por O₂, y el receptor aril hidrocarbon de translocación nuclear con expresión constitutiva HIF-1 α . En condiciones de hipoxia, HIF-1R es estable, se acumula y migra al núcleo donde se une a HIF-1 α para formar el complejo (HIF-1R + HIF-1 α). La transcripción se inicia por la unión del complejo (HIF-1R + HIF-1 α) a los elementos de respuesta de hipoxia (HREs) (Losso JN, 2005) (Figura 10).

En una situación de normoxia, la HIF-1 α se degrada por hidroxilación y es destruida, mientras que en caso de hipoxia, la HIF-1 α no se degrada y aumentan sus niveles. HIF-1 actúa como regulador principal en la expresión de diferentes genes regulados por el oxígeno, entre los cuales están: eritropoyetina, transferrina, factor de crecimiento del

Introducción

endotelio vascular, eNOS, ET-1, transportador de glucosa 1, factor de crecimiento tipo 2 semejante a insulina, proteínas transportadoras 1 y 3 del factor de crecimiento semejante a insulina, etc.

Figura 10. HIF en condiciones de hipoxia y normoxia.²



HIF: factor inducible por hipoxia; HRE: elemento de respuesta a hipoxia; pVHL: proteína von Hippel-Lindau.

La eNOS y la heme oxigenasa-1 (HO-1) son genes con acciones presuntamente antiinflamatorias, cruciales para la protección de la vasculatura. Los ratones mutantes eNOS-nulos (eNOS^{-/-}) tienen una biogénesis y función mitocondrial disminuidas (Nisoli E,

² Figura modificada de: Ratcliffe PJ. HIF-1 and HIF-2: working alone or together in hypoxia? J. Clin. Invest. 2007;117:862-5.

Introducción

2003; Nisoli E, 2004), con acumulación de grasa abdominal y aumento de peso corporal en comparación con ratones *wild-type* (Nisoli E, 2003), estos efectos también se observan en modelos de DIO en rata (Valerio A, 2006).

La acción del gen HO-1, que codifica una enzima microsomal (Maines MD, 1997), es degradar heme a monóxido de carbono (CO), hierro y biliverdina (Tenhunen R, 1968). Recientemente se ha demostrado que diversos fármacos, tales como aspirina, rapamicina y probucol estimulan de manera efectiva la expresión de dicho gen.

Por lo anterior, se ve que la hipoxia es un modulador de la expresión génica, y sus efectos sobre la expresión de genes protectores, tales como HIF-1 y 2, eNOS ó HO-1 podrían ser agregados a los cambios patológicos en enfermedades cardiovasculares. No obstante, aún existen datos limitados de estos genes en las células endoteliales microvasculares del ser humano y los efectos de las estatinas sobre la regulación de su expresión (Loboda A, 2006).

1.8. Cirugía bariátrica

La cirugía bariátrica (CxB) empezó a desarrollarse como alternativa para perder peso en 1954 (Greenway FL, 1996) y en 1991, en el un consenso de los Institutos Nacional de Salud de Estados Unidos, se aceptó que era el tratamiento más efectivo para la obesidad mórbida (NIH, 1991). Existen varios tipos de técnicas (Figura 11) que se agrupan en tres grupos:

A) Técnicas restrictivas

– Gastroplastias: el objetivo es lograr una sensación de plenitud y saciedad con ingestas pequeñas con lo que se disminuye el aporte calórico. Se reduce el tamaño del estómago mediante la formación de un pequeño reservorio adyacente al cardias y comunicado por

Introducción

un pequeño orificio que permite un lento vaciado. No interfieren con la absorción intestinal. La más practicada es la vertical anillada, modificada posteriormente por Mason, dando lugar a la gastroplastia vertical en banda (Mason EE, 1982).

– Bandeleta gástrica hinchable: técnica restrictiva horizontal. Consiste en una bandeleta de silicona en situación subcardial, que provoca un estrechamiento gástrico creando una pequeña bolsa y un pequeño orificio de salida, añadida a una porción ajustable.

B) Técnicas malabsortivas

Actualmente este tipo de técnicas no deben emplearse y le han eliminado de todos los protocolos de CxB debido a sus graves efectos secundarios asociados (Moreno Esteban B, 2004).

C) Técnicas mixtas

– Bypass gástrico: Consiste en crear una pequeña cámara gástrica, a la que se conecta la parte distal del yeyuno, y una yeyuno-yeyunostomía a 50-150 cm de la unión gastroyeyunal. En la mayoría de los casos se consigue una disminución del 60-70% del exceso de peso (Sugerman HJ, 1992). Los efectos secundarios más importantes son los vómitos y el déficit de vitamina B12 con una mortalidad quirúrgica del 0-1,5% (Poitou Bernert C, 2007).

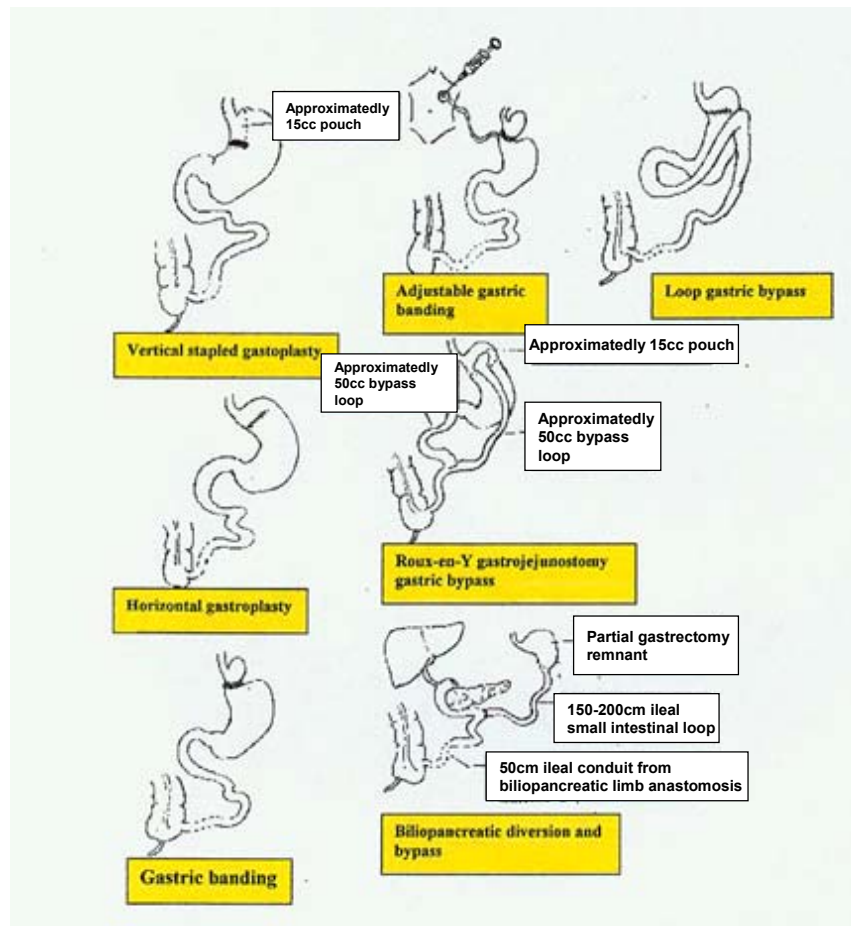
– Derivación biliopancreática: el componente malabsortivo es mayor. Consiste en una gastrectomía con anastomosis gastrointestinal en Y de Roux (RYGB) y una derivación biliodigestiva formando un canal alimentario común a 50-75 cm de la válvula ileocecal (Scopinaro N, 1979). En una serie de más de 2000 pacientes intervenidos se observó una media de pérdida del 75% del exceso de peso con una mortalidad quirúrgica del 0,5% (Van Hee RH, 2005). En la serie de Larrad se observaron resultados similares, en cuanto a pérdida de peso, sin aparición de malnutrición calórica en ninguno de los operados a los

Introducción

5 años (Larrad-Jiménez A, 1999). De todas formas se trata de una técnica complicada para aquellos grupos que carezcan de experiencia suficiente. Esta técnica también reduce los principales factores de riesgo metabólico y cardiovascular, incluyendo DM2 y dislipidemia (Buchwald H, 2004; Sjostrom L, 2004)

– Cruce duodenal: es semejante a la descrita por Scopinaro (Scopinaro N, 1979) excepto en que sustituye la gastrectomía distal por la longitudinal, mantiene la inervación gástrica y la función pilórica íntegra, conservando las mismas distancias del canal alimentario y aumentando el canal común (Marceau P, 1993).

Figura 11. Técnicas quirúrgicas bariátricas.³



³ Reproducido con permiso de [eMedicine.com, 2007](http://www.emedicine.com/med/topic1653.htm). Disponible en: <http://www.emedicine.com/med/topic1653.htm>.

Introducción

La gran diversidad de modificaciones en los tres grupos principales de técnicas quirúrgicas (restrictivas, hipoabsortivas y mixtas) demuestra que no hay un adecuado fundamento fisiopatológico que permita diseñar la que se podría considerar más adecuada. Y ello muy probablemente se debe, por una parte, a las dificultades impuestas por la compleja etiopatogenia de la enfermedad y, por otra, a que los escasos modelos experimentales existentes (Sabench F, 2004), se han centrado más en el desarrollo y la resolución de problemas de técnica quirúrgica que en el análisis de los mecanismos fisiopatológicos (cerebrales, intestinales, tisulares y endocrinológicos) implicados en la pérdida de peso, en el mantenimiento del peso perdido o en la recuperación ponderal (Greenway FL, 2004).

Ante la imparable pandemia de obesidad, incluyendo a la obesidad mórbida, se hace imprescindible profundizar en la investigación de esta cirugía, así como precisar sus indicaciones y mejorar su manejo de manera multidisciplinaria (Burguera B, 2007). Con esta finalidad, nuestro grupo manejó en rata la técnica de Larrad (Larrad-Jiménez A, 2008b), consistente en gastrectomía subcardinal, asa biliopancreática corta (a 5 cm de distancia del ángulo de Treitz) y conducto común corto (a 5 cm del colon) (Figuras 12 y 13).⁴

Figura 12. Puntos de corte.

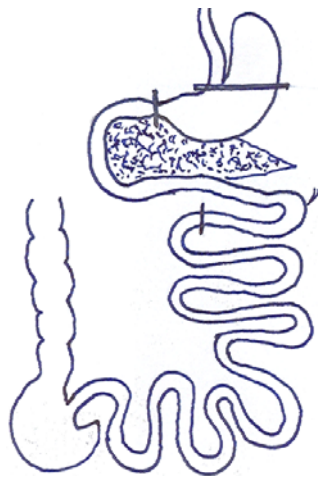
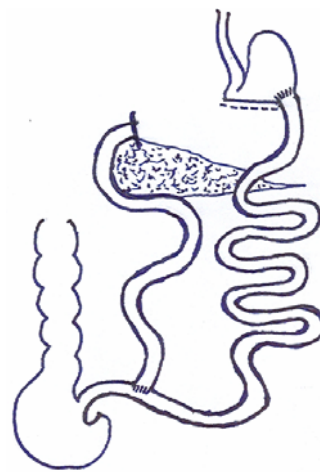


Figura 13. Anastomosis.



⁴ Figuras elaboradas por el Dr. Álvaro Larrad Jiménez.

Introducción

El abordaje laparoscópico de las técnicas de CxB está aumentando en porcentaje, incluida la RYGB (Wittgrove AC, 1994). Un aspecto importante a tomar en consideración con la cirugía bariátrica son las complicaciones de la intervención tales como falla anastomótica, tromboembolismo, adherencias, constricción, hernias, úlceras, colelitiasis, hemorragia, así como desequilibrios metabólicos y nutricionales (Herrod DM, 2006). Siendo las deficiencias más comunes posterior a la CxB las de proteínas, hierro, folato, calcio, vitaminas B12, A, D, E y K, y otros micronutrientes (Bloomberg RD, 2004). Por el contrario, y en punto opuesto, es conocido el efecto de la CxB en la reducción de HTA (Cowan GJ, 1998) y DM2 (Perry CD, 2008), y que hasta el 85% de los pacientes con síndrome de apnea obstructiva del sueño dejan de necesitar soporte ventilatorio nocturno (Valencia Flores M, 2004), sin entenderse aún el mecanismo de estos fenómenos.

En un seguimientos a largo plazo hay divergencia de opinión en cuanto a mortalidad de pacientes sometidos a cirugía bariátrica vs obesos controles por causas metabólicas y cardiovasculares (Adams TD, 2007).

Introducción

2. OBJETIVOS

Objetivos

Objetivos

- Estudiar los efectos del modelo de diferente nutrición neonatal y dietas de diferente porcentaje de grasa en rata, sobre los mecanismos de control de la homeostasis energética.
- Estudiar los efectos de la técnica de cirugía bariátrica consistente en derivación biliopancreática + gastrectomía con anastomosis gastrointestinal en Y de Roux, en un modelo en rata, sobre la homeostasis energética.

Objetivos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y métodos

Materiales y métodos

3.1. Animales de experimentación

Se utilizaron ratas de la raza Sprague-Dawley, procedentes del animalario General de la Universidad de Santiago de Compostela (USC). Los animales, una vez que llegaron a nuestro laboratorio, se estabularon a temperatura constante y fueron sometidos a un período de luz y oscuridad de 12 h (8:00 – 20:00); con libre acceso a comida y bebida.

3.2. Modelo de nutrición neonatal

En las primeras 48 h de vida, las crías de varias madres de ratas Sprague-Dawley fueron mezcladas al azar y divididas en dos grupos: 1) camadas pequeñas (SL, 4 crías, sobrealimentación neonatal) y 2) camadas normales (NL, 12 crías, tasa de ingesta normal) (Plagemann A, 1992; Heidel E, 1999; López M, 2005a; López M, 2007b). Al cumplirse el día 24 un lote de cada grupo fue sacrificado y diseccionado.

3.3. Modelo de dieta alta/baja en grasa

Se separaron a las crías de 24 días en grupos de alimentación con dieta de alto contenido graso [*High Fat Diet* (HF), 45 kcal % grasa, 35 kcal % carbohidratos y 20 kcal % proteínas; 4.73 kcal/g], y bajo contenido graso [*Low Fat Diet* (LF), 10 kcal % de grasa, 70 kcal % carbohidratos y 20 kcal % proteínas; 3.85 kcal/g] (*Diet Research, N.Y., USA.*), continuando su desarrollo hasta el día 90, momento en el que fueron sacrificados y diseccionados.

Otro lote de animales, a partir de los 90 días, se cambió a dieta normal *Panlab A04* (proteína bruta: 15,4%, materias grasas brutas: 2,9 %, celulosa bruta: 4,1%, cenizas brutas: 5,9%) hasta los 122 días.

Materiales y métodos

Durante los experimentos, se registró la evolución de la masa corporal de las ratas cada 72 h.

Al final de período de cada estudio, los animales se sometieron a eutanasia por decapitación obteniendo sangre troncal que fue separada en suero y plasma, y a continuación fueron diseccionados. Los tejidos una vez extraídos se congelaron en un recipiente aislante con nitrógeno líquido y los cerebros en hielo seco. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento.

3.4. Modelo de cirugía bariátrica

Ratas macho Sprague-Dawley de entre 450 y 500 g (entre 64 y 80 días de edad), fueron aclimatadas antes de la cirugía en periodos de 12 h de luz-oscuridad a 22°C . Se hicieron dos protocolos: 1) bypass biliopancreático + gastrectomía con anastomosis gastrointestinal en Y de Roux (BPBP-RYGB) vs Sham (control) y 2) BPBP-RYGB versus Pairfed (PF). En ambos casos se cuantificaron masa e ingesta diariamente. La técnica fue la siguiente:

- Las ratas se alimentaron con dieta normal y agua ad libitum, registrándose masa e ingesta tres días antes de la cirugía. Después de un período de ayuno de 12 h en jaula metabólica fueron anestesiadas con una mezcla de ketamina (*Imalgène 1000, Merial*) + xilazina (*Rompún®, Bayer Lever Kusen, RFA, 2 mg/ml*), (200 mg:5 mg, 200 μl por 100 g, intraperitonealmente),⁵ considerándose una anestesia de grado II-III para un período aproximado de una hora y media.
- El abdomen fue rasurado y se hizo una incisión vertical en epigastrio de 3 cm.

⁵ Para la ketamina, presentación de 500 se mezclan 8.5 ml + 4 ml de xilazina + 7.5 ml de solución salina al 0.9%.

Materiales y métodos

- Cortamos el íleon con tijeras Metzenbaum a una distancia de 5-6 cm debajo del ligamento de Treitz.
- La parte proximal del yeyuno antes cortado se unió al íleon a 4-5 cm del ciego con sutura 8-0 de polyglactina (*Ethicon*).
- Excluimos el duodeno con grapas de Auto Suture, Premium Surgiclip S-9.0 (Tyco, USA).
- Hicimos la resección gástrica con Auto Suture, Multifire Endo Gia*30 y la gastroyeyunostomía con sutura 5-0 de polyglactina (*Ethicon*) entre la parte distal del yeyuno cortado y un corte gástrico de 3-4 mm.
- Se suturó piel y tejido subcutáneo con seda 2-0.
- Después de la intervención las ratas fueron colocadas en una caja con serrín para evitar pérdida de calor e hipotermia y al despertar fueron devueltas a sus cajas metabólicas. Como antibioticoterapia preventiva se administró enrofloxacin (*Baytril*, Bayer) y para el dolor se administró buprenorfina cada 8 h prn. Dependiendo del estado de hidratación se inyectaron 20 a 30 ml de solución salina 0.9% intraperitonealmente cada 8 h.
- Se permitió que las ratas bebieran solución salina 0.9% y sol gluc al 5% y después de 5 días reiniciaron la dieta normal.

En el momento de la cirugía se obtuvieron muestras de duodeno, íleon terminal así como el estómago resecado que al igual que las muestras del final del período de seguimiento (asa anastomótica yeyuno-gástrica, yeyuno-ileal, duodeno, yeyuno proximal e íleon terminal) fueron fijados primero en formaldehído al 3.6% durante 24 h y después en alcohol al 70% hasta su análisis histológico en la Universidad de Navarra, (Pamplona, España). La sangre troncal se separó en suero y plasma.

Materiales y métodos

Todos los protocolos de manipulación animal fueron aprobados por el Comité Ético de la USC, cumpliendo las normas de Cuidado de Animales de Laboratorio y la Ley Internacional de Experimentación Animal.

3.5. Radioinmunoensayos

Por medio de radioinmunoanálisis (RIA) se midieron adiponectina, ghrelin, leptina e insulina.⁶ En todos estos casos las mediciones se hicieron por duplicado.

RIA de adiponectina

El kit comercial (*Linco Research, Inc. USA*) es capaz de reconocer tanto la forma de longitud completa (*full-length*) como la globular. Los reactivos utilizados fueron los siguientes:

- Hormona estándar (hormona fría): adiponectina de ratón.
- Curva estándar de ocho puntos: 0.78 ng/ml a 100 ng/ml (0.78, 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100).
- Hormona marcada, adiponectina-I¹²⁵.
- Primer anticuerpo: policlonal anti-adiponectina obtenido de conejo.
- Tampón de ensayo: 10 mM buffer fosfato pH 7.6, 0.08% azida sódica, 0.1% *bovine serum albumin* (BSA, *Sigma Aldrich*) Ria Grade.
- Suero normal de conejo.
- Agente precipitante: suero anti-conejo IgG (cabra), 3% PEG, 0.025 M ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, *Sigma Aldrich*), 0.05% Triton X-100 en 0.05 M fosfosalino.

⁶ Procedimiento optimizado por la Dra. Sulay Tovar y Dña. María Jesús Vázquez.

Materiales y métodos

- Se hicieron diluciones 1:500 (plasma:tampón de ensayo), de las cuales se cogieron 100 µl para cada punto por duplicado. Se añadió la hormona marcada, se mezcló por agitación y a continuación se añadió el primer anticuerpo. Las muestras se incubaron durante 24 h a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se añadió anticuerpo anti-conejo (obtenido de cabra) y el agente precipitante.
- Se incubó 20 min a 4°C y posteriormente las muestras se centrifugaron 25 min a 3600 rpm (4°C).

RIA de ghrelin

Usamos el kit para ghrelin de *Phoenix Pharmaceuticals*. Se resuspendió el tampón de ensayo con 150 ml de agua destilada para posteriormente utilizarlo como medio de disolución de los demás reactivos:

- Hormona estándar (hormona fría): ghrelin.
- Curva estándar de ocho puntos: 10 pg/ml a 1280 pg/ml (10, 20, 40, 80, 160, 320, 640, 1280).
- Hormona marcada, ghrelin-¹²⁵I.
- Primer anticuerpo: específico para ghrelin obtenido de conejo.
- El anticuerpo secundario que reconoce al anticuerpo primario de conejo.
- Suero normal de conejo.
- Se agitaron las muestras y se dejaron incubar 24 h a 4°C.
- Se añadió a cada uno de los tubos del RIA, el péptido ghrelin marcado radiactivamente, aproximadamente 8000-10000 cpm/cada 100 µl.
- Se agitaron los tubos y se dejaron incubar 24 h a 4°C.
- Se añadieron 100 µl del anticuerpo secundario y 100 µl del suero de conejo.

Materiales y métodos

- Se agitaron los tubos dejándolos posteriormente a temperatura ambiente durante una hora y media. Transcurrido este período de tiempo se añadieron 500 µl del tampón y se centrifugaron a 3000 rpm durante 20 min a 4°C.

RIA de leptina

Los niveles circulantes de leptina se determinaron mediante kit de doble anticuerpo (*Linco Research, Inc. USA*). Los reactivos utilizados fueron los siguientes:

- Hormona estándar (hormona fría).
- Curva estándar de 7 puntos: 0.5 ng/ml a 50 ng/ml (0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50).
- Hormona marcada.
- Primer anticuerpo: policlonal anti-leptina obtenido de cobaya.
- Tampón de ensayo: 0.05 M fosfosalino pH 7.4, 0.025 M EDTA, 0.1 M azida sódica, 0.055 M Triton X-100 y 1% BSA.
- Agente precipitante.
- Se utilizaron 100 µl de cada muestra de suero. Una vez añadido el primer anticuerpo, se mezcló por agitación y las muestras se incubaron durante 12 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se añadió la hormona marcada, se mezcló por agitación y las muestras se incubaron durante 24 h a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se añadió el agente precipitante.
- Se incubó 20 min a 4°C y posteriormente, las muestras se centrifugaron 25 min a 2500 rpm a 4°C.

RIA de insulina

Los niveles circulantes de insulina se determinaron mediante kit de doble anticuerpo (*Linco Research, Inc. USA*). Los reactivos utilizados fueron los siguientes:

- Hormona estándar (hormona fría).

Materiales y métodos

- Curva estándar de 7 puntos: 0.5 ng/ml a 50 ng/ml (0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50).
- Hormona marcada.
- Primer anticuerpo: policlonal anti-insulina obtenido de cobaya.
- Tampón de ensayo: 0.05 M fosfosalino pH 7.4, 0.025 M EDTA, 0.1 M azida sódica, 0.055 M Triton X-100 y 1% BSA.
- Agente precipitante.
- Se utilizaron 100 µl de cada muestra de suero. Una vez añadido el primer anticuerpo, se mezcló por agitación y las muestras se incubaron durante 12 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se añadió la hormona marcada, se mezcló por agitación y las muestras se incubaron durante 24 h a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se añadió el agente precipitante.
- Se incubó 20 min a 4°C y posteriormente, las muestras se centrifugaron 25 min a 2500 rpm a 4°C.

Para cada hormona, después del último paso de centrifugación por 20 min, los tubos se decantaron y la radiactividad del precipitado se midió mediante un contador γ (*Wizard 1470®*, *Wallac*) conectado a un ordenador y que, mediante el programa RIAcalc-LBK, calculó automáticamente las concentraciones de cada hormona.

3.6. Separación de la fracción estroma-vascular (SVF) del tejido adiposo visceral

- Las muestras se cortaron en piezas de 10 a 30 mg y se digirieron en *Hanks Balanced Buffer Solution* (HBBS, *Sigma Aldrich*) suplementado con 5.5 mM glucosa, 5% BSA (*Sigma Aldrich*) y 3 mg/ml de colagenasa tipo I (*Sigma Aldrich*), durante 30 min a 37°C en un baño en agitación.
- La mezcla de la digestión se pasó por un filtro estéril de 180 micras (*Millipore*) y se

Materiales y métodos

centrifugó a 1000 rpm por 10 min.

- Los adipocitos flotaron por gravedad, se recogieron y se lavaron varias veces en HBBS (*Sigma Aldrich*) con BSA (*Sigma Aldrich*) por centrifugación a 700 rpm por 5 min cada una.

- La fracción SVF se encontraba en el pellet, éste se lavó por centrifugación durante 5 min a 600 rpm.

3.7. Extracción de Ácido Ribonucleico (ARN) de la SVF de tejido adiposo visceral y síntesis de Ácido Desoxiribonucleico complementario (ADNc)

Aislamiento de ARN mediante TRizol® LS (*Invitrogen, Carlsbad, CA*)⁷

- Se homogeneizó la fracción SVF mecánicamente con el *Tissue Tearor™* (*Biospec Products, Inc.*), en 350 µl de TRizol® (fenol-cloroformo).

- A cada muestra se añadió cloroformo puro mezclando nuevamente en agitador 5 seg y dejando 3 min a temperatura ambiente.

- Las muestras se centrifugaron 15 min a 12000 rpm a 4°C.

- Se retiró la fase acuosa y se agregó isopropanol, después se agitó y se dejó a -20°C durante 10 min.

- Se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min a 4°C, decantando el sobrenadante, se añadió 1 ml de etanol al 75% y posteriormente se agitó unos segundos.

- Centrifugamos a 12000 rpm durante 5 min a 4°C y una vez decantado el sobrenadante, las muestras se secaron al aire durante 10 min.

- Resuspendimos en H₂O DEPC (agua bidestilada autoclavada con dietilpirocarbonato al 0.1%), y disolvimos el precipitado calentándolo a 65°C durante 5 min.

⁷ (Chomczynski 1993) (fenol-cloroformo). Este reactivo incorpora la mayor parte de componentes del método clásico (guanidín tiocianato y fenol) (Chomczynski & Sacchi 1987) e inhibidores de RNAsas, pero reduce el tiempo de extracción.

Materiales y métodos

Cuantificación

- Determinamos la concentración de ARN de la muestra en un espectrofotómetro ajustado a dos longitudes de onda: 260 y 280 nm. El grado de pureza de la muestra se determinó estudiando el cociente de 260/280, considerándose aceptable una oscilación entre 1.8 y 2.

Reversotranscripción (RT)

La reversotranscripción se llevó a cabo a partir de 2 µg de ARN total. La mezcla de reacción se preparó con las siguientes proporciones:

- 6 µl de tampón de reversotranscripción [*5X first strand buffer*: 250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl, 50 mM DTT, (*Invitrogen*)]
- 1.5 µl MgCl₂ [50 Mm] (*Invitrogen*)
- 0.5 mM de cada dNTP (*Invitrogen*)
- 50 ng de cebadores (*random primers*, *Invitrogen*)
- 10 unidades de inhibidor de RNasa (*RNaseOUT*[®], *Invitrogen*)
- 400 unidades de *M-MLV* reversotranscriptasa (*Invitrogen*).

Todo ello en un volumen total de 30 µl.

Las muestras se llevaron al termociclador Mastercycler Gradient[®] (*Eppendorf*) con parámetros de 50 min a 37°C, 15 min a 42°C y 5 min a 95°C (desnaturalización).

3.8. Reacción en cadena de polimerasa (PCR)

Una vez concluida la RT, 3 µl de dicha mezcla fueron amplificados mediante el uso de cebadores específicos (Tabla 2), diseñados en nuestro laboratorio con el programa "Primer 3" a partir de secuencias corroboradas en *GenBank* de los genes de interés, y que fueron solicitados a *Sigma-Genosys*.

Materiales y métodos

Tabla 2. Secuencias de los primers usados en PCR.

| Gen | Forward | Reverse |
|-----------------------------------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) | 5'-atcatcttctcaaaactcgagtg-3' | 5'-ttgagatccatgccattggcc-3' |
| (<i>Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase</i>) HPRT | 5'-cagtcccagcgtcgtgatta-3' | 5'-agcaagtcttcagtcctgtc-3' |
| Inhibidor tipo 1 del activador del plasminógeno (PAI-1) | 5'-cccacggagatggtttaga-3' | 5'-ccagtttgtcccaaaggaa-3' |
| Interleuquina 1 beta (IL-1 β) | 5'-tgaccatgtgagctgaaag-3' | 5'-gggattttgtcgttgctgt-3' |
| Interleuquina 6 (IL-6) | 5'-aggaacgaagtcaactccatc-3' | 5'-ggcagtggtgtcaacaacatc-3' |
| Proteína C Reactiva (CRP) | 5'-gtctctatgccacgctgat-3' | 5'-ccgtcaagccaaagctctac-3' |
| Proteína quimioatrayente tipo 1 de monocitos (MCP-1) | 5'-atgcagttaatgcccactc-3' | 5'-ttcctattggggtcagcac-3' |

La mezcla de reacción se preparó con las siguientes proporciones:

- 5 μ l de tampón de PCR [10X PCR buffer: 200mM Tris-HCl, pH 8.4, 500mM KCl, (Invitrogen)]
- 1.5 μ l MgCl₂ [50 mM] (Invitrogen)
- 4 μ l de cada dNTP [0.2 mM] (Invitrogen)
- 0.5 μ l (300 ng) de cada cebador
- 0.25 μ l (1.25 unidades) de *Taq DNA* polimerasa (Invitrogen)

El volumen total fue de 50 μ l.

La reacción de amplificación se desarrolló en un termociclador *Mastercycler Gradient*[®] (Eppendorf) con parámetros de: 98°C 15 seg, 60°C 30 seg, 72°C 1 min, 32 ciclos, luego 10 min a 72°C y al final a 4°C.

Cada muestra era amplificada en dos reacciones diferentes, en una con los cebadores específicos del gen de estudio y en la otra con cebadores del gen HPRT (*hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*), un gen de expresión constitutiva ("housekeeping"). Esta segunda amplificación cumplía un doble objetivo: controlar la eficacia de la RT y servir de control para la cuantificación de las muestras.

Materiales y métodos

Electroforesis de ADN

Este método se utilizó para analizar la calidad de los productos de amplificación y para discriminar las muestras de SVF no válidas por estar contaminadas con adipocitos.

- Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 2% en TAE 1X [TAE 50X: Trisma base 2 M (*Merck*); EDTA 50 mM (*Sigma Aldrich*); ácido acético glacial 8 mM, (*Merck*)] teñidos con bromuro de etidio (*Sigma Aldrich*) (1 µl/ml), cargando 16 µl totales por calle, de los cuales 13 µl correspondían al producto amplificado y 3 µl al tampón de carga [50% glicerol (*Sigma Aldrich*); 25% azul de bromofenol (*Merck*)].

- Se dejaron a 100 V por 30 min y luego se visualizaron en transiluminador de luz ultravioleta acoplado a un sistema de imagen digital (*Molecular Analyst*[®] *Biorad*).

3.9. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR)

LightCycler

Con el termociclador fluorescente LightCycler (*Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany*), siguiendo las instrucciones del fabricante se analizaron los genes de la Tabla 2. A partir de 3 µl de la reacción de RT para realizar la PCR en un volumen de 20 µl se mezclaron:

- 13.6 µl de H₂O
- 1.2 µl MgCl₂ [1.5 mM]
- 0.1 µl *Primer forward* [50 µM]
- 0.1 µl *Primer reverse* [50 µM]
- 2 µl de *1X Light Cycler DNA Master SYBR Green I mix* (*Roche Molecular Biochemicals*).

La “premix” (17 µl) se agregó en primer lugar a los capilares de cristal (*Roche Molecular Biochemicals*) añadiendo la muestra (3 µl). Las muestras se sometieron a un centrifugado corto para su mezcla y se colocaron en el carrusel del termociclador.

Materiales y métodos

Los parámetros fueron de: 96°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización (96°C por 2 s), annealing (62°C por 15 s) y elongación (72°C por 15 s).

Los niveles relativos de ARNm de cada gen se normalizaron con HPRT.

TaqMan®

Con este método se analizaron los genes de la Tabla 3, cuyos primers fueron diseñados con el programa “Primer Express”. Las concentraciones de la premix fueron:

- 2.92 µl H₂O MQ estéril
- 0.36 µl *Primer forward* [10µM]
- 0.36 µl *Primer reverse* [10µM]
- 0.36 *Probe* [5µM]
- 6 µl *TaqMan® Universal PCR MasterMix (Applied Biosystems)*

Posteriormente se agregaron 2 µl de cada muestra [100 ng].

Cada muestra se hizo por duplicado, así como los puntos de la recta patrón.

Después de un spin, se colocó la placa en el aparato de TaqMan® (*Applied Biosystems*; Foster City, CA, USA) para la medición correspondiente con parámetros de: 50°C por 2 min, 95°C por 10 min seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 seg y 60°C por 1 min.

Por cada muestra (también en duplicado) se hizo una medición del gen 18S en dilución 1:30.

Materiales y métodos

Tabla 3. Primers de genes utilizados en TaqMan®.

| Gen | Forward | Reverse | Probe |
|-----------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---------------------------------------|
| Gen housekeeping | | | |
| 18S | 5'-cggctaccacatccaaggaa-3' | 5'-gctggaattaccgcggt-3' | 5'-gacggcaagtctgtgccagca-3' |
| Genes del metabolismo de ácidos grasos | | | |
| ACC α | 5'-tggcgggatggtctctt-3' | 5'-agtgcgagaagcagccatt-3' | 5'-accttgaagatttcgtcaggatctttgatga-3' |
| FAS | 5'-gacatttcacagccacc-3' | 5'-cctctagcagccgacctc-3' | 5'-ctgccaggacaggaaccg-3' |
| INSIG-1 | 5'-tgctgtggcagggcag-3' | 5'-ctcccagggtactgtca-3' | 5'-cgctgtgtcggctattgtatccctgt-3' |
| INSIG-2 | 5'-cgtgctgcgtacagcc-3' | 5'-ggctctcctagatgcctgtca-3' | 5'cagctgtgattggactattgtaccctgca-3' |
| SREBP-1c | 5'ctcatcaacaaccaagacag-3' | 5'-cctgtctacccccagcat-3' | 5'-ccctggcctatttgatcc-3' |
| HIF-1 α | 5'-caccgattcgccatgga-3' | 5'-gacgttcggaactatcctattt-3' | 5'-ccggcggcgagaacgagaag-3' |
| HIF-2 | 5'cagaatctggactggttgta-3' | 5'-ccagggcgtgtagaattca-3' | 5'-cccaggagactactggccgct-3' |
| HO-1 | 5'-ggcctgctttttcacctt-3' | 5'-cgagcacgatagagctgttga-3' | 5'-ccgagcatcgacaaccacca-3' |
| eNOS | 5'-cgggtcacagtcttggtgaaag-3' | 5'-acgcggaagccatgac-3' | 5'-tgtctttgcttctgtgtaaatgaggaa-3' |
| Genes proinflamatorios | | | |
| IL-1 β | 5'-gatggctgactattcctaagc-3' | 5'-agactgcccattctcgacaag-3' | 5'-ccccaggacatgctaggagccc-3' |
| IL-6 | 5'-gcccttcaggaaacagctatga-3' | 5'-tgtcaacaacatcagteccaaga-3' | 5'-tctctccgcaagagactccagccagt-3' |
| TNF- α | 5'-ctaactcccagaaaagcaagcaa-3' | 5'-cctcggccagtgatgaga-3' | 5'-cagccaggcaggttccgctc-3' |
| Hep | 5'-tgcgctgctgatgctgaa-3' | 5'agcatttacagcagaaggagcaca-3' | 5'-cgaaggaagcgagacaccaacttccc-3' |
| Lipo | 5'-gccactggaggaggtgtt-3' | 5'-cacggagtcatctgcatcaa-3' | 5'-tgctatgctcaagccccagctca-3' |

ACC α : acetil-CoA carboxilasa alfa; FAS: sintasa de ácidos grasos; Hep: hepcidina; HIF-1 α : factor inducido por hipoxia 1 alpha; HIF-2: factor inducido por hipoxia 2; INSIG: gen inducido por insulina; IL- β : interleuquina 1-beta; IL-6: interleuquina 6; Lipo: lipocortina; eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial; SREBP-1c: proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides-1c; TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa.
Los Probes en el extremo 5' están marcados con 6-carboxi-fluoresceína (FAM) y en el 3' con 6-carboxitetrametil-rodamina (TAMRA).

3.10. Microarray⁸

Aislamiento de ARN de vWAT

Se extrajo ARNm a partir de 250 mg de muestras de vWAT por homogenización con ULTRA-TURRAX® T 25 basic (IKA® Werke GmbH, Staufen, Germany) usando TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las muestras fueron purificadas usando el RNeasy Lipid Tissue Mini kit (Qiagen, Valencia, CA) y tratadas con DNase (RNase-free DNase Set, Qiagen) para eliminar cualquier traza de DNA genómico. La calidad del ARN fue evaluada midiendo la tasa de absorbancia de 260:280 nm, con electroforesis de gel de agarosa y con el equipo "2100 Agilent Bioanalyzer" (Agilent Technologies, Palo Alto, CA).

⁸ Análisis hecho por el Dr. Javier Gómez-Ambrosi de la Universidad de Navarra, Pamplona.

Materiales y métodos

Análisis de expresión génica-marcada e hibridaciones de *microarray*

Este análisis se efectuó usando el “Agilent Whole Mouse Rat Genome array” (*G4131F*, *Agilent Technologies*), representando aproximadamente 44000 genes y transcritos de rata. Brevemente, un microgramo de ARN total de cada muestra fue marcado con aminoallyl y amplificado usando el “Amino Allyl MessageAmp II aRNA Amplification Kit” (*Ambion, Austin, TX*). Alícuotas (1.2 µg) de ARN amplificado fueron marcados con fluorescencia usando Cy3/Cy5 (*Amersham, Buckinghamshire, UK*) y posteriormente apropiadamente combinados e hibridizados sobre *Aginet oligomicroarrays* de acuerdo con las instrucciones del protocolo. Las hibridaciones fueron hechas usando un diseño de referencia, donde las muestras de control fueron pools de ARN de muestras individuales. Se hicieron dos hibridaciones con *fluor reversal (Dye swap)* por cada muestra de vWAT y se usaron 4-5 individuos (muestras de vWAT) por grupo. Después de lavadas, las placas de *microarrays* fueron escaneadas usando un escáner Gene Pix 4100A (*Axon Instruments, Union City, CA*) y la cuantificación de las imágenes se efectuó con el software asociado GenePiX Pro 6.0.

Análisis de Microarray

Los datos de expresión génica de todos los experimentos por replicado se analizaron con GeneSpring GX software v 7.3.1 (*Agilent Technologies*). El *clustering* fue determinado con el *Gene and Condition Tree algorithms*. Además se usaron el *Gene Ontology groupings*, *GenMapp software* y la página web *KEGG* en conjunto con *GeneSpring* para identificar vías y grupos funcionales de genes.

Materiales y métodos

3.11. Hibridación in situ

Se hicieron cortes de 16 μm en un criostato (*HM505E[®], Microm*) de los cerebros de rata que se guardaron a -80°C y se montaron en portaobjetos (*72 Polysine[™], VWR International*). Los portaobjetos con las secciones de interés fueron elegidos en función de los criterios estereotáxicos del “Atlas de cerebro de rata” de Paxinos & Watson (Paxinos G, 1988; López M, 2005a; López M, 2007b).

Marcaje de la sonda

Se llevó a cabo en un volumen total de 20 μl , con las siguientes proporciones:

- 100 ng de oligonucleótido complementario y antisentido mostrados en la Tabla 4.

Tabla 4. Oligonucleótidos para hibridación in situ

| ARNm | Secuencia |
|------|---------------------------------------------------------|
| AgRP | 5'-cgacgCGGgagaacgagactcgCGgttctgtggatctagcacctctgcc-3' |
| NPY | 5'-gggcgttttctgtgctttccttcattaagaggtctg-3' |
| POMC | 5'-cttgatgatggcgttcttgaagagcgtcaccagggcgctctgctctt-3' |
| CART | 5'-ccgaaggaggctgtcacccttcaca-3' |

- 2 μl de tampón de reacción (“10X *one-phor all buffer*: 100 mM tris acetato, 100 mM acetato de magnesio, 500 mM acetato de potasio, *Amersham*).

- 2 μl de [$\alpha^{35}\text{S}$] ATP (*Amersham*), con una concentración de 12.5 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ y una actividad específica de 1250 Ci/mmol (46.2 TBq/mmol).

- 30 unidades de Tdt (*terminal deoxynucleotidil transferase, Amersham*).

La mezcla de reacción se incubó durante 2 horas a 37°C , después de las cuales se procedió a la purificación de la sonda a través de columnas Sephadex (*Nick[™] column, Amersham*), previamente lavadas con tampón de elución estéril (20 mM Tris-HCl pH 7.5, *Merck*; 2 mM EDTA pH 8, *Merck*). Se eluyeron tres fracciones en 400 μl del tampón, y se contaron 4 μl de cada una en el contador β (*WinSpectral 1414[®], Wallac*). La segunda fracción correspondió al oligonucleótido marcado.

Materiales y métodos

Preparación del tejido (prehibridación)

Los cortes tisulares se secaron rápidamente, y a continuación se procedió a su fijación en paraformaldehído 4% en tampón fosfato 0.2 M, durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación, se deshidrataron los cortes mediante lavados sucesivos en diferentes concentraciones de etanol (*Merck*) (70, 80, 90, 95 y 100%, 5 minutos cada uno). Finalmente, las secciones se dejaron secar al aire.

Hibridación

Sobre cada porta se aplicaron 5×10^5 cpm de oligonucleótido marcado (Tabla 5). Los portas con la sonda se hibridaron durante toda la noche a 37°C en atmósfera húmeda.

Lavados

Las secciones fueron sometidas a los siguientes lavados:

- 5 lavados a temperatura ambiente en SSC 1X [SSC 20X: 3 M NaCl (*Merck*); 300 mM $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ (*Merck*)].
- 4 lavados de 30 min en SSC 1 X a la temperatura indicada para cada oligo (Tabla 5).

Tabla 5. Condiciones de hibridación, lavados y exposición de los oligos

| ARNm | cpm (x 106) | Temperatura de lavado (°C) | Tiempo de exposición (días) |
|------|-------------|----------------------------|-----------------------------|
| AgRP | 0.5 | 55 | 4-5 |
| CART | 1 | 42 | 5-6 |
| NPY | 1 | 42 | 4-5 |
| POMC | 1 | 55 | 5 |

- 1 lavado durante 60 min a temperatura ambiente con SSC 1 X.
- Continuamos con lavados rápidos con H₂O MQ autoclavada, etanol 70 % más 300 mM NH₄AC (*Merck*) y etanol absoluto (*Merck*).
- Una vez secos, los portas se expusieron a una película de autoradiografía (*KODAK BioMax MR Film*) con los tiempos de exposición de la Tabla 5.

Materiales y métodos

Cuantificación

La cuantificación de la densidad óptica de las señales de hibridación, se realizó mediante un escáner acoplado a un sistema de imagen digital (*Image J, NIH*). El valor de cada una de las señales de hibridación fue corregido por el de su fondo adyacente. Las áreas de medición (señal positiva y fondos) fueron idénticas en todos los casos.

3.12. Extracción de proteína y Western Blot

a) Extracción de proteína de hipotálamo

- Se diseccionó el hipotálamo de cada cerebro (López M, 2005a; López M, 2007b) y se introdujo tubos eppendorf con 200 µl de buffer lisis (50 mM Hepes pH 7.5, 1% Triton X-100, 10 mM EDTA, 10 mM Na₃CO₄, 10 mM fluoruro sódico). Esta solución se conservó a 4°C y en el momento de su uso se le añadieron los inhibidores de proteasas (*Roche*)
- Una vez homogenizados se añadieron 800 µl adicionales buffer lisis (total de 1000 µl) y se centrifugó a máxima velocidad a 4°C 15 min. Posteriormente se hicieron 5 alícuotas de 200 µl.
- La concentración de proteína fue determinada por medio de *Bio-Rad Protein Assay Kit* (*Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond, CA*).

b) Western Blot

Electroforesis y transferencia

- La electroforesis se realizó en geles SDS-PAGE (6% de separación) preparados de la siguiente manera: primero el *running gel* (gel de poliacrilamida al 6%) [3.5 ml de H₂O destilada, 6.75 ml de Buffer A (90.1 g de Tris-HCl 0.75 M, 2g de SDS 0.2%, 1L H₂O destilada a pH 8.8), 2.7 ml protogel (acrilamida, *Bio-rad*), 75 µl persulfato de amonio (APS) al 10%, 37.5 µl N,N,N,N'-tetrametilnediamina (TEMED)], agregándose isopropanol al 60%

Materiales y métodos

que se decantó una vez polimerizado el gel, se lavó con H₂O MQ y se secó con papel filtro para añadir el *stacking gel* [3,57 ml H₂O destilada, 5 ml de Buffer B (30.2 g de Tris-HCl 0.75 M, 2g de SDS 0.2%, 1L H₂O destilada a pH 6.8), 1.32 ml protogel (acrilamida, *Bio-rad*), 100 µl APS 10%, 20 µl TEMED].

- Para determinar el peso de las proteínas y confirmar la transferencia de las muestras se utilizó marcador teñido Ponceau S (*ICN Biomedicals, Inc., Aurora, OH*).

- La cantidad de proteína de cada muestra fue de 40 µg, y para cargarla se llevó a un volumen de 40 µl con H₂O MQ, añadiendo tampón de carga 5X (50% glicerol, 10% β-mercaptoetanol, 6% SDS, 0.5% azul de bromofenol, 0.4 M tris pH 6.8). Las proteínas se calentaron a 95°C, 10 min.

- El gel se colocó en bandeja con tampón de electroforesis 5X [25 nM Tris base, 192 nM glicina, 0.05% SDS (w/v), 20% metanol (w/v), H₂O] y se dejó corriendo durante 50 min a 130 V y amperaje de 0,18.

- Previa activación de las membranas se realizó la transferencia a 25 V durante 1 h 40 min (Buffer de transferencia: 39 mM glicina, 48 mM Tris-base, 0.037% SDS, 20% metanol a pH 8.3).

Inmunodetección

- Se incubó con el anticuerpo primario con las diluciones indicadas en la tabla 6 [antiratón (*DakoCytomation*): beta actina (*Abcam; Cambridge, UK*), FAS (*BD Transduction Laboratories; Franklin Lakes, NJ, USA*); anticonejo (*DakoCytomation*): ACC (*Upstate; Lake Place, NY, USA*), AMPK (*Upstate; Lake Place, NY, USA*), pACC (*Cell Signaling; Danvers, MA, USA*), pAMPK (*Cell Signaling; Danvers, MA, USA*)], toda la noche a 4°C o 1 h a temperatura ambiente en solución de bloqueo [PBS 10%, 0.58 M Na₂HPO₄-2H₂O, I-Block™ (*Tropix, AI300*), 0.17 M NaH₂PO₄-2H₂O, d H₂O csp, 0.68 M NaCl].

Materiales y métodos

Tabla 6. Diluciones de los anticuerpos primarios

| Anticuerpo | Dilución |
|-----------------|----------|
| ACC | (1:500) |
| AMPK α 1 | (1:1000) |
| AMPK α 2 | (1:1000) |
| pACC | (1:2000) |
| pAMPK | (1:2000) |
| FAS | (1:1000) |

- Se lavó tres veces 10 min con TBS Tween [TBS 10%, 0.1% Tween-20 (*Sigma*) d H₂O].
- Se añadió el anticuerpo secundario, dilución 1:5000 en solución de bloqueo.
- Se dejó en agitación una hora y se lavó nuevamente tres veces con TBS Tween [TBS 10%, 0.1% Tween-20 (*Sigma*) d H₂O].
- Después de humedecer la membrana con solución fluorescente (*Pierce[®] ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific*) se colocó en un cassette de autoradiografía con películas fotográficas (*Amersham, Hiperfilm M RPN 6K*) y se reveló.

3.13. Estudios histológicos⁹

Procesamiento del material

Las muestras de las diferentes regiones del aparato digestivo fueron fijadas en formaldehído al 10% (*Merck KgaA, Darmstadt, Germany*), tamponado durante 24 h a temperatura ambiente. Posteriormente se procedió a la realización de los bloques de parafina orientando las piezas para la obtención de cortes longitudinales. Se realizó la inclusión en parafina mediante un inclusor (*Vacuum Infiltration Processor, SACURA, modelo 4893-Floor E150 de Bayer*), donde se llevó a cabo la deshidratación de las muestras a 40°C, haciéndolas pasar por alcoholes de gradación creciente durante diferentes tiempos, y la inclusión en parafina líquida.

⁹ Procedimientos llevados a cabo por la Dra. María Ángela Burrell, del Departamento de Histología y Patología, de la Universidad de Navarra, Pamplona.

Materiales y métodos

Tras la inclusión de los bloques, se realizaron cortes seriados de 4 μm de espesor, con ayuda de un microtomo Microm HM 340E (*Bio Optica, Milan, Italia*) y cuchillas de acero. Los cortes destinados a la aplicación de las tinciones convencionales se recogieron sobre portaobjetos normales, mientras que aquellos cortes destinados a inmunocitoquímica se recogieron sobre portaobjetos especiales (*Manzel-Glaser®*, *J1800AMNZ, Braunschweig*) que facilitan la adherencia de la muestra para evitar su pérdida durante el proceso.

Tinciones histológicas convencionales

A) Tinción de hematoxilina-eosina

Tras desparafinar los cortes en estufa a 60°C durante 15-30 minutos, se hidrataron mediante alcoholes de gradación decreciente (absoluto, 96°, 80° y 70°) hasta agua corriente, se tuvieron con hematoxilina de Ehrlich durante 5-10 min. Después se lavaron en agua corriente abundante y se añadió en la cubeta del agua 5 gotas de HCl al 37%. A continuación se pasaron los cortes por Li_2CO_3 (hasta que los cortes queden de color azul), se lavaron en agua corriente, se les aplicó la eosina al 1% durante 5 min y por último se volvieron a lavar en agua. Posteriormente los cortes se deshidrataron haciéndolos pasar por alcoholes de gradación creciente hasta xilol y se montaron en DPX (*BDH, 360294H*).

B) Tinción de ácido periódico de Schiff (PAS)

Se desparafinaron y se hidrataron los cortes igual que en el caso de la hematoxilina-eosina y luego se le añadió ácido periódico al 0,5% durante 5 min, se lavaron 3 veces con agua destilada y a continuación se añadió el colorante de Schiff durante 15 min. Se realizaron 3 lavados de ácido sulfuroso de 2 min cada uno, se lavaron en agua corriente de 15-30 min y se le aplicó la hematoxilina durante 1 min. A continuación se diferencié la hematoxilina con HCl y Li_2CO_3 , se deshidrataron las muestras y se montaron con DPX.

Materiales y métodos

Técnicas Inmunocitoquímicas

Este estudio se usó para la detección de ghrelin en la mucosa gástrica, usando un antisuero policlonal específico para ghrelin obtenido en conejo (*Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame, CA*). Concretamente se empleó la técnica del complejo ENVISION® (*Dako, Glostrup, Denmark*), que usa peroxidasa como enzima marcadora y permite una enorme amplificación de la señal. El complejo ENVISION® (*Dako, Glostrup, Denmark*) es un polímero de dextrano que tiene unidas numerosas moléculas de peroxidasa y anticuerpos secundarios de cabra que reconocen la fracción Fc de las inmunoglobulinas de conejo.

El revelado se llevó a cabo mediante la técnica con 3,3'-diaminobencidina (DAB) intensificada con níquel y glucosa oxidasa (Shu SY, 1988). Las preparaciones se incubaron en una solución que contenía: 1 mg/ml de DAB tetrahidroclorada, 1 mg/ml de sulfato de amonio y níquel, 0,8 mg/ml de cloruro amónico, 0,06 mg/ml de glucosa oxidasa y 4 mg/ml de β -D-glucosa disuelto todo en tampón acetato. Esta solución produce un precipitado negro en las zonas donde haya habido reconocimiento del antígeno.

3.14. Análisis estadístico

Las variables cuantitativas se expresaron como promedio \pm error estándar. El análisis estadístico se hizo con el programa *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, 10.0, Chicago, USA)*. Para comparar los resultados obtenidos entre los diferentes grupos se usaron pruebas paramétricas (T de Student, ANOVA) en caso de distribución Gaussiana y no paramétricas (U de Mann Whitney, Kruskal Wallis) en caso contrario.

Materiales y métodos

4. RESULTADOS

Resultados

Resultados

4.1. Efecto del programming neonatal y de la dieta HF/LF hasta el día 90 + 4 semanas con dieta normal

4.1.1. Masas e ingestas en machos

En total se cuantificaron masa e ingesta de 24 machos SLHF, 23 SLLF, 45 NLHF y 38 NLLF. En las SL, desde los 37 días de edad las HF pesaron más, mientras que en las NL, esto sucedió a los 34 días. A partir de los 90 días, cuando un lote de cada grupo recibió dieta normal (SLHF = 12, SLLF = 12, NLHF = 12, NLLF = 13), las diferencias de las masas disminuyeron, de hecho, entre las NLHF y las NLLF se perdió la significancia estadística casi inmediatamente al cambiar de dieta, por el contrario, las SLHF se mantuvieron como las más pesadas durante un mes más después de haber dejado la dieta alta en grasa (Figura 14A).

Al analizar la ganancia de masa por períodos de tiempo en días, encontramos que durante el período de lactancia (día 1 a 25), existió diferencia estadísticamente significativa entre las camadas pequeñas (sobrealimentadas) y las normales. Posteriormente, de los 25 a los 90 días, las ratas alimentadas con HF ganaron más masa, con diferencias estadísticamente significativa entre SLHF vs SLLF, NLHF vs NLLF y SLHF vs NLLF. Al analizar de los 25 a los 122 días (que incluye en este caso los 32 últimos días con dieta normal), no se registraron diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos (Figura 14B).

Resultados

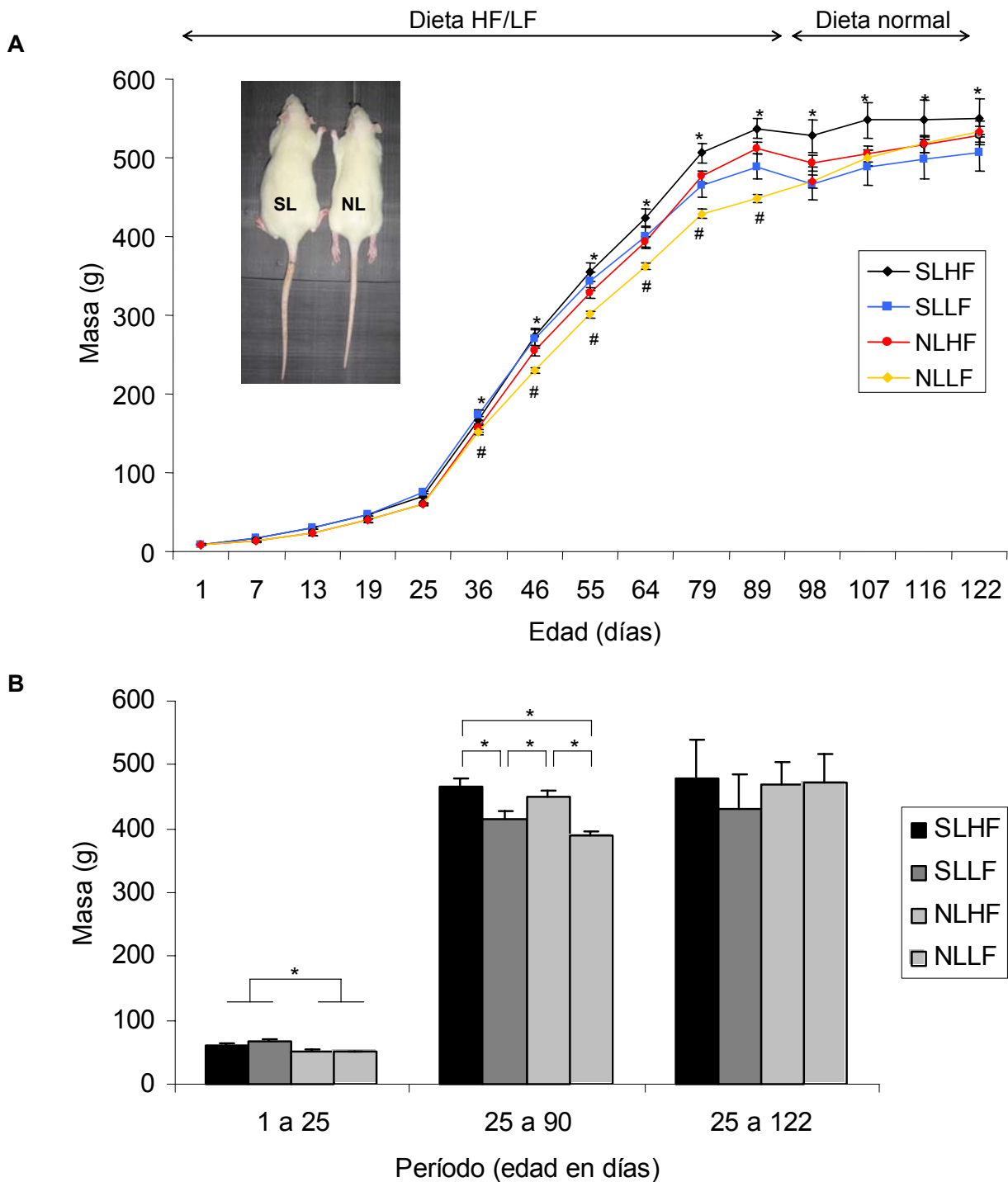


Figura 14. A) Curvas de crecimiento de ratas Sprague Dawley machos sometidas a programming neonatal y distintos tipos de dieta. Extremo superior izquierdo: fotografía comparativa entre macho de camada pequeña (SL) vs camada normal (NL). HF: dieta alta en grasa; LF: dieta baja en grasa. *: $p < 0.05$ SLHF vs. SLLF; #: $p < 0.05$ NLHF vs. NLLF. B) Ganancia de masa por periodos de edad en días en la gráfica descrita. *: $p < 0.05$ entre los grupos indicados.

Resultados

Con relación a la ingesta calórica, de manera general ésta fue mayor en las HF, tanto de las SL como de las NL. El comportamiento particular que presentaron los grupos fue que desde la semana 5 y hasta la semana 11, en las camadas NL existían diferencias estadísticas entre los dos tipos de dieta. Por el contrario, en las SL, sólo hasta la semana 9 es cuando las SLHF ingieren más kcal que las SLLF pero la diferencia se pierde inmediatamente al iniciar dieta normal (semana 11) (Figura 15A). Como se aprecia en la misma Figura 15A, cuando los cuatro grupos se someten a una misma dieta a partir de los 90 días tienden a comer la misma cantidad de kcal/día. Al expresar los datos como ingesta acumulada (*cumulative food intake*, CFI), se observa que las SLLF ingirieron más kcal que incluso las SLHF, manteniendo una diferencia estadísticamente significativa con relación a las NLLF desde el destete y hasta el final del estudio. Entre las NL, las que recibieron LF ingirieron menos kcal que las alimentadas con HF y mantuvieron la diferencia estadística prácticamente todo el estudio (Figura 15B).

Resultados

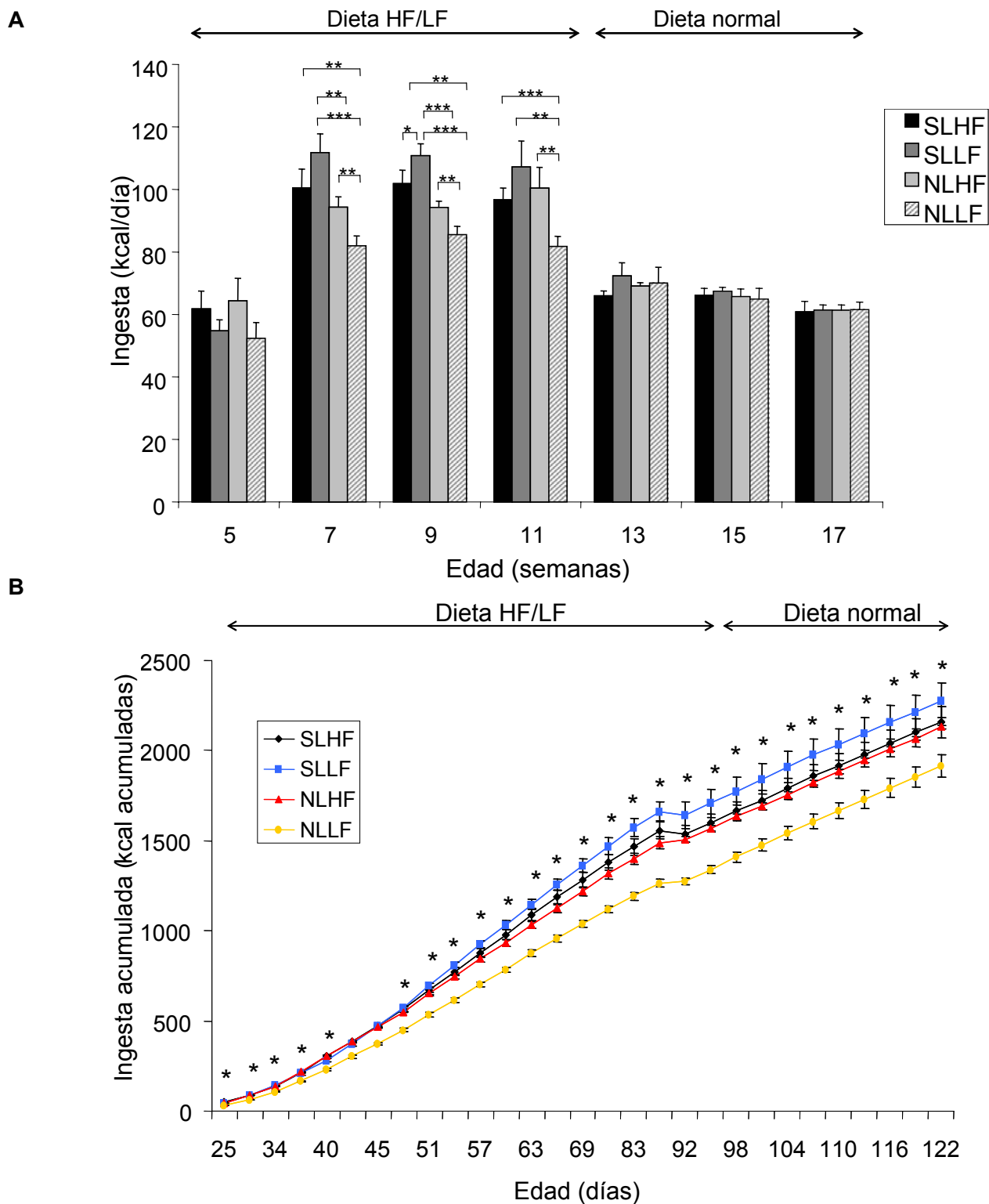


Figura 15. A) Ingesta en ratas Sprague Dawley macho sometidas a programming neonatal y distintos tipos de dieta. SLHF: camadas pequeñas alimentadas con dieta rica en grasa; SLLF: camadas pequeñas alimentadas con dieta baja en grasa NLHF: camadas normales alimentadas con dieta rica en grasa; NLLF: camadas normales alimentadas con dieta baja en grasa. *: $p < 0.05$, ** < 0.005 , *** < 0.001 entre los grupos indicados. B) Ingesta acumulada en los grupos descritos. *: $p < 0.05$ SLLF vs. NLLF y NLHF vs. NLLF.

Resultados

Al hacer las comparaciones de las ingestas acumuladas por períodos, encontramos que de los 25 a 90 días las ratas NL en dieta baja en grasa fueron las que menos consumieron, habiendo significancia estadística contra los otros tres grupos. Por su parte, las SLLF fueron las que más kcal consumieron, con diferencia estadística significativa en relación a las camadas de tamaño normal, independientemente de la dieta recibida (Figura 16A). Considerando todo el lapso de tiempo de los 25 a los 122 días, las SLLF aún fueron las que más kcal consumieron, con diferencia estadística significativa al compararlas con las NLLF. Dentro de las camadas de tamaño normal, en este mismo período, las NLHF consumieron más kcal que las NLLF (Figura 16B). Al evaluar únicamente el período de tiempo de los 90 a los 122 días, en el que todas las ratas recibieron dieta normal, no hubo diferencias significativas en las ingestas (Figura 16C).

Analizando el *food efficiency* [FE, (masa final-masa inicial)/kcal consumidas en el período estudiado] de las camadas, se observa que de los 25 a los 90 días las ratas SLLF tuvieron el menor FE, con significancia estadística contra los otros tres grupos (Figura 17A). En el período de los 25 a los 122 días sucedió lo mismo, pero además, entre las camadas de tamaño normal (NL), las alimentadas con LF tuvieron mayor FE (Figura 17B). Cuando se analiza exclusivamente el período con dieta normal, comprendido entre los 90 y 122 días, las ratas que había sido alimentadas previamente con HF tuvieron menor FE (Figura 17C).

Resultados

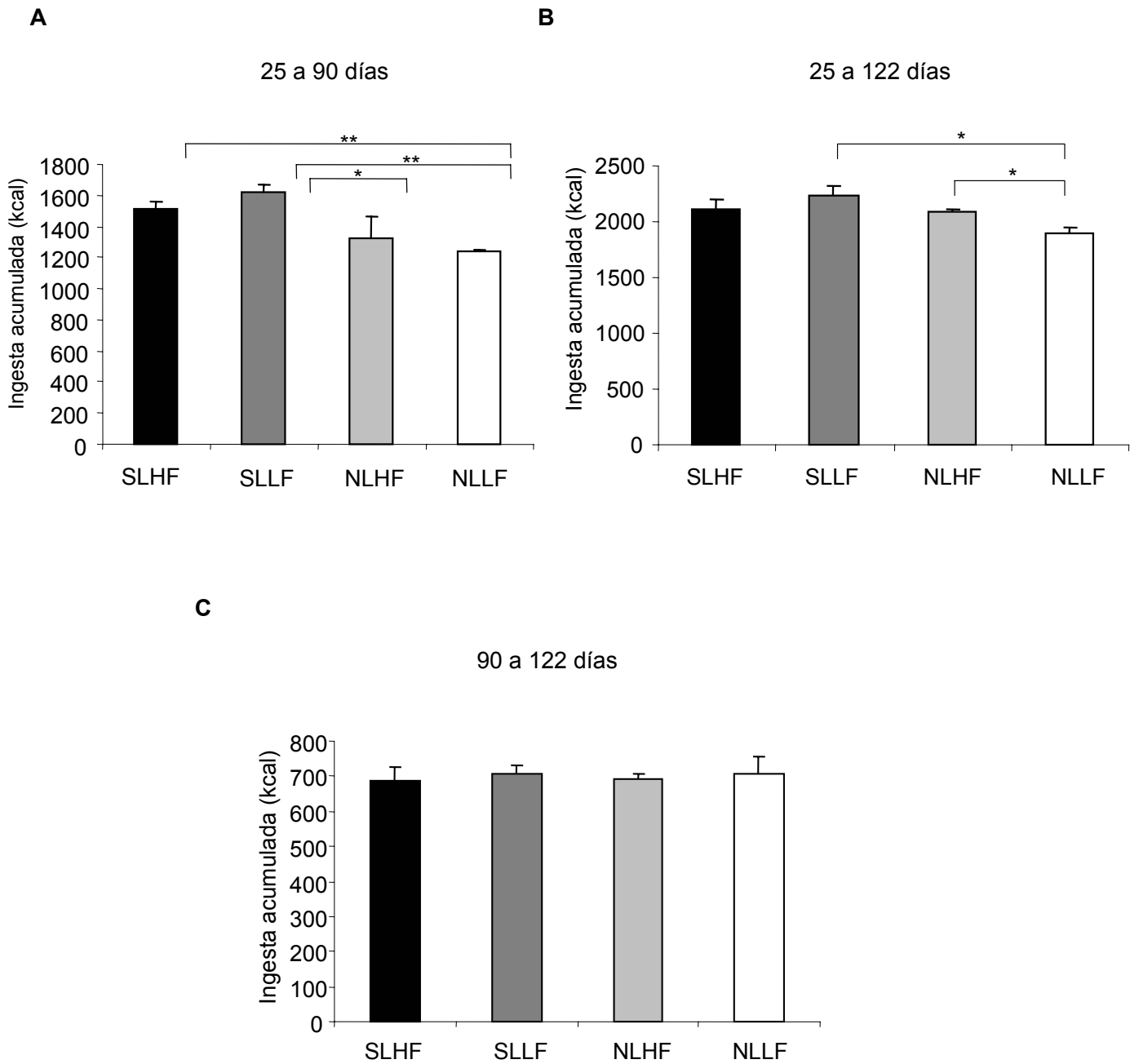


Figura 16. Ingesta acumulada A) de los 25 a 90 días. B) de los 25 a 122 días. C) de los 90 a 122 días. *: $p < 0.05$. **: $p < 0.01$ entre los grupos indicados.

Resultados

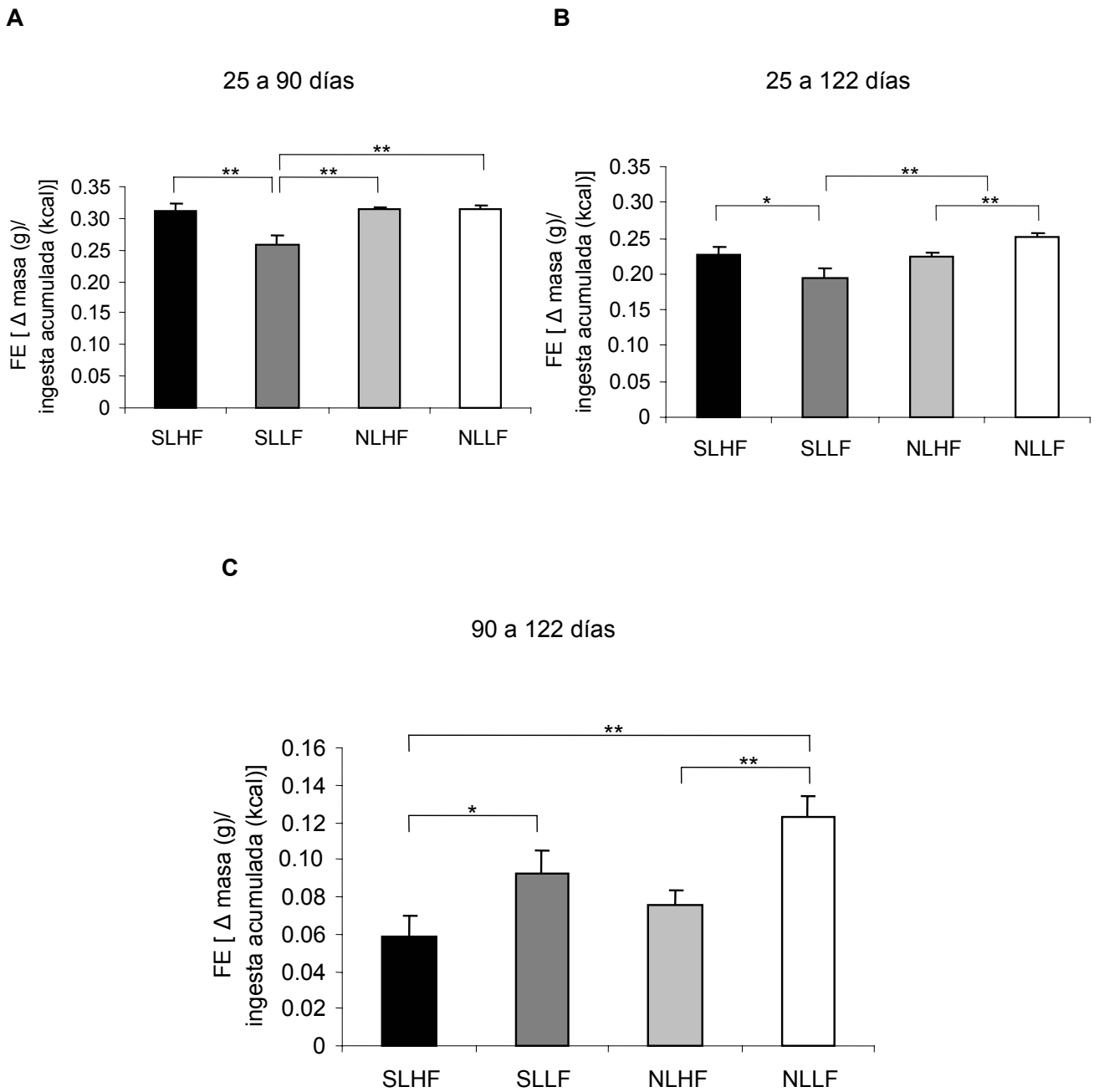


Figura 17. *Food efficiency* (FE). A) de los 25 a 90 días. B) de los 25 a 122 días. C) de los 90 a 122 días. *: $p < 0.05$. **: $p < 0.01$ entre los grupos indicados.

Resultados

4.1.2. Masas e ingestas en hembras

Con relación a las hembras, éstas mantuvieron una masa semejante en los cuatro grupos (12 SLHF, 12 SLLF, 13 NLHF, 14 NLLF), sin diferencias significativas, de hecho, se solapan las curvas de crecimiento de las alimentadas con HF, mientras que las SLLF tienen una curva de crecimiento ligeramente superior entre los 36 y los 64 días, asimismo, las NLLF tienen una curva de crecimiento ligeramente menor entre los días 64 y 80 (Figura 18A), pero en ningún caso se alcanzan diferencias significativas.

En relación a la ingesta, las NL alimentadas con HF ingirieron una cantidad discretamente superior a las NLLF, y la cantidad de cada grupo se mantuvo constante durante cinco semanas, hasta que, de manera llamativa cuando iniciaron a dieta normal (semana 13) todos los grupos aumentaron su ingesta calórica. Las escasas diferencias estadísticamente significativas se dieron entre las NLHF y las NLLF las semanas 7, 9 y 11 (Figura 18B).

Resultados

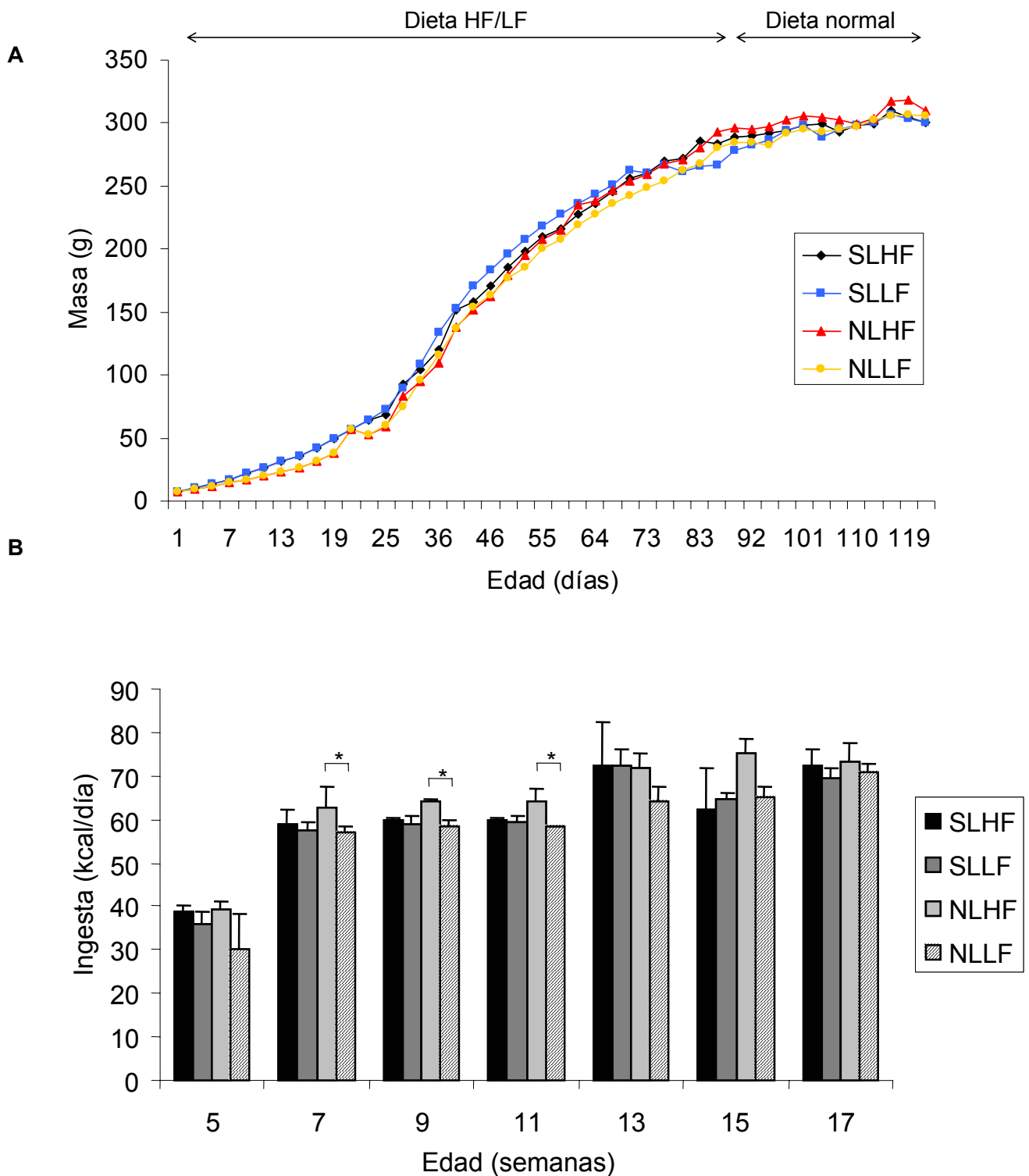


Figura 18. A) Masas en ratas Sprague Dawley hembras tras programming neonatal y distintos tipos de dieta. B) Ingesta. *: $p < 0.05$ entre los grupos indicados.

Resultados

4.1.3. Efecto del programming neonatal y de la dieta sobre los niveles plasmáticos de adiponectina, ghrelin, leptina e insulina

Los RIAs de 24 días fueron con $n = 6-8$ por grupo, y los de 90 y 122 días fueron con $n = 10-12$ por grupo. A los 24 días los niveles de adiponectina fueron semejantes en las SL y NL (Figura 19A), pero a los 90 días fueron menores en las SL ($p < 0.05$), independientemente del tipo de dieta, comparándolas con cada una de las NL (Figura 19B). A los 122 días, los niveles de adiponectina fueron menores en las camada NLLF, con diferencia estadística en relación a las SLLF (Figura 19C).

En relación a ghrelin, a los 24 días no hubo diferencia estadística significativa de acuerdo al tamaño de la camada (Figura 19D), pero a los 90 días, aunque el tamaño de las camadas per se no influyó sobre sus niveles, entre las NL, las alimentadas con HF tuvieron menores niveles que las LF, además, las NLLF también mostraron diferencia significativa contra las SLHF (Figura 19E), finalmente a los 122 días no hubo diferencias (Figura 19F).

Leptina a los 24 días fue mayor en las SL (Figura 20A). En el caso de los adultos sus niveles fueron modificados tanto por la alimentación neonatal (tamaño de la camada) como por la dieta, siendo menores en los alimentados con LF (Figura 20B), mientras que a los 122 días fue mayor en las SLLF (Figura 20C). Por lo que respecta a insulina, a los 24 días fue mayor en las ratas SL (Figura 20D), mientras que a los 90 días, los mayores niveles fueron en las SLLF, con diferencia significativa en relación a las SLHF y las NLLF (Figura 20E), y a los 122 días aunque hubo tendencia a estar disminuida con HF, la diferencia no fue significativa con las LF (Figura 20F).

Debido a que en hembras no hubo diferencias significativas en las masas y muy pocas en las ingestas, estas hormonas, así como el resto de estudios se hicieron únicamente en machos.

Resultados

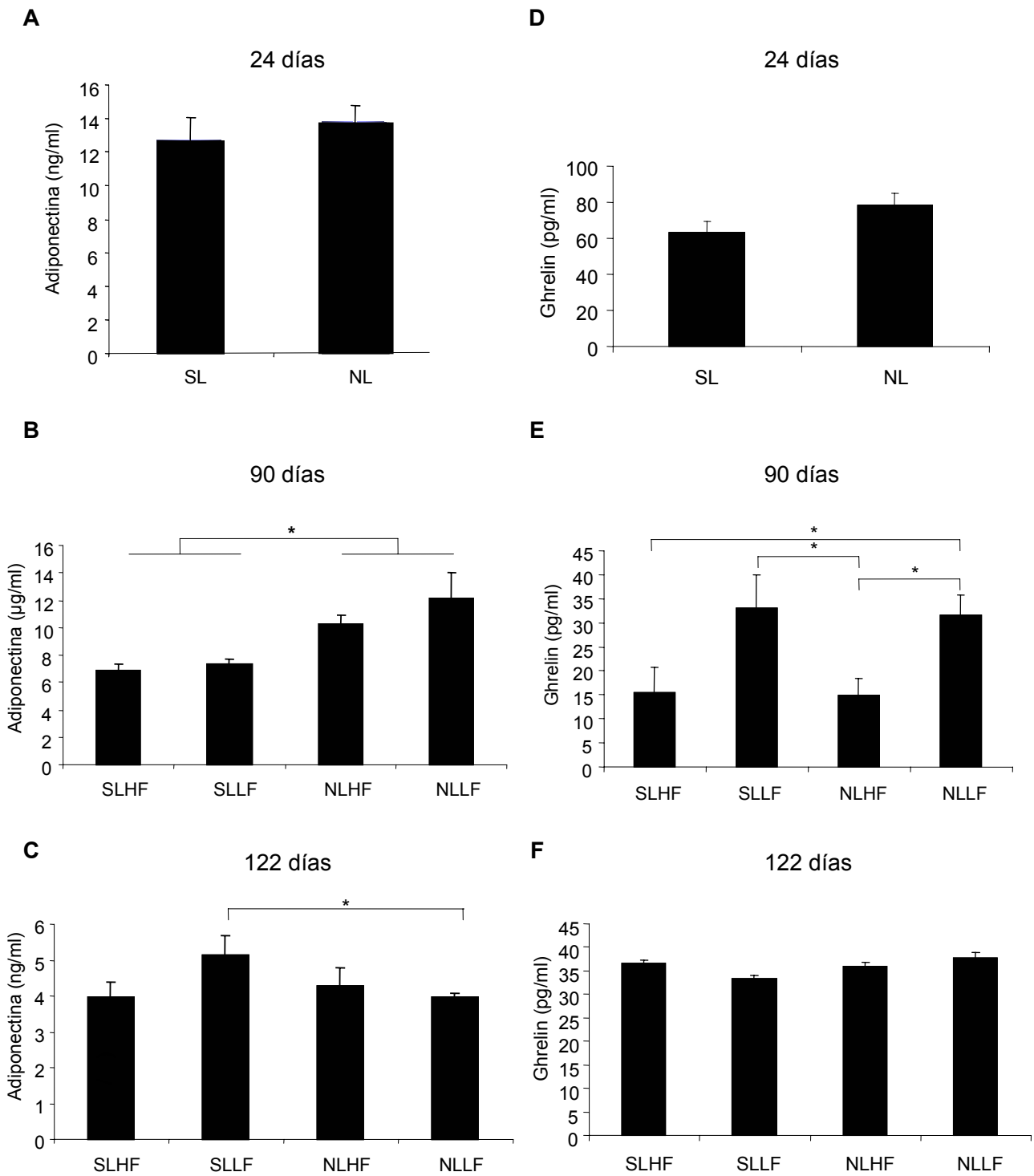


Figura 19. Radioinmunoanálisis de adiponectina A) 24 días, B) 90 días, C) 122 días y de ghrelin D) 24 días, E) 90 días, F) 122 días. SL: camadas pequeñas; NL: camadas normales. *: $p < 0.05$ entre los grupos indicados.

Resultados

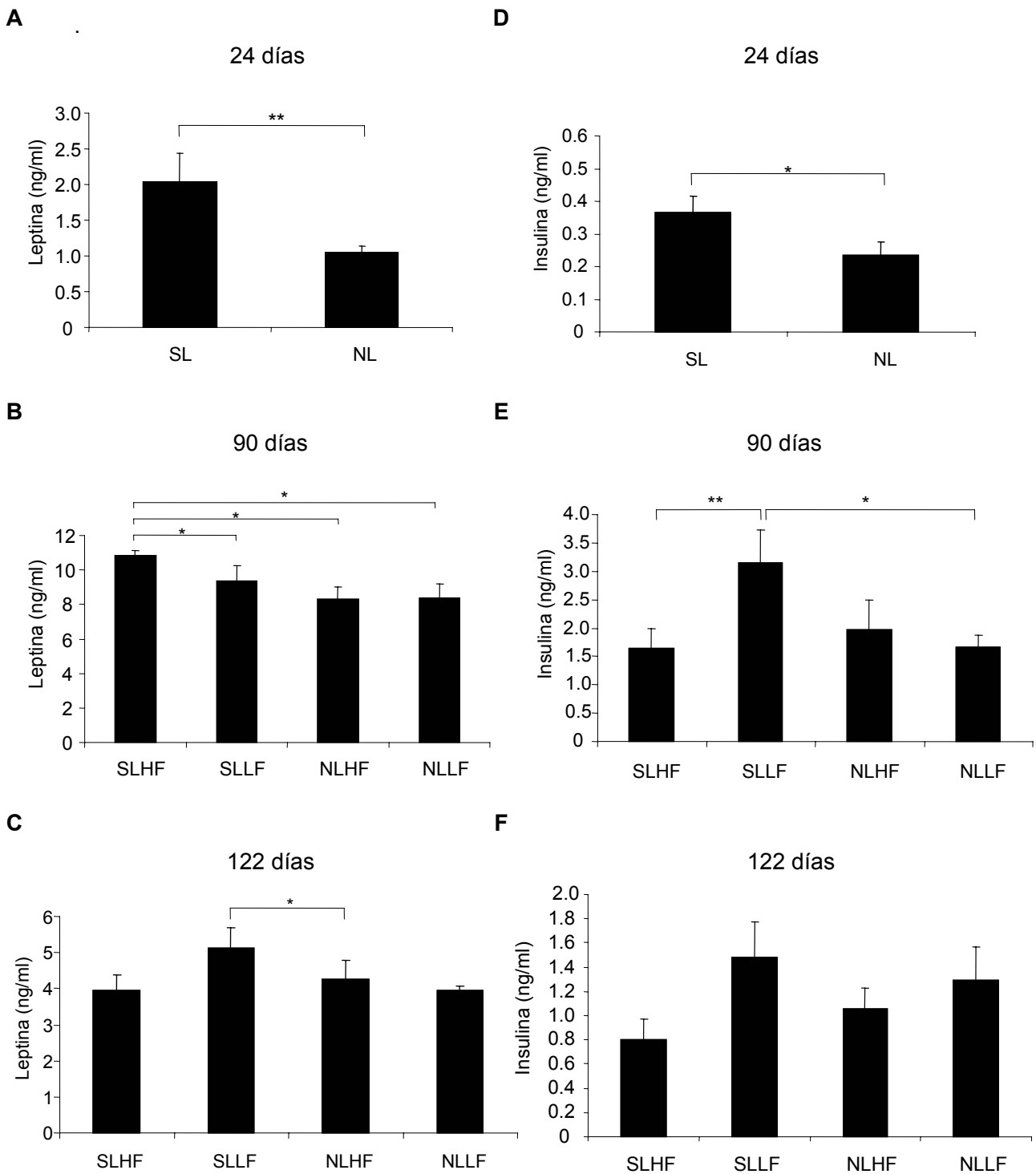


Figura 20. Radioinmunoanálisis de leptina A) 24 días, B) 90 días, C) 122 días y de insulina D) 24 días, E) 90 días, F) 122 días. SL: camadas pequeñas; NL: camadas normales. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ entre los grupos indicados.

Resultados

4.1.4. Efecto del programming neonatal y de la dieta sobre la expresión génica en tejido adiposo visceral

Al hacer el análisis de 44000 genes por *microarray* (Figura 21) ($n = 7$) encontramos una mayor expresión de genes involucrados en crecimiento celular, oncogénesis y metabolismo lipídico en las ratas SL alimentadas con HF (Tablas 7 y 8). Estos resultados indican que HF induce cambios notorios en NL que no se observan en SL, como si las ratas SL ya estuvieran programadas y no respondieran al estímulo de la dieta. Leptina y el gen 1 expresado de macrófago fueron unos de los genes con claras diferencias entre SLHF y SLLF. Estos datos sugieren que el fenotipo obeso podría presentar alteraciones en genes proinflamatorios.

Al analizar el efecto conjunto de programming y dieta, IL-1 β entre SLHF y NLHF tuvo un *fold change* alto (4.93). Mientras que el *fold change* de genes entre SLLF y NLLF fue realmente bajo (máximo de 3.33), entre NLHF y NLLF leptina tuvo un *fold change* de 7.64, lipocortina 1 tuvo 5.17 y adiponectina 4.63. El *fold change* de TNF- α (TNF superfamilia, miembro 2) fue muy bajo (0.44) (Tabla 9).

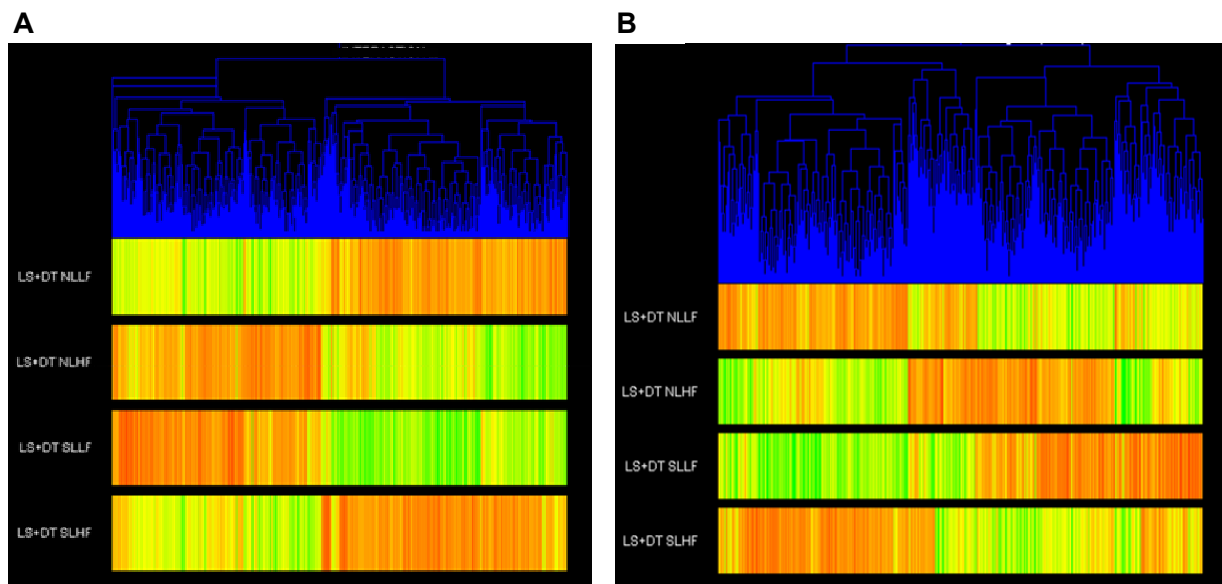


Figura 21. Análisis de expresión génica por *microarray* de ratas sometidas a programming y dieta. A) Efecto global de la dieta. B) Efecto del tamaño de la camada.

Resultados

Tabla 7. Efecto global de la dieta sobre la expresión de genes.

| Gene Name | Fold change | Genbank | Description |
|---------------|-------------|--------------|----------------------------------------------------------------------|
| A_44_P1017367 | 3.68 | NM_134326 | albumin |
| A_44_P899616 | 3.29 | XM_574627 | similar to expressed sequence AW413625 (predicted) |
| A_44_P262091 | 3.17 | NM_024162 | fatty acid binding protein 3 |
| A_44_P170738 | 3.01 | XM_341023 | PREDICTED: Rattus norvegicus similar to CD209 antigen; |
| A_44_P931544 | 2.71 | | Q9M628 (Q9M628) Small GTP binding protein RACDP, |
| A_44_P304009 | 2.68 | AW918609 | Similar to expressed sequence AW413625 (predicted) |
| A_44_P379331 | 2.10 | NM_147136 | rRNA promoter binding protein |
| A_44_P605454 | 1.94 | AY325217 | hypothetical protein LOC503325 |
| A_43_P13162 | 1.89 | NM_133315 | solute carrier family 39 (iron-regulated transporter), member 1 |
| A_44_P605461 | 1.85 | NM_147136 | rRNA promoter binding protein |
| A_43_P21762 | 1.82 | NM_001013187 | solute carrier family 25, member 30 |
| A_44_P914875 | 1.81 | | Q9D VW0 (Q9D VW0) PxORF73 peptide, partial (16%) [TC556312] |
| A_44_P136526 | 1.80 | AW918520 | EST349824 Rat gene index, normalized rat, norvegicus. |
| A_44_P723917 | 1.77 | BF402689 | Transcribed locus |
| A_44_P359156 | 1.72 | XM_237323 | synonym: MGC93914; Rattus norvegicus WD repeat and FYVE domain. |
| A_44_P871833 | 1.70 | | |
| A_44_P482267 | 1.67 | NM_134382 | ELOVL family member 5, elongation of long chain fatty acids (yeast) |
| A_44_P819401 | 1.66 | AI407028 | Solute carrier family 39 (iron-regulated transporter), member 1 |
| A_44_P639519 | 1.65 | | CEY66A7A Y66A7A.8 {Caenorhabditis elegans;}, partial (4%) [TC528331] |
| A_44_P538357 | 1.61 | NM_012827 | bone morphogenetic protein 4 |
| A_44_P960566 | 1.61 | | |
| A_44_P583151 | 1.60 | BF402400 | Transcribed locus |
| A_44_P536476 | 1.60 | XM_234038 | Rattus norvegicus similar to mKIAA0230 protein (LOC314016) |

Resultados

Tabla 8. Efecto del tamaño de la camada sobre la expresión de genes.

| Gene Name | Fold change | Genbank | Description |
|--------------|-------------|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| A_42_P759524 | 2.84 | NM_022957 | serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 5 |
| A_42_P659399 | 2.47 | XM_343839 | ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, plasma membrane 3 |
| A_44_P304009 | 2.36 | AW918609 | Similar to expressed sequence AW413625 (predicted) |
| A_44_P362016 | 2.33 | XM_341326 | ADP-ribosyltransferase (NAD ⁺ ; poly (ADP-ribose) polymerase)-like 1 |
| A_44_P437736 | 2.27 | BF398077 | Poliovirus receptor-related 2 (herpesvirus entry mediator B) |
| A_44_P902033 | 2.17 | | |
| A_44_P189814 | 1.96 | XM_344511 | PREDICTED: Rattus norvegicus similar to ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1 |
| A_44_P466866 | 1.94 | XM_220915 | oxysterol binding protein-like 7 (predicted) |
| A_42_P596050 | 1.76 | NM_053572 | MT-protocadherin |
| A_43_P14665 | 1.76 | NM_013097 | deoxyribonuclease I |
| A_44_P945456 | 1.75 | | |
| A_44_P238927 | 1.73 | XM_342486 | similar to Kinesin family member 18A (predicted) |
| A_44_P501292 | 1.70 | XM_344800 | PREDICTED: Rattus norvegicus similar to ribosomal protein L19 (LOC365061) |
| A_42_P495969 | 1.70 | NM_012824 | apolipoprotein C-I |
| A_44_P251228 | 1.69 | NM_012940 | cytochrome P450, family 1, subfamily b, polypeptide 1 |

Tabla 9. Efecto del tamaño de la camada y dieta sobre la expresión de genes.

| Gene Name | Grupos comparados | Fold change | Description |
|--------------|-------------------|-------------|---------------------------------------------------|
| A_43_P14911 | SLHF vs NLHF | 4.93 | interleukin 1 beta |
| A_44_P402536 | NLHF vs NLLF | 7.64 | leptin |
| A_43_P11614 | NLHF vs NLLF | 5.17 | annexin A1 |
| A_43_P11513 | NLHF vs NLLF | 0.44 | tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2) |
| A_44_P393531 | NLHF vs NLLF | 4.63 | adiponectin |

Resultados

4.1.5. Efecto del programming neonatal y de la dieta sobre la expresión de citoquinas proinflamatorias en la fracción de estroma vascular

Después de comprobar la adecuada amplificación de citoquinas en gel de agarosa (Figura 22), discriminamos las muestras mediante amplificación previa con RT-PCR para evitar contaminación por adipocitos (Figura 23).

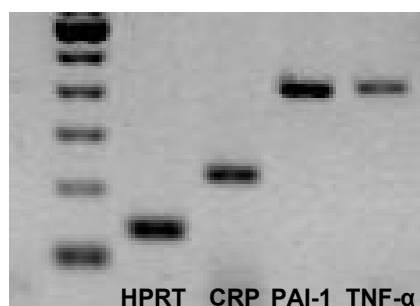


Figura 22. Gel de agarosa de producto de PCR de SVF con *hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase* (HPRT), proteína C reactiva (CRP), inhibidor tipo 1 del activador del plasminógeno (PAI-1) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α).

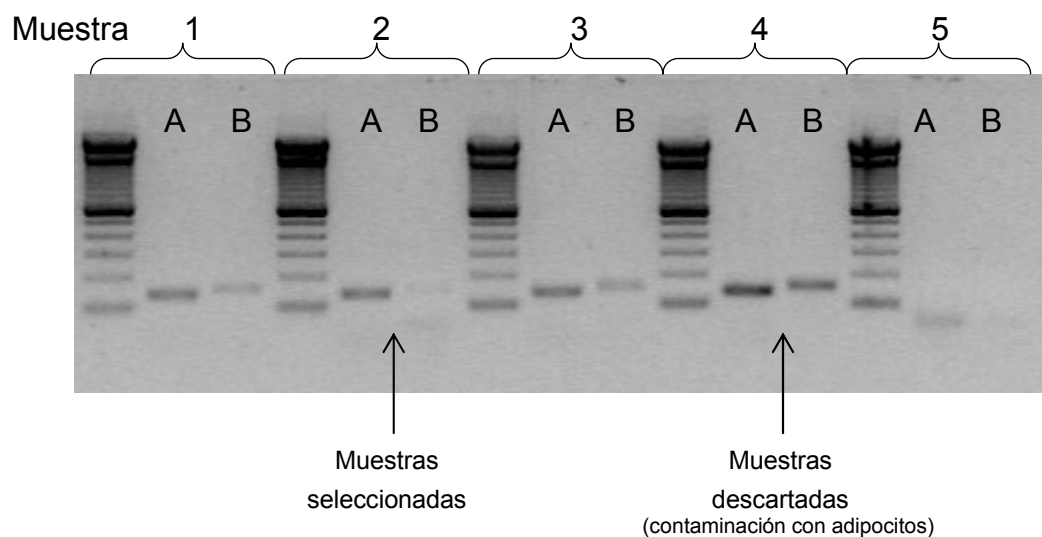


Figura 23. Gel de agarosa de productos de amplificación de SVF, mostrando el criterio de selección de las muestras. Cada muestra se corrió con el marcador de peso, un primer pocillo (A) con HPRT y un segundo pocillo (B) con resistina.

Resultados

Los resultados de RT-PCR a los 90 días (n = 4 por grupo) muestran que la expresión de PAI-1 fue significativamente menor en las camadas de tamaño normal alimentadas con LF (Figura 24A), efecto que se pierde a los 122 días (Figura 24B). MCP-1 alcanza mayores niveles con significancia estadística en las más obesas (SLHF) vs las camadas de tamaño normal independientemente del tipo de dieta (Figura 24C); dicha diferencia se perdió a los 122 días (Figura 24D). CRP también fue mayor en las más obesas (Figura 24E) y a los 122 días se perdió la diferencia (Figura 24F).

Por otra parte, TNF- α , IL-1 β e IL-6 no tuvieron diferencias significativas ni a los 90 días ni a los 122 días (Figuras 25).

Resultados

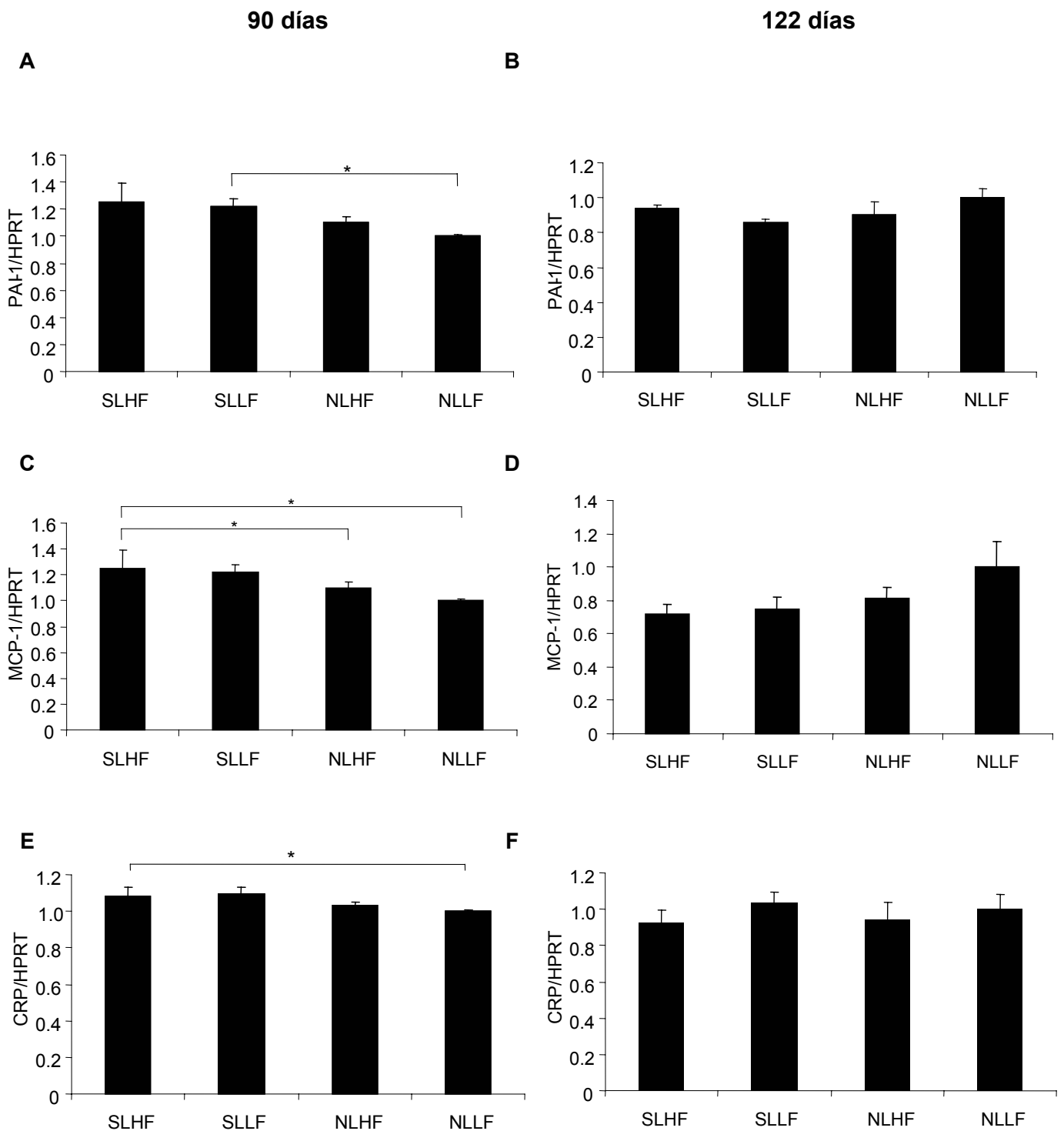


Figura 24. PCR en tiempo real (*Light Cycler*) de citoquinas proinflamatorias. Inhibidor tipo 1 del activador del plasminógeno (PAI-1) a los A) 90 días y B) 122 días, proteína quimioatrayente tipo 1 de monocitos (MCP-1) a los C) 90 días y D) 122 días y proteína C reactiva (CRP) a los E) 90 días y F) 122 días. *: $p < 0.05$ entre los grupos indicados.

Resultados

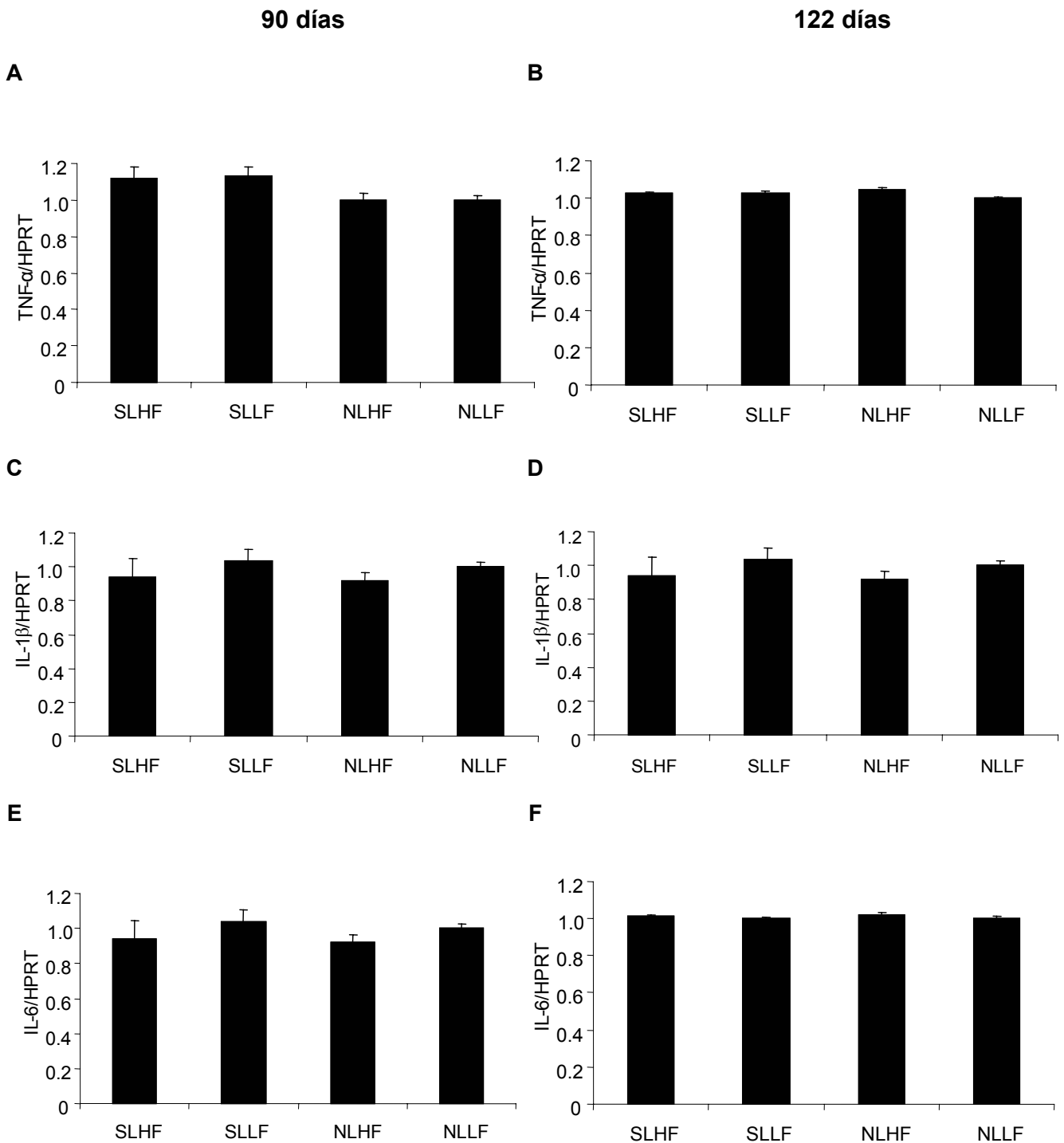


Figura 25. PCR en tiempo real (*Light Cycler*) de citoquinas proinflamatorias. Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) a los A) 90 días y B) 122 días, interleuquina 1 beta (IL-1 β) a los C) 90 días y D) 122 días e interleuquina 6 (IL-6) a los E) 90 días y F) 122 días.

Resultados

4.1.6. Efecto del programming neonatal y de la dieta sobre la expresión de genes de hipoxia en SVF

A los 90 días (n = 8 por grupo), la expresión intracamada de HIF-1 α fue mayor en las SLHF (Figura 26A) y a los 122 días no hubo diferencia estadísticamente significativa entre los grupos (Figura 26B). HIF-2 se expresó de manera intensa en las SLHF a los 90 días (Figura 26C), con diferencia estadísticamente significativa en relación a las camadas de tamaño normal independientemente del tipo de dieta recibida y dicha diferencia se pierde a los 122 días (Figura 26D). HO-1 estuvo relativamente aumentado a los 90 días en las camadas con HF, habiendo diferencia significativa entre las NLHF vs SLLF y SLHF (Figura 26E), diferencia que se pierde a los 122 días (Figura 26F). eNOS estuvo disminuida a los 90 días en las ratas alimentadas con HF (Figura 27A), diferencias que se pierden a los 122 días (Figura 27B) e incluso en SLHF aumentó más que en los otros grupos. Hepcidina a los 90 días estuvo mucho más expresada en las ratas más obesas (SLHF) con relación a las menos obesas (NLLF) (Figura 27C), diferencia que se perdió a los 122 días (Figura 27D). Finalmente, no se observaron diferencias significativas en la expresión de lipocortina, ni a los 90 días (Figura 27E) ni a los 122 días (Figura 27F).

Resultados

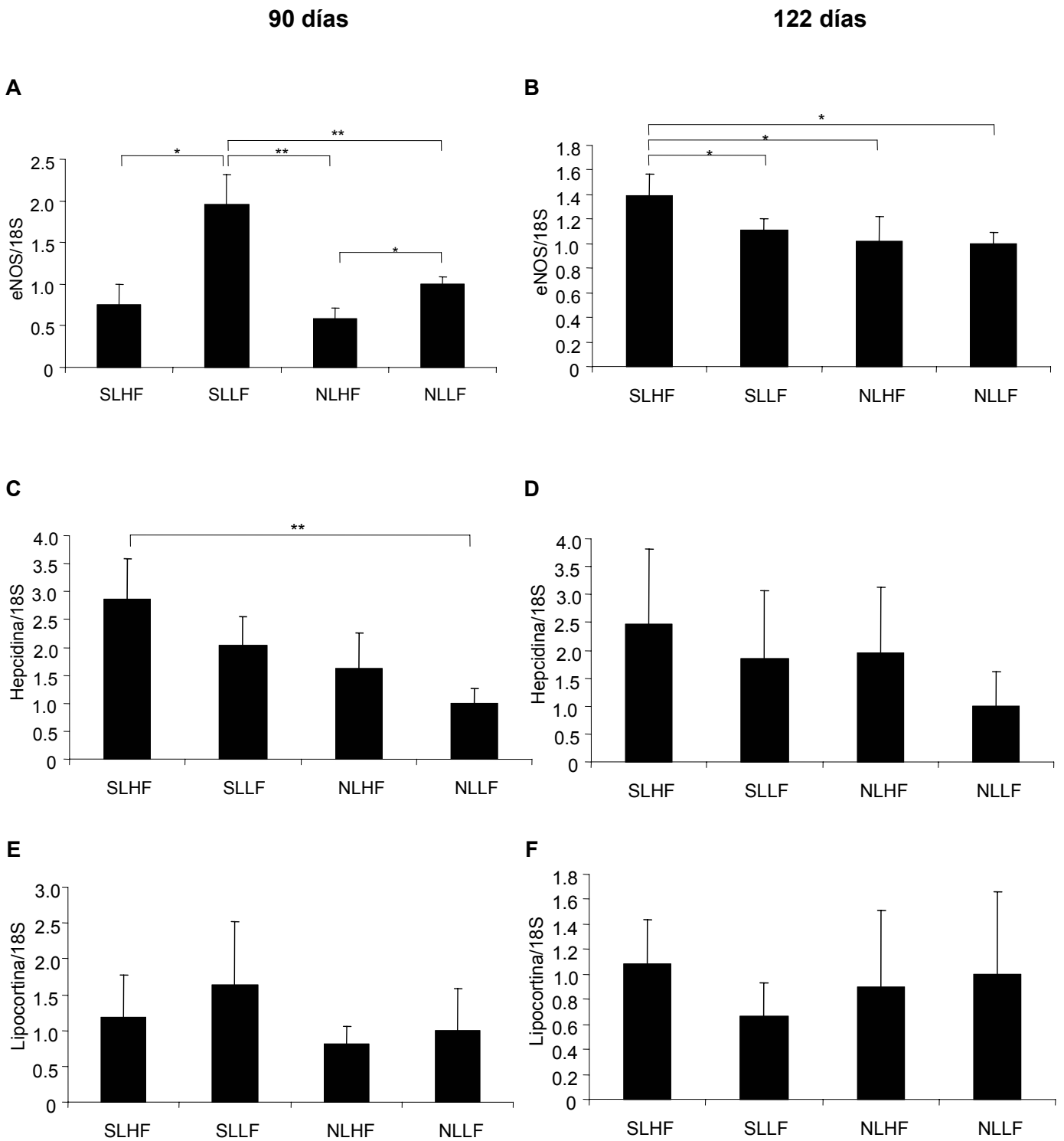


Figura 27. PCR en tiempo real (*TaqMan*®) de genes de hipoxia. Enzima óxido nítrico sintetasa (eNOS) a los A) 90 días y B) 122 días, hepcidina a los C) 90 días y D) 122 días y lipocortina a los E) 90 días y F) 122 días. *: $p < 0.05$. **: $p < 0.01$ entre los grupos indicados.

Resultados

4.1.7. Efecto del programming neonatal y de la dieta sobre el metabolismo lipídico en hígado y tejido adiposo

Hígado

En hígado, a los 90 días, la expresión de ACC α fue mayor en las camadas menos pesadas (NLLF), con diferencia estadísticamente significativa en relación a las camadas de tamaño normal independientemente del tipo de dieta (Figura 28A). En la expresión de FAS hubo diferencia estadísticamente significativa entre las camadas SL y NL alimentadas con LF (Figura 28B). En la expresión de SREBP-1c no encontramos diferencias estadísticamente significativas (Figura 28C).

Tejido adiposo

En vWAT, a los 90 días, encontramos diferencia significativa en la expresión de ACC α en las camadas pequeñas, siendo menor en las ratas más obesas (SLHF) (Figura 29A). Por su parte, FAS fue menor en las camadas de tamaño normal alimentadas con HF (Figura 29B).

INSIG-1 fue mayor en las ratas más obesas (SLHF), con diferencia significativa en relación a las alimentadas con LF de camadas de su mismo tamaño (SLLF) y con las más delgadas (NLLF) (Figura 29C). INSIG-2 fue menor en las camadas alimentadas con LF, pero además, fue menor incluso en las NLLF comparándolas con las SLLF (Figura 29D); mientras que la expresión SREBP-1c no presentó diferencias significativas (Figura 29E).

Resultados

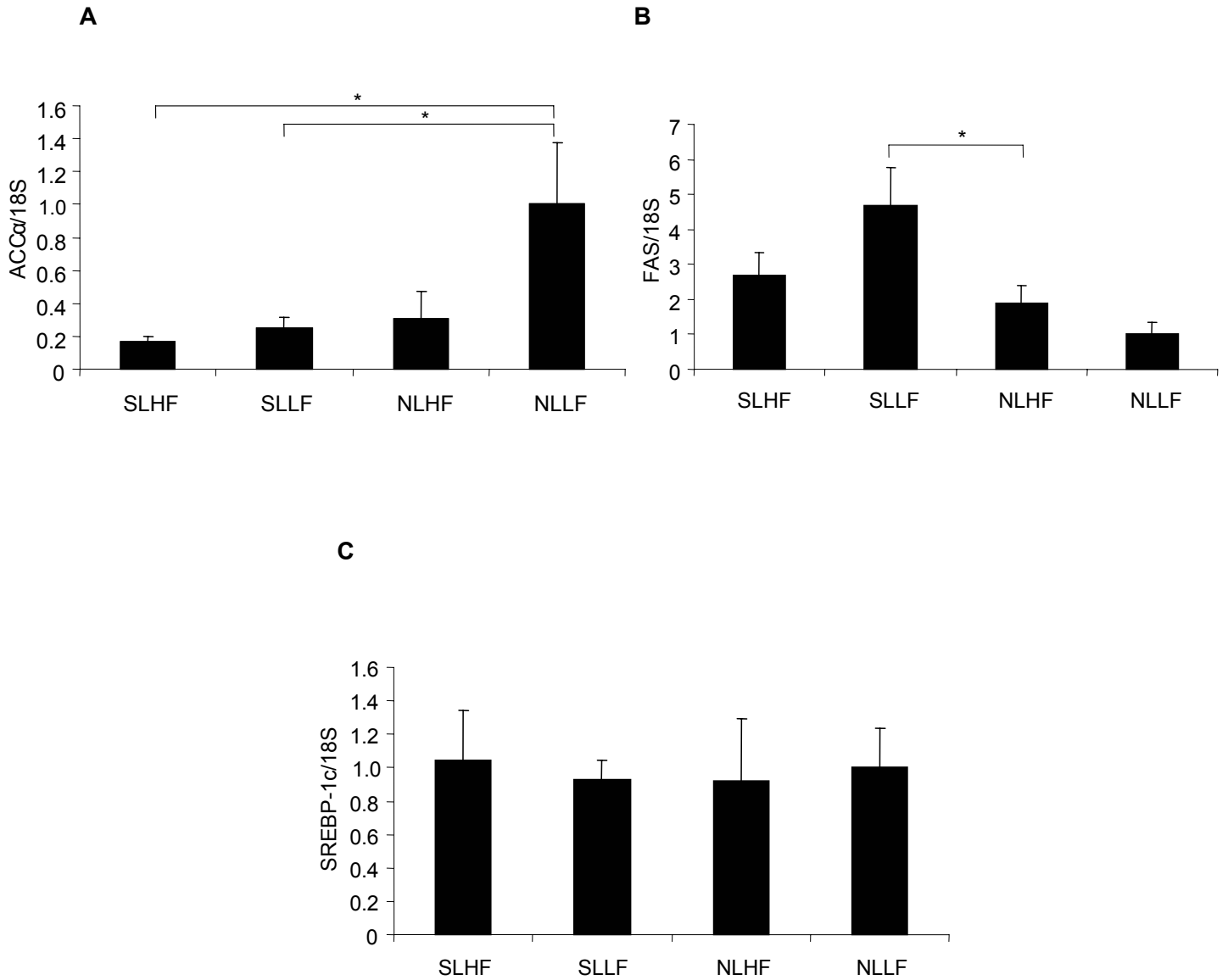


Figura 28. PCR en tiempo real (*TaqMan*[®]) de expresión en hígado a los 90 días de A) Acetil-CoA carboxilasa alfa (ACCα), B) sintasa de ácidos grasos (FAS), C) proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides- 1c (SREBP-1c). *: $p < 0.05$ entre los grupos descritos.

Resultados

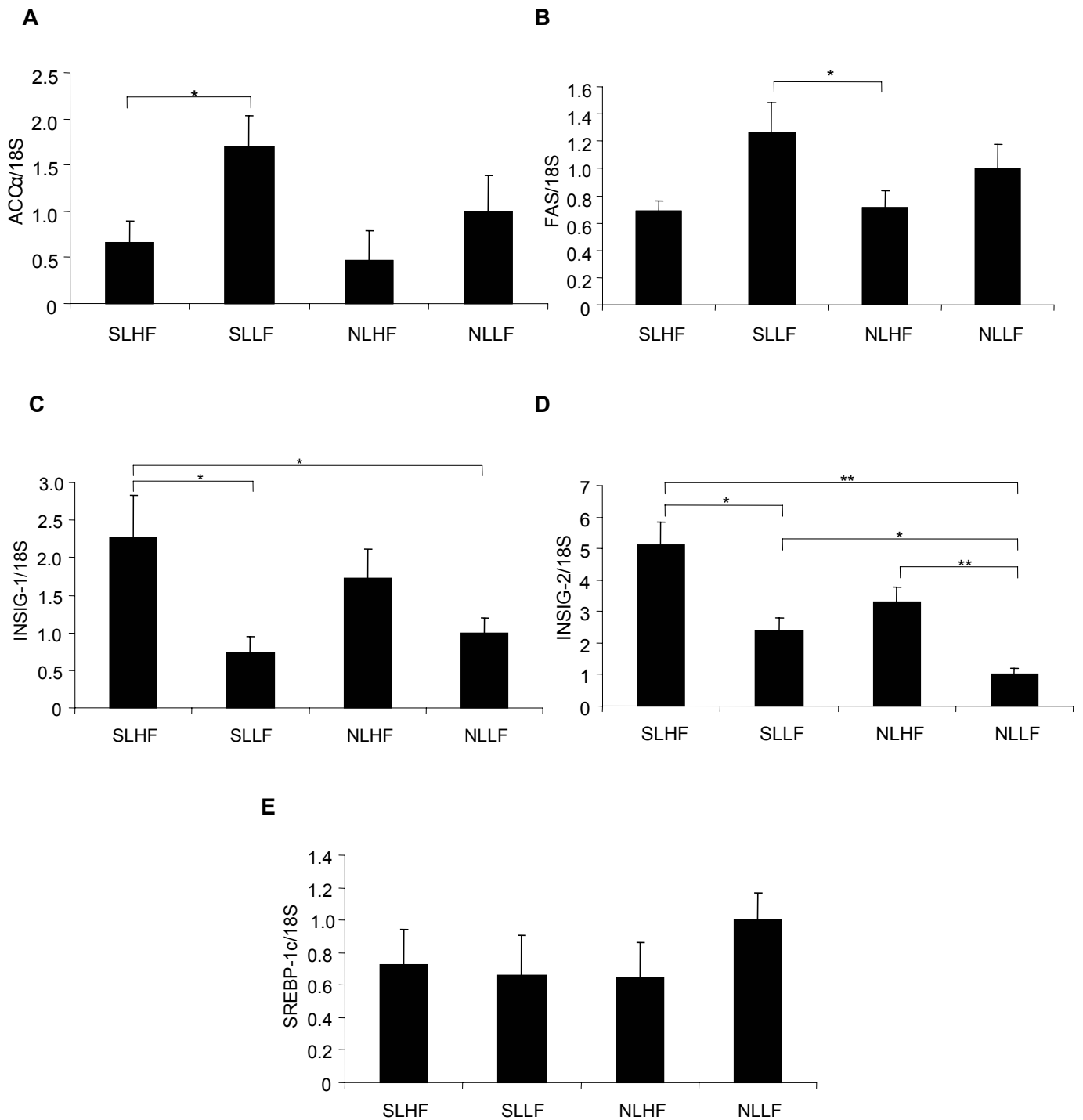


Figura 29. PCR en tiempo real (*TaqMan*[®]) de expresión en tejido adiposo a los 90 días de A) Acetil-CoA carboxilasa alfa (ACCα), B) sintasa de ácidos grasos (FAS), C) gen inducido por insulina tipo 1 (INSIG-1), D) gen inducido por insulina tipo 2 (INSIG-2) y E) proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides (SREBP-1c). *: $p < 0.05$. **: $p < 0.01$ entre los grupos descritos.

Resultados

4.1.8. Efecto del programming neonatal y de la dieta sobre el metabolismo lipídico hipotalámico

AMPK, enzima que responde al estado energético y que está implicada en la regulación de glucosa, homeostasis lipídica y sensibilidad a insulina (Bergeron R, 2001; Fisher JS, 2002; Iglesias MA, 2002; Kahn BB, 2005), puede activarse por fosforilación (pAMPK) por diversas causas que incrementan la relación AMP/ATP como ejercicio, TZD y hipoxia, (Ruderman N, 2004). Evidencias recientes han demostrado que AMPK juega un papel fundamental en la regulación de la ingesta en el hipotálamo (Minokoshi Y, 2004; Kahn BB, 2005; López M, 2008).

En nuestro estudio, la expresión de pAMPK fue menor en ratas alimentadas con HF (Figura 30A). pACC fue menor en las camadas de tamaño normal alimentadas con HF en relación a las SLLF (Figura 30B). En las camadas con sobrealimentación perinatal, los niveles de AMPK alfa 1 (AMPK α 1) fueron mayores en las ratas alimentadas con HF (Figura 31A), mientras que AMPK alfa 2 (AMPK α 2) no tuvo diferencias (Figura 31B). FAS fue mayor en las camadas pequeñas (Figura 32A) y ACC α no presentó diferencias (Figuras 32B).

Resultados

(Con el fin de ser más ilustrativos, el orden de las columnas se ha ajustado al orden de los geles).

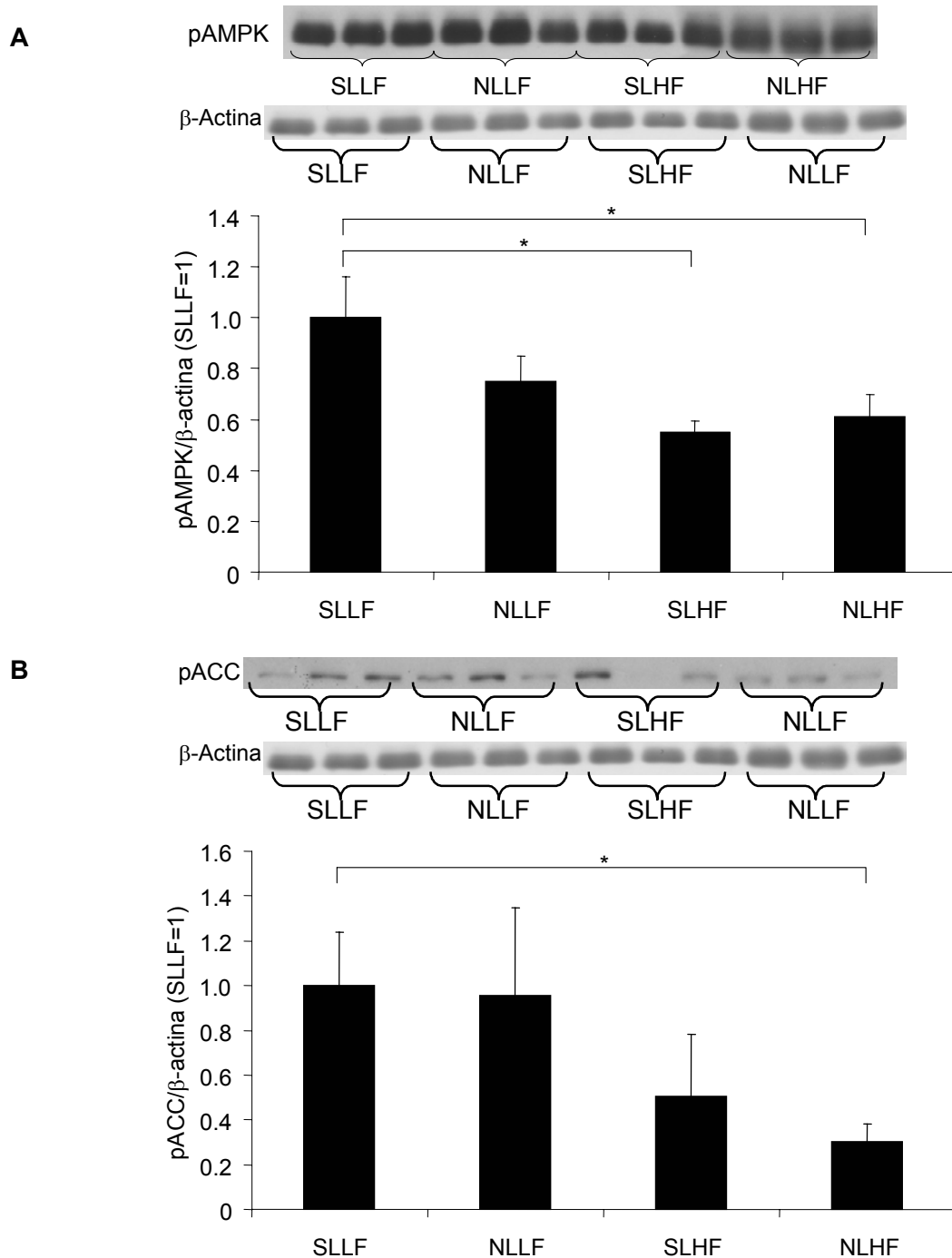
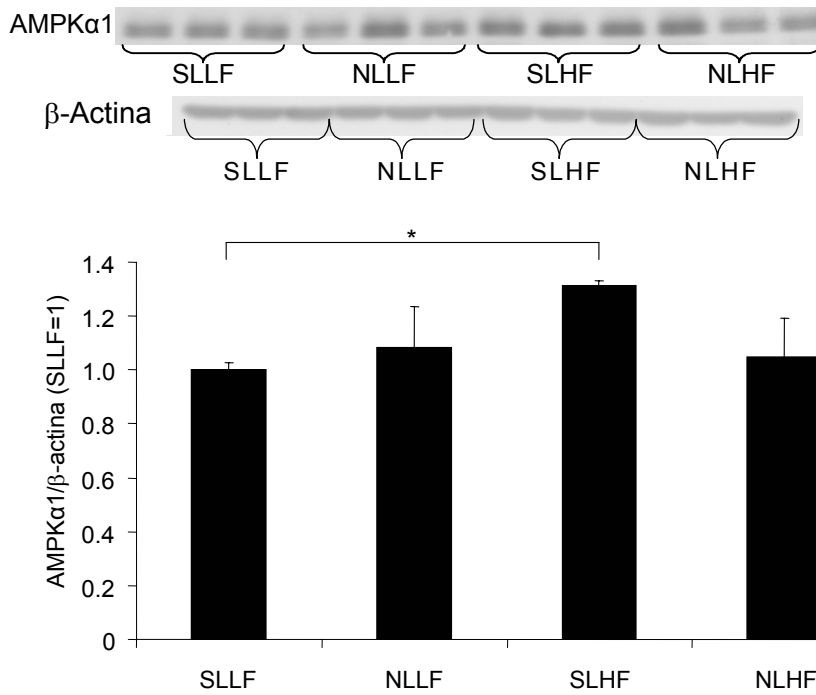


Figura 30. Western Blot de A) AMP kinasa fosforilada (pAMPK). Parte superior: gel de poliacrilamida. Parte inferior: gráfica de la relación pAMPK/ β -actina y B) Acetil-CoA carboxilasa fosforilada (pACC). Parte superior: gel de poliacrilamida. Parte inferior: gráfica de la relación pACC/ β -actina *: $p < 0.05$ entre los grupos indicados.

Resultados

A



B

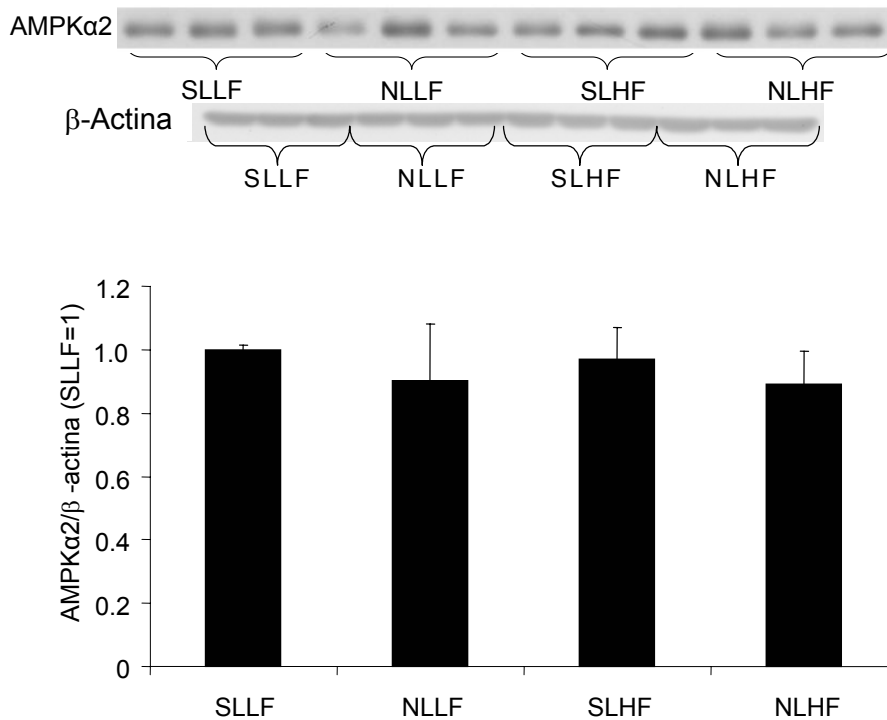


Figura 31. Western Blot de A) AMP quinasa alfa 1 (AMPK α 1). Parte superior: gel de poliacrilamida. Parte inferior: gráfica de la relación AMPK α 1/ β -actina y B) AMPK α 2. Parte superior: gel de poliacrilamida. Parte inferior: gráfica de la relación AMPK α 2/ β -actina. *: $p < 0.05$ entre los grupos indicados.

Resultados

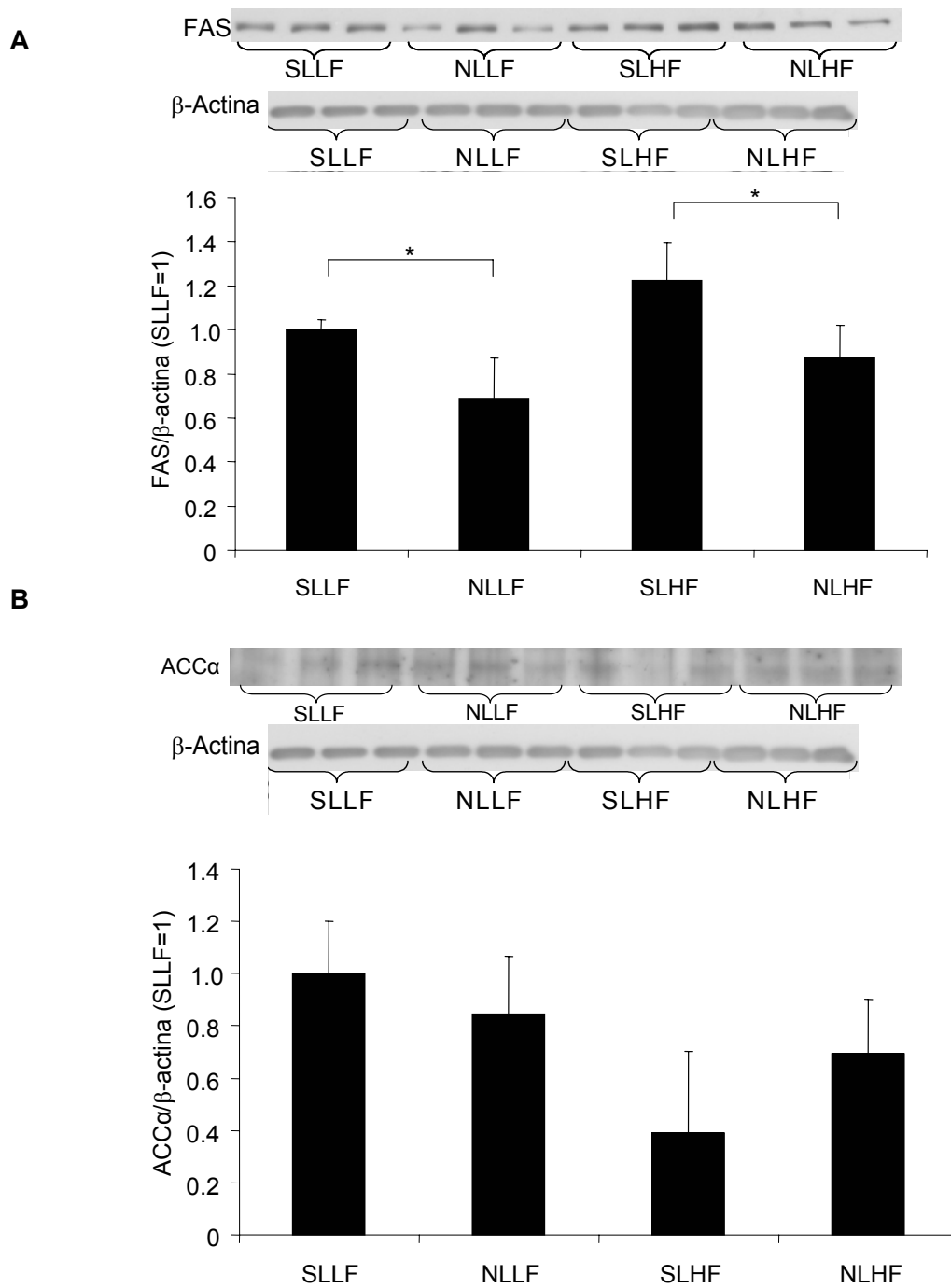


Figura 32. Western Blot de A) sintasa de ácidos grasos (FAS). Parte superior: gel de poliacrilamida. Parte inferior: gráfica de la relación FAS/ β -actina, B) Acetil-CoA carboxilasa alfa (ACC α). Parte superior: gel de poliacrilamida. Parte inferior ACC α / β -actina. *: $p < 0.05$ entre los grupos indicados.

Resultados

4.1.9. Efecto del programming neonatal y de la dieta sobre la expresión de neuropéptidos hipotalámicos

A los 90 días de edad, AgRP tuvo una mayor expresión en caso de alimentación con HF independientemente del tamaño de camada (Figura 33A). NPY no presentó diferencias significativas (Figura 33B). La expresión de POMC fue menor en las camadas SLHF, con diferencia significativa en relación a las SLLF (Figura 34A). Por su parte, la expresión de CART en el ARC fue menor en las ratas SLHF, con significancia estadística en relación a los otros grupos (Figura 34B).

Resultados

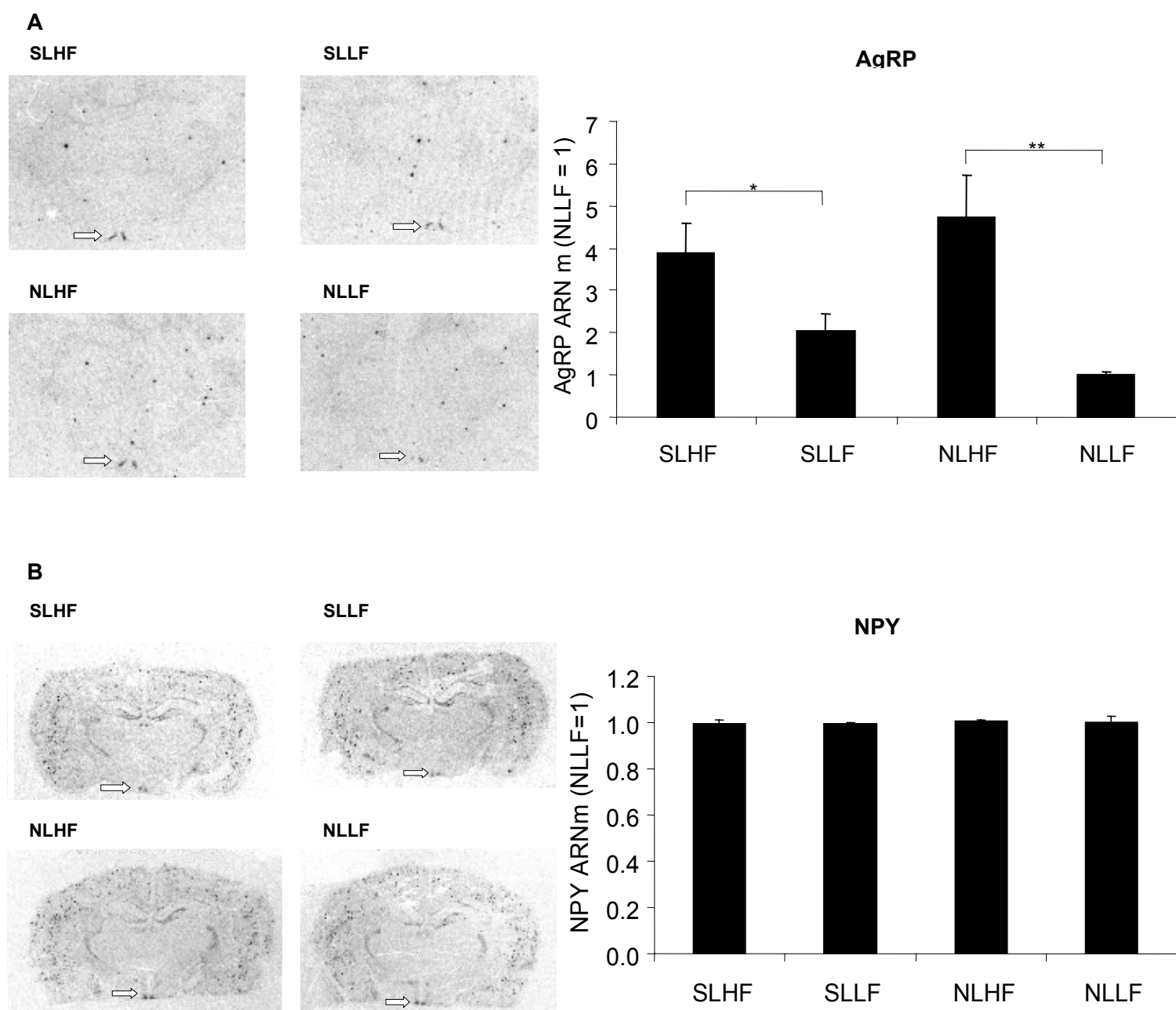


Figura 33. Hibridación in situ a los 90 días de edad con dieta HF/LF. A) péptido relacionado con agutí (AgRP). B) neuropéptido Y (NPY). Panel izquierdo: Cortes coronales de hipotálamo incubado con $[^35\text{S}]$. Panel derecho: niveles de ARNm de AgRP/NPY en los grupos descritos. *: $p < 0.05$. **: $p < 0.01$ entre los grupos indicados.

Resultados

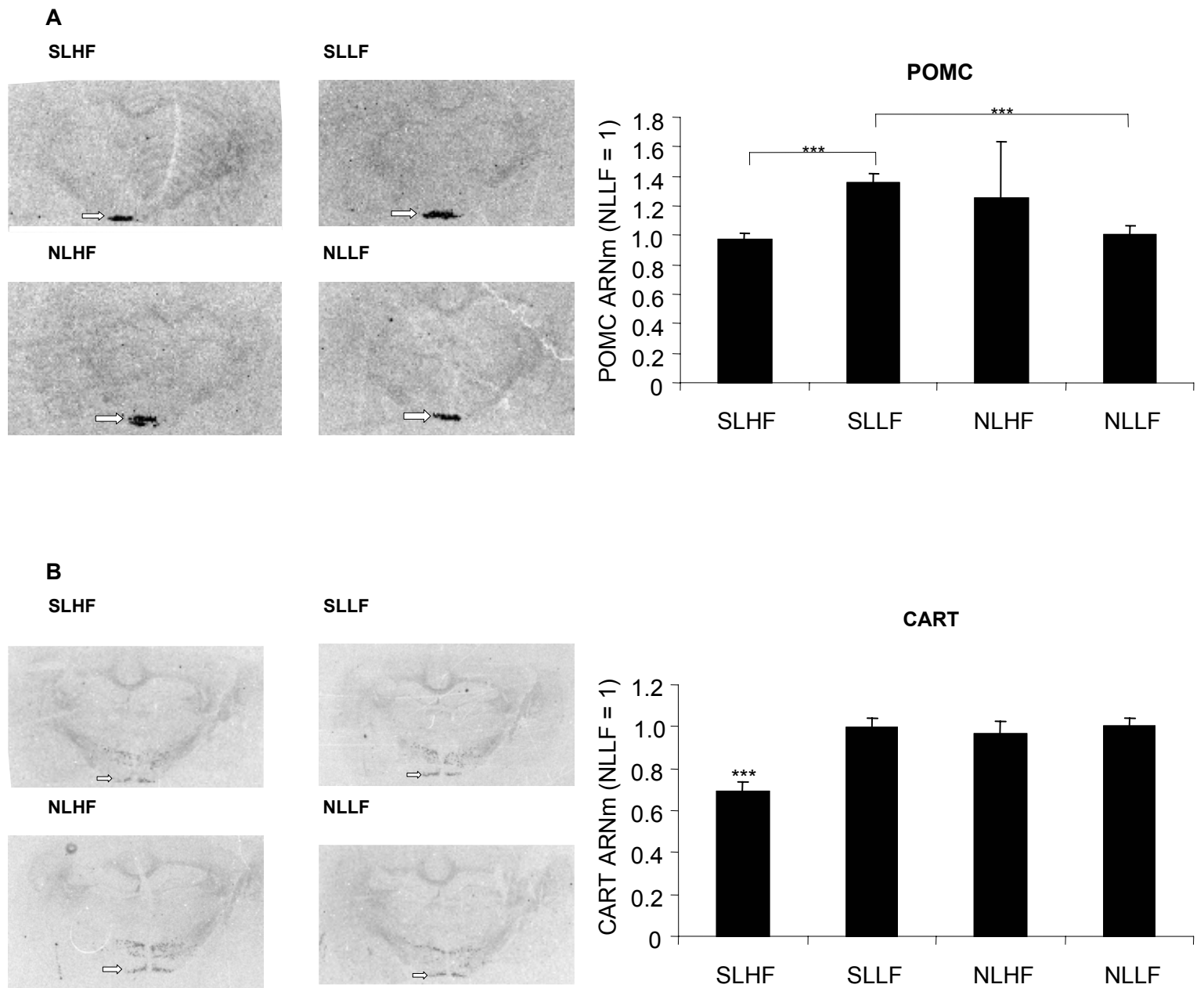


Figura 34. Hibridación in situ a los 90 días de edad con dieta HF/LF. A) proopiomelanocortina (POMC). B) transcrito regulado por cocaína y anfetamina (CART). Panel izquierdo: Cortes coronales de hipotálamo incubado con $[\alpha^{35}\text{S}]$. Panel derecho: niveles de POMC/CART. ***: $p < 0.001$ entre los grupos indicados.

Resultados

4.2. Efectos del bypass biliopancreático + gastrectomía con anastomosis gastrointestinal en Y de Roux

4.2.1. Masas e ingestas

Las ratas sometidas a BPBP-RYGB (Figuras 35A y 35B), iniciaron con una masa promedio de 437.51 ± 10.62 g y después de un mes de la intervención pesaron en promedio 359.08 ± 14.24 g, lo cual representó una pérdida del 17.92%. Por el contrario, el grupo control (solamente incisión abdominal) inició con una masa de 445.08 ± 13.7 g y terminó con 500.25 ± 12.66 g (ganancia de 12.39%) (Figura 36A).

A



B

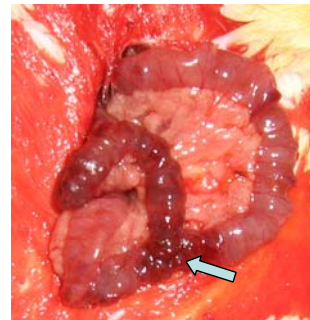


Figura 35. Fotografías de las anastomosis quirúrgicas. A) Anastomosis gastro-yeyunal (señalada y comparada con la tapa de una jeringa de 1 ml). B) Anastomosis yeyuno-íleon (señalada por una flecha azul).

En relación a la ingesta, el grupo de BPBP-RYGB antes de la intervención ingirió 73.15 ± 3.28 kcal/día y al mes postcirugía 63.68 ± 8.66 kcal/día; el grupo control antes de la cirugía ingirió 79.13 ± 4.11 kcal/día y a las cuatro semanas 90.85 ± 3.1 kcal/día (Figura 36B). De manera interesante, al ajustar la ingesta por 100 g de masa, a partir de la tercera semana prácticamente no hay diferencia entre los grupos (Figura 37A). Entre BPBP-RYGB y un grupo *pairfed* (ratas sham que recibieron la cantidad de comida ingerida por una rata operada el día previo) la masa en las operadas descendió de manera drástica (Figura 37B).

Resultados

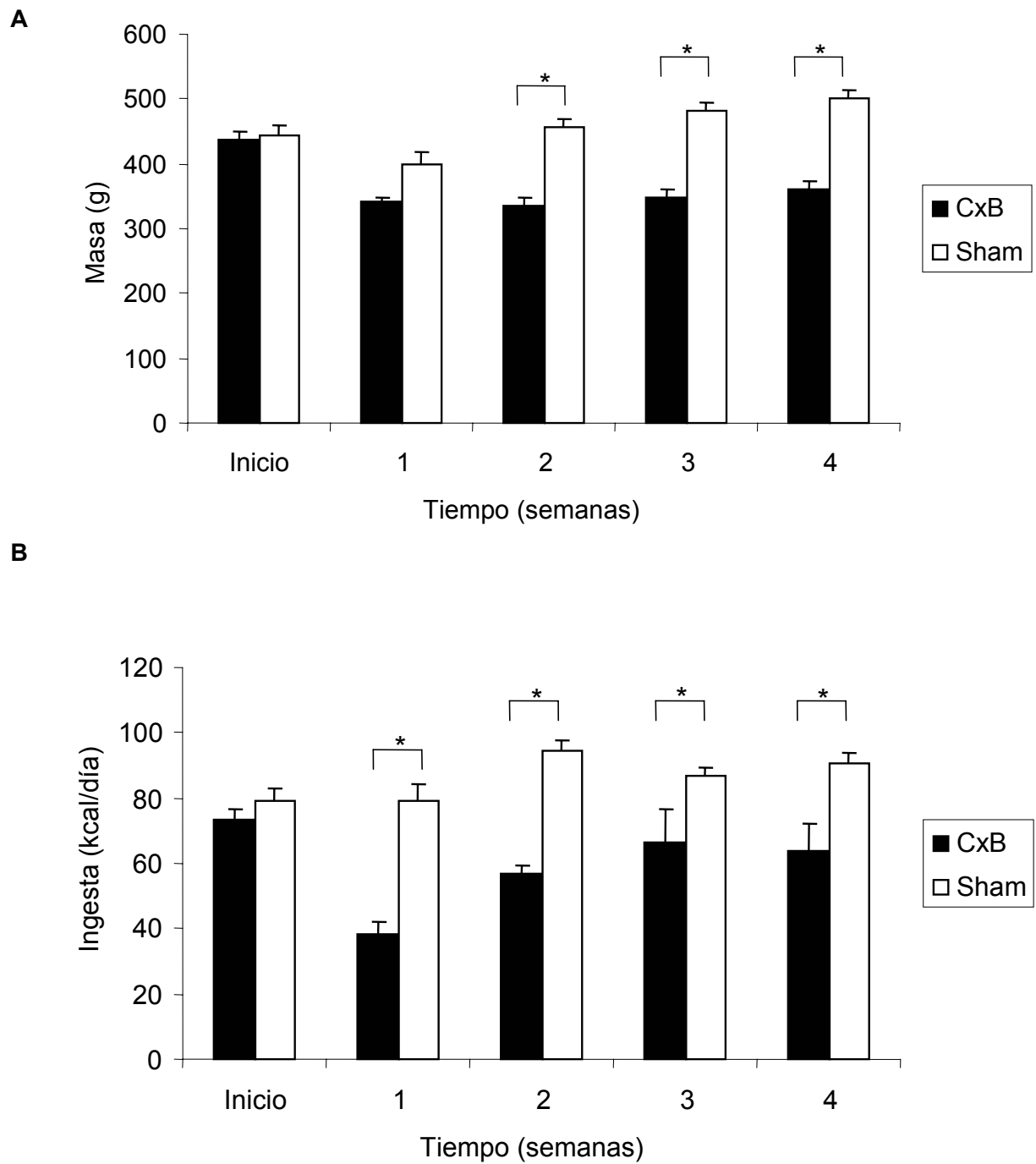
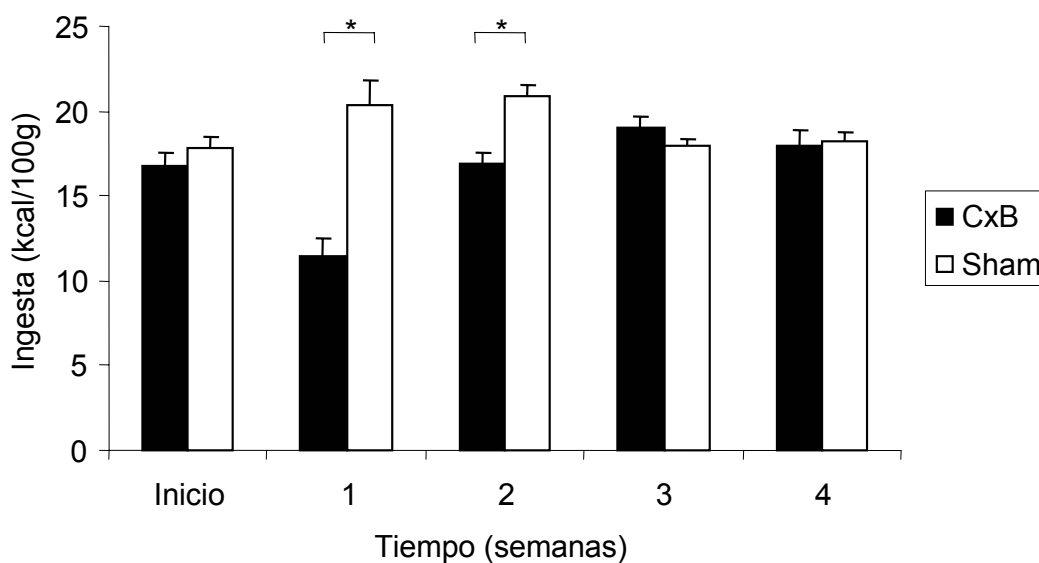


Figura 36. A) Masas en ratas Sprague Dawley sometidas a cirugía bariátrica (CxB). B) Ingesta en ratas Sprague Dawley sometidas a CxB. *: $p < 0.05$.

Resultados

A



B

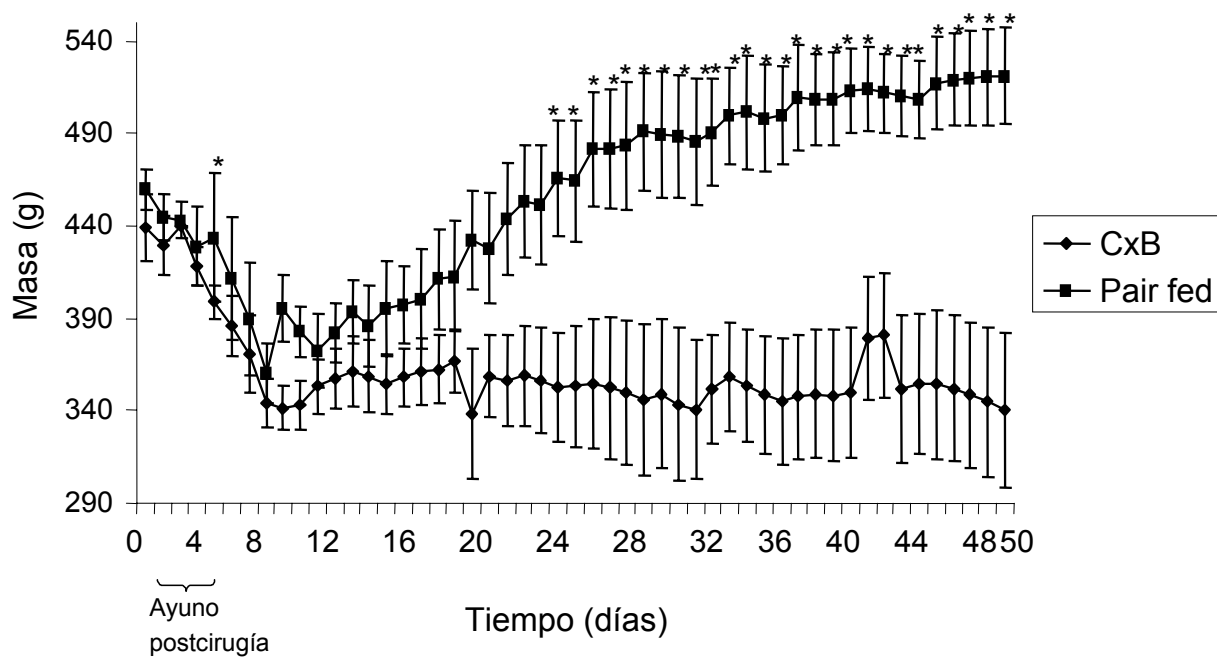


Figura 37. A) Ingesta ajustada por 100 g de masa. B) Evolución ponderal durante 50 días. CxB: Cirugía bariátrica. *: p < 0.05.

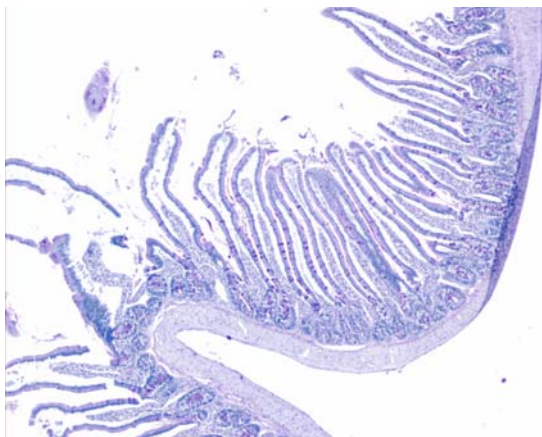
Resultados

4.2.2. Cambios histológicos en el tracto gastrointestinal tras la cirugía bariátrica

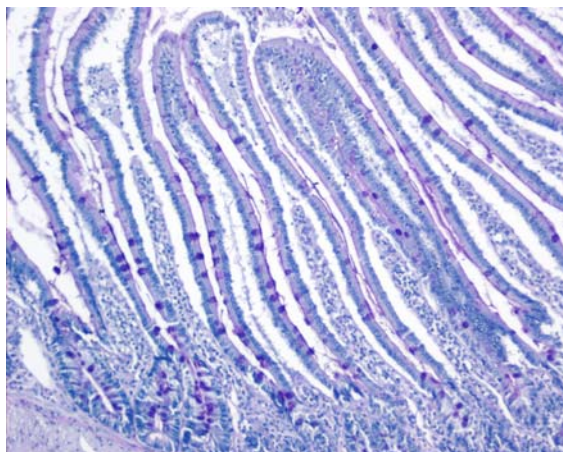
Al comparar las Sham con las operadas se aprecia un marcado alargamiento de las vellosidades intestinales en las sometidas a cirugía bariátrica (Figura 38A y Figura 38B), y se observan zonas de atrofia tanto en las Sham como en las operadas (Figura 38).

Cirugía bariátrica

A

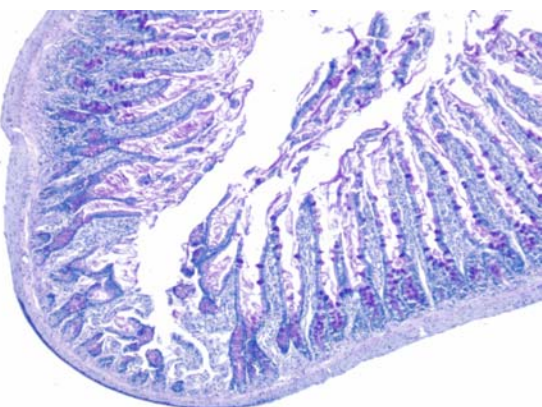


B



Sham

C



D

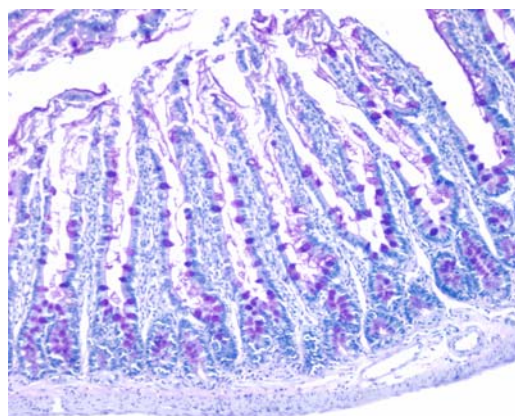


Figura 38. Histología con tinción de ácido periódico de Schiff (PAS). A) Asa alimentaria de cirugía bariátrica (Cx), X4. B) Detalle de A, donde se aprecia el alargamiento de las vellosidades intestinales, X10. C) Íleon de Sham, X4. D) Detalle de C, para observar las vellosidades intestinales, X10.

Resultados

Al hacer los estudios específicos de IHQ, se encontró que la expresión de ghrelin está más disminuida en el estómago residual de la BPBP-RYGB (Figura 39).

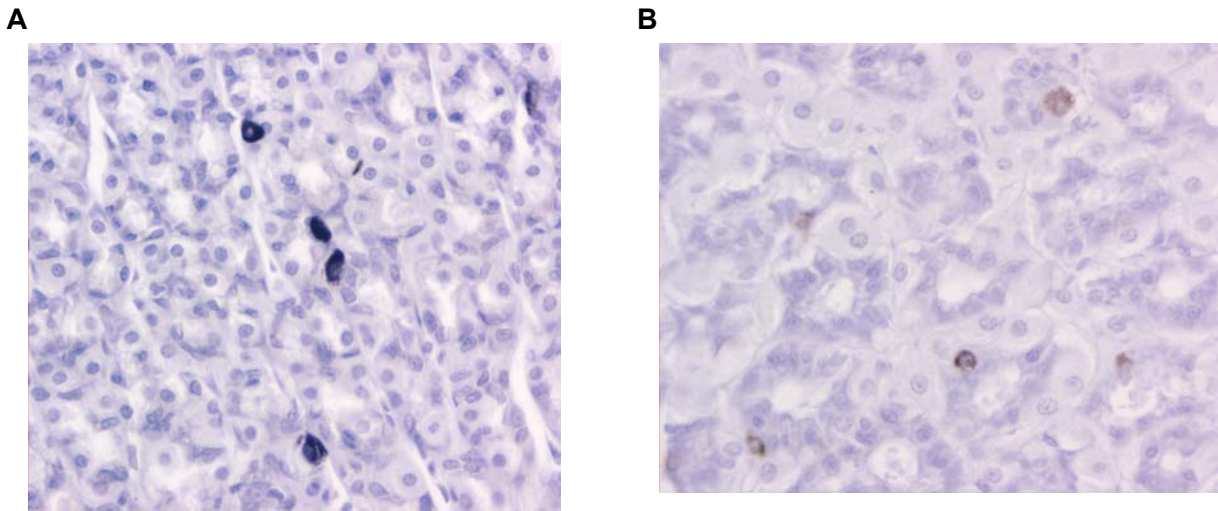


Figura 39. Inmunohistoquímica para ghrelin. A) Estómago resecado en cirugía bariátrica X40. B) Estómago residual X40.

Resultados

Cuando se estudian las muestras a cincuenta días, a simple vista se observa claramente un aumento del diámetro de las asas alimentarias de ratas sometidas a cirugía (Figura 40A). Histológicamente, en diversas zonas de las asas alimentarias de las ratas operadas se observa una pared más gruesa, con un mayor desarrollo de las vellosidades (más largas) (Figura 40B). También existen áreas de pared más fina, con vellosidades rotas, incluso con epitelio destruido. Sin embargo, esto ocurre también en las ratas PF (Figura 40C).

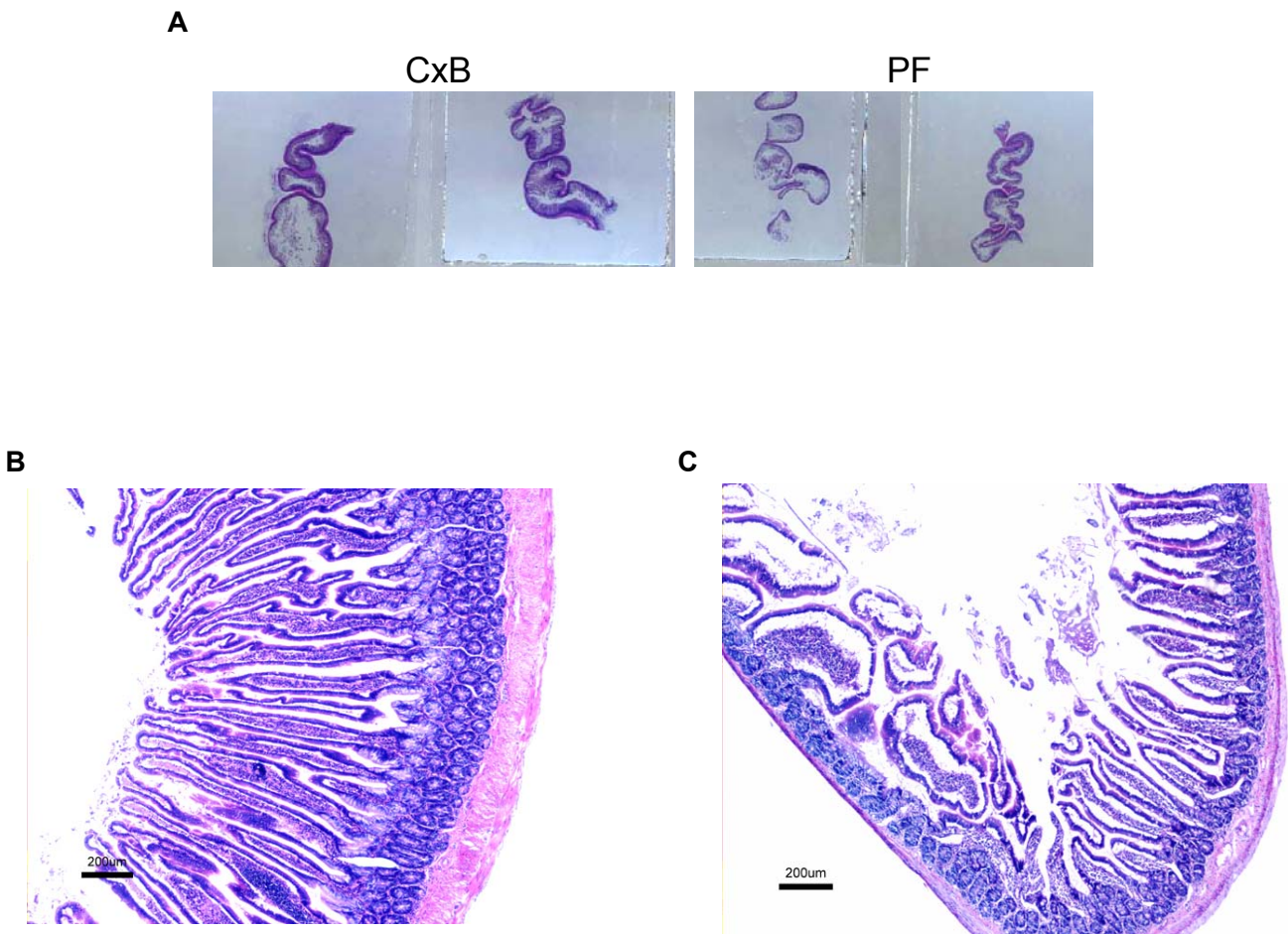


Figura 40. Estudio histológico del intestino a 50 días postcirugía. A) Cortes histológicos observados a simple vista. 1X. B) Tinción con hematoxilina-eosina de asa alimentaria a 50 días después de CxB. 10X C) Tinción con hematoxilina-eosina de íleon distal a 50 días después de cirugía, PF. 10X. CxB: cirugía bariátrica, PF: Pairfed.

Resultados

4.3. Resumen de resultados

4.3.1. Efecto del programming neonatal y de la dieta sobre la masa e ingesta

De cara a desarrollar fenotipos obesos, la sobrealimentación neonatal es mucho más importante que el exceso de calorías en el estado adulto.

4.3.2. Efecto del programming neonatal y de la dieta sobre los niveles de adipoquinas y ghrelin

La alimentación neonatal influye de forma muy marcada en los niveles de adiponectina y leptina, pero no en los de ghrelin en la vida adulta. La dieta HF/LF influye de forma muy marcada sobre los niveles de ghrelin y leptina pero en menos medida sobre Adiponectina a los 90 días.

4.3.3. Efecto del programming neonatal y de la dieta sobre la expresión génica

4.3.3.1. Citoquinas en SVF

Existe una tendencia a haber mayores niveles de citoquinas proinflamatorias en las camadas alimentadas con dieta HF, principalmente PAI-1, MCP-1 y CRP.

4.3.3.2. Genes de hipoxia en SVF

La HF disminuye la expresión de eNOS y estimula la de HO-1 en SVF (ambos antiinflamatorios). Hecpidina se encuentra aumentada en las SLHF por lo que pudiera ser

Resultados

un nuevo marcador semejante a CRP. Como también aumentan HIF-1 y 2, que contribuyen a la angiogénesis, se deduce que la hipoxia induce la expresión de genes con efectos protectores e inflamatorios, manteniéndose un equilibrio, a menos que el estímulo agresor, en este caso la obesidad, persista, situación en la cual el efecto total se decanta a favor de los genes proinflamatorios.

4.3.3.3. Enzimas metabólicas

En las ratas SLHF la expresión de FAS se vio disminuida en hígado y WAT y aumentada en hipotálamo, en este mismo tejido y grupo estuvo aumentada la expresión de AMPK α 1, mientras que pAMPK y pACC estuvieron aumentadas en las SLLF.

4.3.4. Efecto del programming neonatal y de la dieta sobre la expresión de neuropéptidos

La dieta de alto contenido graso estimuló la expresión de AgRP, mientras que la expresión de CART y POMC se suprimió en caso de sobrealimentación neonatal más dieta de alto contenido graso.

Resultados

4.3.5. Efecto de la cirugía bariátrica sobre la homeostasis energética

La pérdida ponderal no se atribuye a menor ingesta cuando se corrige por masa. La longitud de las vellosidades se encuentra aumentada, lo que podría contribuir a la menor absorción de nutrientes, pero el alargamiento observado de las mismas podría explicar, al menos parcialmente, la recuperación de masa a mediano y largo plazo después de la cirugía bariátrica.

Resultados

5. DISCUSIÓN

Discusión

Discusión

5.1. Masas e ingestas

Cada vez se acepta y conoce más del impacto del entorno durante la temprana etapa postnatal sobre la determinación de procesos fundamentales de la vida. En particular las investigaciones e hipótesis de los grupos de Hales y Barker llevaron a la postulación del síndrome del bebé pequeño, caracterizado por un fenotipo desnutrido (Hales CN, 1992; Barrer DJP, 1998). Este concepto ha contribuido a la atención mundial del fenómeno de condicionamiento epigenético temprano y de términos como programación nutricional e impronta. Está ya sin discusión que los problemas metabólicos están relacionados y que, en parte, son el resultado de las influencias epigenéticas por enfermedades metabólicas de la madre y otras influencias durante la etapa fetal y temprana del nacimiento, aunadas a los malos hábitos durante el resto de la vida (Junien C, 2005).

Actualmente existe un gran interés en explicar el potencial de la nutrición prenatal sobre la influencia a largo plazo sobre la adiposidad y trastornos metabólicos asociados que se han corroborado en humanos (Ravelli G, 1976; Ravelli AC, 1999). Nuestro grupo en particular ha tenido interés en investigar factores presentes en la etapa neonatal que puedan condicionar un fenotipo obeso en edad adulta (López M, 2005a; López M, 2007b). Para estudiar las consecuencias de la obesidad sobre el metabolismo un modelo muy útil es el de las camadas de rata, con el cual se ha descrito una correlación positiva entre la ganancia de masa en la primera semana de vida, preferencia por dieta grasa e incremento de norepinefrina ante el estímulo de glucosa como predictores de obesidad (Levin BE, 1992; Gayles EC, 1997; Wang J, 1998).

Son escasos los estudios que evalúan el efecto a largo plazo de los roedores sobrealimentados sobre la masa, ingesta y estado metabólico. Existen publicaciones que demuestran que ratas criadas en camadas pequeñas desarrollan hiperfagia permanente (Plagemann A, 1999; Boullu-Ciocca S, 2005) mientras que otros autores no encuentran

Discusión

diferencias (Mozes S, 2004; López M, 2007b). Las discrepancias entre estos trabajos podría deberse al tipo de dieta. Nuestros datos demuestran que las ratas de camadas pequeñas son más hiperfágicas que las de camadas normales cuando se las somete a una dieta LF pero no bajo dieta HF (datos de este trabajo) y normal (López M, 2007b). Además, de manera interesante, la ingesta acumulada de las ratas SLLF fue mayor que la de las SLHF, no obstante fueron menos pesadas.

Mientras que en ratones alimentados con HF la obesidad resulta de un mayor FE pero no de hiperfagia (Enriori PJ, 2007), en nuestro estudio, para un mismo período de tiempo, el FE fue prácticamente el mismo independientemente del tipo de dieta, por lo que este parámetro no explica la diferencia en masa entre las ratas alimentadas con HF o LF, incluso, de manera inesperada, las ratas SL alimentadas con LF fueron las que mantuvieron durante todo el seguimiento de nuestro proyecto una mayor ingesta calórica y aún así no fueron las más pesadas. Más aún, cuando esta ingesta calórica se controla de tal manera que las ratas HF consuman la misma cantidad de calorías que las ratas con acceso *ad libitum* a LF, ambos grupos ganan la misma masa (Woods SC, 2003).

Parekh et al (Parekh PI, 1998) demostró que los ratones en HF bajan de masa cuando el contenido graso de la dieta disminuye, independientemente de la ingesta calórica total. En nuestro trabajo con ratas, aunque en el periodo de cuatro semanas con dieta normal todos los grupos comieron prácticamente la misma cantidad calórica, las ratas SL previamente alimentadas con HF continuaron siendo de mayor masa corporal. Nuestros datos sugieren que la dieta alta en grasa ejerce un efecto de potenciación sobre la obesidad cuando se sobrealimenta en el periodo neonatal y, que la capacidad para perder masa pese a retomar o iniciar una dieta equilibrada está disminuida cuando en una etapa temprana de la vida se predispone a obesidad, coincidiendo con lo reportado en la literatura (Plagemann A, 1999). En el caso de las hembras, no obtuvimos diferencias en la evolución de las masas en ninguno de los grupos, siendo congruente con lo publicado por

Discusión

otros grupos (Zhang H, 2007), y por lo cual quedan excluidas para ser un modelo óptimo extrapolable a la obesidad en mujeres.

Continuando con esta línea de investigación, será necesario estudiar desde la etapa gestacional los efectos de dietas con diferente porcentaje de grasa sobre el desarrollo, pues ya se ha descrito su implicación con el síndrome metabólico (Srinivasan M, 2006) y se deberá investigar con mayor profundidad las interacciones que se suceden tanto a nivel hipotalámico como periférico.

5.2. Inflamación

Partiendo del hecho de que la obesidad es un estado inflamatorio aún no bien entendido (Trayhurn P, 2004), se ha reportado que la expresión de los genes asociados a inflamación está reducida en un modelo de rata de restricción proteica materna en contraste con otros modelos de obesidad (Guan H, 2005). En nuestro trabajo, al haber encontrado mayores niveles de las citoquinas proinflamatorias PAI-1 y MCP-1 en SVF de vWAT de ratas SLHF, es de suponer que estas moléculas llevan a una inflamación local y generalizada con posible daño a la función endotelial, incluyendo modulación a la baja del óxido nítrico.

Aún queda por definir el papel concreto de los macrófagos-preadipocitos-adipocitos en las proporciones de expresión de estas citoquinas pues por ejemplo Curat y cols. (Curat CA, 2006) han demostrado que en el vWAT las células con fenotipo de macrófagos expresan mayores cantidades de MCP-1 que los adipocitos y el SVF significa una porción enriquecida de macrófagos derivados de la médula ósea (Weisberg SP, 2003).

Llama poderosamente la atención el hecho de que las citoquinas proinflamatorias anteriormente mencionadas disminuyan su expresión cuando se instaura una dieta normal. Tratando de extrapolar esto a humanos, induciría a pensar que cuando se come

Discusión

una dieta equilibrada, a pesar de seguir siendo obeso (ratas SLHF), haber sido obeso (SLLF) o haber ingerido dieta alta en grasa (NLHF), la expresión de factores proinflamatorios disminuye y quizás con ello el riesgo cardiovascular.

El tratamiento enfocado a reducir la masa grasa total así como el tejido adiposo visceral, teóricamente debería revertir la mayoría de las alteraciones metabólicas y vasculares de la obesidad. Al respecto, la reducción de la ingesta de grasa debería ser suficiente para disminuir la expresión de citoquinas proinflamatorias, se alcance pérdida de masa o no. Siguiendo esta línea de investigación será necesario estudiar los efectos de dietas con diferente porcentaje de grasa sobre el desarrollo en la etapa gestacional (Srinivasan M, 2006). Hasta ahora nuestros datos soportan la gran importancia de la dieta neonatal y sus efectos sobre la masa en la edad adulta, de acuerdo con trabajos publicado previamente (Plagemann A, 1999; López M, 2005a; López M, 2007b).

También hemos corroborado que a mayor masa se correlaciona menor nivel sérico de adiponectina a los 90 días de edad. De manera llamativa, ghrelin tuvo los niveles más altos en los grupos con LF. En cuanto a leptina también coincidimos con la mayoría de los autores detectando los menores niveles en aquellas ratas con LF (López M, 2005a; López M, 2007b). Los altos niveles de adiponectina y bajos de leptina a los 90 días de edad con LF son consistentes con la extensa bibliografía de ambas adipocitoquinas (Dullaart RP, 2007; Fantuzzi G, 2007; Stork S, 2007; Xita N, 2007), destacando el hecho de que la hipoadiponectinemia ha emergido como un factor de riesgo para DM2 y enfermedad cardiovascular, además de que una creciente literatura ha reportado asociaciones inversas de adiponectina con CRP y otros marcadores de inflamación subclínica (Ouchi N, 2003). Respecto a la insulina es interesante el hecho de que a los 122 días estuvo disminuida en las ratas que habían sido alimentadas previamente con HF, y aumentada en las LF y este dato coincide con el mayor FE en las ratas alimentadas con LF durante el período de 90 a 122 días.

Discusión

5.3. Hipoxia

No hay muchos datos aún que expliquen la relación entre obesidad, vWAT y genes de hipoxia involucrados a su vez en la adipogénesis. HIF-1 y HIF-2 además de estar relacionados con la respuesta a hipoxia parecen estar involucrados en la adipogénesis (Yun Z, 2002; Lolmede K, 2003; Shimba S, 2004) y de favorecer la angiogénesis (Kaufman B, 2004). Nuestros resultados demuestran una mayor expresión de estos dos genes en las ratas SLHF, siendo congruente con lo publicado en relación a hipoxia y obesidad. No obstante, no podemos descartar la posibilidad de la expresión de HIF sea específicamente regulada en los diferentes depósitos grasos. También es importante tener en cuenta que en condiciones de normoxia, HIF-1 α es mínimo o indetectable ya que sufre una rápida ubiquitinación y degradación proteosómica (Rapisarda A, 2002).

La inducción de HO-1 ha demostrado aminorar la inflamación (Wagener FA, 2001) y proteger al hígado de las ratas Zucker, genéticamente obesas, del daño de isquemia y reperfusión (Amersi F, 1999). Nuestros datos muestran que los niveles de ARNm de HO-1 están más incrementados en ratas alimentadas con HF, sugiriendo que podría ser un mecanismo de protección frente a dieta rica en grasa, de hecho está perfectamente establecido que la inducción de HO-1 es una respuesta al estrés oxidativo (Bocci V, 2007).

Se sabe que eNOS está reducido en vWAT de animales obesos (Valerio A, 2006). Más aún, ratones eNOS-*null* muestran incremento en la masa debido a una mayor acumulación de grasa abdominal cuando se comparan con animales *wild-type* (Nisoli E, 2003). Consistente con trabajos previos, nuestros datos mostraron que la expresión de ARNm de eNOS está infra regulada en animales obesos alimentados con HF; esta inhibición se pierde cuando se da alimentación con dieta normal. Tomado en conjunto, nuestros datos sugieren que las citoquinas proinflamatorias podrían ser las responsables

Discusión

de la disminución de los niveles de eNOS, tal y como se ha demostrado anteriormente (Valerio A, 2006).

Por lo que respecta a hepcidina, está elevada en las ratas más obesas, lo que coincide con modelos animales de inflamación (Pigeon C, 2001; Nicolas G, 2002), lo sorprendente es que este incremento tiende a persistir incluso un mes después de alimentación con dieta normal, enfatizando la influencia de la programación perinatal. En cuanto a lipocortina, su expresión no fue concluyente aunque a los 90 días hay tendencia a estar disminuida en caso de las ratas alimentadas con HF, perdiéndose este efecto a los 122 días.

5.4. Mecanismos metabólicos

Cada día se amplía la información de los mecanismos reguladores de la ingesta con un papel preponderante por parte del hipotálamo, el cual se encuentra en un ciclo de bioretroalimentación con los nutrientes, manteniendo generalmente una homeostasis entre ingesta y energía consumida, equilibrio que se ve afectado por la cantidad y tipo de dieta de cada individuo. Como se ha demostrado por la extensa bibliografía, las señales aferentes/eferentes del hipotálamo involucradas en la ingesta son mucho más complejas de lo que se suponía hace tan sólo un lustro, desde las más conocidas insulina y leptina, pasando por las adipoquinas y las múltiples citoquinas proinflamatorias que podrían estar involucradas, en distinto grado, en una disfunción hipotalámica (Mendieta-Zerón H, 2007). La respuesta de FAS a la dieta parece ser tejido-específica (Laux T, 1990). Una dieta carente de grasa aumenta la expresión de FAS en el hígado (Lakshmanan MR, 1972; Laux T, 1990), lo que hablaría de un tipo de control translacional en la activación de esta enzima. En nuestro estudio, HF a nivel periférico, disminuye la expresión de FAS en tejido adiposo e hígado de ratas crecidas en camadas pequeñas; esto último en concordancia

Discusión

con lo conocido en la literatura en estudios en rata (Shillabeer G, 1990) y en humanos con obesidad (Hudgins LC, 2007).

Evidencias recientes demuestran que la vía de AMPK integra las señales hormonales y de nutrientes para regular la ingesta y el balance energético a través de sus efectos en hipotálamo y tejidos periféricos (Kahn BB, 2005; Xue B, 2006). El aumento de la relación AMP/ATP lleva a la fosforilación y activación de AMPK (Ronnelt GV, 2008). A nivel del SNC leptina inhibe AMPK en hipotálamo, específicamente en el ARC y PVN (Minokoshi Y, 2004). Nuestro trabajo aporta datos de que la dieta HF de alguna manera contribuye a la disminución de pAMPK en hipotálamo, coincidiendo con Martin et al. quien demostró que la obesidad inducida por dieta (DIO) altera la respuesta de AMPK a leptina (Martin TL, 2006).

Cada vez hay más evidencia del papel regulador de FAS en la ingesta (Ronnelt GV, 2006; Wolfgang MJ, 2006). Por estudio de doble marcaje se sabe que el ARNm de FAS está colocalizado con el de NPY/AgRP en el ARC (Shimokawa T, 2002) y se sabe que su inhibición, por ejemplo, con C75, cerulenina o tamoxifeno, reduce la ingesta y produce pérdida ponderal (Loftus TM, 2000; López M, 2006). Nuestro estudio aporta indicios de que para la expresión de FAS es importante tanto el efecto de “programming” como el subsecuente estado de obesidad, estando FAS incrementado en las ratas SL, lo que podría explicar la tendencia a la hiperfagia del modelo, especialmente en LF.

En nuestro trabajo, en el ARC, la expresión de AgRP estuvo incrementada con HF, lo cual coincide con la mayoría de los autores (Gao J, 2002; Enriori PJ, 2007). Al respecto, el aumento de péptidos orexigénicos se ha explicado como efecto de la resistencia a leptina (Enriori PJ, 2007) y nuestros datos son congruentes con la publicación reciente de Nogueiras et al, donde se demuestra que el factor de transcripción Bsx, que medía la transcripción de AgR e implicado en la actividad motora espontánea y respuesta hiperfágica, también está aumentado con HF en el ARC (Nogueiras R, 2008).

Discusión

Por otra parte, varios autores han publicado que la HF reduce la expresión del ARNm de NPY en el ARC en comparación con la LF (Stricker-Krongrad A, 1998; Dziedzic B, 2007) y que esto está probablemente relacionado con el aumento sustancial de leptina circulante (Qian H, 1998). Nosotros, por el contrario, no hemos identificado diferencias significativas. La explicación para esta divergencia no está clara pero podría deberse al grado de obesidad alcanzado, tiempo y tipo de alimentación (Stricker-Krongrad A, 1998; Lin S, 2000; Hansen MJ, 2004; Velkoska E, 2005), porcentaje de lípidos (Giraud SQ, 1994; Hansen MJ, 2004), tipo de lípidos y si estos son o no saturados, etc. (Ziotopoulou M, 2000; Wang HQ, 2002; Hansen MJ, 2004; Tabb K, 2004). Teniendo en cuenta que los circuitos de NPY y melanocortina del ARC se desarrollan durante la segunda y tercera semanas postnatales (Bouret SG, 2004; Grove KL, 2005), la sobrenutrición durante este periodo podría impactar en su desarrollo normal y alterar permanentemente el metabolismo energético. Otra posibilidad sería la presencia de regulación regionales dentro del propio ARC, de hecho, se ha publicado una expresión aumentada de NPY en el hipotálamo de ratas SL en el ARC posterior (López M, 2005a).

Por otra parte, las ratas con obesidad inducida por dieta (DIO) tienen incremento de la expresión de NPY en el ARC antes de hacerse obesas (Levin BE, 1997). Estos niveles elevados caen a valores observados en ratas resistentes a obesidad con un incremento paralelo de leptina después de 4 semanas de llevar una dieta hipercalórica (Levin BE, 2002). La leptina actúa de manera diferente sobre las de las neuronas POMC y NPY/AgRP en el ARC (Schwartz MW, 1996; Xu AW, 2005) y la resistencia a leptina en estas neuronas podría ser una causa de la DIO (Munzberg H, 2004; Enrioni PJ, 2007), pues el mantener la sensibilidad a esta hormona es una acción protectora contra la DIO (Ren D, 2005).

En nuestro modelo de DIO, la expresión de POMC y CART estuvo disminuida en el grupo SLHF, lo cual podría explicar la tendencia a la hiperfagia de las ratas SLHF, al carecer de

Discusión

regulación anoréctica adecuada. Al respecto existe controversia en la literatura (Harrold JA, 1999; Lin S, 2000; Tian DR, 2004; Wortley KE, 2004; Dziedzic B, 2007) que podría atribuirse al tiempo de alimentación con HF y a la proporción de lípidos en la misma.

5.5. Cirugía bariátrica

Con relación a la cirugía bariátrica, convencionalmente se ha explicado la pérdida de masa debido a 1) el tamaño gástrico reducido que limita la ingesta calórica y 2) acortamiento del tránsito intestinal, disminuyendo la absorción de nutrientes. También se ha discutido que la sección de las fibras simpáticas y parasimpáticas durante la gastrectomía no explicarían por sí mismas las consecuencias a largo plazo de la BPBP-RYGB (Phillips RJ, 2005).

A pesar de los resultados favorables con la CxB, aproximadamente un 10%–40% de pacientes no logran una pérdida ponderal óptima (Christou NV, 2004). Aún con la BPD, que es la intervención quirúrgica más efectiva para la obesidad mórbida, hay un 20% de fallos (Larrad-Jiménez A, 2007; Larrad-Jiménez A, 2008), esto pese a que consigue una reducción parcial del estado obeso así como de comorbilidades sin el incremento compensador en la ingesta y nuevo aumento ponderal que se presentan con la mayoría de tratamientos (le Roux CW, 2006). En un trabajo llevado a cabo en la Universidad de Navarra con bypass gástrico en Y de Roux por vía laparoscópica en humanos, se encontró que, además de la pérdida ponderal, hubo un cambio significativo en la composición corporal del paciente, con un descenso medio del 12.4% en el compartimiento graso a 3-5 años de seguimiento postoperatorio (Pastor C, 2008).

El patrón exitoso de pérdida ponderal progresiva que sucede después de la BPD-RYGBP en ratas, es similar al patrón de dos etapas en la pérdida de masa en humanos después de una BPD exitosa (Larrad-Jiménez A, 2008). Después de la CxB, es posible que

Discusión

múltiples mecanismos actúen en concierto para alcanzar pérdida ponderal sostenida, tales como el efecto restrictivo de la gastrectomía y el aumento de la pérdida en el balance energético derivado de la malabsorción lipídica permanente y la malabsorción parcial de almidón además de alteraciones posibles en el SNC, señalización hormonal, almacenamiento energético, FE, etc. (Flancbaum L, 2003; Wardé-Kamar J, 2004). Más aún, y a pesar del escaso conocimiento que existe todavía, también debe considerarse la implicación de la modificación en los efectos de los péptidos gastrointestinales después de la intervención quirúrgica bariátrica en el control de la ingesta y saciedad.

Los cambios observados en la expresión de péptidos reguladores del apetito y saciedad no son del todo claros. Las publicaciones al respecto incluyen disminución de motilina y GIP, aumento de neurotensina, enteroglucagon y GLP-1 (ambos involucrados en la adaptación intestinal) y una reducción temprana considerable (5 días) en las concentraciones de leptina, que persiste más de doce meses y que parece estar más relacionada con la pérdida de masa que con la cirugía. De la misma manera, algunos péptidos gastrointestinales como GLP-2 (Drucker DJ, 2005) han sido relacionados con la ingesta y control de masa después de la cirugía bariátrica, pero ni sus mecanismos íntimos de acción ni su interacción con otros péptidos involucrados en la ingesta (PYY), GLP-1, etc., han sido explicados de manera satisfactoria (le Roux CW, 2006; Borg CM, 2007), así como tampoco ha sido explicado el mecanismo de ganancia ponderal que se sucede nuevamente y que resulta crucial para entender la obesidad y ofrecer nuevas alternativas de manejo.

Los resultados reportados para ghrelin son contradictorios y mientras que García Unzueta et al. (García-Unzueta MT, 2005) y Adami et al. (Adami GF, 2004) describen concentraciones aumentadas al primer año después de la técnica clásica de BPD de Scopinaro (con ulterior normalización), Rubio et al. (Rubio MA, 2003) demostró una reducción similar en los niveles de ghrelin tanto con la técnica de Larrad como con el

Discusión

bypass gástrico, que coincide con nuestros datos de no compensación en la expresión de ghrelin en el estómago residual. En humanos, se argumenta que la falta de ghrelin en el estómago residual y por ende de su secreción, contribuye a la pérdida ponderal en los primeros meses después de la cirugía.

En nuestro estudio queda demostrada una vez más la efectividad de la BPBP-RYGB en la reducción de masa y de acuerdo a la ingesta ajustada por 100 g de masa, así como a un grupo pairfed a mediano plazo, podemos asumir que la pérdida ponderal no se debe a menor ingesta calórica. Como alternativa a explicar la pérdida ponderal estarían cambios metabólicos como aumento en termogénesis (Vincent RP, 2007).

Hasta ahora se ha acumulado evidencia del papel desempeñado por varias hormonas (Cummings DE, 2004; Borg CM, 2006), después del BPBP-RYGB, pero existen pocos datos que analicen los cambios histológicos intestinales que se suceden tras la intervención. Nuestros resultados al respecto, están en concordancia con lo reportado por otros autores (Levi AC, 1991; Evrard S, 1993), más aún, el alargamiento de las vellosidades intestinales en las ratas operadas, manifestación de una compensación intestinal podría explicar, al menos parcialmente, los casos de re-ganancia ponderal que se da en ratas y en humanos (Larrad-Jiménez A, 2008).

Por último, está pendiente profundizar en la investigación que explique los mecanismos de “mejora” de la DM2 (Buchwald H, 2004) y comorbilidades (Sjostrom L, 2004) después de la cirugía bariátrica. Es muy probable que los cambios en péptidos intestinales y sus efectos tengan algo que ver (Ballantyne GH, 2005; Ballantyne GH, 2006; Rubino F, 2006).

En cuanto a las opciones terapéuticas aún falta un largo camino por recorrer ya que los fármacos en uso, tanto de acción periférica como central tienen efectos limitados (López M, 2005b; Atkinson TJ, 2008). En esta área se esperan mayores aportes con un manejo individual aplicando la nutrigenómica/nutrigenética que permitan desarrollar fármacos con una acción mucho más específica en el SNC.

Discusión

6. CONCLUSIONES

Conclusiones

Conclusiones

1. La sobrealimentación perinatal predispone a mantener un fenotipo obeso en etapa adulta, que es difícil revertir incluso llevando una dieta equilibrada.
2. CRP, PAI-1 y MCP-1 son las citoquinas proinflamatorias con mayor expresión en SVF de tejido adiposo visceral en el modelo de alimentación con dieta alta en grasa.
3. Los genes de hipoxia con mayor incremento después de llevar una dieta alta en grasa fueron HIF-1 α , HIF-2, HO-1 y hepcidina, mientras que esta misma dieta reduce los niveles de eNOS.
4. La dieta alta en grasa se asocia a incremento de AgRP y disminución de POMC y CART, así como reducción de pAMPK y pACC a nivel hipotalámico.
5. La cirugía bariátrica produce una reducción ponderal sostenida a largo plazo que se acompaña de alargamiento de vellosidades intestinales.

Conclusiones

7. REFERENCIAS

Referencias

Referencias

1. Adami GF, Cordera R, Andraghetti G, Camerini GB, Marinari GM, Scopinaro N. Changes in serum ghrelin concentration following biliopancreatic diversion for obesity. *Obes Res* 2004;12:684-7.
2. Adams KF, Schatzkin A, Harris TB, Kipnis V, Mouw T, Ballard-Barbash R, et al. Overweight, Obesity, and Mortality in a Large Prospective Cohort of Persons 50 to 71 Years Old. *N Engl J Med* 2006;355:763-78.
3. Adams TD, Gress RE, Smith SC, Halverson RC, Simper SC, Rosamond WD, et al. Long-term mortality after gastric bypass surgery. *N Engl J Med* 2007;357:818-20.
4. Adrian TE, Bacarese-Hamilton AJ, Smith HA, Chohan P, Manolas KJ, Bloom SR. Distribution and postprandial release of porcine peptide YY. *J Endocrinol* 1987;113:11-4.
5. Agarwal MM, Dhatt GS, Zayed R, Bali N. Gestational diabetes: relevance of diagnostic criteria and preventive strategies for Type 2 diabetes mellitus. *Arch Gynecol Obstet*. 2007;276:237-43.
6. Aguilón JC, Escobar A, Ferreira V, Aguirre A, Ferreira L, Molina MC, et al. Daily production of human tumor necrosis factor in lipopolysaccharide (LPS) -stimulated ex vivo blood culture assays. *Eur Cytokine Netw* 2001;12:105-10.
7. Ahima RS, Flier JS. Leptin. *Annu Rev Physiol*. 2000;62:413-37.
8. Ahima RS, Lazar MA. Adipokines and the peripheral and neural control of energy balance. *Mol Endocrinol*. 2008;22:1023-31.
9. Ajioka R, Kushner J. Another link in the chain. *Blood* 2004;103:2439-40.
10. Akabayashi A, Koenig JI, Watanabe Y, Alexander JT, Leibowitz SF. Galanin-containing neurons in the paraventricular nucleus: a neurochemical marker for fat ingestion and body weight gain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994;91:10375-9.
11. Akamizu T, Iwakura H, Ariyasu H, Hosoda H, Murayama T, Yokode M, et al. Repeated administration of ghrelin to patients with functional dyspepsia: its effects on food intake and appetite. *Eur J Endocrinol*. 2008;158:491-8.
12. Almer LO. Fibrinolytic disorders in diabetes mellitus. *Diabetes Metab* 1990;14:519-22.
13. Amann-Gassner U, Hauner H. Ernährungstherapie bei Gestationsdiabetes. *Dtsch Med Wochenschr*. 2008;133:893-8.
14. Amersi F, Buelow R, Kato H, Ke B, Coito AJ, Shen XD, et al. Upregulation of heme oxygenase-1 protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest*. 1999;104:1631-9.
15. Andersson U, Filipsson K, Abbott CR, Woods A, Smith K, Bloom SR, et al. J. AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. *J Biol Chem* 2004;279:12005-8.
16. Anghel SI, Wahli W. Fat poetry: a kingdom for PPARgamma. *Cell Res*. 2007;17:486-511.
17. Annaloro C, Usardi P, Airaghi L, Giunta V, Forti S, Orsatti A, et al. Prevalence of metabolic syndrome in long-term survivors of hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2008 Jan 14; [Epub ahead of print]

Referencias

18. Appleyard SM, Bailey TW, Doyle MW, Jin YH, Smart JL, Low MJ, et al. Proopiomelanocortin neurons in nucleus tractus solitarius are activated by visceral afferents: regulation by cholecystokinin and opioids. *J Neurosci* 2005;25:3578-85.
19. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, et al. Paradoxical decrease of an adipocyte specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;257:79-83.
20. Armitage JA, Khan IY, Taylor PD, Nathanielsz PW, Poston L. Developmental programming of the metabolic syndrome by maternal nutritional imbalance: how strong is the evidence from experimental models in mammals? *J Physiol*. 2004;561(Pt 2):355-77.
21. Arrizabalaga-Amarelo R, Mendieta-Zerón H. Obesity in parents and children from a mexican indigenous rural community. *Sao Paulo Med J*. 2007;125:370-1.
22. Arosio M, Ronchi C, Beck-Peccoz P, Gerbia C, Giavoli C, Cappiello V, et al. Effects of modified sham feeding on ghrelin levels in healthy human subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89:5101-4.
23. Artwohl M, Roden M, Holzenbein T, Freudenthaler A, Waldhausl W, Baumgartner-Parzer SM. Modulation by leptin of proliferation and apoptosis in vascular endothelial cells. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord* 2002;26:577-80.
24. Atkinson TJ. Central and peripheral neuroendocrine peptides and signalling in appetite regulation: considerations for obesity pharmacotherapy. *Obes Rev*. 2008;9:108-20.
25. Auwerx J, Bouillon R, Collen D, Geboers J. Tissue-type plasminogen activator antigen and plasminogen activator inhibitor in diabetes mellitus. *Arteriosclerosis* 1988;8:68-72.
26. Badman MK, Flier JS. The gut and energy balance: visceral allies in the obesity wars. *Science* 2005;307:1909-14.
27. Badman MK, Flier JS. The adipocyte as an active participant in energy balance and metabolism. *Gastroenterology*. 2007;132:2103-15.
28. Ballantyne GH. Peptide YY(1-36) and peptide YY(3-36): Part II. Changes after gastrointestinal surgery and bariatric surgery. *Obes Surg* 2006;16:795-803.
29. Ballantyne GH, Gumbs A, Modlin IM. *Obes Surg* 2005;15:692-9.
30. Banerjee RR, Rangwala SM, Shapiro JS, Rich AS, Rhoades B, Qi Y, et al. Regulation of fasted blood glucose by resistin. *Science* 2004;303:1195-8.
31. Barker DJP. In utero programming of chronic disease. *Clin Sci* 1998;95:115-28.
32. Barker DJP. Mothers, babies and disease in later life. London: BMJ Publishing Group, 1994.
33. Bastard JP, Jardel C, Delattre J, Hainque B, Bruckert E, Oberlin F. Evidence for a link between adipose tissue interleukin-6 content and serum C-reactive protein concentrations in obese subjects. *Circulation* 1999;99:2221-2.
34. Bates SH, Myers MG. The role of leptin-->STAT3 signaling in neuroendocrine function: an integrative perspective. *J Mol Med* 2004;82:12-20.
35. Batterham RL, Bloom SR. The gut hormone peptide YY regulates appetite. *Ann N Y Acad Sci*. 2003a;994:162-8.

Referencias

36. Batterham RL, Cohen MA, Ellis SM, Le Roux CW, Withers DJ, Frost GS, et al. Inhibition of food intake in obese subjects by peptide YY3-36. *N Engl J Med*. 2003b;349:941–8.
37. Batterham RL, Cowley MA, Small CJ, Herzog H, Cohen MA, Dakin CL, et al. *Nature* 2002;418:650-4.
38. Beck B, Kozak R, Moar KM, Mercer JG. Hypothalamic orexigenic peptides are overexpressed in young Long–Evans rats after early life exposure to fat-rich diets. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;342:452-8.
39. Beck B, Richy S, Stricker-Krongrad A. Responsiveness of obese Zucker rats to [D-Trp34]-NPY supports the targeting of Y5 receptor for obesity treatment. *Nutr Neurosci*. 2007;10:211-4.
40. Beck B, Stricker-Krongrad A, Bulet A, Cumin F, Bulet C. Plasma leptin and hypothalamic neuropeptide Y and galanin levels in Long–Evans rats with marked dietary preferences, *Nutr. Neurosci* 2001;4:39-50.
41. Beg AA, Baltimore D. An essential role for NF- κ B in preventing TNF- α -induced cell death. *Science* 1996;274:782-4.
42. Bekri S, Gual P, Anty R, Luciani N, Dahman M, Ramesh B, et al. Increased adipose tissue expression of hepcidin in severe obesity is independent from diabetes and NASH. *Gastroenterology* 2006;131:788–96.
43. Bennett MK, López JM, Sánchez HB, Osborne TF. Sterol regulation of fatty acid synthase promoter. Coordinate feedback regulation of two major lipid pathways. *J Biol Chem* 1995;270:25578-83.
44. Bensaid A, Tomé D, Gietzen D, Even P, Morens C, Gausseres N, et al. Protein is more potent than carbohydrate for reducing appetite in rats. *Physiol. Behav* 2002;75:577-82.
45. Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer P. The adipocyte- secreted protein ACRP30 enhances hepatic insulin action. *Nature Medicine* 2001;7:947-53.
46. Bergeron R, Previs SF, Cline GW, Perret P, Russell RR 3rd, Young LH, Shulman GI. Effect of 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside infusion on in vivo glucose and lipid metabolism in lean and obese Zucker rats. *Diabetes*. 2001;50:1076-82.
47. Berthoud HR. Mind versus metabolism in the control of food intake and energy balance. *Physiol Behav* 2004;81:781–93.
48. Berthoud HR, Jedrzejewska A, Powley TL. Simultaneous labeling of vagal innervation of the gut and afferent projections from the visceral forebrain with dil injected into the dorsal vagal complex in the rat. *J. Comp Neurol*. 1990;301:65-79.
49. Bhagar K, Vallance P. Inflammatory cytokines impairs endothelium-dependent dilatation in human veins in vivo. *Circulation* 1997;96:3042-7.
50. Bjorkbacka H, Kunjathoor VV, Moore KJ, Koehn S, Ordija CM, Lee MA, et al. Reduced atherosclerosis in MyD88-null mice links elevated serum cholesterol levels to activation of innate immunity signaling pathways. *Nat Med* 2004;10:416-21.
51. Bloomberg RD, Fleishman A, Nalle JE, Herron DM, Kini S. Nutritional deficiencies following bariatric surgery: what have we learned? *Obes Surg*. 2005;15:145-54.

Referencias

52. Bocci V, Aldinucci C, Mosci F, Carraro F, Valacchi G. Ozonation of human blood induces a remarkable upregulation of heme oxygenase-1 and heat stress protein-70. *Mediators Inflamm.* 2007;2007:26785.
53. Boden G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes* 1997;46:3-10.
54. Boden G, Sargrad K, Homko C, Mozzoli M, Stein TP. Effect of a low-carbohydrate diet on appetite, blood glucose levels, and insulin resistance in obese patients with type 2 diabetes. *Ann Intern Med* 2005;142:403-11.
55. Boden G, Xinhua C. Effects of fatty acids and ketone bodies on basal insulin secretion in type 2 diabetes. *Diabetes* 1999;48:577-83.
56. Borg CM, le Roux CW, Ghatei MA, Bloom SR, Patel AG. Biliopancreatic diversion in rats is associated with intestinal hypertrophy and with increased GLP-1, GLP-2 and PYY levels. *Obes Surg* 2007;17:1193-8.
57. Borg CM, le Roux CW, Ghatei MA, Bloom SR, Patel AG, Aylwin SJ. Progressive rise in gut hormone levels after Roux-en-Y gastric bypass suggests gut adaptation and explains altered satiety. *Br J Surg* 2006;93:210-5.
58. Bouret SG, Draper SJ, Simerly RB. Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding behavior in mice. *J Neurosci* 2004;24:2797-805.
59. Bouret SG, Draper SJ, Simerly RB. Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science* 2004;304:108-10.
60. Braunwald E. Shattuck lecture-cardiovascular medicine at the turn of the millennium: triumphs, concerns, and opportunities. *New Engl. J. Med.* 1997;337:1360-9.
61. Breunan FM, Maini RN, Feldman M. TNF α : a pivotal role in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1992;6:485-516.
62. Bridle KR, Frazer DM, Wilkins SJ, Dixon JL, Purdie DM, Crawford DHG, et al. Disrupted hepcidin regulation in HFE-associated haemochromatosis and the liver as a regulator of body iron homeostasis. *Lancet* 2003;361:669-73.
63. Broberger C, Johansen J, Brismar H, Johansson C, Schalling M, Hökfelt T. Changes in neuropeptide Y receptors and pro-opiomelanocortin in the anorexia (anx/anx) mouse hypothalamus. *J Neurosci* 1999;19:7130-9.
64. Brownlee M. Biochemistry and molecular biology of diabetic complications. *Nature Medicine* 2001;414:813-20.
65. Buchwald H, Avidor Y, Braunwald E, Jensen MD, Pories W, Fahrenbach K, et al. Bariatric surgery: a systematic review and metaanalysis. *JAMA* 2004;292:1724-37.
66. Burguera B, Agusti A, Arner P, Baltasar A, Barbe F, Barcelo A, et al. Critical assessment of the current guidelines for the management and treatment of morbidly obese patients. *J Endocrinol Invest.* 2007;30:844-52.
67. Caminos JE, Bravo SB, García-Rendueles ME, Ruth González C, Garcés MF, Cepeda LA, et al. Expression of neuropeptide W in rat stomach mucosa: Regulation by nutritional status, glucocorticoids and thyroid hormones. *Regul Pept.* 2008;146:106-11.

Referencias

68. Capasso R, Izzo AA. Gastrointestinal regulation of food intake: general aspects and focus on anandamide and oleylethanolamide. *J Neuroendocrinol.* 2008;20 Suppl 1:39-46.
69. Carpentier A, Mittelman SD, Lamarche B, Bergman RN, Giacca A, Lewis GF. Acute enhancement of insulin secretion by FFA in humans is lost with prolonged FFA elevation. *Am J Physiol* 1999;276:E1055-66.
70. Casanueva FF, Diéguez C. Neuroendocrine regulation and actions of leptin. *Front Neuroendocrinol.* 1999;20:317-63.
71. Casanueva FF, Diéguez C. Ghrelin: the link connecting growth with metabolism and energy homeostasis. *Rev Endocr Metab Disord.* 2002;3:325-38.
72. Cavaillon JM, Haeffner-Cavaillon N. Signals involved in interleukin 1 synthesis and release by lipopolysaccharide-stimulated monocytes/macrophages. *Cytokine.* 1990;2:313-29.
73. Cha SH, Hu Z, Chohnan S, Lane MD. Inhibition of hypothalamic fatty acid synthase triggers rapid activation of fatty acid oxidation in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:14557-62.
74. Challis BG, Coll AP, Yeo GS, Pinnock SB, Dickson SL, Thresher RR, et al. Mice lacking pro-opiomelanocortin are sensitive to high-fat feeding but respond normally to the acute anorectic effects of peptide-YY(3-36). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:4695-700.
75. Chang GQ, Karatayev O, Davydova Z, Leibowitz SF. Circulating triglycerides impact on orexigenic peptides and neuronal activity in hypothalamus. *Endocrinology* 2004;145:3904-12.
76. Charriere G, Cousin B, Arnaud E, Andre M, Bacon F, Casteilla L. Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity. *J Biol Chem* 2003;278:9850-5.
77. Chen A, Mumick S, Zhang C, Lamb J, Dai H, Weingarh D, et al. Diet induction of monocyte chemoattractant protein-1 and its impact on obesity. *Obes Res.* 2005;13:1311-20.
78. Chiba T, Yamaza H, Komatsu T, Nakayama M, Fujita S, Hayashi H, et al. Pituitary growth hormone suppression reduces resistin expression and enhances insulin effectiveness: Relationship with caloric restriction. *Exp Gerontol.* 2008 Mar 20; [Epub ahead of print]
79. Cho E, Manson JE, Stampfer MJ, Solomon CG, Colditz GA, Speizer FE, et al. A prospective study of obesity and risk of coronary heart disease among diabetic women. *Diabetes Care* 2002;25:1142-8.
80. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, et al; Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. National Heart, Lung, and Blood Institute; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension* 2003;42:1206-52.
81. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162:156-9.
82. Choy JC, Granville DJ, Hunt DW, McManus BM. Endothelial cell apoptosis: biochemical characteristics and potential implications for atherosclerosis. *J. Mol. Cell Cardiol* 2001;33:1673-90.
83. Christiansen T, Richelsen B, Bruun JM. Monocyte quemoattractant protein-1 is produced in isolated adipocytes associated with adiposity and reduced after weight loss in morbid obese subjects. *I J Obesity* 2005;29:146-50.

Referencias

84. Christou NV, Sampalis JS, Liberman M, Look D, Auger S, McLean AP, MacLean LD. Surgery decreases long-term mortality, morbidity, and health care use in morbidly obese patients. *Ann Surg* 2004;240:416-23.
85. Clarke SD, Armstrong MK, Jump DB. Dietary polyunsaturated fats uniquely suppress rat liver fatty acid synthase and S14 mRNA content. *J. Nutr* 1990;120:225-31.
86. Clegg DJ, Air EL, Woods SC, Seeley RJ. Eating elicited by orexin-A, but not melanin-concentrating hormone, is opioid mediated. *Endocrinology* 2002;143:2995-3000.
87. Clifton PM, Keogh J. Metabolic effects of high-protein diets. *Curr Atheroscler Rep.* 2007;9:472-8.
88. Coleman DL, Hummel KP. The influence of genetic background on the expression of the obese (Ob) gene in the mouse. *Diabetologia* 1973;9:287-93.
89. Colombo C, Cutson JJ, Yamauchi T, Vinson C, Kadowaki T, Gavrilova O, Reitman ML. Transplantation of adipose tissue lacking leptin is unable to reverse the metabolic abnormalities associated with lipoatrophy. *Diabetes* 2002;51:2727-33.
90. Combs TP, Pajvani UB, Berg AH, Lin Y, Jelicks LA, Laplante M, et al. A transgenic mouse with a deletion in the collagenous domain of adiponectin displays elevated circulating adiponectin and improved insulin sensitivity. *Endocrinology* 2004;145:367-83.
91. Combs TP, Wagner JA, Berger J, Doebber T, Wang WJ, Zhang BB, et al. Induction of adipocyte complement-related protein of 30 kilodaltons by PPARgamma agonists: a potential mechanism of insulin sensitization. *Endocrinology* 2002;143:998-1007.
92. Cone RD, Cowley MA, Butler AA, Fan W, Marks DL, Low MJ. The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2001;25 Suppl 5:S63-7.
93. Cooke JP, Oka RK. Does leptin cause vascular disease? *Circulation* 2002;106:1904-5.
94. Cota D, Proulx K, Smith KA, Kozma SC, Thomas G, Woods SC, Seeley RJ. Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science.* 2006;312:927-30.
95. Cowan GJ, Buffington CK. Significant changes in blood pressure, glucose and lipids with gastric bypass surgery. *World J Surg* 1998;22:987-92.
96. Cramer CP, Blass EM. Nutritive and nonnutritive determinants of milk intake of suckling rats. *Behav Neurosci* 1985;99:578-82.
97. Cummings DE, Clement K, Purnell JQ, Vaisse C, Foster KE, Frayo RS, et al. Elevated plasma ghrelin levels in Prader Willi syndrome. *Nat Med.* 2002a;8:643-4.
98. Cummings DE, Overduin J, Foster-Schubert KE. Gastric bypass for obesity: mechanisms of weight loss and diabetes resolution. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2608-15.
99. Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS. Preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 2001;50:1714 -9.
100. Cummings DE, Schwartz MW. Genetics and pathophysiology of human obesity. *Annu Rev Med* 2003;54:453-71.

Referencias

101. Cummings DE, Weigle DS, Frayo RS, Breen PA, Ma MK, Dellinger EP, Purnell JQ. Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *N Engl J Med.* 2002b;346:1623-30.
102. Curat CA, Wegner V, Sengenés C, Miranville A, Tonos C, Busse R, et al. Macrophages in human visceral adipose tissue: increased accumulation in obesity and a source of resistin and visfatin. *Diabetologia* 2006;49:744-7.
103. Curley JP, Barton S, Surani A, Keverne EB. Coadaptation in mother and infant regulated by a paternally expressed imprinted gene. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 2004;271:1303-9.
104. Czuszek CA, Sutherland DE, Billman MA, Stein SH. Prostaglandin E₂ potentiates interleukin 1 β induced interleukin-6 production by human gingival fibroblasts. *J Clin Periodontol* 1996;23:635-40.
105. Dabelea D, Hanson RL, Lindsay RS, Pettit DJ, Imperatore G, Gabir MM, et al. Intrauterine exposure to diabetes conveys risks for type 2 diabetes and obesity: a study of discordant sibships. *Diabetes* 2000;49:2208-11.
106. 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;86:355-62.
107. Darcel N, Fromentin G, Raybould HE, Gougis S, Gietzen DW, Tome D. Fos-positive neurons are increased in the nucleus of the solitary tract and decreased in the ventromedial hypothalamus and amygdala by a high-protein diet in rats. *J Nutr* 2005;135:1486-90.
108. Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, et al. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* 2000;141:4255-61.
109. Davidowa H, Li Y, Plagemann A. The main effect of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide on hypothalamic neuronal activity depends on the nutritional state of rats. *Neuro Endocrinol Lett* 2005;26:29-34.
110. de Castro JM. Independence of heritable influences on the food intake of free-living humans. *Nutrition* 2002;18:11-6.
111. de Castro JM, Plunkett SS. How genes control real world intake: palatability--intake relationships. *Nutrition* 2001;17:266-8.
112. de Lemos JA, Morrow DA, Sabatine MS, Murphy SA, Gibson CM, Antman EM, et al. Association between plasma levels of monocyte chemoattractant protein-1 and long-term clinical outcomes in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2003;107:690-5.
113. de Luis DA, Sagrado MG, Conde R, Aller R, Izaola O, Romero E. Effect of a hypocaloric diet on serum visfatin in obese non-diabetic patients. *Nutrition.* 2008 Mar 14. [Epub ahead of print]
114. de Souza Batista CM, Yang RZ, Lee MJ, Glynn NM, Yu DZ, Pray J, et al. Omentin plasma levels and gene expression are decreased in obesity. *Diabetes.* 2007;56:1655-61.
115. De Vriese C, Delporte C. Influence of ghrelin on food intake and energy homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2007;10:615-9.

Referencias

116. Degawa-Yamauchi M, Bovenkerk JE, Juliar BE, Watson W, Kerr K, Jones R, et al. Serum resistin (FIZZ3) protein is increased in obese humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:5452-5.
117. Degen L, Oesch S, Casanova M, Graf S, Ketterer S, Drewe J, Beglinger C. Effect of peptide YY3-36 on food intake in humans. *Gastroenterology*. 2005;129:1430-6.
118. Del Carlo M, Cole AA, Levine LA. Differential Calcium Independent Regulation of Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases by Interleukin-1beta and Transforming Growth Factor-beta in Peyronie's Plaque Fibroblasts. *J Urol*. 2008;179:2447-55.
119. Delmas A, Delmas V. Anatomía humana: descriptiva, topográfica y funcional / Henri Rouvière. V 4. 11ª ed. Barcelona. Masson, 2005.
120. Deng YM, Wu BJ, Witting PK, Stocker R. Probucol protects against smooth muscle cell proliferation by upregulating heme oxygenase-1. *Circulation* 2004;110:1855-60.
121. Devaraj S, Xu DY, Jialal I. C-reactive protein increases plasminogen activator inhibitor-1 expression and activity in human aortic endothelial cells: implications for the metabolic syndrome and atherothrombosis. *Circulation* 2003;107:398-404.
122. Dziedzic B, Szemraj J, Bartkowiak J, Walczewska A. Various dietary fats differentially change the gene expression of neuropeptides involved in body weight regulation in rats. *J Neuroendocrinol*. 2007;19:364-73.
123. Díez JJ, Iglesias P. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *European Journal of Endocrinology* 2003;148:293-300.
124. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996;87:2095-147.
125. Dorner G, Plagemann A. Perinatal hyperinsulinism as possible predisposing factor for diabetes mellitus, obesity and enhanced cardiovascular risk in later life. *Horm. Metab. Res* 1994;26:213-21.
126. Dourmashkin JT, Chang GQ, Hill JO, Gayles EC, Fried SK, Leibowitz SF. Model for predicting and phenotyping at normal weight the long-term propensity for obesity in Sprague-Dawley rats. *Physiology & Behavior* 2006;87:666-78.
127. Duan J, Choi YH, Hartzell D, Della-Fera MA, Hamrick M, Baile CA. Effects of subcutaneous leptin injections on hypothalamic gene profiles in lean and ob/ob mice. *Obesity (Silver Spring)*. 2007;15:2624-33.
128. Eckel RH. Obesity and heart disease: a statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee, American Heart Association. *Circulation* 1997;96:3248-50.
129. Elias CF, Aschkenasi C, Lee C, Kelly J, Ahima RS, Bjorbaek C, Flier JS, Saper CB, Elmquist JK. Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron*. 1999;23:775-86.
130. Elmquist JK. Hypothalamic pathways underlying the endocrine, autonomic, and behavioral effects of leptin. *Physiol Behav*. 2001;74:703-8.
131. Engeli S, Peldpausch M, Gorzelnik K, Hartwig F, Heintze U, Janke J, et al. Association between adiponectin and mediators of inflammation in obese women. *Diabetes* 2003;52:942-7.

Referencias

132. Enriori PJ, Evans AE, Sinnayah P, Jobst EE, Tonelli-Lemos L, Billes SK, et al. Diet-induced obesity causes severe but reversible leptin resistance in arcuate melanocortin neurons. *Cell Metab.* 2007;5:181-94.
133. Esposito K, Pontillo A, Di Palo C, Giugliano G, Masella M, Marfella R, Giugliano D. Effect of weight loss and lifestyle changes on vascular inflammatory markers in obese women: a randomized trial. *JAMA* 2003;289:1799-804.
134. Esposito K, Pontillo A, Giugliano F, Giugliano G, Marfella R, Nicoletti G, Giugliano D. Association of low interleukin-10 levels with the metabolic syndrome in obese women. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:1055-8.
135. Evrard S, Aprahamian M, Hoeltzel A, Vasilescu M, Marescaux J, Damge C. Trophic and enzymatic adaptation of the intestine to biliopancreatic bypass in the rat. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1993;17:541-7.
136. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2003;26(Suppl 1):S5-20.
137. 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) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001;285:2486-97.
138. Fain JN, Madan AK. Regulation of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) release by explants of human visceral adipose tissue. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* 2005;29:1299-307.
139. Faldt J, Wernstedt I, Fitzgerald SM, Wallenius K, Bergstrom G, Jansson JO. Reduced exercise endurance in interleukin-6-deficient mice. *Endocrinology* 2004;145:2680-6.
140. Farooqi IS, Matarese G, Lord GM, Keogh JM, Lawrence E, Agwu C, et al. Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin Invest* 2002;110:1093-103.
141. Fasshauer M, Klein J, Lossner U, Paschke R. Interleukin (IL)-6 mRNA expression is stimulated by insulin, isoproterenol, tumour necrosis factor alpha, growth hormone, and IL-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Horm Metab Res* 2003;35:147-52.
142. Fernández-Fernández R, Navarro VM, Barreiro ML, Vigo EM, Tovar S, Sirotkin AV, et al. Effects of chronic hyperghrelinemia on puberty onset and pregnancy outcome in the rat. *Endocrinology.* 2005;146:3018-25.
143. Festa A, D'Agostino R Jr, Tracy RP, Haffner SM. Insulin Resistance Atherosclerosis Study. Elevated levels of acute-phase proteins and plasminogen activator inhibitor-1 predict the development of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes* 2002;51:1131-7.
144. Fisher JS, Gao J, Han DH, Holloszy JO, Nolte LA. Activation of AMP kinase enhances sensitivity of muscle glucose transport to insulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002;282:E18-23.
145. Flancbaum L. Mechanisms of weight loss after bariatric surgery. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A.* 2003;13:215-20.

Referencias

146. Fleming RE, Sly WS. Hepcidin: a putative iron-regulatory hormone relevant to hereditary hemochromatosis and the anemia of chronic disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:8160–2.
147. Fleming TP, Kwong WY, Porter R, Ursell E, Fesenko I, Wilkins A, et al. The embryo and its future. *Biol Reprod* 2004;71:1046–54.
148. Flier JS. Obesity wars: Molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell* 2004;116:337-50.
149. Flier JS, Lowell B, Napolitano A, Usher P, Rosen B, Cook KS, et al. Adipsin: regulation and dysregulation in obesity and other metabolic states. *Recent Prog.Horm.Res* 1989;45:567-80.
150. Ford ESG, Dietz, WH. Prevalence of the metabolic syndrome Among U.S. adults: Findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA* 2002;287:356-9.
151. Ford ESG, Galuska DA, Gillespie C, Will JC, Giles WH, Dietz WH. C-reactive protein and body mass index in children: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *J Pediatrics* 2001;138:486-92.
152. Fortunati N, Manti R, Birocco N, Pugliese M, Brignardello E, Ciuffreda L, et al. Pro-inflammatory cytokines and oxidative stress/antioxidant parameters characterize the bio-humoral profile of early cachexia in lung cancer patients. *Oncol Rep.* 2007;18:1521-7.
153. Freeman DJ, Norrie J, Caslake MJ, Gaw A, Ford I, Lowe GD, et al. West of Scotland Coronary Prevention Study. C-reactive protein is an independent predictor of risk for the development of diabetes in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Diabetes* 2002;51:1596-600.
154. Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: Depot difference and regulation by glucocorticoid. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 1998;83:847-50.
155. Friedman JM. Obesity in the new millennium. *Nature* 2000;404:632-4.
156. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 1998;395:763-70.
157. Fu-Cheng X, Anini Y, Chariot J, Voisin T, Galmiche JP, Roze C. Peptide YY release after intraduodenal, intraileal, and intracolonic administration of nutrients in rats. *Pflugers Arch.* 1995;431:66–75.
158. Furuyama A, Hosokawa T, Mochitate K. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha have opposite effects on fibroblasts and epithelial cells during basement membrane formation. *Matrix Biol.* 2008 Feb 29; [Epub ahead of print]
159. Gao J, Ghibaudi L, van Heek M, Hwa JJ. Characterization of diet-induced obese rats that develop persistent obesity after 6 months of high-fat followed by 1 month of low-fat diet. *Brain Res.* 2002;936:87-90.
160. Gao Z, Zhang X, Zuberi A, Hwang D, Quon MJ, Lefevre M, et al. Inhibition of insulin sensitivity by free fatty acids requires activation of multiple serine kinases in 3T3–L1 adipocytes. *Mol Endocrinol* 2004;18:2024-34.
161. García A, Alvarez CV, Smith RG, Diéguez C. Regulation of Pit-1 expression by ghrelin and GHRP-6 through the GH secretagogue receptor. *Mol. Endocrinol* 2001;15:1484–95.

Referencias

162. García MC, López M, Gualillo O, Seoane LM, Diéguez C, Señarís RM. Hypothalamic levels of NPY, MCH, and prepro-orexin mRNA during pregnancy and lactation in the rat: role of prolactin. *FASEB J.* 2003;17:1392-400.
163. García-Unzueta MT, Fernandez-Santiago R, Dominguez-Diez A, Vazquez-Salvi L, Fernandez-Escalante JC, Amado JA. Fasting plasma ghrelin levels increase progressively after biliopancreatic diversion: one-year follow-up. *Obes Surg* 2005;15:187-90.
164. Gayles EC, Pagliassotti MJ, Prach PA, Koppenhafer TA, Hill JO. Contribution of energy intake and tissue enzymatic profile to body weight gain in high-fat-fed rats. *Am J Physiol* 1997;272:R188-94.
165. Gerhardt CC, Romero IA, Canello R, Camoin L, Strosberg AD. Chemokines control fat accumulation and leptin secretion by cultured human adipocytes. *Mol Cell Endocrinol* 2001;175:81-92.
166. Gidding SS, Dennison BA, Birch LL, Daniels SR, Gilman MW, Lichtenstein AH, et al. American Heart Association; American Academy of Pediatrics. Dietary recommendations for children and adolescents: a guide for practitioners: consensus statement from the American Heart Association. *Circulation* 2005;112:2061-75.
167. Giraud SQ, Kotz CM, Grace MK, Levine AS, Billington CJ. Rat hypothalamic NPY mRNA and brown fat uncoupling protein mRNA after high-carbohydrate or high-fat diets. *Am. J. Physiol.* 1994;266,R1578-83.
168. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis: The road ahead. *Cell* 2001;104:503-16.
169. Gluckman PD, Hanson MA. Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. *Science* 2004;305:1733-6.
170. González F, Rote NS, Minium J, O'leary VB, Kirwan JP. Obese reproductive-age women exhibit a proatherogenic inflammatory response during hyperglycemia. *Obesity (Silver Spring)*. 2007;15:2436-44.
171. Gracia-Navarro F, Castaño JP, Malagon MM, Sánchez-Hormigo A, Luque RM, Hickey GJ, et al. Research progress in the stimulatory inputs regulating growth hormone (GH) secretion. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2002;132:141-50.
172. Greenway FL. Surgery for obesity. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1996;25:1005-27.
173. Greenway FL, Greenway SE, Raum WJ. The physiology of the brain, the gut, and the fat cells. In the morbidly obese. En: Martin LF, editor. *Obesity surgery*. New York: McGraw-Hill; 2004. p. 49-65.
174. Grove KL, Grayson BE, Glavas MM, Xiao XQ, Smith MS. Development of metabolic systems. *Physiol Behav* 2005;86:646-60.
175. Grove KL, Smith MS. Ontogeny of the hypothalamic neuropeptide Y system. *Physiol Behav* 2003;79:47-63.
176. Grosser N, Abate A, Oberle S, Vreman HJ, Dennery PA, Becker JC, et al. Heme oxygenase-1 induction may explain the antioxidant profile of aspirin. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;308:956-60.
177. Gualillo O, Caminos JE, Nogueiras R, Seoane LM, Arvat E, Ghigo E, et al. Effect of food restriction on ghrelin in normal-cycling female rats and in pregnancy. *Obes Res.* 2002;10:682-7.

Referencias

178. Gualillo O, Lago F, Gómez-Reino F, Casanueva FF, Diéguez C. Ghrelin, a widespread hormone: insights into molecular and cellular regulation of its expression and mechanism of action. *FEBS Lett.* 2003;552:105–9.
179. Guan H, Arany E, van Beek JP, Chamson-Reig A, Thyssen S, Hill DJ, Yang K. Adipose tissue gene expression profiling reveals distinct molecular pathways that define visceral adiposity in offspring of maternal protein-restricted rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005;288:E663-73.
180. Haffner SM. Insulin resistance, inflammation, and the prediabetic state. *Am J Cardiol* 2003;92:18J-26J.
181. Hales CN, Barker DJ. The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull* 2001;60:5-20.
182. Hales CN, Barker DJ. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 1992;35:595-601.
183. Halford JC, Blundell JE. Pharmacology of appetite suppression. *Prog. Drug Res* 2000;54:25-58.
184. Hannon R, Croxtall JD, Getting SJ, Roviezzo F, Yona S, Paul-Clark MJ, et al. Aberrant inflammation and resistance to glucocorticoids in annexin 1-/- mouse. *FASEB J* 2003;17:253–5.
185. Hansen MJ, Jovanovska V, Morris MJ. Adaptive responses in hypothalamic neuropeptide Y in the face of prolonged high-fat feeding in the rat. *J. Neurochem.* 2004;88,909–16.
186. Hara K, Boutin P, Mori Y, Tobe K, Dina C, Yasuda K, et al. Genetic variation in the gene encoding adiponectin is associated with an increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetes* 2002;51:536-40.
187. Harding R, Leek BF. Central projections of gastric afferent vagal inputs. *J Physiol* 1973;228:73-90.
188. Harrold JA, Williams G, Widdowson PS. Changes in hypothalamic agouti-related protein (AGRP), but not alpha-MSH or pro-opiomelanocortin concentrations in dietary-obese and food-restricted rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;258:574–7.
189. Hayman LL, Meininger JC, Daniels SR, McCrindle BW, Helden L, Ross J, et al. Primary Prevention of Cardiovascular Disease in Nursing Practice: Focus on Children and Youth. A Scientific Statement From the American Heart Association Committee on Atherosclerosis, Hypertension, and Obesity in Youth of the Council on Cardiovascular Disease in the Young, Council on Cardiovascular Nursing, Council on Epidemiology and Prevention, and Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. *Circulation.* 2007;116:344-57.
190. Heidel E, Plagemann A, Davidowa H. Increased response to NPY of hypothalamic VMN neurons in postnatally overfed juvenile rats. *Neuroreport* 1999;10:1827-31.
191. Heilbronn LK, Noakes M, Clifton PM. Energy restriction and weight loss on very-low-fat diets reduce C-reactive protein concentrations in obese, healthy women. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 2001;21:968-70.
192. Herder C, Müller-Scholze S, Rating P, Koenig W, Thorand B, Haastert B, et al. Systemic monocyte chemoattractant protein-1 concentrations are independent of type 2 diabetes or parameters of obesity: results from the Cooperative Health Research in the Region of Augsburg Survey S4 (KORA S4). *Eur J Endocrinol* 2006;154:311-7.
193. Herron DM, Bloomberg R. Complications of bariatric surgery. *Minerva Chir.* 2006;61:125-39.

Referencias

194. Hill JW, Elmquist JK, Elias CF. Hypothalamic pathways linking energy balance and reproduction. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008;294:E827-32.
195. Hillebrand JJ, de Wied D, Adan RAH. Neuropeptides, food intake and body weight regulation: a hypothalamic focus. *Peptides* 2002;23:2283-6.
196. Hiltunen MO, Turunen MP, Häkkinen TP, Rutanen J, Hedman M, Mäkinen K, et al. DNA hypomethylation and methyltransferase expression in atherosclerotic lesions. *Vasc Med* 2002;7:5-11.
197. Hirano T, Akira S, Taga T, Kishimoto T. Biological and clinical aspects of interleukin 6. *Immunol Today* 1990;11:443-9.
198. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 2002;420:333-6.
199. Hober D, Haque A, Wattré P. Production of tumour necrosis factor-alpha (TNF-a) and interleukin-1 (IL-1) in patients with AIDS. Enhanced level of TNF-a is related to a higher cytotoxic activity. *Clin Exp Immunol* 1989;78:329-33.
200. Holcomb IN, Kabakoff RC, Chan B, Baker TW, Gurney A, Henzel W, et al. FIZZ1, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family. *EMBO J* 2000;19:4046-55.
201. Horton JD, Bashmakov Y, Shimomura I, Shimano H. Regulation of sterol regulatory element binding proteins in livers of fasted and refed mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:5987-92.
202. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest.* 2002;109:1125-31
203. Hotamisligil GS. Inflammatory pathways and insulin action. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003;27(Suppl 3):S53-5.
204. 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.
205. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993;259:87-91.
206. Hotamisligil GS, Spiegelman BM. TNF α : a key component of obesity-diabetes link. *Diabetes* 1994;43:1271-8.
207. 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;20:1595-9.
208. Hu E, Liang P, Spiegelman BM. AdipoQ is a novel adipocytespecific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* 1996;271:10697-703.
209. Hu FB, Stampfer, Haffner SM, Solomon CG, Willett WC, Manson JE. Elevated Risk of Cardiovascular Disease Prior to Clinical Diagnosis of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 2002;25:1129-34.

Referencias

210. Hu Z, Cha SH, van Haasteren G, Wang J, Lane MD. Effect of centrally administered C75, a fatty acid synthase inhibitor, on ghrelin secretion and its downstream effects. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:3972-7.
211. Hua W, Hailing Z, Yiwen J, Zhengxian Z, Rebekah C, Xiaoqin W, Steven E. Adiponectin Receptor 1 Gene (ADIPOR1) as a Candidate for Type 2 Diabetes and Insulin Resistance. *Diabetes* 2004;53:2132-6.
212. Hubert H, Feinleib M, McNamara PM, Castelli WP. Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26- year follow-up of participants in the Framingham Heart Study. *Circulation* 1983;67:968-77.
213. Hudgins LC, Baday A, Hellerstein MK, Parker TS, Levine DM, Seidman CE, et al. The effect of dietary carbohydrate on genes for fatty acid synthase and inflammatory cytokines in adipose tissues from lean and obese subjects. *J Nutr Biochem*. 2008;19:237-45.
214. Huizinga CT, Oudejans CBM, Delemarre-van de Waal HA. Persistent changes in somatostatin and neuropeptide Y mRNA levels but not in growth hormone-releasing hormone mRNA levels in adult rats after intrauterine growth retardation. *J Endocrinol* 2001;168:273-81.
215. Hürliemann D, Enseleit F, Ruschitzka F. [Rheumatoid arthritis, inflammation, and atherosclerosis] *Herz*. 2004;29:760-8.
216. Iglesias MA, Ye JM, Frangioudakis G, Saha AK, Tomas E, Ruderman NB, et al. AICAR administration causes an apparent enhancement of muscle and liver insulin action in insulin-resistant high-fat-fed rats. *Diabetes*. 2002;51:2886-94.
217. Iizuka K, Bruick RK, Liang G, Horton JD, Uyeda K. Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:7281-6.
218. Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, et al. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* 2000;49:1939-45.
219. Inui A, Asakawa A, Bowers C, Mantovani G, Laviano A, Meguid M, Fujimiya M. Ghrelin, appetite and gastric motility: the emerging role of the stomach as an endocrine organ. *FASEB* 2004;18:439-6.
220. Inui A. Cancer anorexia-cachexia syndrome: are neuropeptides the key? *Cancer Res* 1999;59:4493-501.
221. Ishii S, Iizuka K, Miller BC, Uyeda K. Carbohydrate response element binding protein directly promotes lipogenic enzyme gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:15597-602.
222. Jacob CO, Fronek Z, Lewis GD. Heritable major histocompatibility complex class II-associated differences in production of tumor necrosis factor- α : relevance to genetic predisposition to systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:1233-7.
223. Jean C, Rome S, Mathe V, Huneau JF, Aattouri N, Fromentin G, et al. Metabolic evidence for adaptation to a high protein diet in rats. *J. Nutr* 2001;131:91-8.
224. Jéquier E. Leptin signaling, adiposity, and energy balance. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;967:379-88.

Referencias

225. Joffe BI, Panz VR, Raal FJ. From lipodystrophy syndromes to diabetes mellitus. *Lancet* 2001;5;357:1379-81.
226. Jughan-Vague I, Thompson SG, Jespersen J. Involvement of the hemostatic system in the insulin resistance syndrome: a study of 1 500 patients with angina pectoris: the ECAT Angina Pectoris Study Group. *Arteriocler Thromb* 1993;13:1865-73.
227. Jump DB. Fatty acid regulation of gene transcription. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2004;41:41-78.
228. Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab*. 2005;1:15-25.
229. Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*. 2000;106:473-81.
230. Kamal AM, Flower RJ, Perretti M. An overview of the effects of annexin 1 on cells involved in the inflammatory process. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100 Suppl 1:39-47.
231. Kanatani A, Hata M, Mashiko S, Ishihara A, Okamoto O, Haga Y, et al. A typical Y1 receptor regulates feeding behaviors: effects of a potent and selective Y1 antagonist, J-115814. *Mol Pharmacol*. 2001;59:501-5.
232. Karhunen LJ, Juvonen KR, Huotari A, Purhonen AK, Herzig KH. Effect of protein, fat, carbohydrate and fibre on gastrointestinal peptide release in humans. *Regul Pept*. 2008 Mar 25. [Epub ahead of print]
233. Kaser S, Kaser A, Sanhofer A, Ebenbichler CF, Tilg H, Patsch JR. Resistin messenger-RNA expression is increased by proinflammatory cytokines in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;309:286-90.
234. Kaufman B, Scharf O, Arbeit J, Ashcroft M, Brown JM, Bruick RK, et al. Proceedings of the Oxygen Homeostasis/Hypoxia Meeting. *Cancer Res*. 2004;64:3350-6.
235. Kazumi T, Kawaguchi A, Sakai K, Hirano T, Yoshino G. Young men with high-normal blood pressure have lower serum adiponectin, smaller LDL size, and higher elevated heart rate than that with optimal blood pressure. *Diabetes Care* 2002;25:971-6.
236. Kharroubi I, Rasschaert J, Eizirik DL, Cnop M. Expression of adiponectin receptors in pancreatic beta cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;312:1118-22.
237. Kim JB, Spiegelman BM. ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev*. 1996;10:1096-107.
238. Kim KH, Lee K, Moon YS, Sul HS. A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 2001;276:11252-6.
239. Kimura M, Tanaka S, Isoda F, Sekigawa K, Yamakawa T, Sekihara H. T lymphopenia in obese diabetic (db/db) mice is non-selective and thymus independent. *Life Sci* 1998;62:1243-50.
240. Kirchgessner AL, Liu M. Orexin synthesis and response in the gut. *Neuron* 1999;24:941-51.
241. Kishore U, Reid KB. C1q: structure, function, and receptors. *Immunopharmacology* 2000;49:159-70.
242. Kissebah AH, Sonnenberg GE, Myklebust J, Goldstein M, Broman K, James RG, et al. Quantitative trait loci on chromosomes 3 and 17 influence phenotypes of the metabolic syndrome. *PNAS* 2000;97:14478-83.

Referencias

243. Knittle J, Hirsch J. Effect of early nutrition on the development of rat epididymal fat pads: cellularity and metabolism. *J Clin Invest* 1968;47:2091-8.
244. Knoll J. Satielin: a highly potent anorexogenic substance in human serum. *Physiol Behav* 1979;23:497-502.
245. Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol* 2002;30:620-50.
246. Kohler HP, Grant PJ. Plasminogen-Activator Inhibitor Type 1 and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2000;342:1792-801.
247. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa, K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999;402:656-60.
248. Konstantinides S, Schafer K, Koschnick S, Loskutoff DJ. Leptin-dependent platelet aggregation and arterial thrombosis suggests a mechanism for atherothrombotic disease in obesity. *J. Clin. Invest* 2001;108:1533-40.
249. Konturek PC, Konturek JW, Cześniakiewicz-Guzik M, Brzozowski T, Sito E, Konturek SJ. Neuro-hormonal control of food intake: basic mechanisms and clinical implications. *J Physiol Pharmacol.* 2005;56 Suppl 6:5-25.
250. Konturek SJ, Konturek JW, Pawlik T, Brzozowski T. Brain-gut axis and its role in the control of food intake. *J Physiol Pharmacol.* 2004;55(1 Pt 2):137-54.
251. Konturek SJ, Meyers CA, Kwiecien N, Obtulowicz W, Tasler J, Oleksy J, et al. Effect of human pancreatic polypeptide and its C-terminal hexapeptide on pancreatic secretion in man and in the dog. *Scand J Gastroenterol* 1982;17:395-9.
252. Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature* 2000;404:635-43.
253. Korbonits M, Goldstone AP, Gueorguiev M, Grossman AB. Ghrelin – a hormone with multiple functions. *Front Neuroendocrinol* 2004;25:27-68.
254. Korner J, Savontaus E, Chua SC Jr, Leibel RL, Wardlaw SL. Leptin regulation of *Agrp* and *Npy* mRNA in the rat hypothalamus. *J Neuroendocrinol.* 2001;13:959-66.
255. Kozak R, Burlet A, Burlet C, Beck B. Dietary composition during fetal and neonatal life affects neuropeptide Y functioning in adult offspring. *Brain Res Dev Brain Res* 2000;125:75-82.
256. Kozak R, Richy S, Beck B. Persistent alterations in neuropeptide Y release in the paraventricular nucleus of rats subjected to dietary manipulation during early life. *Eur J Neurosci* 2005;21:2887-92.
257. Krzystek-Korpacka M, Matusiewicz M, Diakowska D, Grabowski K, Blachut K, Kustrzeba-Wojcicka I, et al. Acute-phase response proteins are related to cachexia and accelerated angiogenesis in gastroesophageal cancers. *Clin Chem Lab Med.* 2008;46:359-64.
258. Kubota N, Terauchi Y, Yamauchi T, Kubota T, Moroi M, Matsui J, et al. Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *J Biol Chem.* 2002;277:25863-6.
259. Kunkel SL, Chensue SW. Arachidonic acid metabolites regulate interleukin-1 production. *Biochem Biophys Res Commun.* 1985;128:892-7.

Referencias

260. Lago F, Diéguez C, Gómez-Reino J, Gualillo O. The emerging role of adipokines as mediators of inflammation and immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2007;18:313-25.
261. Lam TK, Pocai A, Gutierrez-Juarez R, Obici S, Bryan J, Aguilar-Bryan L, et al. Hypothalamic sensing of circulating fatty acids is required for glucose homeostasis. *Nat. Med* 2005;11:320-7.
262. Langley K. The neuroendocrine concept today. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1994;733:1-17.
263. Langley-Evans SC, Welham SJ, Sherman RC, Jackson AA. Weanling rats exposed to maternal low-protein diets during discrete periods of gestation exhibit differing severity of hypertension. *Clin Sci (Lond)* 1996;91:607-15.
264. Larrad-Jiménez A. Biliopancreatic diversion for the treatment of morbid obesity. *Obesity and Metabolism* 2008;4:12-21.
265. Larrad-Jiménez A, Álvarez MP, Fernández MP, Canoc P, Jiménez Ortega V, Isabel Esquifino A. Derivación biliopancreática de Larrad. Descripción de un modelo experimental en la rata. *Cir Esp.* 2008b;83:89-92.
266. Larrad-Jiménez, A, Díaz-Guerra CS, de Cuadros Borrajo P, Lesmes IB, Esteban BM. Short, mid- and long-term results of Larrad biliopancreatic diversion. *Obes.Surg* 2007;17:202-10.
267. Larrad-Jiménez A, Sánchez C, Moreno B. Tratamiento quirúrgico de la obesidad mórbida. En: Moreno B, Monereo S, Álvarez J. *Obesidad: la epidemia del siglo XXI.* Madrid 1999;340-71.
268. Larsen CM, Faulenbach M, Vaag A, Volund A, Ehse JA, Seifert B, et al. Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 2007;356:1517-26.
269. Laux T, Schweizer M. Dietary-induced pre-translational control of rat fatty acid synthase. *Biochem J.* 1990;266:793-7.
270. Le Roux CW, Aylwin SJ, Batterham RL, Borg CM, Coyle F, Prasad V, et al. Gut hormone profiles following bariatric surgery favor an anorectic state, facilitate weight loss, and improve metabolic parameters. *Ann Surg* 2006;243:108-14.
271. Le Roux C, Patterson R, Vincent P, Hunt C, Ghatei A, Bloom S. Postprandial plasma ghrelin is suppressed proportional to meal calorie content in normal-weight but not obese subjects. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2005;90:1068-71.
272. Lecheminant JD, Gibson CA, Sullivan DK, Hall S, Washburn R, Vernon MC, et al. Comparison of a low carbohydrate and low fat diet for weight maintenance in overweight or obese adults enrolled in a clinical weight management program. *Nutr J.* 2007;6:36.
273. Lee JH, Kwon YD, Hong SH, Jeong HJ, Kim HM, Um JY. Interleukin-1 Beta gene polymorphism and traditional constitution in obese women. *Int J Neurosci.* 2008;118:793-805.
274. Leibowitz SF, Akabayashi A, Wang J. Obesity on a high-fat diet: role of hypothalamic galanin in neurons of the anterior paraventricular nucleus projecting to the median eminence. *J Neurosci* 1998;18:2709-19.
275. Leibowitz SF, Wortley KE. Hypothalamic control of energy balance: different peptides, different functions. *Peptides* 2004;25:473-504.
276. Lehrke M, Reilly MP, Millington SC, Iqbal N, Rader DJ, Lazar MA. An inflammatory cascade leading to hyperresistinemia in humans. *PLoS Med* 2004;1:161-8.

Referencias

277. Lely AJ, Tschop M, Heiman ML, Ghigo E. Biological, physiological, pathophysiological and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocrine Reviews* 2004;25:426-57.
278. Levi AC, Borghi F, Petrino R, Bargoni A, Fronticelli CM, Gentili S. Modifications of the trophism of intestinal mucosa after intestinal and bilio-pancreatic diversion in the rat. *Ital J Gastroenterol* 1991;23:202-7.
279. Levin BE. Intracarotid glucose induced norepinephrine response and the development of diet induced obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1992;16:451-7.
280. Levin BE, Dunn-Meynell A. A dysregulation of arcuate nucleus preproneuropeptide Y mRNA in diet-induced obese rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 1997;272:R1365-70.
281. Levin BE, Dunn-Meynell A. A reduced central leptin sensitivity in rats with diet-induced obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002;283:R941-8.
282. Levin BE, Govek E. Gestational obesity accentuates obesity in obesity-prone progeny. *Am J Physiol* 1998;275:R1374-9.
283. Lewis GF, Carpentier A, Adeli K, Giacca A. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr. Rev* 2002;23:201-29.
284. Lewis RM, Petry CJ, Ozanne SE, Hales CN. Effects of maternal iron restriction in the rat on blood pressure, glucose tolerance and serum lipids in the 3-month old offspring. *Metabolism* 2001;50:562-7.
285. Leyton J, Drury PJ, Crawford MA. Differential oxidation of saturated and unsaturated fatty acids in vivo in the rat. *Br J Nutr.* 1987;57:383-93.
286. Li J, Takaishi K, Cook W, McCorkle SK, Unger RH. Insig-1 "brakes" lipogenesis in adipocytes and inhibits differentiation of preadipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;5:9476-81.
287. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation* 2002;105:1135-43.
288. Lin S, Thomas TC, Storlien LH, Huang XF. Development of obesity and central leptin resistance in high-fat diet induced obese mice. *Int J Obes Rel Metab Disorder* 2000;1-8.
289. Loboda A, Jazwa A, Jozkowicz A, Dorosz J, Balla J, Molemac G, Dulak J. Atorvastatin prevents hypoxia-induced inhibition of endothelial nitric oxide synthase expression but does not affect heme oxygenase-1 in human microvascular endothelial cells. *Atherosclerosis* 2006;187:26-30.
290. Loftus TM, Jaworsky DE, Frehywot GL, Townsend CA, Ronnett GV, Lane MD, et al. Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. *Science.* 2000;288:2379-81.
291. Lolmède K, Durand de Saint Front V, Galitzky J, Lafontan M, Bouloumié A. Effects of hypoxia on the expression of proangiogenic factors in differentiated 3T3-F442A adipocytes. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2003;27:1187-95.
292. Loos BG, Craandijk J, Hoek FJ, Wertheim-van Dillen PME. Elevation of systemic markers to cardiovascular diseases in the peripheral blood of periodontitis patients. *J Periodontol* 2000;71:1528-34.

Referencias

293. López M, Lage R, Saha AK, Pérez-Tilve D, Vázquez MJ, Varela L, et al. Hypothalamic Fatty Acid Metabolism Mediates the Orexigenic Action of Ghrelin. *Cell Metab.* 2008;7:389-99.
294. López M, Lage R, Tung YC, Challis BG, Varela L, Virtue S, et al. Orexin expression is regulated by alpha-melanocyte-stimulating hormone. *J Neuroendocrinol.* 2007a;19:703-7.
295. López M, Lelliott CJ, Tovar S, Kimber W, Gallego R, Virtue S, et al. Tamoxifen-induced anorexia is associated with fatty acid synthase inhibition in the ventromedial nucleus of the hypothalamus and accumulation of malonyl-CoA. *Diabetes* 2006;55:1327-36.
296. López M, Señaris R, Gallego R, García-Caballero T, Lago F, Seoane L, et al. Orexin receptors are expressed in the adrenal medulla of the rat. *Endocrinology.* 1999;140:5991-4.
297. López M, Seoane LM, García MC, Diéguez C, Señaris R. Neuropeptide Y, but not agouti-related peptide or melanin-concentrating hormone, is a target peptide for orexin-A feeding actions in the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology.* 2002;75:34-44.
298. López M, Seoane LM, García MC, Lago F, Casanueva FF, Señaris R, Diéguez C. Leptin regulation of prepro-orexin and orexin receptor mRNA levels in the hypothalamus. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;269:41-5.
299. López M, Seoane LM, Tovar S, García MC, Nogueiras R, Diéguez C, Señaris RM. A possible role of neuropeptide Y, agouti-related protein and leptin receptor isoforms in hypothalamic programming by perinatal feeding in the rat. *Diabetologia.* 2005a;48:140-8.
300. López M, Tovar S, Vázquez MJ, Nogueiras R, Señaris R, Diéguez C. Sensing the fat: fatty acid metabolism in the hypothalamus and the melanocortin system. *Peptides.* 2005b;26:1753-8.
301. López M, Tovar S, Vázquez MJ, Nogueiras R, Seoane LM, García M, et al. Perinatal overfeeding in rats results in increased levels of plasma leptin but unchanged cerebrospinal leptin in adulthood. *Int J Obes (Lond).* 2007b;31:371-7.
302. Loskutoff DJ, Samad F. The adipocyte and hemostatic balance in obesity: studies of PAI-1. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 1998;18:1-6.
303. Losso JN, Bawadi HA. Hypoxia inducible factor pathways as targets for functional foods. *J Agric Food Chem.* 2005;53:3751-68.
304. Lotter EC, Woods SC. Injections of insulin and changes of body weight. *Physiol Behav* 1977;18:293-7.
305. Lucas A. Programming by early nutrition: an experimental approach. *J. Nutr* 1998;128:401S-6S.
306. Lund G, Andersson L, Lauria M, Lindholm M, Fraga MF, Villar-Garea A, et al. DNA methylation polymorphisms precede any histological sign of atherosclerosis in mice lacking apolipoprotein E. *J Biol Chem* 2004;279:29147-54.
307. Lundberg JM, Tatemoto K, Terenius L, Hellstrom PM, Mutt V, Kokfelt T, et al. Localization of peptide YY (PYY) in gastrointestinal endocrine cells and effects on intestinal blood flow and motility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982;79:4471-5.
308. Lustig RH. The neuroendocrinology of obesity. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2001;30:765-85.

Referencias

309. MacDougald OA, Mandrup S. Adipogenesis: forces that tip the scales. *Trends Endocrinol Metab* 2002;13:5–11.
310. 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;221:286-9.
311. Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, Kihara S, Nishizawa H, Kishio K, et al. PPAR γ ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes* 2001;50:2094-9.
312. Maines MD. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997;37:517–54.
313. Mancuso P, Canetti C, Gottschalk A, Tithof PK, Peters-Golden M. Leptin augments alveolar macrophage leukotriene synthesis by increasing phospholipase activity and enhancing group IVC iPLA2 (cPLA2 γ) protein expression. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;287:497–502.
314. Manning J, Vehaskari VM. Postnatal modulation of prenatally programmed hypertension by dietary Na and ACE inhibition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;288:R80-4.
315. Mantzoros CS. The role of leptin in human obesity and disease: a review of current evidence. *Ann Intern Med* 1999;130:651-7.
316. Marceau P, Biron S, Bourque RA, Potvin M, Hould FS, Simard S. Biliopancreatic diversion with a new type of gastrectomy. *Obes Surg* 1993;3:29-35.
317. Marfella R, Quagliari L, Nappo F, Ceriello A, Giugliano D. Acute hyperglycemia induces an oxidative stress in healthy subjects. *J Clin Invest* 2001;108:635-6.
318. Martin TL, Alquier T, Asakura K, Furukawa N, Preitner F, Kahn BB. Diet-induced obesity alters AMP kinase activity in hypothalamus and skeletal muscle. *J Biol Chem* 2006;281:18933-41.
319. Mason EE. Vertical banded gastroplasty for obesity. *Arch Surg* 1982;117:701-6.
320. Mason TM, Goh T, Techipashvili V, Sandhu H, Gupta N, Lewis GF, et al. Prolonged elevation of plasma free fatty acids desensitizes the insulin secretory response to glucose in vivo in rats. *Diabetes* 1999;48:524-30.
321. Matsuda M, Shimomura I, Sata M, Arita Y, Nishida M, Maeda N, et al. Role of adiponectin in preventing vascular stenosis. The missing link of adipo-vascular axis. *J Biol Chem* 2002;277:37487-91.
322. Matsuzawa Y, Funahashi T, Nakamura T. Molecular mechanism of metabolic syndrome X: contribution of adipocytokines adipocyte-derived bioactive substances. *Ann N Y Acad Sci* 1999;892:146-54.
323. McGarry JD, Brown NF. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem* 1997;244:1–14.
324. Mc Gill JB, Schneider DJ, Arfken CL, Lucore CI, Sobel BE. Factors responsible for impaired fibrinolysis in obese subjects and NIDDM patients. *Diabetes* 1994;43:104-9.
325. Meckling KA, O'Sullivan C, Saari D. Comparison of a low-fat diet to a low-carbohydrate diet on weight loss, body composition, and risk factors for diabetes and cardiovascular disease in free-living, overweight men and women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89:2717-23.

Referencias

326. Medina-Gómez G, Virtue S, Lelliott C, Boiani R, Campbell M, Christodoulides C, et al. The link between nutritional status and insulin sensitivity is dependent on the adipocyte-specific peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 isoform. *Diabetes*. 2005;54:1706-16.
327. Mendieta-Zerón H. Malnutrición en Colorines, Valle de Bravo, Estado de México y tres comunidades del programa PROGRESA. *Aten Primaria* 2008a;40:156-7.
328. Mendieta-Zerón H, López M, Diéguez C. Regulación hipotalámica de la ingesta por nutrientes y estado metabólico. *Rev Esp Obes* 2007;5:351-62.
329. Mendieta-Zerón H, López M, Diéguez C. Gastrointestinal peptides controlling body weight homeostasis. *Gen Comp Endocrinol*. 2008b;155:481-95.
330. Menzaghi C, Ercolino T, Di Paola R, Berg AH, Warram JH, Scherer PE, et al. A haplotype at the adiponectin locus is associated with obesity and other features of the insulin resistance syndrome. *Diabetes* 2002;51:2306-12.
331. Mercer JG, Hoggard N, Williams LM, Lawrence CB, Hannah LT, Trayhurn P. Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (OB-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. *FEBS Lett* 1996;387:113-6.
332. Merryweather-Clarke AT, Cadet E, Bomford A, Capron D, Viprakasit V, Miller A, et al. Digenic inheritance of mutations in HAMP and HFE results in different types of haemochromatosis. *Hum Mol Genet* 2003;12:2241-7.
333. Meyer K, Lubo Zhang. Fetal programming of cardiac function and disease. *Reprod Sci*. 2007;14:209-16.
334. Micic D, Sumarac-Dumanovic M, Kendereski A, Cvijovic G, Zoric S, Pejkovic D, et al. Total ghrelin levels during acute insulin infusion in patients with polycystic ovary syndrome. *J Endocrinol Invest*. 2007;30:820-7.
335. Milagro FI, Campeón J, Martínez JA. Weight gain induced by high-fat feeding involves increased liver oxidative stress. *Obesity (Silver Spring)*. 2006;14:1118-23.
336. Miljic D, Pekic S, Djurovic M, Doknic M, Milic N, Casanueva FF, et al. Ghrelin has partial or no effect on appetite, growth hormone, prolactin, and cortisol release in patients with anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91:1491-5.
337. Miller DS, Parsonage SR. The effect of litter size on subsequent energy utilization. *Proc Nutr Soc* 1972;31:30A.
338. Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa N, Kim Y-B, Lee A, Xue B, et al. AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 2004;428:569-74.
339. Mitra S, Bansal VS, Bhatnagar PK. From a glucocentric to a lipocentric approach towards metabolic syndrome. *Drug Discov Today*. 2008;13(5-6):211-8.
340. Mohamed-Ali V, Pinkney JH, Coppack SW. Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord* 1998;22:1145-58.
341. Mokdad AH, Bowman BA, Ford ES, Vinicor F, Marks JS, Koplan JP. The continuing epidemics of obesity and diabetes in the United States. *JAMA* 2001;86:1195-200.

Referencias

342. Morita T. Heme oxygenase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1786-95.
343. Moreno Esteban B, Zugasti Murillo A. Cirugía bariátrica: situación actual. *Rev Med Univ Navarra* 2004;4866-71.
344. Morrison CD, Morton GJ, Niswender KD, Gelling RW, Schwartz MW. Leptin inhibits hypothalamic Npy and Agrp gene expression via a mechanism that requires phosphatidylinositol 3-OH-kinase signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005;289:E1051-7.
345. Moustaid N, Beyer RS, Sul HS. Identification of an insulin response element in the fatty acid synthase promoter. *J. Biol. Chem* 1994;269:5629-34.
346. Münzberg H, Flier JS, Bjørbaek C. Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice. *Endocrinology*. 2004;145:4880-9.
347. Murray I, Sniderman AD, Havel PJ, Cianflone K. Acylation stimulating protein (ASP) deficiency alters postprandial and adipose tissue metabolism in male mice. *J Biol Chem* 1999;274:36219-25.
348. Mutch DM, Wahli W, Williamson G. Nutrigenomics and nutrigenetics: the emerging faces of nutrition. *FASEB J* 2005;19:1602-16.
349. Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura NH, Mazda T, Tomita T. Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J Biochem* 1996;120:803-12.
350. Naito M. Macrophage differentiation and function in health and disease. *Pathol Int*. 2008;58:143-55.
351. Näslund E, Hellström PM. Appetite signaling: from gut peptides and enteric nerves to brain. *Physiol Behav*. 2007;92:256-62.
352. National Institutes of Health. Consensus Development Conference Panel. Gastrointestinal Survey for Severe Obesity: Consensus Development Conference Statement. *Ann Intern Med* 1991;115:956-61.
353. Nemeth E, Valore EV, Territo M, Schiller G, Lichtenstein A, Ganz T. Heparin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood* 2003;101:2461-3.
354. Nguyen TT. The cholesterol-lowering action of plant stanol esters. *J. Nutr* 1999;129:2109-12.
355. Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, Danan JL, Brigard X, Devaux I, et al. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia and inflammation. *J Clin Invest* 2002;110:1037-44.
356. Nishizawa H, Shimomura I, Kishida K, Maeda N, Kuriyama H, Nagaretani H, et al. Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte-derived protein. *Diabetes* 2002;51:2734-41.
357. Nisoli E, Clementi E, Paolucci C, Cozzi V, Tonello C, Sciorati C, et al. Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science*. 2003;299:896-9.
358. Nisoli E, Falcone S, Tonello C, Cozzi V, Palomba L, Fiorani M, et al. Mitochondrial biogenesis by NO yields functionally active mitochondria in mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004;101:16507-12.

Referencias

359. Nogueiras R, Barreiro ML, Caminos JE, Gaytán F, Suominen JS, Navarro VM, et al. Novel expression of resistin in rat testis: functional role and regulation by nutritional status and hormonal factors. *J Cell Sci.* 2004;117(Pt 15):3247-57.
360. Nogueiras R, González CR, Mendieta-Zerón H, Lage R, Diéguez C. Resistina: una nueva hormona expresada en el tejido adiposo. *Rev Esp Obes* 2005;3:194-211.
361. Nogueiras R, López M, Lage R, Perez-Tilve D, Pfluger P, Mendieta-Zerón H, et al. Bsx, a Novel Hypothalamic Factor linking Feeding with Locomotor Activity, is Regulated by Energy Availability. *Endocrinology.* 2008;149:3009-15.
362. Nonogaki K, Fuller GM, Fuentes NL, Moser AH, Staprans I, Grunfeld C. Interleukin-6 stimulates hepatic triglyceride secretion in rats. *Endocrinology* 1995;136:2143-9.
363. Obici S, Feng Z, Tan J, Liu L, Karkanas G, Rossetti L. Central melanocortin receptors regulate insulin action. *J Clin Invest.* 2001;108:1079-85.
364. Ogden CL, Carroll MD, Flegal KM. Epidemiologic trends in overweight and obesity. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2003;32:741-60.
365. Olszewski PK, Wirth MM, Shaw TJ, Grace MK, Levine AS. Peptides that regulate food intake: effect of peptide histidine isoleucine on consummatory behavior in rats. *Am. J. Physiol* 2003;284:R1445-53.
366. Oral EA, Simha V, Ruiz E, Andewelt A, Premkumar A, Snell P, et al. Leptin replacement therapy for lipodystrophy. *N Engl J Med* 2002;346:570-8.
367. O'Rourke L, Gronning LM, Yeaman SJ, Shepherd PR. Glucose-dependent regulation of cholesterol ester metabolism in macrophages by insulin and leptin. *J. Biol. Chem* 2002;277:42557-62.
368. Otero M, Lago R, Gómez R, Diéguez C, Lago F, Gómez-Reino J, Gualillo O. Towards a pro-inflammatory and immunomodulatory emerging role of leptin. *Rheumatology (Oxford).* 2006;45:944-50.
369. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, et al. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* 1999;100:2473-6.
370. Ozanne SE, Hales CN. Lifespan: catch-up growth and obesity in male mice. *Nature* 2004;427:411-2.
371. Palkovits M. Interconnections between the neuroendocrine hypothalamus and the central autonomic system. Geoffrey Harris Memorial Lecture, Kitakyushu, Japan, October 1998. *Front Neuroendocrinol.* 1999;20:270-95.
372. Paoli G, Mantovani P, Ardissino D. [Pathogenesis of acute coronary syndromes: the activated plaque] *Ital Heart J.* 2005;6 Suppl 3:5S-11S.
373. Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. Hepcidin, an urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 2001; 276:7806-10.
374. Park H, Kaushik VK, Constant S, Prentki M, Przybytkowski E, Ruderman NB, et al. Coordinate regulation of malonyl-CoA decarboxylase, sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase, and acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase in rat tissues in response to exercise. *J Biol Chem* 2002;277:32571-7.

Referencias

375. Park HY, Kwon HM, Lim HJ, Hong BK, Lee JY, Park BE. Potential role of leptin in angiogenesis: leptin induces endothelial cell proliferation and expression of matrix metalloproteinases in vivo and in vitro. *Exp Mol Med* 2001;33:95-102.
376. Pastor C. Relevancia de la determinación de la composición corporal en el criterio diagnóstico, terapéutico y evolutivo de la obesidad mórbida. Estudio de la relación del porcentaje de grasa corporal con comorbilidades asociadas tras bypass gástrico. Tesis Doctoral. Universidad de Navarra. 2008.
377. Patel L, Buckels AC, Kinghorn IJ, Murdock PR, Holbrook JD, Plumpton C, et al. Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;300:472-6.
378. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego, CA, Academic Press, 1998, p.22
379. Peeraully MR, Jenkins JR, Trayhurn P. NGF gene expression and secretion in white adipose tissue: regulation in 3T3-L1 adipocytes by hormones and inflammatory cytokines. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004;287:E331-9.
380. Peng Y, Schwarz EJ, Lazar MA, Genin A, Spinner NB, Taub R. *Genomics* 1997;43:278-84.
381. Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update. *J. Clin. Invest* 2003;111:1805-12.
382. Perretti M, Gavins FN. Annexin 1: an endogenous anti-inflammatory protein. *News Physiol Sci* 2003;18:60-4.
383. Perry CD, Hutter MM, Smith DB, Newhouse JP, McNeil BJ. Survival and changes in comorbidities after bariatric surgery. *Ann Surg.* 2008;247:21-7.
384. Petrovich GD, Setlow B, Holland PC, Gallagher M. Amygdalo-hypothalamic circuit allows learned cues to override satiety and promote eating. *J. Neurosci* 2002;22:8748-53.
385. Phillips RJ, Powley TL. Plasticity of vagal afferents at the site of an incision in the wall of the stomach. *Auton Neurosci* 2005;123:44-53.
386. Pigeon C, Ilyin G, Courseland B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, et al O. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem* 2001;276:7811-9.
387. Pinheiro AR, Salvucci ID, Aguila MB, Mandarin-de-Lacerda CA. Protein restriction during gestation and/or lactation causes adverse transgenerational effects on biometry and glucose metabolism in F1 and F2 progenies of rats. *Clin Sci (Lond)*. 2008;114:381-92.
388. Plagemann A, Harder T, Janert U, Rake A, Rittel F, Rohde W, Dörner G. Malformations of hypothalamic nuclei in hyperinsulinemic offspring of rats with gestational diabetes. *Dev Neurosci* 1999;21:58-67.
389. Plagemann A, Harder T, Melchior K, Rake A, Rohde W, Dörner G. Elevation of hypothalamic neuropeptide Y-neurons in adult offspring of diabetic mother rats. *Neuroreport* 1999a;10:3211-6.
390. Plagemann A, Harder T, Rake A, Melchior K, Rittel F, Rohde W, Dörner G. Hypothalamic insulin and neuropeptide Y in the offspring of gestational diabetic mother rats. *Neuroreport* 1998;9:4069-73.

Referencias

391. Plagemann A, Harder T, Rake A, Voits M, Fink H, Rohde W, Dörner G. Perinatal increase of hypothalamic insulin, acquired malformation of hypothalamic galaninergic neurons, and syndrome X-like alterations in adulthood of neonatally overfed rats. *Brain Res.* 1999b;836:146-55.
392. Plagemann A, Heidrich I, Gotz F, Rohde W, Dörner G. Obesity and enhanced diabetes and cardiovascular risk in adult rats due to early postnatal overfeeding, *Exp. Clin. Endocrinol* 1992;99:154-8.
393. Pocai A, Lam TKT, Obici S, Gutiérrez-Juárez R, Muse ED, Arduini A, Rossetti L. Restoration of hypothalamic lipid sensing normalizes energy and glucose homeostasis in overfed rats. *J Clin Invest.* 2006;116:1081-91.
394. Pociot F, Briant L, Jongeneel CV, Mölvig J, Worsaae H, Abbal M, et al. Association of tumor necrosis factor alpha (TNF) and class II major histocompatibility complex alleles with the secretion of TNF-alpha by human mononuclear cells: a possible link to insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Immunol* 1993;23:224-31.
395. Poitou Bernert C, Ciangura C, Coupaye M, Czernichow S, Bouillot JL, Basdevant A. Nutritional deficiency after gastric bypass: diagnosis, prevention and treatment. *Diabetes Metab.* 2007;33:13-24.
396. Popovic V, Leal A, Micic D, Koppeschaar HP, Torres E, Paramo C, et al. GH-releasing hormone and GH-releasing peptide-6 for diagnostic testing in GH-deficient adults. *Lancet.* 2000;356:1137-42.
397. Popovic V, Svetel M, Djurovic M, Petrovic S, Doknic M, Pekic S, et al. Circulating and cerebrospinal fluid ghrelin and leptin: potential role in altered body weight in Huntington's disease. *Eur J Endocrinol.* 2004;151:451-5.
398. Pradet-Balade B, Boulme F, Beug H, Mullner EW, García-Sanz JA. Translation control: bridging the gap between genomics and proteomics? *Trends Biochem Sci* 2001;26:225-9.
399. Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *J. Am. Med. Assoc* 2001;286:327-4.
400. Qi C, Pekala PH. Tumor necrosis factor- α -induced insulin resistance in adipocytes. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000;223:128-35.
401. Qian H, Azain MJ, Hartzell DL, Baile CA. Increased leptin resistance as rats grow to maturity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1998;219:160-5.
402. Rajala MW, Obici S, Sherer PE, Rossetti L. Adipose-derived resistin an gut-derived resistin-like molecule-beta selectively impair insulin action on glucose production. *J Clin Invest* 2003;111:225-30.
403. Rajala MW, Scherer PE. Minireview: The adipocyte-at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology* 2003;144:3765-73.
404. Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. The glucose fatty-acid cycle: its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1963;i:785-9.
405. Rapisarda A, Uranchimeg B, Scudiero DA, Selby M, Sausville EA, Shoemaker RH, Melillo G. Identification of small molecule inhibitors of hypoxia-inducible factor 1 transcriptional activation pathway. *Cancer Res.* 2002;62:4316-24.

Referencias

406. Raso GM, Pacilio M, Esposito E, Coppola A, Di Carlo R, Meli R. Leptin potentiates IFN-gamma-induced expression of nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase-2 in murine macrophage J774A. 1. *Br J Pharmacol* 2002;137:799–804.
407. Ravelli ACJ, van der Meulen JHP, Osmond C, Barker DJP, Bleker OP. Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally. *Am J Clin Nutr* 1999;70:811–6.
408. Ravelli G, Stein Z, Susser MW. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N Engl J Med* 1976;295:349-53.
409. Ravussin E, Bogardus C. Energy balance and weight regulation: genetics versus environment. *Br J Nutr* 2000;83 Suppl 1:S17-20.
410. Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988;37:1595-607.
411. Ren D, Li M, Duan C, Rui L. Identification of SH2-B as a key regulator of leptin sensitivity, energy balance, and body weight in mice. *Cell Metab* 2005;2:95–104.
412. Revel M. Host defense against infections and inflammations: role of the multifunctional IL-6/IFN- β 2 cytoquine. *Experientia* 1989;45:549-57.
413. Ridker PM. Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention. *Circulation* 2003;107:363-9.
414. Ridker PM, Buring JE, Cook NR, Rifai N. C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14 719 initially healthy American women. *Circulation* 2003;107:391-7.
415. Rimm E, Stampfer M, Giovannucci E, Ascherio A, Spiegelman D, Colditz GA, et al. Body size and fat distribution as predictors of coronary heart disease among middle-aged and older US men. *Am. J. Epidemiol* 1995;141:1117-27.
416. Robbins TW. Hunger. In: Lighman S.L.& Everitt B (ed). *Neuroendocrinology*. Blackwell Scientific Publications, London, 1986, pp. 252-303.
417. Rodríguez DF, Navarro M, Gómez R, Escuredo L, Nava F, Fu J, et al. An anorexic lipid mediator regulated by feeding. *Nature* 2001;414:209-12.
418. Ronnett GV, Kleman AM, Kim EK, Landree LE, Tu Y. Fatty acid metabolism, the central nervous system, and feeding. *Obesity (Silver Spring)*. 2006;14 Suppl 5:201S-207S.
419. Roseboom TJ, van der Meulen JHP, Osmond C, Barker DJP, Ravelli ACJ, Bleker OP. Plasma lipid profiles in adults after prenatal exposure to the Dutch famine. *Am J Clin Nutr* 2000b;72:1101–6.
420. Roseboom TJ, van der Meulen JHP, Osmond C, Barker DJP, Ravelli ACJ, Tanka JS, et al. Coronary heart disease after prenatal exposure to the Dutch famine. *Heart* 2000a;84:595–8.
421. Rossi M, Kim MS, Morgan DG, Small CJ, Edwards CM, Sunter D, et al. A C-terminal fragment of Agouti-related protein increases feeding and antagonizes the effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in vivo. *Endocrinology* 1998;139:4428-31.
422. Rubino F, Forgione A, Cummings DE, Vix M, Gnuli D, Mingrone G, et al. The mechanism of diabetes control after gastrointestinal bypass surgery reveals a role of the proximal small intestine in the pathophysiology of type 2 diabetes *Ann Surg* 2006;244:741-9.

Referencias

423. Ruderman N, Prentki M. AMP kinase and malonyl-CoA: targets for therapy of the metabolic syndrome. *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3:340-51.
424. Sabench F, Hernández M, Blanco S, del Castillo D. Cirugía experimental y obesidad mórbida. *Cir Esp.* 2004;75:56-63.
425. Samaha FF, Foster GD, Makris AP. Low-carbohydrate diets, obesity, and metabolic risk factors for cardiovascular disease. *Curr Atheroscler Rep.* 2007;9:441-7.
426. Saper CB, Chou TC, Elmquist JK. The need to feed: homeostatic and hedonic control of eating. *Neuron* 2002;36:199-211.
427. Savage DB, Sewter CP, Klenk ES, Segal DG, Vidal-Puig A, Considine RV, O'Rahilly S. Resistin/Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma action in humans. *Diabetes* 2001;50:2199-202.
428. Sbarsi I, Falcone C, Boiocchi C, Campo I, Zorzetto M, De Silvestri A, Cuccia M. Inflammation and atherosclerosis: the role of TNF and TNF receptors polymorphisms in coronary artery disease. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2007;20:145-54.
429. Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 1995;270:26746-9.
430. Schwartz MW, Baskin DG, Bukowski TR, Kujiper JL, Foster D, Lasser G, et al. Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in ob/ob mice. *Diabetes* 1996;45:531-5.
431. Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Jr., Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature* 2000;404:661-71
432. Scopinaro N, Gianetta E, Civaleri D, Bonalumi U, Bachi V. Bilio-pancreatic bypass for obesity: II. Initial experience in man. *Br J Surg* 1979;66:618-20.
433. Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 1992;12:5447-54.
434. Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, Zimmers TA, Koniaris LG, Furlanetto RW. Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 2003;278:13740-6.
435. Seoane LM, Al-Massadi O, Caminos JE, Tovar SA, Diéguez C, Casanueva FF. Sensory stimuli directly acting at the central nervous system regulate gastric ghrelin secretion. an ex vivo organ culture study. *Endocrinology.* 2007;148:3998-4006.
436. Seoane LM, López M, Tovar S, Casanueva FF, Señaris R, Diéguez C. Agouti-related peptide, neuropeptide Y, and somatostatin-producing neurons are targets for ghrelin actions in the rat hypothalamus. *Endocrinology.* 2003;144:544-51.
437. Seoane LM, Tovar SA, Pérez D, Mallo F, López M, Señaris R, et al. Orexin A suppresses in vivo GH secretion. *Eur J Endocrinol.* 2004;150:731-6.
438. Shiiya T, Nakazato M, Mizuta M, Date Y, Mondal MS, Tanaka M, et al. Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:240-4.

Referencias

439. Shillabeer G, Hornford J, Forden JM, Wong NC, Lau DC. Hepatic and adipose tissue lipogenic enzyme mRNA levels are suppressed by high fat diets in the rat. *J Lipid Res.* 1990;31:623-31.
440. Shimba S, Wada T, Hara S, Tezuka M. EPAS1 promotes adipose differentiation in 3T3-L1 cells. *J Biol Chem.* 2004;279:40946-53.
441. Shimokawa T, Kumar MV, Lane MD. Effect of a fatty acid synthase inhibitor on food intake and expression of hypothalamic neuropeptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:66–71.
442. Shimomura I, Matsuda M, Hammer RE, Bashmakov Y, Brown MS, Goldstein JL. *Mol Cell* 2000;6:77-86.
443. Shu SY, Ju G, Fan LZ. The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system. *Neurosci Lett.* 1988;85:169-71.
444. Sierra-Honigmann MR, Nath AK, Murakami C, García-Cardena G, Papapetropoulos A, Sessa WC, et al. Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science* 1998;281:1683-6.
445. Sjostrom L, Lindroos AK, Peltonen M, Torgerson J, Bouchard C, Carlsson B, et al. Lifestyle, diabetes, and cardiovascular risk factors 10 years after bariatric surgery. *N Engl J Med* 2004;351:2683–93.
446. Sloth B, Davidsen L, Holst JJ, Flint A, Astrup A. Effect of subcutaneous injections of PYY1-36 and PYY3-36 on appetite, ad libitum energy intake, and plasma free fatty acid concentration in obese males. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;293:E604-9.
447. Smith SR, Bai F, Charbonneau C, Janderowa L, Argyropoulos G. A promoter genotype and oxidative stress potentially link resistin to human insulin resistance. *Diabetes* 2003;52:1611-8.
448. Song KS, Scherer PE, Tang Z-L, Okamoto T, Li S, Chafel M, et al. Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins. *J Biol Chem* 1996;271:15160–5.
449. Souza SC, Yamamoto MT, Franciosa MD, Lien P, Greenberg AS. BRL 49653 blocks the lipolytic actions of tumor necrosis factor- α : a potential new insulin-sensitizing mechanism for thiazolidinediones. *Diabetes* 1998;47:691-5.
450. Sowers JR, Frohlich ED. Insulin and insulin resistance: Impact on blood pressure and cardiovascular disease. *Med Clin North Am* 2004;88:63-82.
451. Spranger J, Kroke A, Mohlig M, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H, Pfeiffer AF. Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *Lancet* 2003;361:226-8.
452. Srinivasan M, Aalinkeel R, Song F, Patel MS. Programming of islet functions in the progeny of hyperinsulinemic/obese rats. *Diabetes* 2003;52:984-90.
453. Srinivasan M, Katewa SD, Palaniyappan A, Pandya JD, Patel MS. Maternal high fat diet consumption results in fetal malprogramming predisposing to the onset of metabolic syndrome-like phenotype in their adulthood. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;291:E792-9.
454. Stanley BG, Daniel DR, Chin AS, Leibowitz SF. Paraventricular nucleus injections of peptide YY and neuropeptide Y preferentially enhance carbohydrate ingestion. *Peptides* 1985;6:1205-11.

Referencias

455. Statnick MA, Beavers LS, Conner LJ, Corominola H, Johnson D, Hammond CD, et al. Decreased expression of apM1 in omental and subcutaneous adipose tissue of humans with type 2 diabetes. *International Journal of Reproduction and Diabetes Research* 2000;1:51-8.
456. Stein AD, Zybert PA, van der Pal-de Bruin K, Lumey LH. Exposure to famine during gestation, size at birth, and blood pressure at age 59 y: evidence from the Dutch Famine. *Eur J Epidemiol.* 2006;21:759-65.
457. Steinberg HO, Tarshoby M, Monestel R, Hook G, Cronin J, Johnson A, et al. Elevated circulating free fatty acid level impair endothelium-dependent vasodilatation. *J. Clin. Invest.* 1997;100:1230-9.
458. Stepanan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 2001;409:307-12.
459. Strandberg L, Mellström D, Ljunggren O, Grundberg E, Karlsson MK, Holmberg AH, et al. IL6 and IL1B polymorphisms are associated with fat mass in older men: the MrOS Study Sweden. *Obesity (Silver Spring).* 2008;16:710-3.
460. Stricker Krongrad A, Cumin F, Burlet C, Beck B. Hypothalamic neuropeptide Y and plasma leptin after long-term high-fat feeding in the rat. *Neurosci Lett* 1998;254:157-60.
461. Stumvoll M, Tschrötter O, Fritsche A, Staiger H, Renn W, Weisser M, et al. Association of the T-G polymorphism in adiponectin (exon 2) with obesity and insulin sensitivity: interaction with family history of type 2 diabetes. *Diabetes* 2002;51:37-41.
462. Sugeran HJ, Kellum JM, Engle KM, Wolfe L, Starkey JV, Birkenhauer R, et al. Gastric bypass for treating severe obesity. *Am J Clin Nutr* 1992;55S:560S-6S.
463. Tabb K, Szot P, White SS, Liles LC, Weinshenker D. The ketogenic diet does not alter brain expression of orexigenic neuropeptides. *Epilepsy Res.* 2004;62,35-9.
464. Takahashi M, Arita Y, Yamagata K, Matsukawa Y, Okutomi K, Horie M, et al. Genomic structure and mutations in adipose specific gene, adiponectin. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000;24:861-8.
465. Takeuchi H, Matsuo T, Tokuyama K, Shimomura Y, Suzuki M. Diet induced thermogenesis is lower in rats fed a lard diet than in those fed a high oleic acid safflower oil diet, a safflower oil diet or a linseed oil diet. *J Nutr.* 1995;125:920-5.
466. Tan BK, Heutling D, Chen J, Farhatullah S, Adya R, Keay SD, et al. Metformin Decreases the Adipokine Vaspin in Overweight Women with the Polycystic Ovary Syndrome: Concomitant Improvement in Insulin Sensitivity and a Decrease in Insulin Resistance. *Diabetes.* 2008 Apr 14. [Epub ahead of print]
467. Tan MS, Chang SY, Chang DM, Tsai JC, Lee Y. Association of resistin gene 3'-untranslated region +62GA polymorphism with type 2 diabetes and hypertension in a Chinese population. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:1258-63.
468. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 1995;83:1263-71.
469. Tatemoto K, Mutt V. Isolation of two novel candidate hormones using a chemical method for finding naturally occurring polypeptides. *Nature.* 1980;285(5764):417-8.

Referencias

470. Tchernof A, Nolan A, Sites CK, Ades PA, Poehlman ET. Weight loss reduces C-reactive protein levels in obese postmenopausal women. *Circulation* 2002;105:564-9.
471. Teichtahl AJ, Wluka AE, Proietto J, Cicuttini FM. Obesity and the female sex, risk factors for knee osteoarthritis that may be attributable to systemic or local leptin biosynthesis and its cellular effects. *Med Hypotheses* 2005;65:312-5.
472. Tena-Sempere M, Barreiro ML, González LC, Gaytán F, Zhang FP, Caminos JE, et al. Novel expression and functional role of ghrelin in rat testis. *Endocrinology*. 2002;143:717-25.
473. Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1968;61:748-55.
474. Tham DM, Martin-McNulty B, Wang YX, Wilson DW, Vergona R, Sullivan ME, et al. Angiotensin II is associated with activation of NF- κ B-associated genes and downregulation of PPARs. *Physiol Genomics* 2002;11:21-30.
475. Thompson DG. Neurogastroenterology: imaging of the sensory and motor control of the GI tract. *J Psychosom Res.* 2006;61:301-4.
476. Thor PJ, Konturek JW, Konturek SJ. Pancreatic polypeptide and intestinal motility in dogs. *Dig Dis Sci* 1987;32:513-9.
477. Tian DR, Li XD, Shi YS, Wan Y, Wang XM, Chang JK, et al. Changes of hypothalamic alpha-MSH and CART peptide expression in diet-induced obese rats. *Peptides* 2004;25:2147-53.
478. Tian Z, Sun R, Wei H, Gao B. Impaired natural killer (NK) cell activity in leptin receptor deficient mice: leptin as a critical regulator in NK cell development and activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;298:297-302.
479. Tilg H, Moschen AR. Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance. *Mol Med.* 2008;14:222-31.
480. Tomas E, Tsao TS, Saha AK, Murrey HE, Zhang CC, 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* 2002;99:16309-13.
481. Tovar S, Nogueiras R, Tung LY, Castañeda TR, Vázquez MJ, Morris A, et al. Central administration of resistin promotes short-term satiety in rats. *Eur J Endocrinol.* 2005;153:R1-5.
482. Tracey K, Cerami A. Tumor necrosis factor: An updated review of its biology. *Crit Care Med* 1993;21:s415-22.
483. Trayhurn P, Beattie JH. Physiological role of adipose tissue white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proceedings of the Nutrition Society* 2001;60:329-39.
484. Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 2004;92:347-55.
485. Tremblay MS, Katzmarzyk PT, Willms JD. Temporal trends in overweight and obesity in Canada. *Int. J. Obesity* 2002;26:538-43.
486. Trosheid M, Lappegard KT, Claudi T, Damas JK, Morkrid L, Brendberg R, et al. Exercise reduces plasma levels of the chemokines MCP-1 and IL-8 in subjects with the metabolic syndrome. *Eur Heart J* 2004;25:349-55.

Referencias

487. Tschöp M, Weyer C, Tataranni PA, Devanaravan V, Ravussin E, Heinman ML. Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes* 2001;50:707-9.
488. Tsigos C, Papanicolaou DA, Kyrou I, Defensor R, Mitsiadis CS, Chrousos GP. Dose-dependent effects of recombinant human interleukin-6 on glucose regulation. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 1997;82:4167-70.
489. Tzamelis I, Fang H, Ollero M, Shi H, Hamm JK, Kievit P, et al. Regulated production of a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand during an early phase of adipocyte differentiation in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 2004;279:36093-102.
490. Unger RH. Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications. *Diabetes*. 1995;44:863-70.
491. Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature*. 1997;389:610-14.
492. Valassi E, Scacchi M, Cavagnini F. Neuroendocrine control of food intake. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2008;18:158-68.
493. Valencia-Flores M, Orea A, Herrera M, Santiago V, Rebollar V, Castaño VA, et al. Effect of bariatric surgery on obstructive sleep apnea and hypopnea syndrome, electrocardiogram, and pulmonary arterial pressure. *Obes Surg*. 2004;14:755-62.
494. Valerio A, Cardile A, Cozzi V, Bracale R, Tedesco L, Pisconti A, et al. TNF- α downregulates eNOS expression and mitochondrial biogenesis in fat and muscle of obese rodents. *J Clin Invest*. 2006;116:2791-8.
495. Van Hee RH. Biliopancreatic diversion in the surgical treatment of morbid obesity. *World J Surg*. 2004;28:435-44.
496. Vasseur F, Helbecque N, Dina C, Lobbens S, Delannoy V, Gaget S, et al. Single-nucleotide polymorphism haplotypes in the both proximal promoter and exon 3 of the APM1 gene modulate adipocyte-secreted adiponectin hormone levels and contribute to the genetic risk for type 2 diabetes in French Caucasians. *Hum Mol Genet* 2002;11:2607-14.
497. Vázquez MJ, González CR, Varela L, Lage R, Tovar S, Sangiao-Alvarellos S, et al. Central resistin regulates hypothalamic and peripheral lipid metabolism in a nutritional dependent fashion. *Endocrinology*. 2008 May 22. [Epub ahead of print]
498. Velkoska E, Cole TJ, Morris MJ. Early dietary intervention: long-term effects on blood pressure, brain neuropeptide Y, and adiposity markers. *Am. J. Physiol*. 2005;288, E1236-43.
499. Venu L, Harishankar N, Krishna TP, Raghunath M. Does maternal dietary mineral restriction per se predispose the offspring to insulin resistance? *Eur. J. Endocrinol* 2004;151:287-94.
500. Verma S, Anderson TJ. Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. *Circulation*. 2002;105:546-9.
501. Vickers MH, Breier BH, Cutfield WS, Hofman PL, Gluckman PD. Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000;279:E83-7.

Referencias

502. Vickers MH, Ikenasio BA, Breier BH. IGF-I treatment reduces hyperphagia, obesity, and hypertension in metabolic disorders induced by fetal programming. *Endocrinology* 2001;142:3964-73.
503. Vincent RP, le Roux CW. Changes in gut hormones after bariatric surgery. *Clin Endocrinol.(Oxf)*, 2007. Dec 20; [Epub ahead of print]
504. Visner GA, Lu F, Zhou H, Liu J, Kazemfar K, Agarwal A. Rapamycin induces heme oxygenase-1 in human pulmonary vascular cells: implications in the antiproliferative response to rapamycin. *Circulation* 2003;107:911-6.
505. Visser M, Bouter LM, McQuillan GM, Wener MH, Harris TB. Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *J. Am. Med. Assoc.* 1999;282:2131-5.
506. Wagener FA, Eggert A, Boerman OC, Oyen WJ, Verhofstad A, Abraham NG, et al. Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase. *Blood*. 2001;98:1802-11.
507. Wallenius V, Wallenius K, Ahrén B, Rudling M, Carlsten H, Dickson SI, et al. Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nat Med* 2002;8:75-9.
508. Wang CH, Li SH, Weisel RD, Fedak PW, Dumont AS, Szmítko P, et al. C-reactive protein upregulates angiotensin type 1 receptors in vascular smooth muscle. *Circulation*. 2003;107:1783-90.
509. Wang GP, Deng ZD, Ni J, Qu ZL. Oxidized low density lipoprotein and very low density lipoprotein enhance expression of monocyte chemoattractant protein-1 in rabbit peritoneal exudate macrophages. *Atherosclerosis*. 1997;133:31-6.
510. Wang HQ, Storlien LH, Huang XF. Effects of dietary fat types on body fatness, leptin, and ARC leptin receptor, NPY, and AgRP mRNA expression. *Am. J. Physiol.* 2002;282, E1352-E1359.
511. Wang J, Alexander JT, Zheng P, Yu HJ, Dourmashkin J, Leibowitz SF. Behavioral and endocrine traits of obesity-prone and obesity-resistant rats on macronutrient diets. *Am J Physiol* 1998;274:E1057-66.
512. Wardé-Kamar J, Rogers M, Flancbaum L, Laferrère B. Calorie intake and meal patterns up to 4 years after Roux-en-Y gastric bypass surgery. *Obes Surg*. 2004;14:1070-9.
513. Warne JP, John CD, Christian HC, Morris JF, Flower RJ, Sugden D, et al. Gene deletion reveals roles for annexin A1 in the regulation of lipolysis and IL-6 release in epididymal adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006;291:E1264-73.
514. Wasim H, Al-Daghri NM, Chetty R, McTernan PG, Kumar S. Relationship of Serum Adiponectin and Resistin to Glucose Intolerance and Fat Topography in South-Asians. *Cardiovasc Diabetol*. 2006;5:10.
515. Waterland RA, Garza C. Early postnatal nutrition determines adult pancreatic glucose-responsive insulin secretion and islet gene expression in rats. *J Nutr* 2002;132:357-64.
516. Waterland RA, Jirtle RL. Developmental relaxation of insulin-like growth factor 2 imprinting in kidney is determined by weanling diet. *Pediatr Res* 2003;53 suppl:5A.
517. Waterland RA, Jirtle RL. Early nutrition, epigenetic changes at transposons and imprinted genes, and enhanced susceptibility to adult chronic diseases. *Nutrition* 2004;20:63-8.

Referencias

518. Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, et al. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci* 2004;7:847-54.
519. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante JAW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003;112:1796-808.
520. Wiśłowska M, Rok M, Stępień K, Kuklo-Kowalska A. Serum leptin in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int.* 2008 Jan 15; [Epub ahead of print]
521. Wisse BE. The inflammatory syndrome: the role of adipose tissue cytokines in metabolic disorders linked to obesity. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15:2792-800.
522. Wittgrove AC, Clark GW, Tremblay LJ. Laparoscopic gastric bypass, Roux-en Y: preliminary report of five cases. *Obes Surg* 1994;4:353-7.
523. Wolfgang MJ, Lane MD. The role of hypothalamic malonyl-CoA in energy homeostasis. *J Biol Chem.* 2006;281:37265-9.
524. Woods SC, Seeley RJ, Cota D. Regulation of Food Intake Through Hypothalamic Signaling Networks Involving mTOR. *Annu Rev Nutr.* 2008 Apr 22; [Epub ahead of print]
525. Wortley KE, Chang GQ, Davydova Z, Fried SK, Leibowitz SF. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript in the arcuate nucleus stimulates lipid metabolism to control body fat accrual on a high-fat diet. *Regul Pept* 2004;117:89-99.
526. Wortley KE, Chang GQ, Davydova Z, Leibowitz SF. Peptides that regulate food intake: orexin gene expression is increased during states of hypertriglyceridemia. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2003;284:R1454-65.
527. Wu G, Bazer FW, Cudd TA, Meininger CJ, Spencer TE. Maternal nutrition and fetal development. *J Nutr* 2004;134:2169-72.
528. 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;52:1355-63.
529. Wynne K, Stanley S, McGowan B, Bloom S. Appetite control. *J Endocrinol* 2005;184:291-318.
530. Wyrwoll CS, Mark PJ, Mori TA, Puddey IB, Waddell BJ. Prevention of programmed hyperleptinemia and hypertension by postnatal dietary omega-3 fatty acids. *Endocrinology* 2006;147:599-606.
531. Xiong S, Chirala SS, Hsu MH, Wakil SJ. Identification of thyroid hormone response elements in the human fatty acid synthase promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:12260-5.
532. Xu AW, Kaelin CB, Takeda K, Akira S, Schwartz MW, Barsh GS. PI3K integrates the action of insulin and leptin on hypothalamic neurons. *J Clin Invest* 2005;115:951-8.
533. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan 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.
534. Xue B, Kahn BB. AMPK integrates nutrient and hormonal signals to regulate food intake and energy balance through effects in the hypothalamus and peripheral tissues. *J Physiol.* 2006;574(Pt 1):73-83.

Referencias

535. Yamagishi SI, Edelstein D, Du XL, Kaneda Y, Guzman M, Brownlee M. Leptin induces mitochondrial superoxide production and monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic endothelial cells by increasing fatty acid oxidation via protein kinase A. *J Biol Chem* 2001;276:25096-100.
536. Yamamoto Y, Hirose H, Miyashita K, Nishikai K, Saito I, Taniyama M, et al. PPARgamma2 gene Pro12Ala polymorphism may influence serum level of an adipocyte-derived protein, adiponectin, in the Japanese population. *Metabolism* 2002a;51:1407-9.
537. Yamamoto Y, Hirose H, Saito I, Tomita M, Taniyama M, Matsubara K, et al. Correlation of the adipocyte-derived protein adiponectin with insulin resistance index and serum high-density lipoprotein-cholesterol, independent of body mass index, in the Japanese population. *Clinical Sciences* 2002b;103:137-42.
538. Yamashita H, Takenoshita M, Sakurai M, Bruick RK, Henzel WJ, Shillinglaw W, et al. A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:9116-21.
539. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 2003;423:762-9.
540. 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. *Nature Medicine* 2002;8:1288-95.
541. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med* 2001;7:941-6.
542. Yan H, Aziz E, Shillabeer G, Wong A, Shanghavi D, Kermouni A, et al. Nitric oxide promotes differentiation of rat white adipocytes in culture. *J. Lipid Res.* 2002;43:2123-9.
543. Yang RZ, Lee MJ, Hu H, Pray J, Wu HB, Hansen BC, et al. Identification of omentin as a novel depot-specific adipokine in human adipose tissue: possible role in modulating insulin action. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006;290:E1253-61.
544. Yang WS, Jeng CY, Wu TJ, Tanaka S, Funahashi T, Matsuzawa Y, et al. Synthetic peroxisome proliferator-activated receptor-g agonist, rosiglitazone, increases plasma levels of adiponectin in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2002;25:376-80.
545. Yang WS, Lee WJ, Funahashi T, Tanaka S, Matsuzawa Y, Chao CL, et al. Weight reduction increases plasma levels of an adipose derived anti-inflammatory protein, adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3815-9.
546. Yokota T, Oritani K, Takahashi I, Ishikawa J, Matsuyama A, Ouchi N, et al. Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. *Blood* 2000;96:1723-32.
547. Youn BS, Yu KY, Park HJ, Lee NS, Min SS, Youn MY, et al. Plasma resistin concentrations measured by enzyme-linked immunosorbent assay using a newly developed monoclonal antibody are elevated in individuals with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol* 2004;89:150-6.
548. Yu JG, Javorschi S, Hevener AL, Kruszynska YT, Norman RA, Sinha M, et al. The effect of thiazolidinedione on plasma adiponectin levels in normal, obese, and type 2 diabetic subjects. *Diabetes* 2002;51:2968-74.

Referencias

549. Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, Coppack SW. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:972-8.
550. Yun R, Dourmashkin JT, Hill JO, Gayles EC, Fried SK, Leibowitz SF. PVN galanin increases fat storage and promotes obesity by causing muscle to utilize carbohydrate more than fat. *Peptides* 2005;26:2265-73.
551. Yun Z, Maecker HL, Johnson RS, Giaccia AJ. Inhibition of PPAR gamma 2 gene expression by the HIF-1-regulated gene DEC1/Stra13: a mechanism for regulation of adipogenesis by hypoxia. *Dev Cell.* 2002;2:331-41.
552. Zamboni M, Zoico E, Fantin F, Panourgia MP, Di Francesco V, Tosoni P, et al. Relation between leptin and the metabolic syndrome in elderly women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2004;59:396-400.
553. Zarjevski N, Cusin I, Vettor R, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B. Intracerebroventricular administration of neuropeptide Y to normal rats has divergent effects on glucose utilization by adipose tissue and skeletal muscle. *Diabetes* 1994;43:764-9.
554. Zarkesh-Esfahani H, Pockley G, Metcalfe RA, Bidlingmaier M, Wu Z, Ajami A, et al. High-dose leptin activates human leukocytes via receptor expression on monocytes. *J Immunol* 2001;167:4593-9.
555. Zhang H, Chen X, Aravindakshan J, Sairam MR. Changes in Adiponectin and Inflammatory Genes in Response to Hormonal Imbalances in Female Mice and Exacerbation of Depot Selective Visceral Adiposity by High-Fat Diet: Implications for Insulin Resistance. *Endocrinology* 2007;148:5667-79.
556. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994;372:425-32.
557. Zhang YL, Hernández-Ono A, Siri P, Weisberg S, Conlon D, Graham MJ, et al. Aberrant hepatic expression of PPARgamma2 stimulates hepatic lipogenesis in a mouse model of obesity, insulin resistance, dyslipidemia, and hepatic steatosis. *J Biol Chem.* 2006;281:37603-15.
558. Zheng H, Fletcher D, Kozak W, Jiang M, Hofmann KJ, Conn CA, et al. Resistance to fever induction and impaired acute-phase response in interleukin-1 beta-deficient mice. *Immunity* 1995;3:9-19.
559. Zinman B, Hanley AJG, Harris SB. Circulating tumor necrosis factor- α concentrations in a native canadian population with high rates of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:272-8.
560. Ziotopoulou M, Mantzoros CS, Hileman SM, Flier JS. Differential expression of hypothalamic neuropeptides in the early phase of diet-induced obesity in mice. *Am. J. Physiol.* 2000;279:E838-45.
561. Zorrilla EP, Iwasaki S, Moss JA, Chang J, Otsuji J, Inoue K, Meijler MM, Janda KD. Vaccination against weight gain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:13226-31.