



Universitat de Lleida

Modulacion de vias de senalizacion celular que controlan el metabolismo energetico por compuestos bioactivos presentes en soja y te verde: Implicaciones para la prevencion del sindrome metabolico.

Hugo Gonzalo Benito

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Modulación de las vías de señalización celular que controlan el metabolismo energético por compuestos bioactivos presentes en soja y té verde: Implicaciones para la prevención del síndrome metabólico.



Autor: Hugo Gonzalo Benito

Directores: Dr. Jordi Boada

Dr. Manel Portero

-Lleida, 15 junio 2012-



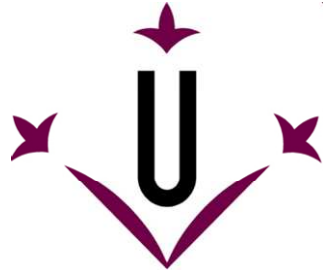
Universitat de Lleida

Tesis Doctoral

Modulación de vías de señalización celular que controlan el metabolismo energético por compuestos bioactivos presentes en soja y té verde: Implicaciones para la prevención del síndrome metabólico.

Hugo Gonzalo Benito

Lleida 2012



Universitat de Lleida

Departament de Medicina
Experimental

Modulación de vías de señalización celular que controlan el metabolismo energético por compuestos bioactivos presentes en soja y té verde: Implicaciones para la prevención del síndrome metabólico.

Memoria presentada por:

Hugo Gonzalo Benito

Para optar al título de Doctor por la Universitat de Lleida

Tesis Doctoral realizada bajo la dirección del Dr. Manuel Portero Otín y Dr. Jordi Boada Pallàs, del Departamento de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la Universitat de Lleida y dentro del programa de Estudios Avanzados en Ciencias Biomédicas.

Dr. Manuel Portero Otín

Dr. Jordi Boada Pallàs

Sr. Hugo Gonzalo Benito

Parte de este trabajo ha sido realizado en las instalaciones del Institut de Recerca Biomèdica de Lleida (IRBLleida), del centro NUTREN-nutrigenomics, del Parc Científic i Tecnològic Agroalimentari de Lleida (PCiTAL) y del laboratorio *Molecular Function of Foods* de la Universidad de Kyoto (Japón).

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Industria (proyecto CENIT MET-DEV-FUN con la colaboración del Grupo Leche Pascual), por el Instituto de Salud Carlos III (FIS PI08/1238) y con el soporte de la Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i Recerca (AGAUR) con una beca predoctoral para la contratación de personal investigador novel (FI HG017611) y una beca para la investigación al extranjero (BE-DGR 2010)

AGRADECIMIENTOS

¡Y por fin los agradecimientos! es curioso que siendo de los primeros folios en aparecer en esta Tesis sea el último que escribo, en cierta manera me gusta que sea así ya que ahora, con la Tesis escrita, puedo pasar de pensar con la cabeza a hacerlo con el corazón, una estupenda forma de culminar este ciclo.

Me gustaría comenzar este apartado dando las gracias a los principales responsables de que este trabajo se haya podido llevar a cabo. Muchas gracias Manel y Reinald por dejarme formar parte de vuestra “familia científica” ya que en ocasiones me he sentido como un hijo, por abrirme las puertas de un mundo que espero no deje nunca de sorprenderme y sobretodo por enseñarme que la mejor forma de aprender es enseñando.

A tu Jordi, a part de per compartir els teus coneixements amb mi, moltes gràcies per haver-hi estat sempre al meu cantó, per intentar i saber-me entendre sense parlar y sobretot per haver-me fet veure el món amb un altra perspectiva.

A M^a Josep, gracias por todo el cariño que me has dado, has sabido ponerme en mi sitio cuando lo he necesitado pero siempre con el cariño de una *padrineta*, mi padrineta.

A José y a Meri por formar parte activa de este trabajo. Al Chamaco por hacer de tutor en la “sombra” y a Meri.....que puedo decir de ti, la verdad es que sin tu ayuda este trabajo no habría salido para adelante. Gracias chicos!

A Vicky por esas buenas parrafadas, por ser sincera conmigo y por enseñarme que todo esfuerzo tiene su recompensa.

A Dani por descubrirme tu grupo de trabajo y por recibirme con los brazos abiertos, por ser buen compañero de curro y de casa, por los viajes en la Matilda y sobretodo por tu “hidromiel” otra categoría de licor!!!

A las Annas, Omar, Nuria, David, Mariona, Alba, Liliana, Saray, Jesica y Katia. Todos me habéis influido muy positivamente para la elaboración de esta Tesis y como tal formáis parte de ella. He aprendido de todos vosotros cosas más importantes que la ciencia y la mayoría habéis estado ahí para darme el apoyo que más necesitaba, vuestra amistad. Gracias chicos!

Quiero agradecer al resto de los compañeros del departamento de Medicina Experimental y a los de Ciencias Médicas Básica, por ser más que compañeros de trabajo, da gusto ir a trabajar con gente que te recibe con una sonrisa! En especial me gustaría agradecer a Isu que me instruyera en el apasionante y loco mundo de la RT-PCR, y sobretodo a Jacint por haberme permitido volver a la guardería (a leer y escribir) en su despacho. Muchas gracias!

No me quiero olvidar de agradecer a Luís, Paco, Alex, Jordi, Elo, Lourdes... a todos los integrantes del servicio de neurología del Hospital Universitario Arnau de Vilanova, por confiar en mí para hacerme partícipe en sus cursos de formación y con los que descubrí el fascinante mundo de la docencia.

También me gustaría agradecer a mis compañeros de la otra parte del mundo la oportunidad de vivir una de las experiencias más importantes de mi vida. Muchas gracias Kawada-Sensei por aceptar mi solicitud y permitirme aprender en su grupo de trabajo de la Universidad de Kyoto, a Takahasi-Sensei por tutorar mi trabajo allí y a Tomo-kun, Kim-kun, Poi-san, Lin-san, Ran-san, Rino-san, Akira-kun, Taki-kun, Maru-san, Tada-chan....en definitiva todos los integrantes del grupo por enseñarme no sólo las técnicas de laboratorio sino por aprender con vosotros que la grandeza de las cosas está en la importancia de sus detalles. *Arigatoo gozaimasuta!*

Volviendo a esta parte del planeta, gracias a Mima, Nuria y Laia por ser mi apoyo durante tanto tiempo y por todo los buenos momentos vividos. En breve estaremos cada uno en un sitio, pero me gustaría que nuestros caminos se volvieran a cruzar.

A *mis* chicas Rita, Isabelita (Isis), Xènia, Elia, Marina...Gracias por hacerme sentir una persona especial, por saber la importancia de un abrazo en el momento justo y por romper mi rutina siempre con buenas propuestas.

A todos mis amigos, la "*minipandi*", a la "*colla pesigolla*", a Sara, Analía, Elvira (y Adolfito), Emma, Rober, Fer, Francesco, Angelo, Maria, Maricruz...a TODOS, por sentirlos tan cerca cuando más lo necesitaba aún teniéndolos tan lejos. Por hacerme llegar vuestros ánimos, buenas vibraciones, energía positiva con la que me he recargado y espero seguir haciendo, por recibirme siempre con los brazos abiertos, por un sinfín de momentos vividos y por los que nos quedan por vivir.....por ser mis amigos. Gracias!

A mis Familias, a lo largo de mi vida he tenido el privilegio de contar no con un apoyo sino con verdaderas familias que me han tratado siempre como un integrante más. Mi familia Napolitana: la Mamma, Luigi, Chiara y Checco gracias por enseñarme que las cosas tienen la importancia que se les quiera dar. Mi familia Barcelonesa: Amelin, Jaume i Mariona con vosotros he aprendido la importancia de relativizar y de reírse de los malos momentos. Mi familia Biológica: Mama, Papa, los gorditos (Rubén y Nuria) y Yony. Gracias Papá por enseñarme el afán de superación, la constancia y el valor del trabajo y por enseñarme que yo "puedo con eso....y con menos!". Gracias gorditos, por ser los hermanos menores que siempre quise tener. Gracias Yony por saber sobrellevar mis malos momentos y disfrutar conmigo de los buenos. Gracias Mamá por que de ti he aprendido a caminar con la verdad por delante y en definitiva a ser quien soy. Gracias Gus por estar a mi lado todo este tiempo, por sufrir conmigo los malos momentos y apoyarme, por entenderme cuando ni yo mismo lo hacía y sobretodo por tener la paciencia de hacer de mí una mejor persona.

A todos vosotros, GRACIAS!

RESUMEN

El estilo de vida que durante las últimas décadas se está imponiendo en nuestra sociedad favorece el desequilibrio del balance energético debido al desajuste entre los hábitos alimentarios (más ingresos energéticos) y el nivel de sedentarismo (menos gasto) fenómenos vinculados directamente al desarrollo del síndrome metabólico.

Las patologías asociadas al síndrome metabólico son la principal causa de muerte en los países desarrollados, con las implicaciones que supone no sólo en salud pública sino también a nivel socioeconómico. Sin embargo, este fenómeno no tiene lugar en todo el mundo por igual, siendo Japón uno de los países con menor incidencia de síndrome metabólico. La relación directa entre los hábitos alimentarios y el desarrollo del síndrome metabólico sugiere la existencia de biocompuestos en la dieta tradicional japonesa, con capacidad de prevenir, retrasar o mejorar el síndrome metabólico.

Aunque existen trabajos que evidencian efectos beneficiosos sobre parámetros del síndrome metabólico atribuidos al consumo de soja y té verde, las vías moleculares de actuación de sus principales biocompuestos no han sido aún totalmente caracterizadas. Con intención de aportar conocimiento que ayuden a dilucidarlas, se presenta esta tesis en la que se ha estudiado los efectos metabólicos atribuibles a la ingesta de soja o té verde, teniendo en cuenta la biodisponibilidad de sus principales biocompuestos: las isoflavonas y las catequinas respectivamente.

Se han realizando estudios para estimar tanto el carácter terapéutico como preventivo del síndrome metabólico de estos biocompuestos. En este contexto, se ha descrito que las vías de actuación y los mecanismos mediados por las isoflavonas genisteína, daidzeína y su metabolito equol, en modelos *in vitro* insulinoresistentes de los principales tejidos diana de la insulina, contribuirían a una mejora de la hiperglucemia, la hiperlipidemia, la inflamación y la esteatosis hepática, importantes componentes de la fisiopatología del síndrome metabólico en humanos. Por su parte, se ha demostrado que la principal catequina del té verde, el galato de epigallocatequina, actúa mediante su autooxidación, como señalizador celular, induciendo un desacoplamiento mitocondrial, que se compensa por un incremento de la activación de AMPK. Estos hallazgos contribuyen a una descripción más detallada de los mecanismos de acción que podrían explicar parte de los efectos beneficiosos sobre los desajustes del metabolismo energético asociados al consumo de soja y té verde.

RESUM

L'estil de vida que durant les últimes dècades s'està imposant a la nostra societat afavoreix el desequilibri del balanç energètic degut al desajustament entre els hàbits alimentaris (més ingressos energètics) i el nivell de sedentarisme (menys despeses), fenòmens vinculats directament a l'aparició de la síndrome metabòlica.

Les patologies associades a la síndrome metabòlica són la principal causa de mort en els països desenvolupats, amb les implicacions que suposa no només en salut pública sinó també a nivell socioeconòmic. No obstant, aquest fenomen no té lloc a tot arreu de la mateixa manera, essent el Japó un dels països amb menor incidència de síndrome metabòlica. La relació directa entre els hàbits alimentaris i el desenvolupament de la síndrome metabòlica suggereix l'existència de biocompostos en la dieta tradicional japonesa amb capacitat de prevenir, alenir o millorar la síndrome metabòlica.

Malgrat que existeixen treballs que evidencien efectes beneficiosos sobre paràmetres de la síndrome metabòlica atribuïts al consum de soja i te verd, les vies moleculars d'actuació dels seus principals biocompostos no han estat encara totalment caracteritzades. Amb intenció d'aportar coneixements que ajudin a dilucidar-les, es presenta aquesta tesi en la que s'han estudiat els efectes sobre el metabolisme i la seva senyalització atribuïbles a la ingesta de soja i te verd, tenint en compte la biodisponibilitat dels seus principals biocompostos, les isoflavones i les catequines, respectivament.

S'han realitzat estudis per estimar tant el caràcter terapèutic com preventiu de la síndrome metabòlica d'aquest biocompostos. En aquest context s'ha descrit que les vies d'actuació i els mecanismes en els que participen les isoflavones genisteïna, daidzeïna i el seu metabòlit equol, en models in vitro insulinoresistents dels principals teixits diana de la insulina, contribuirien a una millora de la hiperglucèmia, la hiperlipidèmia, la inflamació i l'esteatosi hepàtica, importants components de la fisiopatologia de la síndrome metabòlica en humans. Per altra banda, s'ha demostrat que la principal catequina del te verd, el gal·lat d'epigal·locatequina, actua mitjançant la seva autooxidació, com a senyalitzador cel·lular, induint un desacoblament mitocondrial compensat per un augment de l'activació d'AMPK. Aquestes troballes contribueixen a una descripció més detallada dels mecanismes d'acció que podrien explicar part dels efectes beneficiosos sobre les alteracions del metabolisme energètic associats al consum de soja i te verd.

ABSTRACT

Changes in Life style during the last decades in our society has lead to a shift of the energy balance due to an imbalance between the eating habits (higher energy input) and the sedentarism (lower output), two hallmarks directly associated to the development of metabolic syndrome.

Pathologies associated to metabolic syndrome are the main cause of death in developed countries, with consequences both in public health and socioeconomics. However, this phenomenon does not appear equally in all countries. Japan is one of the countries with less incidence of metabolic syndrome. The direct relationship between eating habits and the development of metabolic syndrome suggests the existence of biocompounds in the Japanese traditional diet, with potential to prevent, diminish or ameliorate the metabolic syndrome.

Although beneficial effects of soy and green tea ingestion have been described previously, the molecular mechanisms of their main biocompounds have not been completely characterized yet. The aim of this thesis is to provide knowledge to help dilucidate them. The effects of soy and green tea consumption on cell metabolism and signalling have been studied, according to the bioavailability of their main biocompounds: isoflavones and catechines, respectively.

Studies have been performed to assess both the therapeutics and prevention of the metabolic syndrome by these biocompounds. In this context, the mechanism of action of the isoflavones genistein, daidzein and its metabolite equol have been described in in vitro models with insulin resistance of the main tissues that are targets of insulin, with potential interest to improve hyperglycemia, hyperlipidemia, inflammation and hepatic steatosis, which constitute important hallmarks of the physiopathology of metabolic syndrome in humans. On the other hand, it has been demonstrated that the main catechin of green tea, epigallocatequin gallate, through its autooxidation products, modifies cell signaling, leading to a mitochondrial uncoupling compensated by activation of AMPK. In conclusion, these findings offer a more detailed description of the action mechanisms that justify part of the beneficial effects of soy and green tea ingestion on alterations of energy metabolism.

Índices

Índices	19
ÍNDICE DE TABLAS	19
ÍNDICE DE FIGURAS	21
Abreviaciones	25
Introducción	29
METABOLISMO ENERGÉTICO	31
Órganos participantes en la homeostasis energética	32
Hígado	32
Metabolismo glucídico.....	32
Metabolismo lipídico	32
Músculo Esquelético	35
Metabolismo glucídico.....	35
Metabolismo lipídico	36
Tejido Adiposo.....	37
Lipogénesis.....	38
Lipólisis.....	38
SÍNDROME METABÓLICO (SM)	41
Definición y criterios diagnósticos.....	41
Relevancia de los parámetros diagnóstico para la estimación del SM	44
Obesidad central y parámetros del metabolismo lipídico	44
Glucemia basal alterada.....	45
Importancia de la hipertensión en el SM.....	46
Epidemiología del SM	47
Prevalencia a nivel mundial	47
Prevalencia del SM en España.....	49
RESISTENCIA A LA INSULINA (RI)	52
Insulina	52
Proceso de secreción insulínica.....	53
Acciones de la insulina	54
Vía de señalización insulínica	55
Receptor de insulina (IR).....	56
Substratos del receptor de la insulina (IRS).....	57
AKT/PKB	58
ERK1/2.....	60
Otras acciones de la insulina.....	61
Etiopatología de la RI.....	62
Filogenia de la RI: un problema en el ritmo de acontecimientos	62
Glucotoxicidad.....	62
Hiperinsulinemia	64
Lipotoxicidad	66

El proceso inflamatorio como desencadenante de RI.....	68
Métodos e índices para el estudio de la RI.....	69
Estrategias para la prevención e intervención de la RI	70
Tratamientos farmacológicos.....	70
Tratamientos no farmacológicos	72
Cirugía bariátrica.....	72
Modificación saludable en el estilo de vida.....	72
LA ALIMENTACIÓN como herramienta terapéutica	74
Polifenoles	75
Las Isoflavonas	78
Alimentos ricos en isoflavonas	79
Absorción y Metabolismo de las isoflavonas.....	80
Concentraciones plasmáticas	81
Las isoflavonas como moduladoras del metabolismo energético a nivel sistémico .	82
Posibles mecanismos de acción: modulación de la señalización celular.....	83
El EGCG.....	87
Absorción y metabolismo	88
Características preventivas del EGCG en el SM	89
Sobre la regulación del metabolismo energético en situación RI	89
Efectos del EGCG sobre la obesidad	90
Modulación del colesterol plasmático.....	91
Prevención de hipertensión.....	92
Otros efectos del EGCG.....	92
Mecanismos de acción del EGCG: modulación enzimática.	94
Efectos sobre el sensor energético celular: AMPK	95
Efectos adversos atribuidos al EGCG.	96
Hipótesis	97
Objetivos.....	101
Materiales y métodos.....	105
MATERIALES.....	107
Reactivos.....	107
Tampones y soluciones.....	110
MÉTODOS	112
Cultivo celular	112
Miotubos L6	113
Adipocitos 3T3-L1.....	113
Macrófagos RAW 264.7.....	114
Hepatocitos FAO	114
Cocultivo adipocitos 3T3-L1 y macrófagos RAW 264.7	114
Estimación de la viabilidad celular	115
Obtención de lisados celulares	115
Determinación de la concentración proteica.....	116
Experimentación en placa de cultivo	116

Immunodetección por <i>Western Blot</i>	116
Preparación de la muestra	116
Separación de proteínas por electroforesis	117
Control de carga por tinción de geles	118
Electrotransferencia.....	118
Bloqueo de la membrana.....	118
Immunodetección	119
Revelado y Análisis de los datos.....	120
Medición de la concentración de TNF α y MCP1.....	121
Inhibición de la traducción génica por RNA de interferencia (siRNA).....	122
Medición de nitratos y nitritos	123
Medición de la concentración de TG.....	123
Estimación de la captación de glucosa por 2-NBDG.....	124
Estudio de la actividad de AMPK	124
PCR a tiempo real	125
Extracción total de RNA	126
Precipitación proteica	128
Cuantificación de la concentración de ácidos nucleicos por NANODROP®	128
Control de integridad de RNA por gel de agarosa	129
Retrotranscripción reversa.....	130
PCR a tiempo real de la expresión de UCP2 y GADPH	132
PCR a tiempo real de la expresión de TNF α - α , MCP-1, eNOS y 36B4	133
Medición de la concentración de lactato	135
Estudio de la captación de ácidos grasos	136
Tinción de TG por la técnica Oil Red.....	136
Estimación de la capacidad antioxidante por DCFH-DA.....	137
Estimación de la respiración mitocondrial por consumo de oxígeno	138
Estudio de la activación de PPAR's	139
Condiciones de siembra celular	139
Transfección celular	139
Estimulación de PPAR's.....	140
Ensayo Luciferasa	140
Estimación del ratio ATP/ADP	141
Análisis estadístico.....	142
Resultados y discusión	143
Estudio in vitro de las vías moleculares de actuación de la isoflavonas como moduladoras del metabolismo energético.....	145

Efectos a nivel de músculo esquelético: modelo de miotubos L6.....	146
Validación del modelo.....	146
Validación Morfológica.....	146
Validación Molecular: vía de señalización insulínica.....	148
Modelo de miotubos L6 insulinoresistentes.....	150
Efectos moleculares de las isoflavonas en miotubos L6 insulinoresistentes.....	152
AKT.....	152
ERK1 y 2.....	153
Efectos <i>Upstream</i> : IRS1.....	155
Efectos <i>Downstream</i> : AS160.....	156
Mecanismos de acción de las isoflavonas.....	159
Implicación del receptores estrogénicos.....	160
Implicación de la óxido nítrico sintetasa.....	161
Efectos funcionales de las isoflavonas sobre el modelo L6 con RI.....	163
Flujo glicolítico.....	163
Implicación del Ca ²⁺	166
Resumen del estudio: <i>isoflavonas en músculo esquelético</i>	167
Efectos en el tejido adiposo: modelo adipocitos maduros 3T3-L1.....	168
Validación del modelo.....	168
Validación Morfológica.....	169
Validación molecular del modelo adipocítico de RI.....	170
Efectos moleculares de las isoflavonas en el modelo RI.....	170
Mecanismos de acción.....	172
Implicación de receptores estrogénicos.....	172
Efectos funcionales de las isoflavonas sobre el modelo RI de adipocitos.....	174
Sobre la captación de ácidos grasos.....	174
Implicación de receptores estrogénicos.....	176
Efecto señalizador del NO.....	176
Resumen del estudio: <i>isoflavonas en tejido adiposo</i>	178
Efectos a nivel hepático: modelo de hepatocitos FAO.....	180
Estudio de la capacidad ligante de las Isoflavonas sobre PPAR α	180
Efectos de las isoflavonas sobre la β oxidación.....	182
Efectos sobre la regulación de la expresión génica.....	183
Estudio de la capacidad ligante de las Isoflavonas sobre PPAR γ	185
Resumen del estudio: <i>isoflavonas en hepatocitos</i>	186

Estudio <i>in vitro</i> de las isoflavonas sobre la modulación de la respuesta inflamatoria	188
Estudio en modelo de cocultivo directo de 3T3-L1 y RAW 264.7	190
Estudio de los efectos de las isoflavonas dependientes del tipo celular	192
Efectos en adipocitos 3T3-L1 cultivados con medio condicionado de RAW 264.7.....	193
Efectos en macrófagos RAW 264.7 activados por LPS	194
Resumen del estudio: <i>isoflavonas en la respuesta inflamatoria del tejido adiposo</i>	196
Estudio <i>in vitro</i> de las vías moleculares de actuación del EGCG como modulador del metabolismo energético independiente de insulina.....	198
Efectos sobre la modulación de la vía AMPK	199
Efectos del EGCG sobre AMPK	199
Efectos del EGCG sobre ACC	202
Análisis de la modulación del ratio ADP/ATP	203
Efecto sobre la actividad metabólica.....	204
Análisis del flujo glicolítico	204
Análisis de la respiración mitocondrial	205
Descripción de los mecanismos de acción del EGCG	206
Efecto sobre las proteínas desacopladoras (UCP's).....	206
Efectos sobre la producción de ROS	211
Implicación del Ca ²⁺	214
Resumen del estudio: <i>EGCG como regulador del metabolismo energético</i>	215
Conclusiones	217
Anexos	221
Bibliografía	249

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Criterios diagnósticos de SM por la IDF.....	42
Tabla 2. Puntos de corte para el perímetro de cintura de la IDF.....	42
Tabla 3. Criterios metabólicos adicionales y variables indicadoras.....	43
Tabla 4. Prevalencia de SM española por comunidades autónomas.....	51
Tabla 5. Isoformas de IRS y distribución de su expresión.....	57
Tabla 6. Clasificación de los métodos e índices para el estudio de la RI.....	69
Tabla 7. Contenido de isoflavonas en productos derivados de soja.....	79
Tabla 8. Actividades biológicas atribuidas al EGCG.....	93
Tabla 9. Reactivos utilizados en la parte experimental.....	107
Tabla 10. Medios utilizados para el cultivo celular.....	112
Tabla 11. Sueros utilizados para el cultivo celular.....	112
Tabla 12. Composición de los geles para la electroforesis de proteínas.....	117
Tabla 13. Anticuerpos primarios utilizados en Inminodetección.....	119
Tabla 14. Anticuerpos secundarios utilizados en Inmunodetección.....	120
Tabla 15. siRNA utilizados para la inhibición de la traducción de UCP2.....	122
Tabla 16. Composición de geles de agarosa para la electroforesis de ácidos nucleicos.....	129
Tabla 17. Composición de las muestras para electroforesis.....	130
Tabla 18. Composición de la <i>Master Mix</i> para una reacción.....	131
Tabla 19. Secuencias y referencias de las sondas utilizadas para la RT-PCR.....	134
Tabla 20. Composición de las muestras para la cuantificación de lactato.....	135
Tabla 21. Composición de las Mix realizadas para la trasfección celular.....	139
Tabla 22. Prevalencia del SM por países según criterios IDF y ATPIII.....	225

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Composición de los quilomicrones.</i>	33
<i>Figura 2. Evolución de los quilomicrones a lipoproteínas de muy baja densidad(VLDL), baja densidad (LDL) y de alta densidad (HDL).</i>	34
<i>Figura 3. Esquema del metabolismo glucídico en el músculo esquelético.</i>	36
<i>Figura 4. Interrelación de sustratos energéticos entre hígado, músculo esquelético y tejido adiposo.</i>	40
<i>Figura 5. Proceso de formación de la insulina a través de sus precursores</i>	53
<i>Figura 6. Mecanismo de liberación de insulina en las células β del páncreas.</i>	54
<i>Figura 7. Esquema representativo de la vía de señalización insulínica</i>	55
<i>Figura 8. Estructura química de compuestos fenólicos</i>	76
<i>Figura 9. Sitios de acción potencial de los polifenoles dietarios sobre el metabolismo y homeostasis de la glucosa.</i>	77
<i>Figura 10. Comparación de la estructura química del 17β estradiol con la de las isoflavonas daidzeína, equol y genisteína.</i>	78
<i>Figura 11. Metabolismo de la daidzeína y la genisteína por la flora intestinal.</i>	80
<i>Figura 12. Estructura molecular de las catequinas presentes en el té verde</i>	88
<i>Figura 13. Programa del termociclador para la realización de una copia de cDNA a partir de mRNA</i>	132
<i>Figura 14. Programa del termociclador RTPCR de UCP2 y GADPH</i>	133
<i>Figura 15. Programa del termociclador para RTPCR de TNFα MCP1 iNOS y 36B4</i>	134
<i>Figura 16. Cambios fenotípicos durante la diferenciación de mioblastos a miotubos L6.</i>	146
<i>Figura 17. Caracterización morfológica del modelo de miotubo diferenciado L6.</i>	147
<i>Figura 18. Efectos de daidzeína, equol y genisteína sobre la fosforilación de AKT en miotubos L6.</i>	149
<i>Figura 19. Efectos del TNFα, ceramida 2, palmitato y glucosa oxidasa como inductores de RI.</i>	151
<i>Figura 20. Efectos daidzeína, equol y genisteína sobre la fosforilación de AKT en miotubos L6 en situación de RI.</i>	153
<i>Figura 21. Efectos de daidzeína, equol y genisteína sobre la fosforilación de ERK 1 y 2 en miotubos L6 en situación de RI.</i>	154
<i>Figura 22. Efectos de daidzeína, equol y genisteína sobre la fosforilación de IRS1 en miotubos L6 en situación normal y de RI.</i>	155

<i>Figura 23. Efectos de daidzeína, equol y genisteína sobre la fosforilación de AS160 en miotubos L6 en situación de RI.....</i>	<i>157</i>
<i>Figura 24. Efectos de daidzeína, equol y genisteína sobre la captación de glucosa estimada por 2-NBDG.....</i>	<i>158</i>
<i>Figura 25. Efectos del fulvestrant sobre la fosforilación de AKT inducida por daidzeína, equol y genisteína en miotubos L6 con RI.....</i>	<i>160</i>
<i>Figura 26. Inmunotinción de AKT en miotubos L6 diferenciados.</i>	<i>161</i>
<i>Figura 27. Análisis densitométrico de los efectos de la inhibición de la NOS sobre la fosforilación de AKT estimulada por equol.....</i>	<i>162</i>
<i>Figura 28. Efecto de las isoflavonas sobre la producción de lactato en miotubos L6 con RI. ...</i>	<i>164</i>
<i>Figura 29. Esquema de la señalización de la contracción muscular. Implicación del calcio. ...</i>	<i>165</i>
<i>Figura 30. Efecto del EGTA sobre la producción de Lactato en miotubos L6 con RI estimulada por isoflavonas.</i>	<i>166</i>
<i>Figura 31. Cambios fenotípicos durante la diferenciación de la línea 3T3-L1.....</i>	<i>169</i>
<i>Figura 32. Efectos de daidzeína, equol y genisteína sobre la fosforilación de AKT y ERK 1 y 2 en adipocitos 3T3-L1 en situación de RI.</i>	<i>171</i>
<i>Figura 33. Efectos del fulvestrant sobre la fosforilación de AKT inducida por daidzeína, equol y genisteína.</i>	<i>172</i>
<i>Figura 34. Captación de AGL estimulada por isoflavonas en adipocitos maduros RI.</i>	<i>174</i>
<i>Figura 35. Efecto del Fulvestrant sobre la captación de AGL estimulada por isoflavonas en adipocitos maduros RI.....</i>	<i>176</i>
<i>Figura 36. Efecto de la inhibición de la NOS sobre la captación de AGL estimulada por isoflavonas en adipocitos maduros RI.....</i>	<i>178</i>
<i>Figura 37. Capacidad de las isoflavonas para actuar como ligandos de PPAR α en hepatocitos FAO.....</i>	<i>181</i>
<i>Figura 38. Concentración de TG en hepatocitos FAO tratados con isoflavonas.</i>	<i>182</i>
<i>Figura 39. Efectos de las isoflavonas sobre la estimulación de la expresión génica de CPT-1 y AOX.....</i>	<i>184</i>
<i>Figura 40. Capacidad de las isoflavonas para actuar como ligandos de PPAR γ en hepatocitos FAO.....</i>	<i>185</i>
<i>Figura 41. Esquema del desarrollo de inflamación entre adipocitos y macrófagos.....</i>	<i>189</i>
<i>Figura 42. Modulación de los mediadores inflamatorios MCP1, TNFα y NO dependientes de isoflavonas en modelo de cocultivo.....</i>	<i>191</i>
<i>Figura 43. Viabilidad celular dependiente de isoflavonas en modelo de cocultivo.....</i>	<i>192</i>

<i>Figura 44. Efecto de las isoflavonas sobre la estimulación y la expresión génica de MCP1, TNFα y NO en adipocitos cultivados con medio condicionado.....</i>	<i>193</i>
<i>Figura 45. Efecto de las isoflavonas sobre la estimulación y la expresión génica de MCP1, TNFα y NO en macrófagos activados por LPS</i>	<i>195</i>
<i>Figura 46. Efectos del EGCG sobre la fosforilación de AMPK en miotubos L6.....</i>	<i>199</i>
<i>Figura 47. Comparación de los efectos del AICAR y del EGCG sobre la fosforilación de AMPK en miotubos L6.....</i>	<i>201</i>
<i>Figura 48. Efectos del EGCG y del AICAR sobre la fosforilación de ACC en miotubos L6.....</i>	<i>202</i>
<i>Figura 49. Efectos del EGCG sobre la modulación del ratio ADP/ATP.....</i>	<i>203</i>
<i>Figura 50. Efecto del EGCG sobre la producción de Lactato.</i>	<i>204</i>
<i>Figura 51. Efecto del EGCG sobre la respiración mitocondrial.....</i>	<i>206</i>
<i>Figura 52. Efectos del EGCG sobre las proteínas desacopladoras UCP2 y UCP3.....</i>	<i>207</i>
<i>Figura 53. Efectos de la Genipina sobre el incremento de actividad de AMPK estimulada por EGCG en miotubos L6.</i>	<i>209</i>
<i>Figura 54. Efectos de los siRNA NC, 19 y 21 en la activación de AMPK estimulada por EGCG en miotubos L6.....</i>	<i>210</i>
<i>Figura 55. Efectos de los siRNA NC, 19 y 21 sobre la expresión de UCP2.</i>	<i>211</i>
<i>Figura 56. Efectos del EGCG sobre la producción de ROS en miotubos L6.....</i>	<i>212</i>
<i>Figura 57. Efectos del EGCG y del AICAR sobre ACC en miotubos L6.</i>	<i>213</i>
<i>Figura 58. Efectos del STO-609 sobre la inducción de la fosforilación de AMPK y ACC estimuladas por EGCG en miotubos L6.....</i>	<i>214</i>
<i>Figura 59. Propuesta de mecanismo de acción del EGCG sobre la activación de AMPK</i>	<i>216</i>

Abreviaciones

AGL	Ácidos Grasos Libres
AGEs	Compuestos de glicosilación avanzada
AKT/ PKB	Proteína quinasa B
BSA	Albúmina sérica bovina
CaMKK	Quinasa de la quinasa de calmodulina
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CHX	Cicloheximida
CoA	Coenzima A
D	Daidzeína
DE	Desviación estándar
DMT2	Diabetes mellitus tipo 2
DM	Diabetes mellitus
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E	Equol
ECV	Evento/Enfermedad Cardiovascular
EGCG	Galato de epigallocatequina
eNOS	Sintasa del óxido nítrico endotelial
ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares
ER α/β	Receptor estrogénico α/β
G	Genisteína
GLUT	Proteínas transportadoras de glucosa
HDL	lipoproteína de alta densidad
IGF	Factor de crecimiento insulínico
IL	Interleuquina
IMC	Índice de Masa Corporal
iNOS	Sintasa del óxido nítrico inducible
Ins	Insulina
IR	Receptor de insulina
IRS	Sustrato del receptor de insulina
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LPL	lipoproteína lipasa
LPS	lipopolisacáridos

MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
MCP1	Proteína quimotáctica de monocitos uno
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NF-κB	Factor Nuclear Kappa-B
NOS	Sintasa del óxido nítrico
o/n	toda la noche (del ingles <i>overnight</i>)
PC	Perímetro de cintura
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDK	Proteína quinasa dependiente de PIP3
PI3K	Quinasa de Fosfatidil inositol 3
PIP2	Fosfatidil inositol-4,5-bifosfato
PIP3	Fosfatidil inositol-3,4,5-trifosfato
PKC	Proteína quinasa C
PPARs	Receptores Activados por Proliferadores de Peroxisomas.
P/S	Penicilina y estreptomicina
p/v	Relación peso por volumen
RI	Resistencia a la insulina
RNAsa	Ribonucleasa
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	revoluciones por minuto
SM	Síndrome Metabólico
TA	Temperatura ambiente
TG	Triglicéridos
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
VLDL	lipoproteínas de muy baja densidad
v/v	relación volumen por volumen
WB	Western Blot

Introducción

Nota: se ha estimado oportuno empezar esta Tesis con un breve repaso de la fisiología del metabolismo energético y de los órganos participantes en el proceso antes de comentar las complicaciones derivadas de la pérdida de la homeostasis en el balance energético. Este compendio servirá tanto para centrar el tema como para comprender mejor los argumentos que se han desarrollado durante la elaboración de esta Tesis.

METABOLISMO ENERGÉTICO

Se define el metabolismo como el conjunto de las reacciones y procesos físico-químicos que ocurren en una célula y, por extensión en el organismo. La interrelación de estos procesos son la base de la vida a escala molecular y permiten las diversas actividades de las células (Elsas LJ. 2012).

Las células requieren de una serie de *combustibles* para su correcto funcionamiento que son obtenidos por la dieta. La actividad y sustancias químicas del sistema digestivo degradan las macromoléculas de los alimentos para liberar los substratos energéticos del cuerpo que puede ser utilizado inmediatamente o almacenado en tejidos corporales, tales como el hígado, los músculos y el tejido adiposo.

El estudio del metabolismo de un organismo en concreto, aporta información de cómo se encuentra en cuanto a parámetros fisiológicos, lo que implica una buena herramienta para predecir o detectar diferentes enfermedades y/o problemas de salud.

Una característica del metabolismo es la similitud de las rutas básicas entre especies muy diferentes (Smith, Morowitz 2004) que puede ser debido a una temprana aparición en la historia evolutiva (Ebenhoh, Heinrich 2001) condicionada por la prevalencia de aquellas rutas altamente eficientes (Melendez-Hevia, Waddell & Cascante 1996).

Con el fin de entender mejor como se lleva a cabo la regulación de la homeostasis energética desde la ingesta de los nutrientes hasta su utilización o almacenamiento, a continuación se hará un breve resumen de los principales órganos participantes en este proceso.

Órganos participantes en la homeostasis energética

Hígado

El hígado es la más voluminosa de las vísceras del cuerpo humano y una de las más importantes en el control de la homeostasis energética ya que es el primer órgano comprometido en el control de los niveles sanguíneos de glucosa, lípidos y aminoácidos. Se puede considerar que el hígado funciona como centro de reprocesamiento de estas sustancias nutritivas.

Metabolismo glucídico

La glucosa se incorpora a los hepatocitos por transportadores GLUT2 en un proceso no afectado de forma directa por la insulina (Wells et al. 1992). Una vez en su interior, la glucosa es rápidamente convertida en glucosa 6-fosfato por la enzima glucoquinasa¹, de esta manera, el éster de fosfato no puede difundir hacia el medio extracelular y por ende es *atrapado* en el interior celular. La glucosa 6-fosfato puede seguir procesos catabólicos hasta la obtención de dos moléculas de piruvato o puede ser convertida en glucosa 1-fosfato para ser posteriormente almacenada en forma de glucógeno. A parte, otras hexosas como la fructosa y galactosa pueden ser convertidas en glucosa en el hígado. De las dos, la fructosa es particularmente importante debido a la gran cantidad presente en una dieta humana saludable, principalmente por la fruta. Además, el exceso de glucosa es convertido en ácidos grasos y después en triglicéridos (TG).

Una de las particularidades más importantes que presenta el hígado en cuanto al metabolismo glucídico es que en situaciones de hipoglucemia, puede activar la ruta metabólica que permite la síntesis de glucosa a partir de precursores no glucídicos, a este proceso se le denomina **gluconeogénesis**.

Metabolismo lipídico

Los lípidos de la dieta ingresan al hígado desde 2 orígenes. Por un lado, los ácidos grasos libres (AGL) de cadena corta que son absorbidos directamente en el intestino se unen a albúmina y se liberan al sistema porta para que llegue al hígado. Por otro lado,

¹ Isoenzima de la familia de las hexoquinasa predominante en el hígado

la principal porción de los ácidos grasos de la dieta llegan a través de la arteria hepática como TG en forma de remanentes de quilomicrones (Figura 1). Los AGL de la dieta son convertidos en TG por las células de la mucosa intestinal. Éstos, en conjunción con fosfolípidos y una fina capa de proteínas (apolipoproteínas), constituyen los quilomicrones que ingresan en los vasos linfáticos y en la sangre periférica.

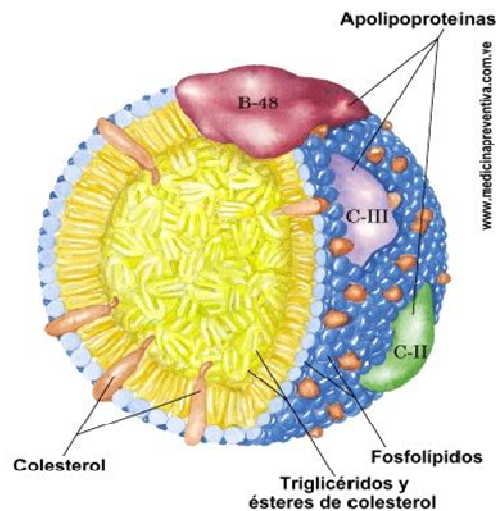


Figura 1. Composición de los quilomicrones. Los quilomicrones se generan en el intestino delgado y están formados por triglicéridos, fosfolípidos, colesterol y apolipoproteínas.

La mayoría de los quilomicrones son depurados de la sangre por tejidos extrahepáticos tales como el adiposo y el muscular. En las células del endotelio vascular de estos tejidos la lipoproteína lipasa (LPL) cataliza la liberación de los TG. Los residuos de los quilomicrones ingresan al hígado, donde son degradados los TG remanentes. Aproximadamente 20% de los ácidos grasos de la dieta entran en los hepatocitos, donde pueden ser utilizados como sustrato energético o *resintetizados* a TG.

El hígado forma una sola reserva de ácidos grasos a partir de varias fuentes. Además de los ácidos grasos de los quilomicrones y los AGL circulantes, están los sintetizados endógenamente a partir de la acetil CoA de la glucosa. Estos AGL son luego utilizados para sintetizar TG y, en presencia de las apolipoproteínas, constituyen la lipoproteína plasmática de muy baja densidad (VLDL).

Por consiguiente, y como se ilustra en la figura 2, los ácidos grasos de la dieta son procesados a quilomicrones y VLDL y redistribuidos a nivel plasmático por todo el

organismo. En su trayecto son utilizados por los diferentes tipos celulares de los órganos periféricos dependiendo de los receptores de apolipoproteínas que expresen, fenómeno que está en función de sus necesidades de TG y/o colesterol. La LPL hidroliza los TG y los AGL se incorporan al interior celular por transportadores específicos. La disminución de la concentración de TG y colesterol provoca un incremento de la densidad de las VLDL generándose así las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y las lipoproteínas de alta densidad (HDL). Estas últimas pueden ser directamente sintetizadas por el hígado cuando existe requerimientos de colesterol como sustrato para la síntesis de compuestos como: sales biliares, hormonas y vitamina D.

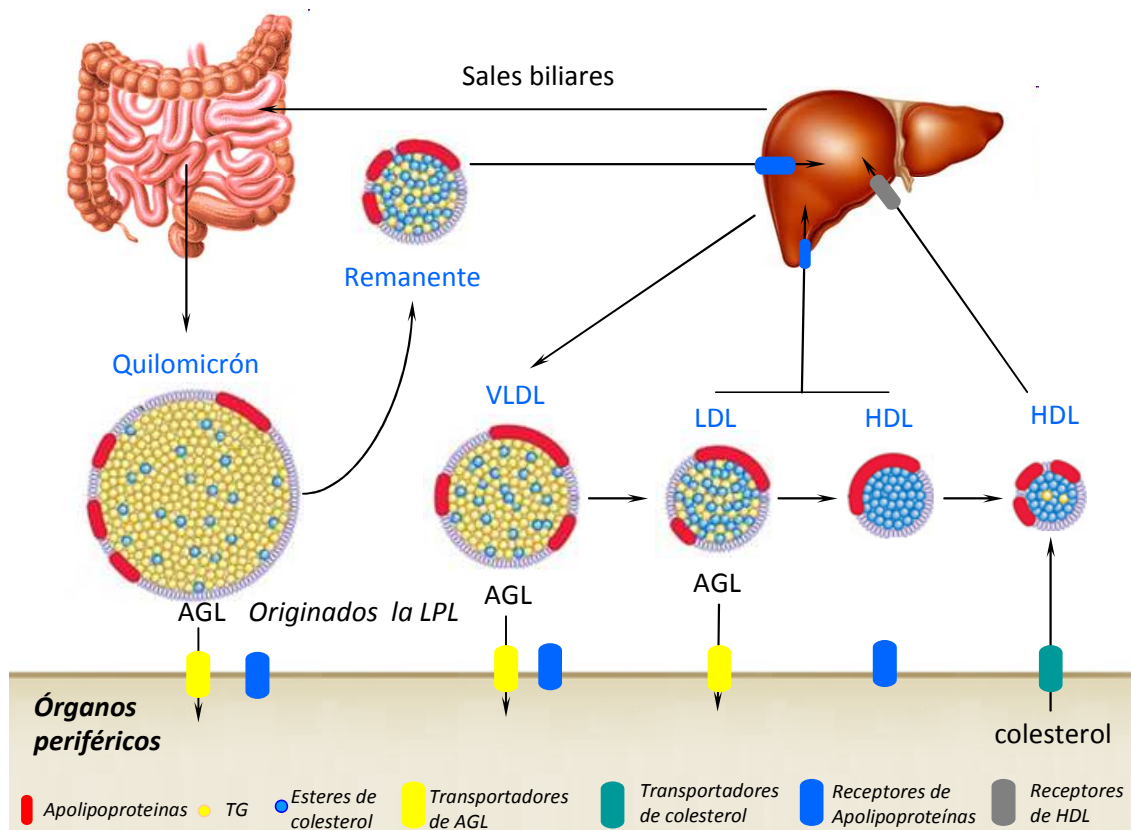


Figura 2. Evolución de los quilomicrones a lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), baja densidad (LDL) y de alta densidad (HDL).

En cuanto al aporte de ésteres de colesterol a las células de un organismo, se puede decir que se realiza a través de VLDL o LDL mientras que su eliminación tiene lugar en forma de HDL (Shi, Burn 2004). Este hecho sugiere que la relación entre la concentración de los niveles plasmáticos de estos compuestos sea un buen indicador del estado metabólico lipídico de un individuo.

Músculo Esquelético

La principal función de las células musculares es la generación de movimiento convirtiendo la energía química en energía mecánica. Metabólicamente, están especializadas en degradar las sustancias nutritivas y producir el ATP necesario para la contracción muscular.

Metabolismo glucídico

El músculo esquelético juega un rol central en la regulación del metabolismo de la glucosa de todo el cuerpo. Debido a su masa, el músculo esquelético es el principal tejido responsable de la incorporación de glucosa dependiente de insulina, explicando más del 80 % de la captación de glucosa de todo el cuerpo (Henriksson 1990). En este caso, la glucosa sanguínea ingresa a los miocitos por un proceso de difusión facilitada a través del transportador GLUT4 (Camps et al. 1992). Una vez dentro de la célula, es fosforilada y utilizada para la obtención de ATP o almacenada en forma de glucógeno.

Durante requerimientos energéticos a corto plazo (20-30 minutos), los miocitos obtienen la energía a partir de la captación de la glucosa plasmática o de la reserva de glucosa en forma de glucógeno, que es transformada a piruvato por glucólisis. El piruvato formado puede seguir dos caminos dependiendo del suministro de oxígeno existente. Si hay suficiente suministro de oxígeno, el piruvato es descarboxilado en la matriz de la mitocondria por el complejo enzimático piruvato deshidrogenasa formando CO_2 y acetil coenzima A (acetil CoA) que ingresa en el ciclo de Krebs otorgando los substratos necesarios para la formación de ATP por fosforilación oxidativa. Si no hay suficiente cantidad de oxígeno disponible o el organismo es incapaz de continuar con el proceso oxidativo, el piruvato sigue una ruta anaeróbica. En esta vía, el piruvato se reduce a lactato con la participación de la lactato deshidrogenasa (LDH). El exceso lactato producido ingresa al torrente sanguíneo y es restituido al hígado, donde es convertido en glucosa por procesos gluconeogénicos, que vuelve a ser secretada al torrente sanguíneo completando así el proceso denominado *ciclo de Cori* (Figura 3).

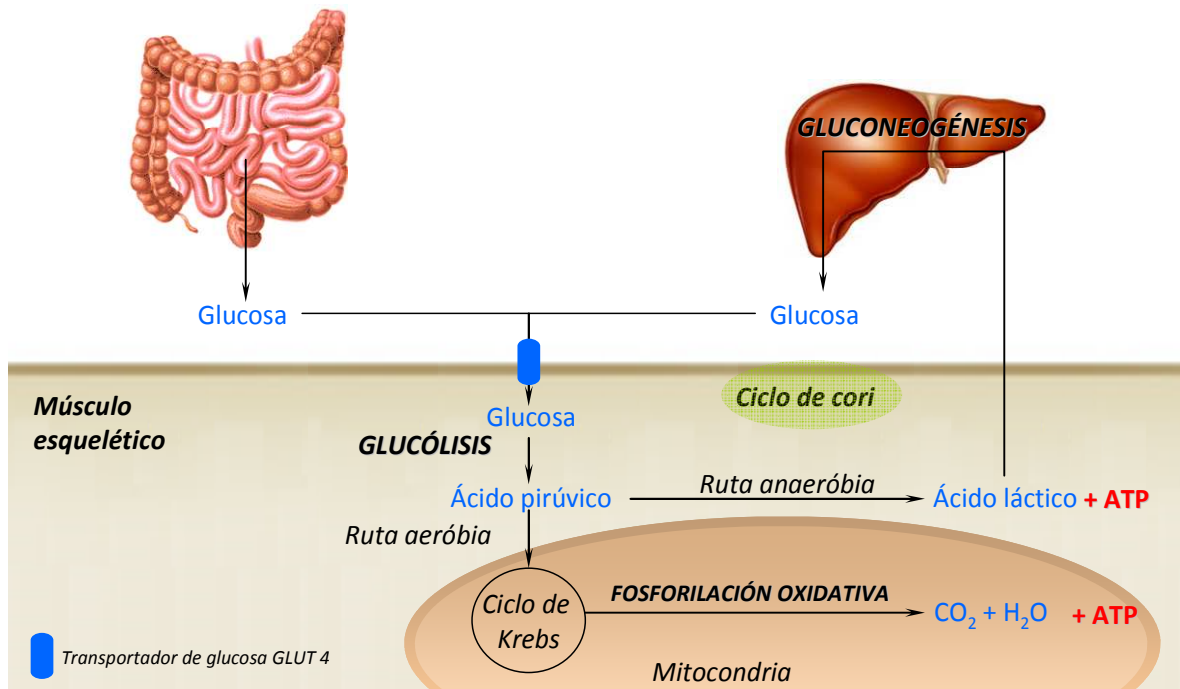


Figura 3. Esquema del metabolismo glucídico en el músculo esquelético. La glucosa plasmática puede obtenerse a partir del alimento a través del tubo digestivo o puede producirla el hígado a partir del glucógeno almacenado o por gluconeogénesis.

Dado que el músculo esquelético no expresa la enzima *glucosa 6-fosfatasa*, este tejido no puede realizar la *gluconeogénesis* como ocurre en el hígado.

Metabolismo lipídico

En estado de reposo el músculo esquelético obtiene la mayor parte de la energía a partir de la β oxidación los AGL circulantes (unidos a seroalbúmina), o procedentes de la hidrólisis, mediada por LPL, de los TG de quilomicrones o VLDL.

Los mecanismos por los cuales los AGL ingresan a la célula no han sido dilucidados completamente, aunque se propone que tienen lugar tanto por difusión pasiva como mediada por proteínas específicas tales como: proteínas transportadoras de ácidos grasos (FATP), proteínas traslocadoras de ácidos grasos (FAT/CD36), proteínas de unión a ácidos grasos (FABP) o por la acción de caveolinas (Abumrad, Harmon & Ibrahimi 1998, Koonen et al. 2005).

En el músculo esquelético se expresan principalmente la isoforma uno de FATP y el *tándem* FAT/CD36 (Binnert et al. 2000, Abumrad et al. 1993). La regulación tanto de FATP como de FAT/CD36 esta mediada por la acción insulínica que promueve la

translocación de estas proteínas transportadoras del citoplasma hacia la membrana plasmática (Sfeir et al. 1997, Luiken et al. 2002) favoreciendo así la incorporación de los AGL.

Una vez en el interior celular, los AGL son esterificados a aciles CoA grasos² que, de esta forma, pueden seguir diferentes rutas: pueden ser sintetizados a fosfolípidos y formar así parte de la membrana plasmática, pueden ser almacenados en forma de TG o pueden ser utilizados como sustrato energético para la *regeneración* de ATP (Lopaschuk et al. 2010). En este último caso, los aciles CoA se acortan en el peroxisoma mediante la participación de acil CoA oxidasa (AOX o ACO) o incorporados directamente a la mitocondria, a través del sistema de carnitina palmitoil transferasas (CPT's) (McGarry, Brown 1997).

Ante determinados requerimientos fisiológicos, las proteínas musculares también pueden ser hidrolizadas para liberar aminoácidos que serán catabolizados para satisfacer los requerimientos energéticos. Dado que la célula muscular no puede manejar el nitrógeno liberado en el catabolismo de los aminoácidos, se produce alanina y glutamina con el fin de transportar el nitrógeno al hígado en forma no tóxica, donde pueden ser resintetizados a piruvato o eliminados por el ciclo de la urea.

Tejido Adiposo

El tejido adiposo desempeña un importante papel en la regulación del metabolismo energético ya que, dependiendo de la situación fisiológica del individuo, regula el almacenamiento o la liberación de compuestos de alta energía. Así, cuando la alimentación es abundante y nivel de actividad física es bajo se produce la **lipogénesis**, proceso por el cual el exceso de energía se almacena en el tejido adiposo en forma de TG. Por el contrario, cuando se produce un déficit de energía, como por ejemplo durante el ayuno o el ejercicio, tiene lugar la **lipólisis** y en este caso los TG se descomponen, y ácidos grasos son liberados al torrente sanguíneo.

² Los aciles coenzima A (acil-CoA) son grupos acilo derivados de ácidos carboxílicos unidos al coenzima A mediante un enlace tioéster. Dependiendo del ácido carboxílico se obtendrán: Acetil CoA, del ácido acético; Propionil CoA, del ácido propiónico; Malonil CoA; del ácido malónico y Acil CoA graso de los ácidos grasos.

Lipogénesis

Se define lipogénesis como la formación de TG a partir de sus precursores. Los ácidos grasos provienen principalmente de las VLDL o sintetizados a partir de la glucosa. El tejido adiposo es el sitio primario para la degradación de los quilomicrones ya que los AGL de esta fuente, así como de las VLDL, son incorporados a estas células de forma muy eficiente. Por su parte, la glucosa ingresa a los adipocitos por un mecanismo de transporte facilitado dependiente de insulina. En su interior, la glucosa, es metabolizada hasta acetil-CoA que será utilizado junto con el glicerol 3-fosfato, como *intermediarios* en la síntesis de los TG.

Debido a su bajo contenido en agua y elevado contenido de lípidos, es el tejido que presenta la mayor relación calorías-peso (8 Kcal. por gramo de tejido) del organismo, lo que lo convierte en el tejido más eficiente en el almacenamiento de sustratos energéticos³.

Lipólisis

Ante determinados estímulos o requerimientos energéticos, los TG son hidrolizados hasta ácidos grasos y glicerol y secretados al torrente sanguíneo para su distribución por todo el organismo.

La etapa limitante de la lipólisis está controlada por la lipasa sensible a hormonas (HSL) que cataliza la hidrólisis de los TG. La activación de HSL depende de la síntesis de AMP cíclico (cAMP) y este a su vez del grado de activación/inactivación mediado por proteínas G. Por lo tanto, La lipólisis será estimulada por todas aquellas hormonas que al unirse a su receptor provoquen la activación de proteínas G estimuladoras mediante la adenilato ciclasa, como es el caso de los glucocorticoides, catecolaminas y la hormona del crecimiento (GH) (Peckett, Wright & Riddell 2011). Por el contrario, la lipólisis puede ser inhibida mediante dos mecanismos. Por una lado, mediante hormonas cuyo receptor se encuentre asociado a una proteína G inhibidora mediante la fosfodiesterasa, como es el caso de: los receptores adrenérgicos alfa-2, los

³ El 85% de las reservas energéticas totales del organismo se encuentran como TG en el tejido adiposo.

receptores nicotínicos, los de la prostaglandina E2, los de la adenosina A1 y los de los neuropeptidos Y (Langin 2006). Por el otro, mediante la activación de receptores con actividad tirosinquinasa como es el caso del receptor de la insulina y el del factor de crecimiento 1 (EGFR1) (Langin 2006). De forma general se puede decir que la actividad de la HSL aumenta en situaciones de ayuno o de estrés y disminuye por la alimentación.

El tejido adiposo esta compuesto principalmente por adipocitos, pero también existen otros tipos celulares que conforman este tejido como preadipocitos, células endoteliales, fibroblastos, y numerosas células del sistema inmune, en particular, macrófagos. Las interacciones paracrinas entre estos tipos celulares modularán las funciones tanto endocrinas como de reserva energética del tejido adiposo. A modo de curiosidad, algunos autores relacionan de forma directa la concentración de macrófagos presentes en el tejido adiposo con el índice de masa corporal (IMC) (Weisberg et al. 2003).

Aunque se hable del tejido adiposo de forma general, es importante destacar la existencia de diferentes tipos que, aún presentando las mismas características en cuanto la captación de TG, difiere en sus funciones principales. Así, el *tejido adiposo blanco* presenta principalmente una función endocrina y de almacén de TG mientras que el *tejido adiposo marrón*, que debe su nombre a la alta concentración de mitocondrias⁴, está directamente relacionado con la regulación de la temperatura corporal aunque es un mecanismo de termogénesis poco relevante en humanos adultos. Por su parte, el *tejido adiposo blanco* puede catalogarse en visceral o subcutáneo, dependiendo de su localización.

A modo de resumen de lo que se acaba de describir y con la intención de tener una visión general de cómo se consigue la homeostasis energética a nivel sistémico, se muestra la figura 4 en la que se representan las interrelaciones existentes entre el hígado, el músculo esquelético y el tejido adiposo con el fin de mantener un flujo constante de los substratos energéticos utilizados a nivel celular para la producción de ATP imprescindible para el correcto funcionamiento de las células del organismo.

⁴ Las mitocondrias presentan color parduzco.

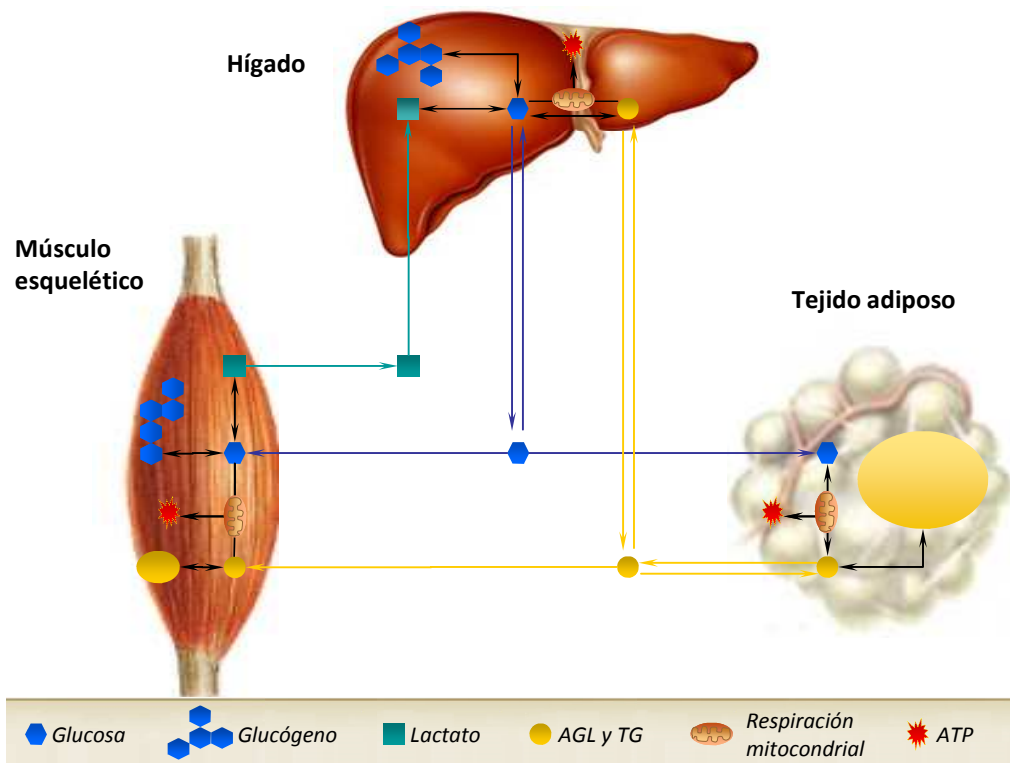


Figura 4. Interrelación de sustratos energéticos entre hígado, músculo esquelético y tejido adiposo. Tanto la glucosa como los AGL provienen de la dieta y son transportados a nivel sistémico por el torrente sanguíneo.

Existen situaciones en la vida de un individuo en los que este tipo de comunicación entre los diferentes órganos se ve modificado como, por ejemplo, durante la gestación, periodo en el que pueden ocurrir desajustes del metabolismo tanto de la madre (Metzger et al. 2007) como del feto (Ravelli, Stein & Susser 1976), pero, por medio de sistemas de control homeostático, el cuerpo es capaz de adaptarse. El problema surge cuando esta inestabilidad energética es mantenida en el tiempo ya que se supera la capacidad homeostática, fenómeno que conduce a una situación patológica. .

Los factores de riesgo que juegan cada vez más a favor en el desequilibrio entre los *ingresos* y los *gastos* energéticos están principalmente vinculados al *estilo de vida* que durante las últimas décadas se ha impuesto en nuestras sociedades y que se generaliza en un desequilibrio entre de los hábitos alimentarios (*incremento de la incorporación de nutrientes*) y el nivel de sedentarismo (*disminución del gasto energético*). Esta situación se asocia directamente no sólo con la obesidad sino que también con todas las patologías que es engloban en lo que se conoce como Síndrome Metabólico (SM).

SÍNDROME METABÓLICO

Definición y criterios diagnósticos

Aunque el concepto de SM se remonta a los años 20 (Kylin E, 1923, citado por Zimmet, M M Alberti & Serrano Rios 2005) actualmente no existe una definición generalmente aceptada que detalle los criterios cuali y cuantitativos para diagnosticar el SM.

En 2005, Instituciones como la Federación Internacional de Diabetes (IDF por sus siglas en inglés, *International Diabetes Federation*), la Asociación Americana del Corazón (AHA de *American Heart Association*) o el la Federación Mundial del Corazón (WHF de *World Heart Federation*) propusieron un consenso que no fue aprobado ni por la Organización Mundial de la Salud (OMS o WHO de *World Health Organization*) ni por el Grupo Europeo para el Estudio de la Resistencia a la Insulina (EGIR de *European Group for the Study of Insulin Resistance*) entre otros. Uno de los temas que no se menciona en la explicación de la diversidad de criterios es que, así como se delimitan diferencias entre género, la mayoría no tiene en cuenta el factor de grupo étnico, muy importante debido a la carga genética asociada, lo que explicaría la diferencia de valores de corte en los parámetros medidos. Dicho esto, y en base a que los criterios establecidos por la IDF si que recoge el sesgo de variedad racial, se antojan los parámetros establecidos por la IDF como los más indicados para el diagnostico del SM, aunque el debate sigue abierto (para información adicional consultar anexo I).

Sin entrar más en detalle en esta discrepancia y con la necesidad de centrar el tema, nos basamos en los argumentos generalmente aceptados para definir el SM como el conjunto de *factores de riesgo* que aumenta la probabilidad de padecer situaciones patológicas que engloban enfermedades cardiovasculares (ECV) o diabetes mellitus tipo 2 (DMT2).

Las ECV son la principal causa de muerte en los países desarrollados (McGill et al. 2000) lo que convierte el SM uno de los principales problemas de salud de estos países con las implicaciones socioeconómicas que esto supone.

Debido a la importancia de tipificar los parámetros diagnósticos del SM que sirvan para comparar prevalencia e impacto de SM a nivel mundial, la IDF definió una serie de nuevos criterios incluidos en las siguientes tablas (Zimmet et al. 2005).

Tabla 1. Criterios diagnósticos de SM por la IDF

Obesidad central* : dependiendo del grupo étnico presentar un diámetro de cintura que no exceda los valores de la tabla 2 junto con dos o más de los siguientes criterios:	
Elevación de TG	> 150 mg/dL, o Estar en tratamiento específico para dicha anomalía lipídica.
Colesterol HDL (HDLc) bajo	< 40 mg/dL en hombres < 50 mg/dl en mujeres
Hipertensión arterial	≥ 130/85 mm Hg, o Seguir tratamiento de hipertensión.
Glucemia basal alterada**	≥ 100 mg/dl, o Diagnostico previo de DMT2

* La obesidad central será asumida si el índice de masa corporal (IMC) es mayor de 30 kg/m².

** En la práctica clínica, también es aceptable el test de intolerancia a la glucosa.

Tabla 2. Puntos de corte para el perímetro de cintura de la IDF

Grupo étnico	Perímetro de cintura	
	Hombre	Mujer
Europeos	≥ 94 cm	≥ 80 cm
Oriente medio	≥ 94 cm	≥ 80 cm
Sudasiáticos	≥ 90 cm	≥ 80 cm
Chinos	≥ 90 cm	≥ 80 cm
Japoneses	≥ 85 cm	≥ 80 cm
Norteamericanos	≥ 102 cm	≥ 88 cm
Sudamericanos	≥ 90 cm	≥ 80 cm
Africanos subsaharianos	≥ 94 cm	≥ 80 cm

A parte de estos referentes clínicos, la IDF definió también unos criterios (tabla 3) aplicables en el campo de la investigación que sirvieran como referencia para determinar, de forma individualizada, el riesgo de ECV o de DMT2.

Tabla 3. Criterios metabólicos adicionales y variables indicadoras

Distribución anormal de la grasa corporal

- Distribución general de la grasa corporal
- Análisis de biomarcadores del tejido adiposo
- Evaluación del estado de esteatosis hepática

Dislipidemia aterogénica

- Medición de Apo B
- Análisis de LDL

Intolerancia a la glucosa

- Sobrecarga oral de glucosa

Resistencia insulínica

- Elevación de los niveles de insulina/proinsulina en ayunas
- HOMA-IR
- Resistencia a la insulina según el BMM (*Bergman Minimal Model*)
- Elevación de ácidos grasos libres en ayunas

Alteraciones en la regulación vascular

- Medición de la disfunción endotelial
- Microalbuminuria

Estado inflamatorio

- Elevación de citoquinas proinflamatorias (TNF α , MCP1...)
- Elevación de moduladores del proceso inflamatorio (NO)

Estado protrombótico

- Factores fibrinolíticos (PAI-1...)

Factores hormonales

- Eje hipotálamo-hipófisis-glándula adrenal

Relevancia de los parámetros diagnósticos para la estimación del SM

Antes de empezar a introducir este apartado cabe la pena destacar que cuando se habla de la problemática de la obesidad, no se refiere precisamente del exceso de peso con la que se normalmente se estima, sino a los problemas que suelen acompañar a éste exceso de peso, como son la hipertensión, la hiperglucemia o la hipercolesterolemia, cuya problemática se comentará a lo largo de este apartado. Es también importante aclarar que estas patologías no son condiciones *sine qua non* de todos los sujetos obesos ya que, a modo de ejemplo, no todos los hipertensos son obesos ni todos los obesos son hipertensos. Hecha la reflexión sobre la existencia de los *obesos sanos*, se procederá a la explicación del título de este apartado.

Obesidad central y parámetros del metabolismo lipídico

En una situación de exceso de energía, en la que se supera la capacidad de captación de AGL por el adipocito, se produce un aumento de su concentración en sangre (hiperlipidemias). En esta situación los AGL no captados por los adipocitos son redistribuidos por la circulación sistémica y acumulados de forma ectópica en otros tejidos como el hepático o el músculo esquelético (Miranda et al. 2005a). El tejido adipocítico visceral también es receptor de los AGL circulantes y su incremento es fácilmente correlacionable por medidas antropométricas como el IMC o el perímetro de cintura (PC). Por eso se incluyen estos parámetros en la mayoría de los criterios diagnósticos de SM.

El metabolismo lipídico normal incluye liberación de AGL desde los adipocitos a la sangre siendo así distribuidos a nivel sistémico para su utilización por los órganos o tejidos como el hígado y el músculo esquelético. En el hígado, una parte de los AGL es catabolizada pero la mayoría es transformada a TG por un proceso de esterificación. De forma general, existe un transporte continuo de AGL desde el tejido adiposo hacia el hígado; sin embargo, un exceso de este transporte favorece que el proceso de esterificación se sature debido a la acumulación de TG a nivel hepático, que puede conducir a la situación de esteatosis hepática⁵ (Ginsberg 2000). Esta alteración del

⁵ Situación conocida comúnmente como hígado graso

metabolismo lipídico se caracteriza por la elevación tanto de TG como de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y el descenso de lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Ginsberg 2000).

El excesivo flujo de AGL al hígado produce aumento de la síntesis de TG que resulta en un incremento de la concentración de VLDL. Además, en el tejido adiposo y en el músculo se produce un descenso de la actividad LPL, viéndose comprometida la capacidad de extraer los TG de las VLDL lo que favorece la acumulación de lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) y LDL (Franssen et al. 2011). El incremento de estas lipoproteínas está asociado a complicaciones aterogénicas⁶ debido a que presentan una mayor capacidad de penetración en la íntima, una mejor adherencia a los glucosaminoglicanos y mayor susceptibilidad a la oxidación que las HDL (Cucuianu, Brudasca 2008). Parece lógico pensar que la medida del incremento de estas formas podría ser un buen indicador del estado metabólico lipídico del individuo, que sirviera como criterio diagnóstico del SM. Sin embargo, se estimó más conveniente para este fin la medida del descenso de las HDL ya que son depuradas con mayor facilidad que las otras lipoproteínas además de presentar capacidad *antiaterogénica* (Julius 2003).

Glucemia basal alterada

En situaciones en la que se encuentra comprometida la capacidad de captación de glucosa por parte de los órganos periféricos, aumenta la glucemia y este fenómeno se asocia al riesgo de desarrollar SM.

El nivel de glucosa circulante en ayunas que se utiliza como referencia para diagnosticar la hiperglucemia varía dependiendo de los autores y criterios. Así, puede considerarse hiperglucemia cuando los niveles plasmáticos son ≥ 150 mg/dL (Alberti, Zimmet 1998), mientras que otros trabajos la diagnostican cuando la glucemia basal excede los 100 mg/dL (Al-Bermani et al. 2005) si bien es cierto que éste último valor es el que actualmente se tienen más en consideración.

⁶ *Capacidad de promover aterosclerosis por deposición e infiltración de sustancias lipídicas en las paredes de las arterias.*

Importancia de la hipertensión en el SM

La relación entre hipertensión y SM se antoja compleja debido principalmente a que presenta particularidades independientes a las de otras variables del SM (Miranda et al. 2005b). Aún así, la mayoría de los expertos coinciden en que la presión arterial con valores $\geq 130/85$ mm Hg sea incluida como criterio diagnóstico en la mayoría de las definiciones del síndrome metabólico, como se puede corroborar en el anexo I.

Los puntos clave para este consenso incluyen el aumento de la incidencia de la hipertensión en los pacientes diabéticos (Morales et al. 1993), la correlación negativa entre sensibilidad a la insulina y la hipertensión arterial (Ferrannini et al. 1997) y el papel desencadenante de la hipertensión en otros factores de riesgo vinculados con el desarrollo del SM como es el caso de la aterosclerosis (Haffner 1997). Si bien es cierto que este último punto, aunque relevante, no es exclusivo de la hipertensión ya que como se ha comentado anteriormente, el incremento de los niveles de colesterol LDL, también juega un importante papel en el desarrollo de la aterosclerosis.

Es sabido que el riñón desempeña un papel clave en el control de la presión sanguínea (Hall et al. 1980). Uno de los principales mediadores del control de la hemodinámica es el sistema renina-angiotensina-aldosterona por su capacidad de modular tanto la vasoconstricción (angiotensina II) como la concentración de electrolitos a nivel renal (aldosterona) que determinaran el aumento de la presión arterial.

Está descrito que un aumento de la masa adipocítica conduce a un incremento de la producción de angiotensinógeno, precursor inactivo de la angiotensina, proporcionando un mecanismo potencial para aumentar presión sanguínea (Egan, Greene & Goodfriend 2001). Por su parte, los AGL también presentan efectos sobre la estimulación de la producción de angiotensinógeno a nivel hepático (Egan, Greene & Goodfriend 2001), lo que hace evidente la relación directa entre obesidad e hipertensión. Esta relación sugiere una posible regulación de la hipertensión, y las patologías asociadas, mediante el control de la alimentación.

Epidemiología del SM

Prevalencia a nivel mundial

A la hora de analizar y contrastar la prevalencia del SM hay que tener en cuenta las pautas que se han seguido para su evaluación, ya que no todos los estudios se basan en los mismos criterios e incluso muchas veces no queda claro cuales son éstos, lo que hace farragosa la interpretación de los resultados. A modo de ejemplo, dependiendo de los estudios consultados, la prevalencia de SM en la población originaria de África puede ser incluida tanto entre las más altas (Taylor et al. 2008, Okpechi et al. 2007) como entre las más bajas (Woo Y et al. 2003). Si bien es cierto que, a parte del grupo étnico, la prevalencia del SM en las diversas poblaciones depende de otros factores como la edad, el sexo, la coexistencia de otras enfermedades e incluso de la renta *per cápita* del país (Miranda et al. 2005a).

A continuación, se intentará simplificar los resultados de los estudios examinados, cuyos detalles pueden ser consultados en el Anexo II.

Uno de los estudios que probablemente mas relevancia ha suscitado ha sido el de la Tercera Encuesta Nacional de Salud Americana (NHANES III) (Ford, Giles & Dietz 2002), principalmente por la aleatoriedad de las personas seleccionadas y el amplio rango de edades elegido. Fueron evaluadas 8.800 personas, de 89 localidades de los Estados Unidos con edades comprendidas entre 20 y 89 años. En esta muestra poblacional y siguiendo los criterios de la IDF, la prevalencia de SM se estimó en un 33,7%. Entrando un poco más en detalle, se demuestra una relación directa entre la prevalencia del SM tanto con la obesidad, ya que prácticamente se obtienen el mismo porcentaje de prevalencia de SM que de individuos norteamericanos obesos, que son 1/3 de la población (Bonow, Eckel 2003); como con la edad, ya que la prevalencia de SM en personas mayores de 60 años es superior al 40%.

En otros estudios realizados también con cohortes norteamericanas, como el estudio Framingham (Rutter et al. 2004, Ridker et al. 2003) o el de San Antonio (Meigs et al.

2003) se encontraron prevalencia similares, destacando también incrementos cercanos al doble de incidencia de SM tanto individuos con un IMC superior al percentil 85 como los que presentaban ECV (de Ferranti et al. 2004).

En cuanto a la población europea y siguiendo los criterios de la OMS, los datos de la prevalencia media de SM se sitúa entorno al 23%. Si se utilizan los criterios de la ATPIII, estos valores se incrementan hasta el 25,9% en hombres y 23,4% en mujeres (Qiao, DECODE Study Group 2006). Según el IMC, la prevalencia del SM se sitúa en 4,6% en varones con normopeso, 22,4% en varones con sobrepeso y de 59,6% en los obesos (Ascaso et al. 2003). Por su parte, las mujeres con normopeso tienen una prevalencia del 6,2%, este valor se incrementa hasta el 28,1% cuando presentan sobrepeso y hasta un 50% en mujeres obesas (Ascaso et al. 2003). A tenor de estos resultados queda patente la relación entre la obesidad y el desarrollo del SM.

Analizando la situación por países, donde se presentan mayores valores de incidencia de SM es en Finlandia, con valores entorno al 50% (Hu et al. 2008). En el otro extremo se encuentra Hungría con valores entorno al 10% de prevalencia de SM entre su población según los criterios ATPIII (Csaszar et al. 2006), seguido de Eslovaquia, donde se registran valores del 15,9% de prevalencia de SM en su población masculina (Mokan et al. 2008). Caso curioso es el de Italia, país mediterráneo por definición, en el que se encuentra una gran dispersión de prevalencia de SM en su población que varía entre el 15% en la población del norte y del 25% en el sur (Mancia et al. 2007a).

En el continente asiático se pueden diferenciar claramente dos zonas en cuanto a la prevalencia de SM. Por una parte, en Asia central y occidental⁷ es donde se presentan los mayores índices. A modo de ejemplo, comentar que los países árabes presentan una prevalencia entorno al 32% (Zabetian, Hadaegh & Azizi 2007). Valores similares (33%) se detectan en Pakistán (Hydrie et al. 2009), mientras que los valores máximos corresponden a la India, en donde se ha descrito una prevalencia media del 41%

⁷ *Compuesto por: Afganistán, Arabia Saudita, Armenia, Azerbaiyán, Bahrein, Bangladesh, Catar, Chipre, Emiratos Árabes Unidos, Georgia, India, Irak, Irán, Israel, Jordania, Kuwait, Líbano, Omán, Pakistán, Autoridad Nacional Palestina, Siria, Turquía y Yemen.*

(Ramachandran et al. 2003, Das, Pal & Ghosh 2011a). Por otra parte, la menor incidencia de SM corresponde a la parte oriental asiática⁸, cuyos mínimos corresponden a Japón, que con valores inferiores al 10% (DECODA Study Group 2007) se sitúa como el país con menor prevalencia de SM a nivel mundial. Con intención de dar una explicación a este fenómeno, son varios los trabajos que vinculan los bajos niveles de prevalencia de SM en Japón al efecto beneficioso que aportan diferentes compuestos bioactivos de origen vegetal típicos de su dieta tradicional (Otsuka et al. 2010, Misra et al. 2009, Damiao et al. 2006) como son la soja o el té verde.

Prevalencia del SM en España

En España, como en la mayoría de los países desarrollados, las ECV continúan siendo la principal causa de mortalidad y, en consecuencia, se puede encontrar bastante información sobre los factores de riesgo cardiovasculares (Grima Serrano, Alegria Ezquerro & Jover Estelles 1999, Rodriguez Artalejo et al. 2002, Aranceta et al. 2003a, Masia et al. 1998, Masia et al. 1998, Tomas Abadal et al. 2001, Masia et al. 2004). Sin embargo, la prevalencia del SM y su impacto en las ECV está sujeta a una mayor incertidumbre debida no sólo a las diferencias existentes en los criterios diagnósticos evaluados sino también a las diferencias poblacionales, socioeconómicas, etc.

En 1997 la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO) realizó el primer estudio nacional basado en datos antropométricos y socioeconómicos en el que se incluyeron individuos entre 25 y 60 años en 5 comunidades autónomas (SEEDO'97) (Aranceta et al. 1998). Tres años después, se incluyeron al trabajo los datos de 4 comunidades más, formando así el estudio SEEDO'2000 que constaba de 9.885 de 8 regiones españolas (Andalucía, Baleares, País Vasco, Canarias, Cataluña, Galicia, Madrid y Valencia). En este estudio se estimó que la prevalencia de obesidad en España era 14,5%, con diferencias significativas entre sexos (15,5% en mujeres y 13,3% en hombres). En este mismo estudio, se destacó que el 39% de la población española presentaba sobrepeso ($IMC \geq 25 \text{Kg/m}^2$) y que el 0.5% sufría de obesidad mórbida (Aranceta et al. 2003b).

⁸ Formada por: China, Corea del Norte, Corea del Sur, Hong Kong, Japón, Macao, Mongolia y la República de China (conocida como Taiwán).

Uno de los primeros estudios en el que se hace referencia directamente a la prevalencia del SM fue el realizado por la Encuesta Nutricional de Canarias (Alvarez Leon, Ribas Barba & Serra Majem 2003). En este estudio participaron 578 adultos con edades entre 18 y 74 años. La prevalencia de SM encontrada de este grupo poblacional fue del 24,4%. No se hallaron diferencias significativas entre sexos aunque si que se denotó una relación inversa entre el nivel de estudios y la prevalencia de SM.

Más alentadores fueron los datos del registro MESYAS (*MEtabolic SYndrome in Active Subjects*) en el que se analizaron a 7.256 sujetos laboralmente activos cuya prevalencia del SM se situó en torno al 10% (Alegria et al. 2005). Lamentablemente este dato no puede ser extrapolado como representativo de la población total española, debido a que el grupo de estudio fruto de estos resultados se encuentra limitado. Por una parte, sólo se incluyeron a los individuos laboralmente activos y por otra, sólo participaron en el estudio los trabajadores de dos factorías ubicadas en específicamente en la misma región (Valencia).

Posteriormente, el interés por el estudio de la situación epidemiológica del SM nacional sufrió un aumento exponencial. Se han realizado exhaustivos trabajos a lo largo de toda la geografía nacional, en los que se han registrado, a parte de los propios parámetros para estimar la prevalencia del SM según los criterios IDF, definidos anteriormente en la tabla 2, otros datos como la coexistencia de ECV, DM, el grado de tabaquismo o el nivel académico. Estos datos han sido englobados en el estudio DARIOS (Fernandez-Berges et al. 2012) cuyos datos son resumidos en la tabla 4.

Dentro del mismo rango de edades, la prevalencia de SM más alta se encuentra en la población de Baleares seguida de la de Canarias mientras que la prevalencia más baja tiene lugar en Cataluña (hay que tener en cuenta que los datos referentes al estudio ARPER corresponden a una población mas envejecida lo que justifica los valores entorno al 40% de prevalencia de SM en esta población). En cualquier caso, los valores medios de SM en la población adulta española se encuentran actualmente entorno al 30%, superior al de la media europea.

Tabla 4. Prevalencia de SM en la población española por comunidades autónomas. Población entre 35 y 74 años

Población	Estudio	Prevalencia SM (%) (IC 95%)	
		Hombres	Mujeres
Andalucía	DRECA-2	30 (27-33)	27 (25-30)
Baleares	CORSAIB	36 (33-39)	31 (28-34)
Canarias	CDC	34 (31-36)	37 (35-39)
Castilla la Mancha	TALAVERA	28 (22-34)	25 (20-30)
Castilla y León	RECCyL	30 (27-33)	31 (28-33)
Cataluña	REGICOR	23 (20-25)	25 (22-27)
Cataluña	ARPER*	42 (39-45)	41 (39-43)
Extremadura	HERMEX	33 (31-36)	29 (27-32)
Madrid	PREDIMERC	29 (26-31)	23 (21-26)
Murcia	DINO	29 (25-34)	27 (23-30)
Navarra	RIVANA	32 (30-34)	22 (20-24)
TOTAL	DARIOS	32 (29-35)	29 (25-33)

*En este estudio la edad de la población esta entre 49-74 años

Hay que tener en cuenta que la situación de actual del SM repercute directamente no solo a la salud pública sino que origina un grave problema económico a corto plazo que se verá considerablemente aumentado con el paso de los años. Este hecho se debe, no sólo por las repercusiones futuras de las condiciones actuales sino también a las previsiones de incremento de la tendencia actual, sólo teniendo en cuenta la DMT2 se estima que en los próximos 20 años se alcanzarán valores del 69% de prevalencia en esta patología (Shaw, Sicree & Zimmet 2010). En consecuencia, se hace más que evidente la necesidad de implementar medidas de prevención comunitaria. El hecho de que los principales factores de riesgo relacionados directamente con el incremento de la prevalencia de SM, sean debidos al cambio en los patrones alimentarios que esta teniendo lugar últimamente en nuestra sociedad, hace evidente la importancia de encaminar los planes de prevención al fomento de un estilo de vida sano basado en una alimentación saludable.

RESISTENCIA A LA INSULINA

Una de las características más importantes en la etiopatología del SM es la Resistencia a la Insulina (RI) (Lann, Gallagher & Leroith 2008) que se define como la disminución de la sensibilidad a las acciones desencadenadas por la insulina, que se detallarán posteriormente. El concepto de RI se propuso ya en 1936 (Himsworth 1936) con la intención de diagnosticar a los pacientes diabéticos que requerían altas dosis de insulina para regular la homeostasis de la glucosa. La RI juega un importante papel clave en patologías como la DMT2 y está directamente asociada con los principales problemas de salud de las sociedades *desarrolladas* (DeFronzo y Ferrannini, 1991; Petersen *et al.*, 2007; Reaven, 2005). Para entender mejor los problemas de la falta de sensibilidad a la insulina a continuación se hará un breve resumen de los efectos fisiológicos relacionados con la acción insulínica, no sin antes definir la hormona.

Insulina

Se puede afirmar que la insulina es una de las hormonas por excelencia que regula la homeostasis energética, debido principalmente a sus efectos directos sobre el metabolismo tanto glucídico (Cheatham, Kahn 1995) como lipídico (Dyck 2009) y proteico (Keller 2011). A modo de curiosidad comentar que su descubrimiento, en 1921, fue debido al trabajo de Frederick Grant Banting realizado en el laboratorio de John James Richard Macleod lo que les valió el premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1923. Aunque en este galardón fue excluida la participación del *becario* Charles Herbert Best, Banting reconoció su valor en el descubrimiento compartiendo con él la mitad del premio (Wikipedia contributors) hecho honroso que merece la pena comentar.

La insulina es un polipéptido formado por 51 aminoácidos distribuidos en dos cadenas peptídicas unidas por puentes disulfuro. Se sintetiza en las células β pancreáticas y requiere de una serie de pasos hasta adquirir la conformación activa. Estos pasos se resumen gráficamente en la figura 5 y se detallan a continuación. En primer lugar se forma la preproinsulina, un precursor inactivo que madura en el retículo endoplasmático a proinsulina, proceso en el que pierde parte de los residuos del

extremo amino terminal, en esta forma migra al aparato de Golgi donde se separa el péptido C y se genera la insulina propiamente dicha. Ambos compuestos, se almacenan en vesículas secretoras que se liberarán posteriormente por exocitosis (Quitons A, Hall GE. 2006).

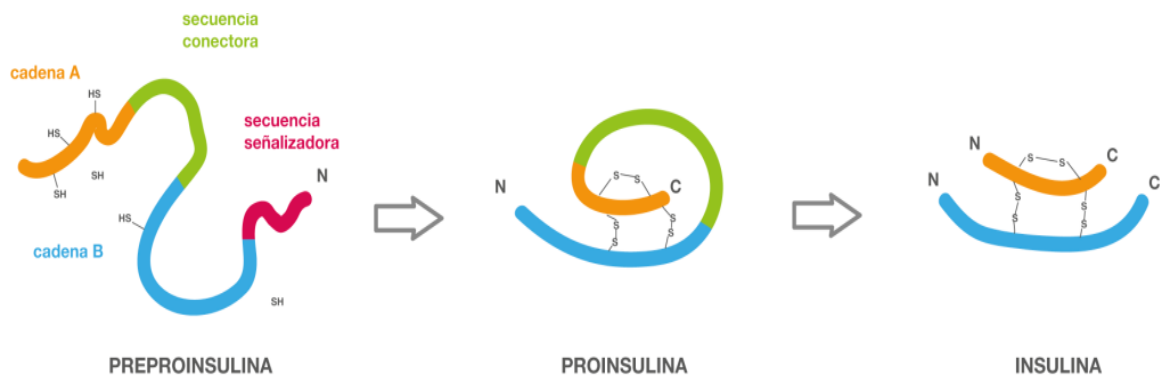


Figura 5. Proceso de formación de la insulina a través de sus precursores

Proceso de secreción insulínica

Cuando la glucemia aumenta por encima de 3 mM, comienza la captación de glucosa por las células β pancreáticas a través de los transportadores de glucosa tipo 2 (GLUT-2) (Mueckler 1994). Una vez en el interior celular, la glucosa se fosforila formando glucosa-6 fosfato que posteriormente se metaboliza, oxidándose mediante la glucólisis para la generación de energía en forma de ATP.

El incremento de ATP provoca la inactivación de los canales de potasio sensibles al ATP (Maechler 2003) impidiendo así la salida de K^+ de las células β pancreáticas, fenómeno crea una despolarización de la membrana celular y con ello la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. El incremento de Ca^{2+} citosólico es el estímulo que provoca la fusión de las vesículas que contienen insulina con la membrana plasmática y con ello la liberación de insulina por exocitosis, que se transportará hacia los órganos diana por vasos sanguíneos (Pocock G y Richards CD, 2005). A modo de resumen, en la siguiente figura (Figura 6) se representa el proceso que se acaba de definir.

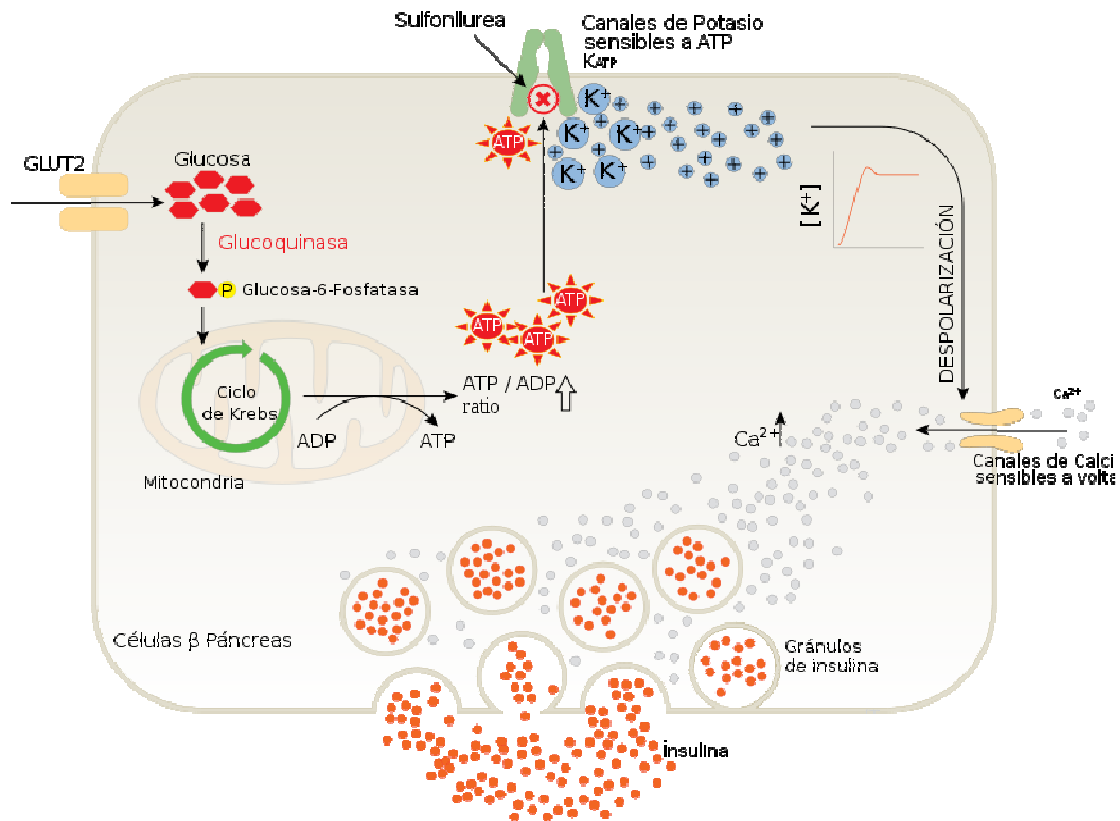


Figura 6. Mecanismo de liberación de insulina dependiente de glucosa en las células β del páncreas (Adaptación del mecanismo propuesto por MacDonald (MacDonald, Wheeler 2003).

Acciones de la insulina

Una de las principales funciones de la insulina es la de estimular la captación de glucosa en el músculo esquelético mediada por la translocación del transportador de glucosa 4 (GLUT-4), hacia el sarcolema⁹ (Mueckler 1994), aunque también actúa directamente sobre otros órganos y tejidos. A nivel hepático, la insulina activa la enzima glucógeno sintetasa que estimula la síntesis de glucógeno como reserva energética de la célula, y a su vez se inhibe la enzima glucógeno fosforilasa, evitando así la glucogenólisis (Cheatham, Kahn 1995). Por su parte, en el tejido adiposo, la insulina estimula la captación de AGL mediante la activación de proteínas transportadoras de ácidos grasos (FATP) (Stahl et al. 2002). Este fenómeno resulta en un incremento de los AGL y con ello de la síntesis de TG, aumentando así los depósitos de almacenamiento de lípidos.

⁹ El sarcolema es el nombre que se le da a la membrana citoplasmática de las células musculares.

Vía de señalización insulínica

La señalización insulínica comienza cuando la hormona se une a su receptor específico (IR). Como resultado de esta interacción tienen lugar una cascada de fosforilaciones ligadas a la activación de varias proteínas clave para la regulación de las vías metabólicas que gobiernan el metabolismo energético celular y por extensión del organismo. En el anexo IV se puede consultar los detalles de las vías relacionadas con el metabolismo energético celular sensibles a la acción insulínica que, para facilitar la comprensión de los resultados que se expondrán en esta tesis, se resumen esquemáticamente en la siguiente figura (Figura 7) y cuyos detalles se explicarán a lo largo de este apartado.

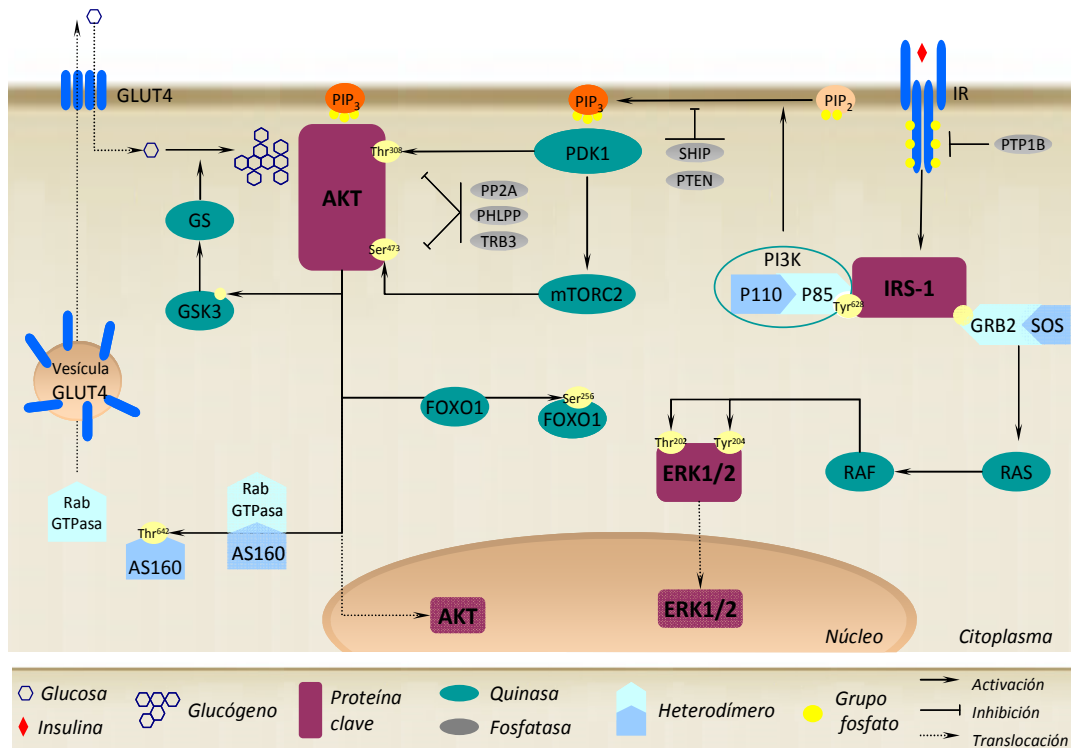


Figura 7. Esquema representativo de la vía de señalización insulínica

A primera vista, se sugiere una vía muy bien definida, sin embargo hay que tener en cuenta la existencia de un gran número de factores que afectan a su regulación y que resultan en la generación de diferentes efectos metabólicos (Taniguchi, Emanuelli & Kahn 2006). A modo de ejemplo comentar que teniendo en cuenta las isoformas existentes de las proteínas participantes existen más de 1.000 posibles combinaciones diferentes (Taniguchi, Emanuelli & Kahn 2006).

De las vías reguladas por la acción insulínica se pueden destacar **la vía del AKT**, conocida también como PKB, responsable de la mayoría de las acciones metabólicas de la insulina; y **la vía de las proteínas activadas por mitógeno** (MAPK / ERK 1 y 2), que regula la expresión de genes que intervienen en el control del crecimiento y diferenciación celular (Avruch 1998) .

Entre las muy diversas moléculas que están involucradas en la vía de señalización insulínica se revelan como proteínas *clave*: el receptor de la insulina (IR), su substrato (IRS), la AKT y las ERK 1 y 2 debido principalmente a que cada uno de estas proteínas son esenciales para la transducción de señal insulínica, constan de varias isoformas con funciones únicas, y sirven de mediador entre otras cascadas de señalización; por lo que merecen una mención especial.

Receptor de insulina (IR)

El receptor de insulina es una proteína tetramérica compuesta por dos subunidades α y dos β , unidas covalentemente por enlaces disulfuro. La subunidad α se localiza extracelularmente y contiene el dominio de unión a la insulina mientras que la subunidad β presenta un dominio intermembrana y posee una función tirosina quinasa.

La unión de la insulina a las subunidades α induce la autofosforilación de la subunidad β en 6 residuos tirosina activándose así la función quinasa (Ullrich, Schlessinger 1990a). Esta función activada permite la fosforilación de la proteína IRS-1 (*insulin receptor substrate 1*) aportando así la capacidad de unirse de forma covalente con otras proteínas específicas, que tienen en común un dominio-SH2 (Ullrich, Schlessinger 1990b), iniciando así la transducción de señal insulínica.

Aunque presenta gran afinidad por la insulina, el IR también puede ser activado por IGF (*insulin-like growth factor*) (Yamaguchi et al. 1991). El grado de activación del IR por IGF dependerá de la isoforma de IR expresada en cada tejido (Yamaguchi et al. 1991). Como regulación negativa cabe destacar la función que presentan fosfatasa como PTP1B, que interactúa directamente con el IR desfosforilando importantes residuos en tirosina reduciendo así su actividad (Elchebly et al. 1999).

Substratos del receptor de la insulina (IRS)

Es una familia de proteínas compleja debido a varios fenómenos que se resumen a continuación. En primer lugar, se han identificado al menos 6 isoformas de IRS intracelulares (tabla 5) con diferentes particularidades en cuanto a su activación y distribución. La coexistencia de varias isoformas en las mismas células complica la comprensión de la regulación de la vía.

Tabla 5. Isoformas de IRS y distribución de su expresión

Isoforma	Distribución	Referencia
IRS1	Ubicuo	Sun et al. 1991
IRS2	Ubicuo	Sun et al. 1995
IRS3	Adipocitos y cerebro	Lavan et al. 1997
IRS4	Células embrionarias	Fantin et al. 1998
IRS5*	Riñones e hígado	Cai et al. 2003
IRS6*	Músculo esquelético	Cai et al. 2003

** Aunque definidos como ubicuos, presentan una expresión predominante en los órganos indicados*

En segundo lugar, las proteínas IRS presentan varios dominios de regulación con acciones específicas como dominios de homología Pelkstrin (dominios PH), que permiten la unión con fosfolípidos de membrana PIP3; dominios vinculantes a fosfotirosina (dominios PTB), que otorgan alta afinidad de estos substratos para el IR; y dominios de homología a Src2 (dominios SH2) que aportan la capacidad de unirse a moléculas adaptadoras como la subunidades reguladores que conforman la PI3K o la molécula adaptadora GRB2, (Virkamaki, Ueki & Kahn 1999) favoreciendo la transducción de señal hacia AKT o ERK1/2 respectivamente.

En tercer lugar, IRS presenta múltiples residuos susceptibles de fosforilación. De forma general la fosforilación de serina parece que regula negativamente la señalización del IRS (Zick 2005). Corroborando este fenómeno, está descrito que la fosforilación en las serinas de IRS1 se encuentra incrementada en estados fisiológico de resistencia a la insulina y podría tener un papel en su patogénesis (Bouzakri et al. 2003).

Los mecanismos exactos por los que la fosforilación de la serina altera la función de IRS1 no están del todo definidos, aunque se sugiere que dichas fosforilaciones pudieran intervenir directamente en los dominios funcionales de IRS. Por ejemplo, la fosforilación de IRS1 en su Ser³⁰⁷ altera su dominio PTB por lo que se ha correlacionado con la regulación negativa de la señalización insulínica (Hirosumi et al. 2002). Aunque su papel exacto en la fisiopatología de la resistencia a la insulina no está todavía completamente dilucidado.

Por último, la regulación de la expresión de IRS depende de los niveles plasmáticos de glucosa. Se sabe que la hiperglucemia disminuye la concentración de IRS1 y IRS2, tanto en cultivos celulares como en modelos animales, debido principalmente a que induce la degradación de IRS1 e inhibe la síntesis de IRS2 a nivel transcripcional (Hirashima et al. 2003). Independientemente del mecanismo, la disminución de los niveles de las proteínas IRS e IR sin duda contribuirá al desarrollo de la RI.

AKT/PKB

AKT es un quinasa formada por unos 500 aminoácidos del tipo serina/treonina que consta de un dominio PH en la zona N terminal y una parte catalítica en el extremo C-terminal (Vanhaesebroeck, Alessi 2000). Entre otras funciones, media en las acciones metabólicas de la insulina por medio de la fosforilación de: otras quinasas, proteínas de señalización y/o determinados factores de transcripción que se detallarán a continuación, no sin antes exponer los procesos requeridos para su activación.

Activación de Akt

La conformación de la PI3K, heterodímero formado por la unión de las subunidades p110 y p85, resulta en la transformación de los fosfolípidos de la membrana plasmática de PIP₂ a PIP₃ conformación en la que actúan como sitio de anclaje de proteínas con dominios PH (Foster et al. 2003). Tanto PDK1 como AKT presentan estos dominios, lo que facilita su proximidad y con ello la fosforilación de AKT en la treonina 308 (Thr³⁰⁸) (Sen et al. 2003). Para la completa activación de Akt se requiere una segunda fosforilación en la serina 473 (Ser⁴⁷³) que está mediada por el complejo mTORC2 (Sarbasov et al. 2005).

La actividad de Akt puede ser regulada por varias moléculas inhibitorias, bien por presentar actividad fosfatasa, como son la proteína fosfatasa 2A (PP2A) y la PHLPP, que desfosforilan directamente AKT (Brazil, Yang & Hemmings 2004, Gao, Furnari & Newton 2005) o bien por unirse a los residuos desfosforilados impidiendo así su activación, como es el caso de la proteína tribbles-3 (TRB3) (Du et al. 2003).

Tanto los procesos de activación e inhibición de AKT que se acaban de describir, como las dianas de Akt relacionadas con el metabolismo energético, se detallarán a continuación y se encuentran representados esquemáticamente en la figura 7.

Dianas de Akt

La quinasa glucógenosintasa 3 (GSK3) fue una de las primeras dianas fisiológicas de Akt en ser identificada (Cross et al. 1995). La fosforilación de la GSK3 disminuye su actividad inhibitoria sobre la glucógeno sintasa (GS), lo que conduce a un aumento de la síntesis de glucógeno (Frame, Cohen 2001). Aparte de favorecer la acumulación de glucosa en forma de glucógeno, AKT también participa en la captación de glucosa ya que gobierna la disociación del heterodímero formado por las proteína Rab GTPasa y AS160 (substrato de Akt de 160 kDa) por fosforilación de AS160 en la treonina 642 (Sano et al. 2003). Este fenómeno origina la *liberación* de Rab-GTPasas que está implicada en la reorganización del citoesqueleto que se requiere para la translocación del transportador de glucosa GLUT4 del citosol hacia la membrana plasmática.

AKT también interviene en los procesos de gluconeogénesis y de lipogénesis ya que inhibe la expresión de enzimas que participan en estas rutas mediante el control de los factores de transcripción de la familia FOX (Tran et al. 2003). A modo de ejemplo, la activación de Akt inhibe la translocación de FOXO1 al núcleo, con lo que se limita la expresión de genes gluconeogénicos (Puigserver et al. 2003).

Isoformas de AKT, funciones y distribución

En mamíferos, se han encontrado tres isoformas de AKT (AKT1-3 o PKB α , β , y γ) que aún compartiendo la misma estructura general, están involucradas en la regulación de diferentes procesos biológicos (Hers, Vincent & Tavaré 2011).

Por medio de experimentos con siRNA en ratones *knockout* se demostró que la supresión de AKT1 esta vinculada con un retraso en el crecimiento y con una reducción de la esperanza de vida (Chen et al. 2001) aunque no se describieron anomalías metabólicas (Cho et al. 2001b). Por el contrario, una deficiencia de AKT2 promueve el desarrollo de RI (Cho et al. 2001a). En consonancia con estos estudios, se ha demostrado que una mutación del dominio catalítico de AKT2 causa una severa RI y DM en humanos (George et al. 2004). Por su parte, AKT3, no parecen tener un papel en la homeostasis de la glucosa, pero si presenta efectos significativos en el desarrollo neuronal (Tschopp et al. 2005). A tenor de estos resultados parece lógico pensar que las proporciones relativas de expresión de las tres isoformas dependa del tejido en el que se encuentren; de hecho, AKT3 se expresa predominantemente en células del sistema nervioso y de los testículos, mientras que AKT1 y AKT2 están ampliamente distribuidos, aunque cabe destacar que AKT2 se encuentra predominantemente expresado en los tejidos sensibles a la insulina, como el hígado, el músculo esquelético y el tejido adiposo (Chan, Rittenhouse & Tschlis 1999).

ERK1/2

Las ERK1/2 (*Extracellular signal-regulated kinases*) son proteínas clave de la vía de las MAPK quinasas, vía que se activa por mitógenos¹⁰ como el IGF o la Insulina, entre otros. La activación de la vía MAPK por la acción de la insulina está mediada por la fosforilación de IRS en determinados residuos reconocidos por GRB2. A continuación, se forma el heterodímero GRB2-SOS que estimula la activación de RAS y la posterior activación de RAF. Este fenómeno desencadena una *cascada de quinasas* que resulta en la activación por fosforilación de las ERK1 y 2 (Pouyssegur, Volmat & Lenormand 2002). Una vez activado, este complejo de quinasas es capaz de translocarse al núcleo y modular así la expresión de distintos genes, principalmente relacionados con el crecimiento, diferenciación, supervivencia y biogénesis celular (Pouyssegur, Volmat & Lenormand 2002). La activación de estas quinasas se complica si se tiene en cuenta la diferentes isoformas de los *reguladores* RAS y RAF, ya que cada isoforma presenta diferentes grados de colocalización, reconocimiento y unión a substrato (Hancock, Parton 2005).

¹⁰ Factores que actúan en el ciclo celular estimulando la mitosis

Estas características evidencian que, aunque todas las isoformas son capaces de activar MAPK, existen diferencias en duración y/o intensidad de la activación (Hancock, Parton 2005, Wellbrock, Karasarides & Marais 2004).

Aunque se pueden destacar algunas funciones específicas dependientes de las isoformas de ERK, como la que presenta ERK1 en el fenómeno de la adipogénesis (Bost et al. 2005), se ha postulado que ERK1 y ERK2 presentan funciones similares. Ambas isoformas se evidencian de vital importancia en procesos de crecimiento y diferenciación celular (Pages et al. 1999). Sin embargo, no son tan esenciales en los efectos sobre el metabolismo energético asociado a la señalización insulínica (Taniguchi, Emanuelli & Kahn 2006) si bien es cierto que participan, una vez realizados sus efectos *proinsulínicos*, en la inhibición de la señal insulínica mediante la fosforilación de IRS1 en residuos serina (Bouzakri et al. 2003).

Otras acciones de la insulina

Cabe destacar que aún relacionada directamente con el control de la homeostasis energética, la insulina puede participar en otros procesos.

Desde principios de la década de 1990 se han postulado otras funciones de la insulina independientes de las relacionadas con el metabolismo energético. Ha quedado clara una función a nivel vascular, especialmente a nivel del endotelio, relacionada con la prevención o el retraso de ECV (Baron, Brechtel 1993). Es muy probable que el efecto de la activación de la microcirculación sea debido a la capacidad que presenta la insulina sobre la activación de la síntesis de óxido nítrico (NO) catalizada por la NO-sintasa endotelial (Baron, Brechtel 1993) y con ello se estimula una vasodilatación con la condominante reducción de la presión arterial. Por su parte, también se ha involucrado a la insulina en la participación de diferentes procesos a nivel neuronal ya que se ha descrito que interviene en su desarrollo y diferenciación (Fernandez y Torres-Alemán, 2012).

Etiopatología de la resistencia a la insulina

Antes de entrar directamente en la descripción de los procesos fisiopatológicos que desencadenan el RI, se realizará una breve interpretación del por qué de la prevalencia actual del RI y a qué puede ser debido que su prevalencia haya aumentado de forma exponencial durante los últimos años.

Filogenia de la IR: un problema en el ritmo de acontecimientos

A lo largo de la evolución humana, la selección natural ha permitido que los sistemas fisiológicos de aprovechamiento energético, tanto de almacenaje como de ahorro, fueran muy eficientes para poder sobrevivir en las condiciones limitadas de alimentos que han primado, de forma general, a lo largo de toda la historia de la humanidad. Sin embargo, gracias a los avances tecnológicos que han tenido lugar en las últimas décadas, sobretodo los relacionados con los sistemas de producción intensiva, se ha conseguido que la alimentación no sea un recurso limitado en los países desarrollados. El problema deriva principalmente en el *ritmo* de los acontecimientos, ya que estos cambios *rápidos* de producción-consumo no han sido aún asumidos en términos evolutivos, lo que sitúa a una población muy eficiente energéticamente en un ambiente de excesos nutricionales. El cómo el cuerpo intenta redistribuir o almacenar este exceso energético desencadena los principales procesos fisiológicos asociados al SM y el impacto que tiene a nivel fisiopatológico se resumirá en los siguientes apartados.

Glucotoxicidad

En células de mamíferos, el papel fundamental de la glucosa se inicia con su transporte y metabolismo con el fin de generar la principal fuente de energía celular, el ATP.

Aunque esencial para la vida, un exceso de glucosa circulante resulta de carácter *tóxico* a diferentes niveles. A nivel celular, una de las estrategias seguidas para disminuir la glucemia consiste en incrementar el uso de la glucosa como substrato energético, sin embargo, este proceso se relaciona directamente con un incremento del estrés

oxidativo mitocondrial (Nishikawa et al. 2000) ya que una estimulación del ciclo de Krebs proporciona un incremento de los donantes de electrones NADH y FADH₂, substratos de los complejos I y II respectivamente y que confluyen en el complejo III. Tanto el complejo I como el III son los principales generadores de radicales libres de la cadena de transporte electrónico (Naudi et al. 2012), por lo que consecuentemente se conduce a un aumento en la generación de las especies reactivas de oxígeno (ROS). Si la producción de las ROS supera la capacidad antioxidante celular, se produce el fenómeno conocido como *estrés oxidativo* que favorece los procesos de RI por, entre otros mecanismos, interrumpir la translocación de GLUT4 hacia la membrana plasmática (Rudich et al. 1998). Apoyando esta teoría, se ha comprobado una mejoría de la situación RI por tratamientos con antioxidantes (Maddux et al. 2001).

Otros autores relacionan el incremento de estrés oxidativo con el desarrollo de SM, principalmente por la capacidad aterogénica de los ROS (Holvoet 2008, Ford et al. 2003, Colas et al. 2011). Independientemente de la descripción de los mecanismos que relacionan el estrés oxidativo con el SM, se evidencia importante la disminución de estrés oxidativo, tanto por incremento de antioxidantes como por disminución de la producción de ROS, como estrategia para reducir o controlar la prevalencia de RI y por ende del SM.

Por otro lado, un exceso de glucosa circulante acelera el proceso fisiológico de la glicosilación no enzimática (GNE) que resulta en un incremento de los productos avanzados de glicosilación (AGE's) (Nishikawa et al. 2000). Todas las proteínas del organismo son susceptibles de glicosilación, como la albúmina (Jones *et al.*, 1983), la hemoglobina (Gabbay, 1982), las apolipoproteínas (Duell *et al.*, 1991), el colágeno (Schnider y Kohn, 1980), el fibrinógeno (McVerry *et al.*, 1981) o las inmunoglobulinas (Kaneshige, 1987; Menini *et al.*, 1993). Debido a este fenómeno, las proteínas modifican su estructura y con ello sus propiedades físico-químicas, fenómeno que está directamente relacionado con una pérdida de sus funciones biológicas.

A nivel de RI, los productos de glicosilación producen un deterioro de la vía de señalización dependiente de AKT ya que inhiben tanto la fosforilación, estimulada por

insulina, de IRS como la actividad de la GS en el músculo esquelético (Miele et al. 2003). El grado de glicosilación proteica dependerá de la concentración de glucosa en el medio y de la vida media de la proteína (Armbruster, 1987; Bunn, 1981; Kennedy et al., 1981).

No solamente el exceso de glucosa presenta efectos perjudiciales para el organismo sino que también el incremento de su transporte a través de las células endoteliales presenta efectos tóxicos principalmente porque conlleva un aumento de la GNE, la activación de hexoquinasas e isoformas concretas de PKC y de la vía del poliol¹¹ (Klein, Klein & Moss 1996). El incremento de esta vía trae aparejados cambios severos que incluyen la disminución en los niveles de glutatión y mioinositol; cada uno con un papel importante en la prevención de la RI (Tomlinson, Willars & Carrington 1992).

Las estrategias que ayuden a incrementar la sensibilidad insulínica se evidencian como importantes líneas de actuación para mejorar no sólo el control del metabolismo glucídico sino que también la prevención del agotamiento irreversible de las células β pancreáticas, fenómeno asociado a la *hiperproducción* de insulina y que se explica a continuación.

Hiperinsulinemia

Los mecanismos de regulación de la glucemia están gobernados por la acción de la insulina y por *ende* de su producción en las células β pancreáticas. En determinadas situaciones fisiológicas puntuales, el efecto señalizador de la insulina se ve limitado pero puede ser compensado por un incremento de la producción de insulina. El problema se origina cuando este fenómeno se alarga en el tiempo, situación asociada a la RI, y no sólo por los problemas asociados a la hiperinsulinemia, que se describirán a continuación, sino por que el incremento de la producción de insulina degenera en un *agotamiento* de las células β e incluso a la pérdida total de la capacidad de producción de insulina.

¹¹ Vía metabólica por la cual se obtiene fructosa a partir de glucosa dependiente de la enzima aldosa reductasa.

Las altas concentraciones plasmáticas de insulina junto con niveles elevados de glicémia, se asocian a fenómenos de RI principalmente a través de la supresión de los efectos mediados por el eje PI3K-AKT (Combettes-Souverain, Issad 1998) que desequilibran el sistema de señalización insulínica hacia los fenómenos activados por MAPK, vía que se ve menos afectada en situaciones de RI (Cusi et al. 2000). Este fenómeno resulta en un incremento de estímulos vasoconstrictores debido principalmente a la sobreproducción de la endotelina 1 y de la inhibición de la síntesis de NO (Potenza et al. 2005), situación que se ve agravada por los efectos de la hiperinsulinemia a nivel renal ya que promueve la retención de sodio y con ello descompensación del sistema renina-angiotensina (Wang et al. 2001). Dicha descompensación puede ser catalogada como la característica clave de la disfunción endotelial que favorece el desarrollo de insulonorresistencia y que enlaza con un incremento de la presión arterial. En relación a esta hipótesis, se ha postulado que la modulación del sistema renina-angiotensina resultaría no sólo en un incremento de la sensibilidad a la insulina sino que también en un mejor mantenimiento de células β pancreáticas (Egan, Greene & Goodfriend 2001, Higashi et al. 2002).

En modelos animales de hiperinsulinemia, como ratones ob/ob o ratas obesas Zucker, se han descrito deficiencias en los niveles proteicos de IRS y como consecuencia una disminución en la transducción insulínica sobre el eje PI3K-AKT (Saad et al. 1992, Anai et al. 1998). Apoyando esta teoría, estudios *in vitro* han demostrado que la incubación de mioblastos con altas dosis de insulina resultan en una reducción de la expresión de IRS-1 que resulta en una pérdida de la captación de glucosa por una deficiencia en la conformación de PI3K, que resulta en una pérdida de activación de AKT y con ello de translocación de GLUT4 (Bertacca et al. 2005).

A tenor de los resultados que se acaban de comentar, una sobreproducción de insulina se presenta como un arma de *doble filo* ya que así como un incremento puntual de insulina aporta efectos beneficiosos en la reducción de la glucemia, los efectos a largo plazo degeneran en complicaciones que incrementan el riesgo de ECV y con ello de desarrollo de SM.

Lipotoxicidad

Al igual que ocurre con la glucosa, en situación de exceso energético, también se ven incrementados los AGL circulantes. Este hecho desencadena una serie de fenómenos vinculados a reequilibrar la homeostasis lipídica bien por incremento tanto de la captación de los AGL, principalmente por los adipocitos; como de su catabolismo por β oxidación, principalmente por miocitos y hepatocitos.

En primer lugar, los adipocitos aumentan su tamaño para poder ampliar la capacidad de acumulación de AGL en forma de TG. Esta modulación del tamaño presenta efectos positivos en el control de la lipidemia pero, por otra parte, estudios transversales han evidenciado que el incremento en tamaño adipocítico se asocia directamente con posterior incremento de RI y de desarrollo de DMT2 (Weyer et al. 2000). Se ha sugerido que el incremento en volumen del adipocito está vinculado con una pérdida de capacidad de diferenciación de nuevos adipocitos (Danforth 2000) y con un incremento de la actividad de la lipasa (Shulman, 2000) que repercutiría en una mayor hidrólisis de TG y en consecuencia una mayor liberación de AGL contribuyendo así al desarrollo de resistencia metabólica a la insulina. Apoyando esta teoría, diversos estudios demuestran una considerable mejora de insulinosensibilidad en pacientes sometidos a cirugía para la disminución del tejido adiposo visceral (Miyazaki et al. 2002).

En segundo lugar, cuando la capacidad de almacenaje de TG del adipocito se satura, los TG tienden a acumularse de forma ectópica en células de otros tejidos como el hígado, páncreas, músculo esquelético y músculo cardiaco (Unger, Orci 2001). Este fenómeno inicia múltiples procesos celulares que incluyen señalización alterada de la insulina (Wang et al. 2006) y en general, una limitación tanto en el correcto funcionamiento celular como su propia supervivencia (Lee et al. 2007). El mecanismo por el cual los depósitos ectópicos de lípidos presenten cierto grado de toxicidad se debe principalmente al incremento de los niveles de sus metabolitos, como el acetil Coenzima A (CoA) y el diacilglicerol (DAG), que estimulan la actividad de la proteína quinasa C (PKC) (Lowell, Shulman 2005). La PKC activada promueven la resistencia a

insulina fosforilando directamente el IRS-1 en un lugar diferente al que lo hace el RI, dañando así toda la cascada de señalización dependiente de PI3K y AKT (Lowell, Shulman 2005). Otro producto con efectos insulinoresistentes derivado de los AGL, en concreto de los ácidos grasos saturados de cadena larga, es la ceramida que, entre sus efectos biológicos, está el de inhibir la activación de AKT estimulada por la insulina y con ello limitar la translocación de GLUT's hacia la membrana plasmática (Chavez et al. 2003), además de estimular un incremento de ROS (Li et al. 2002) con la relevancia que esto tiene en la fisiopatología de la RI. Es destacable que la incubación de células musculares con alguno de estos metabolitos constituiría un modelo de RI.

A parte de la función de *almacén* energético, hay que tener en cuenta el tejido adiposo presenta importantes funciones endocrinas. Se ha descrito que la obesidad genera un desequilibrio en la producción de adipocinas como la interleuquina 6 (IL-6), o la proteína quimioattractora de monocitos (MCP)-1, que repercute en las comunicaciones paracrinas resultando en un deterioro del metabolismo energético (Furukawa et al., 2004).

Por otra parte, los AGL, también activan vías de señalización proinflamatorias, lo que contribuye a la resistencia a insulina como se verá en el siguiente apartado. El aumento de la actividad de la PKC en respuesta a los elevados niveles de AGL activa el NF- κ B, un factor de transcripción asociado con la inflamación ya que gobierna la expresión de citoquinas proinflamatorias como el TNF α (Ajuwon, Spurlock 2005, Jove et al. 2005). El TNF α activa la producción de IKK β y JNK, citoquinas inflamatorias que juegan un papel primordial en la relación existente entre las vías de señalización inflamatorias y la vía de señalización insulínica (Hirosumi et al. 2002). Es destacable que tanto IKK β como JNK conducen la fosforilación de IRS1 en serinas contribuyendo así al desarrollo de la RI.

El aumento de la liberación de AGL y la síntesis de TG son los puntos clave en las alteraciones lipídicas del SM, por lo que un posible aspecto terapéutico sería aumentar la sensibilidad de los adipocitos a la insulina para incrementar su capacidad de almacén de TG.

El proceso inflamatorio como desencadenante de RI

Últimamente, son cada vez más los estudios que sugieren que el origen de la obesidad presenta un componente inflamatorio (Jialal et al. 2012, Kalupahana, Claycombe & Moustaid-Moussa 2011, Ndisang 2010, Zeyda, Stulnig 2009, Olefsky, Glass 2010). La inflamación sistémica, determinada por un incremento de los niveles plasmáticos de citoquinas inflamatorias, es notablemente evidente tanto en modelos insulinoresistentes animales como humanos (Xu H et al. 2003). Dichas citoquinas son producidas por los adipocitos aunque también se ha constatado que pueden ser secretadas por determinadas células del sistema inmune como los macrófagos (Weisberg SP et al. 2003).

Las citoquinas que intervienen directamente en la *comunicación* paracrina tiene lugar en el tejido adiposo, normalmente resultan en la activación de los macrófagos. Los macrófagos activados son cruciales en el desarrollo del proceso de inflamación (Zhang X y Mosser DM, 2008) ya que en esta forma desencadenan la expresión de diferentes mediadores inflamatorios como el $TNF\alpha$, la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP1) y el óxido nítrico (NO). De hecho esta descrito que tanto los niveles del $TNF\alpha$, como los de MCP1 y de la NOS inducible están elevados en los tejidos adiposos de varios modelos de roedores obesos (Fujitani Y et al 2010; Engeli S et al. 2007; Yu R et al 2006).

Suganami T et al. (2005) reportaron la existencia de interacciones paracrinas entre los adipocitos y macrófagos, mediante la intervención del $TNF\alpha$ y MCP1, estableciendo así un *círculo vicioso* que agrava el proceso inflamatorio del tejido adiposo y como consecuencia un aumento de la resistencia a la insulina. Por lo tanto, el estudio de componentes con capacidad antiinflamatoria parece ser una buena estrategia a seguir para su posible aplicación en la atenuación de las enfermedades relacionadas con la obesidad, debido a su potencial efecto reductor de la expresión de factores proinflamatorios.

Métodos e índices para el estudio de la RI

Dada su importancia, la RI ha sido objeto de numerosos estudios realizados con el fin de desarrollar métodos que sirvieran para su diagnóstico. Gracias a ello, hoy en día se cuenta con diferentes estrategias para su evaluación aunque, desafortunadamente, no se puede hacer una recomendación universal en cuanto al mejor método disponible, ya que se basan en parámetros que presentan tanto ventajas como inconvenientes (para información adicional consultar anexo III). Sin entrar en hacer una valoración de las particularidades de los métodos existentes, en la siguiente tabla se resumen los más utilizados, ordenados de los más sencillos a los más complicados o tediosos de obtener.

Tabla 6. Clasificación de los métodos e índices para el estudio de la resistencia a la insulina

<p>Basados en la exploración física</p> <ul style="list-style-type: none"> • Evaluación del grado de obesidad <p>Basados en datos basales</p> <ul style="list-style-type: none"> • Insulinemia basal • Ratio glucosa/insulina • Modelo homeostático con datos basales (HOMA) • Índice cuantitativo de valoración de sensibilidad insulínica (QUICKI) • Índice de sensibilidad a la insulina (ISI) <p>Basados en la tolerancia oral a la glucosa (TTOG)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Insulinemia estimulada <p>Basados en estímulos endovenosos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Estudios de pinzamiento • Modelo Mínimo • Modelo homeostático CIGMA • Test de tolerancia a la insulina

Para una información adicional de estos métodos consultar anexo III.

Estrategias para la prevención e intervención de RI

Los pacientes con RI pueden presentar simultáneamente alteraciones fisiológicas como obesidad, hipertensión arterial, dislipemia, etc. Este hecho supone que cada paciente tendrá una combinación de estas patologías con distinto grado de severidad por lo que el médico deberá individualizar prioridades y estrategias de intervención en consonancia con lo que corresponda a cada una de estas condiciones. Un análisis detallado del tratamiento de todos los componentes del SM excede los objetivos de esta Tesis, sin embargo se presenta importante comentar brevemente las estrategias que actualmente se siguen en la prevención y tratamiento de las patologías asociadas al SM.

Tratamientos farmacológicos

A continuación se hará un breve resumen de los fármacos utilizados para la prevención e intervención del SM dependiente de la fisiopatología predominante.

Históricamente los tratamientos contra el desarrollo del SM estaban encaminados al control de la obesidad principalmente mediante inhibidores del apetito (Rubio MA 2011) pero muchos de los fármacos utilizados se han ido retirando del mercado debido a que los efectos adversos superaban los beneficios como ha ocurrido con la **Sibutramina y el Rimonabant** (Rubio MA 2011). Actualmente se encuentran en el mercado fármacos como el **Topiramato, Bupoprión o la Zonisamida**, que promueven el tratamiento de la obesidad mediante el control del apetito por inhibición de la recaptación de serotonina (Rubio MA 2011) conseguido por la acción directa sobre el sistema nervioso central (SNC) por lo que hay que tener en cuenta las complicaciones que esto puede originar sobretodo relacionadas con situaciones depresivas o de ansiedad.

En los pacientes con glucemia alterada en ayunas y con tolerancia alterada a la glucosa, la **metformina** ha disminuido tanto el desarrollo de diabetes como del SM pero ha sido significativamente menos eficaz que las modificaciones intensivas en el estilo de vida (Knowler et al. 2002, Goldberg et al. 2009).

En una revisión de estudios clínicos controlados utilizando **inhibidores de la α -glucosidasa** en tolerancia a la glucosa alterada se demostró una disminución en la incidencia de diabetes pero sin diferencias en la morbilidad, mortalidad, o niveles plasmáticos de hemoglobina glucosilada (Van de Laar et al. 2006).

En pacientes con dislipidemia acusada, las **glitazonas** aportan efectos beneficiosos ya que estimulan el receptor γ y del activador del proliferador de peroxisomas (PPAR γ). Además, se ha demostrado que la **rosiglitazona** disminuye el desarrollo de diabetes en los sujetos con glucemia alterada en ayunas y con tolerancia a la glucosa alterada (DREAM (Diabetes REduction Assessment with ramipril and rosiglitazone Medication) Trial Investigators et al. 2006). Sin embargo la retención de líquidos y el aumento de peso que provocan estos fármacos limita su uso y pone en duda la relación entre beneficios y desventajas en los individuos no diabéticos.

El uso de **antihipertensivos** que bloquean el eje renina-angiotensina se ha asociado con una menor incidencia de diabetes en individuos con sensibilidad a la insulina comprometida (Elliott, Meyer 2007, Unger, Paulis & Sica 2011) pero debido a que los sujetos con SM son frecuentemente obesos y sensibles a la sal, obligan en tratamiento combinado con otros fármacos, como diuréticos o bloqueante de calcio (Mancia et al. 2007b) que requieren frecuentemente una dieta hiposódica estricta difícil de mantener en el tiempo.

Se ha demostrado que tratamientos con **aspirina** a bajas dosis (75-100 mg/día) favorecen la reducción de ECV en diversos grupos de alto riesgo ya que evita la agregación plaquetaria favoreciendo así una circulación sanguínea más fluida (Antithrombotic Trialists' Collaboration 2002) fenómeno relacionado con un incremento en la incidencia de hemorragias, importante a valorar previamente a su administración. En sujetos con ECV la relación riesgo-beneficio es netamente favorable, pero en individuos sin estas condiciones el beneficio es menos claro y dependiente del riesgo absoluto.

Tratamientos no farmacológicos

Cirugía bariátrica

Aunque originalmente se desarrolló exclusivamente como una terapia de reducción de peso, se ha descrito que la cirugía bariátrica reduce tanto la progresión de la DMT2 (Sjostrom et al. 2004) como de las ECV (Sjostrom et al. 2012).

Estudios experimentales tanto en ratones (Rubino et al. 2006) como en humanos (Salinari et al. 2009) sugieren que ciertos procedimientos bariátricos pueden mejorar la diabetes mas allá del control del peso corporal. En concreto se han descrito fenómenos específicos sobre los órganos claves para la homeostasis energética como son el hígado, músculo esquelético y tejido adiposo (Dankel et al. 2011). Estos resultados, han favorecido la decisión de la IDF de incluir esta práctica para el tratamiento de determinados casos de DMT2 (Dixon et al. 2011). Sin embargo, el nivel de evidencia clínica para apoyar la cirugía como alternativa para el tratamiento del SM es insuficiente (Mingrone et al. 2012) sin entrar en detalle en los riesgos asociados a los procesos quirúrgicos.

Modificación saludable en el estilo de vida

Las modificaciones saludables en el estilo de vida, se postulan como la estrategia central para el tratamiento del SM. En especial hay que favorecer aquellos hábitos encaminados a un control del exceso energético, bien por la regulación de la alimentación como por un incremento del gasto mediante actividad física.

Las modificaciones del estilo de vida hacia *hábitos saludables* no sólo corrigen los factores de ECV y previenen el desarrollo de DMT2 [(Tuomilehto et al. 2001, Lindstrom et al. 2006, Orozco et al. 2008) sino que evidencian específicamente importantes para la prevención tanto del SM (Mecca et al. 2012) como de las patologías asociadas (Salazar et al. 2005).

En términos generales se puede afirmar que ningún fármaco ni cirugía pueden reemplazar los beneficios globales sobre el SM a los que se accede con las modificaciones saludables en el estilo de vida, debido principalmente a que con estas modificaciones se ataja directamente el problema intrínseco del SM: el exceso de energía circulante.

Aunque parece fácil de entender es muy importante realizar un trabajo previo de *cómo* y *qué* conceptos inculcar a la sociedad. A modo de ejemplo comentar la diferencia entre inculcar el concepto *hacer dieta* con el de *llevar una alimentación saludable* cuyo fin social es el mismo aunque su arraigo cultural es muy diferente.

La mayoría de la gente que sigue una *dieta* lo hace con el fin de controlar el peso corporal pero, por lo general, presentan una eficiencia limitada debido principalmente a que requieren un compromiso estricto y que los resultados son visibles a medio-largo plazo, lo que favorece el “abandono”. Sin embargo, las personas que cuidan su alimentación, no persiguen resultados a corto plazo ni siguen dietas estrictas, lo que favorece la creación de hábitos que generan beneficios para la salud más que demostrables, y que contribuyen al objetivo principal de reducir la incidencia del SM.

Es muy importante tener en cuenta el comportamiento humano para controlar el SM. A la personas nos gusta comer (*lo tenemos programado*), por lo que cualquier solución que vaya en contra de esta premisa está condenada al fracaso.

La alimentación como herramienta terapéutica

Los efectos de la alimentación sobre la prevención y/o tratamiento de determinadas patologías son conocidos desde tiempos inmemoriales. Se tiene constancia de que en China existió un registro de los alimentos óptimos para el tratamiento de diferentes enfermedades hacia el 2000 antes de Cristo (Vivien Chou 2012). A pesar de que la idea y uso de los alimentos como herramienta terapéutica es muy antigua, el concepto de *alimento funcional* nace en Corea del Sur en los 1980's (Goldberg 1994). Surge cuando las autoridades alimentarias coreanas tomaron conciencia de que para controlar los gastos globales en salud era necesario desarrollar alimentos que mejoraran la calidad de vida de la población (Goldberg et al. 2009). Idea que poco a poco fue *contagiándose* al resto de los países y con ello la necesidad de regulación de este tipo de alimentos.

Aunque existen diferentes definiciones de alimento funcional, se puede destacar la acotada por Doyon y Labrecque en 2008, en la que expresan que *“Un alimento funcional es, o se parece, a un alimento convencional, forma parte de una dieta estándar y ha de ser consumido de manera regular y en cantidades normales. Es beneficioso para la salud, debido a que reduce el riesgo de sufrir determinadas enfermedades o mejora variables fisiológicas más allá de su aporte nutricional básico”*(Doyon M 2008).

El punto clave de esta definición manifiesta la necesidad de corroborar los beneficios para la salud, tanto del alimento completo como de sus compuestos bioactivos, por lo que surge la necesidad de una *validación científica*. A nivel Europeo, en el año 1996, la acción concertada por la Comisión Europea sobre la ciencia de los alimentos funcionales (FUFLOSE) convocó una serie de reuniones de expertos fruto de las cuales se redactó el “documento de consenso sobre los conceptos científicos de la alimentación funcional en Europa” (Contor 2001). Éste documento ayudó a la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) para crear el primer reglamento referente a las declaraciones nutricionales y de las propiedades saludables de los alimentos (reglamento CE nº 1924/2006) en el que, aparte de definir tres tipos de declaraciones (nutricionales, de propiedades saludables y de reducción de riesgo de enfermedades)

cobra una importancia notable el etiquetado. Se definen los parámetros para poder incluir declaraciones nutricionales y de salud en el etiquetado del producto, con el fin de garantizar una información fidedigna para el consumidor y homogénea a nivel europeo, ya que hasta el momento no existía una regulación con criterios comunes y cada país aplicaba sus propios criterios, lo que dificultaba el entendimiento de las declaraciones por el consumidor y la libre circulación de alimentos.

La aparición de patentes relativas al diseño de alimentos funcionales y su beneficio económico ha disparado el interés por parte de la industria alimentaria, que cada vez invierte más recursos para la búsqueda de *compuestos bioactivos*¹² como ingredientes susceptibles de formar parte de alimentos funcionales. En este contexto, los compuestos fenólicos de origen vegetal se presentan como reveladoras dianas de estudio por su potencial uso en la alimentación funcional.

Polifenoles

Los polifenoles corresponden a un grupo heterogéneo de compuestos bioactivos de origen vegetal que pertenecen al grupo de metabolitos secundarios¹³ de las plantas. Químicamente se definen por la presencia de al menos un grupo fenol, hecho que da nombre a la familia de compuestos. Dependiendo de la combinación y diversidad estructural de estos grupos fenólicos se pueden obtener desde simples moléculas como los ácidos hidroxibenzoicos o hidroxicinámicos hasta grandes macromoléculas poliméricas como las proantocianidinas y elagitaninas (Figura 8).

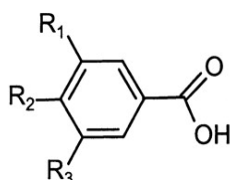
La mayoría de los polifenoles de la dieta son metabolizados por la microbiota del colon antes de la absorción, aunque una pequeña proporción puede ser absorbida en el tracto gastrointestinal superior (Selma, Espin & Tomas-Barberan 2009). Las bacterias del intestino modifican la estructura de los polifenoles mediante diversos mecanismos, principalmente por hidrólisis, reducción, descarboxilación y desmetilación. Así los efectos sistémicos dependen, en gran medida, de la acción sinérgica después de entrar

¹² *Sustancias no nutritivas pero consideradas beneficiosas para la salud humana.*

¹³ *Se llama metabolitos secundarios a los compuestos químicos sintetizados por las plantas que cumplen funciones no esenciales en ellas pero que intervienen en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente.*

en la circulación, tanto con los otros compuestos de la alimentación como con factores endógenos (Lila 2007, Liu 2003).

ÁCIDOS HIDROBENZOICOS

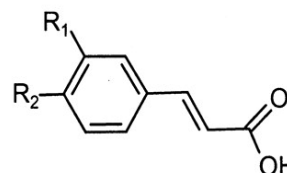


$R_1=R_2=OH$ y $R_3=H$ Ácido 3,4-dihidroxibenzoico

$R_1=R_3=H$ y $R_2=OH$ Ácido 4-hidroxibenzoico

$R_1=R_2=R_3=OH$ Ácido Gálico

ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS

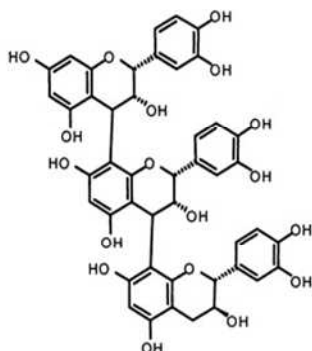


$R_1=H$ y $R_2=OH$ Ácido cumárico

$R_1=R_2=OH$ Ácido caféico

$R_1=OCH_3$ y $R_2=OH$ Ácido Ferúlico

PROANTOCIANIDAS



ELAGITANINAS

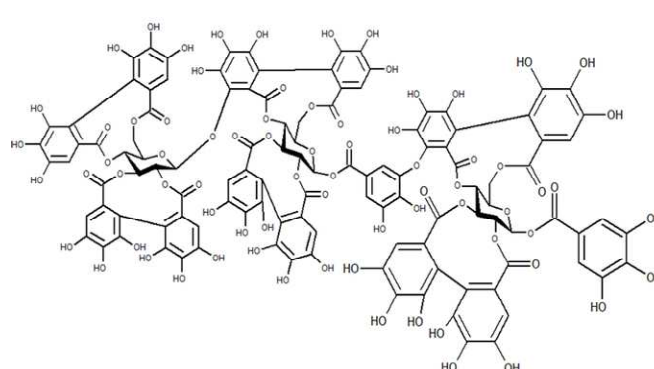


Figura 8. Estructura química de compuestos fenólicos. Adaptación de Manach (Manach et al. 2004)

Actualmente, son cada vez más las recomendaciones dietéticas a favor de dietas ricas en compuestos fenólicos para personas en riesgo de padecer DMT2, ya que pueden influir positivamente en la modulación del metabolismo glucídico por mecanismos tales como: la inhibición de la digestión y absorción de carbohidratos en el intestino, la estimulación de la secreción insulínica por las células β pancreáticas, la modulación de la liberación de glucosa a nivel hepático y la activación de la transducción insulínica y de la captación de glucosa en tejidos sensibles a la insulina (Hanhineva et al. 2010) fenómenos que se ilustran en la siguiente figura (Figura 9).

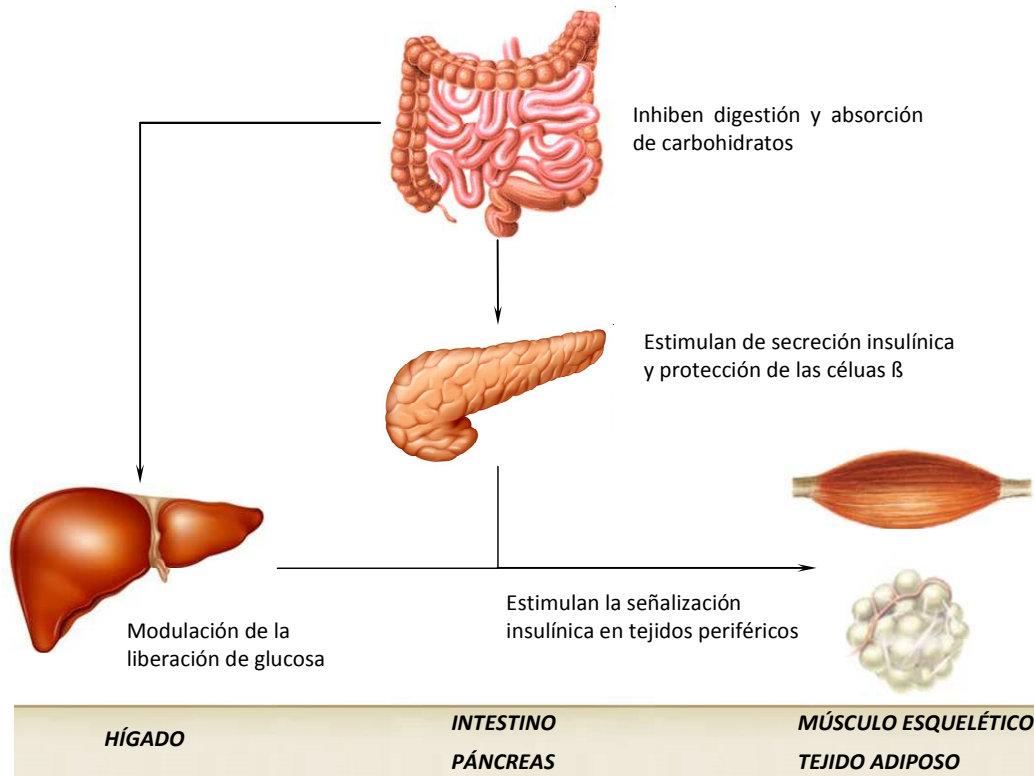


Figura 9. Sitios de acción potencial de los polifenoles dietarios sobre el metabolismo y homeostasis de la glucosa. Adaptación de la propuesta por Hanhieva (Hanhineva et al. 2010)

En este contexto, los alimentos más estudiados y recomendados para la mejora de parámetros diabéticos son: la soja y productos derivados, debido a su elevada concentración de isoflavonas (Orgaard, Jensen 2008); el té verde, principalmente por su elevada concentración de catequinas (Wolfram 2007); el café, por su contenido en ácidos fenólicos (van Dam, Hu 2005); las uvas y productos derivados, por su alto contenido en resveratrol (Zunino 2009); frutos como las bayas (Ghosh, Konishi 2007) o la manzana, por su capacidad antioxidantes (Boyer, Liu 2004); al igual que el cacao (Katz, Doughty & Ali 2011); y diferentes hierbas, que por los efectos beneficiosos que aportan sobre la salud están incluidas en la categoría de medicinales (Najm, Lie 2010).

Debido a la baja frecuencia tanto de obesidad como de trastornos metabólicos en poblaciones asiáticas, especialmente en la sociedad japonesa, se sugiere la existencia de componentes dietarios en su dieta tradicional con capacidad de prevenir, retrasar o mejorar el SM. Por eso, para la elaboración de esta Tesis se ha elegido el estudio de las isoflavonas de soja y del polifenol mayoritario del té verde, el galato de epigallocatequina (EGCG).

Las isoflavonas

Las isoflavonas son un grupo de compuestos bioactivos de origen vegetal muy estudiado por su potencial implicación en la prevención de enfermedades crónicas como ECV, enfermedades neurodegenerativas, osteoporosis o cáncer (Steiner et al. 2008).

Las isoflavonas presentan una estructura química similar a los estrógenos, en concreto al 17- β estradiol (figura 10). Esta similitud estructural les confiere la capacidad de unirse a receptores estrogénicos (ER) en diferentes modelos celulares (Martin et al. 1978, Wang, Sathyamoorthy & Phang 1996, Kuiper et al. 1998) por lo que, junto con los lignanos y coumestanos, muchas veces se las referencia como fitoestrógenos.

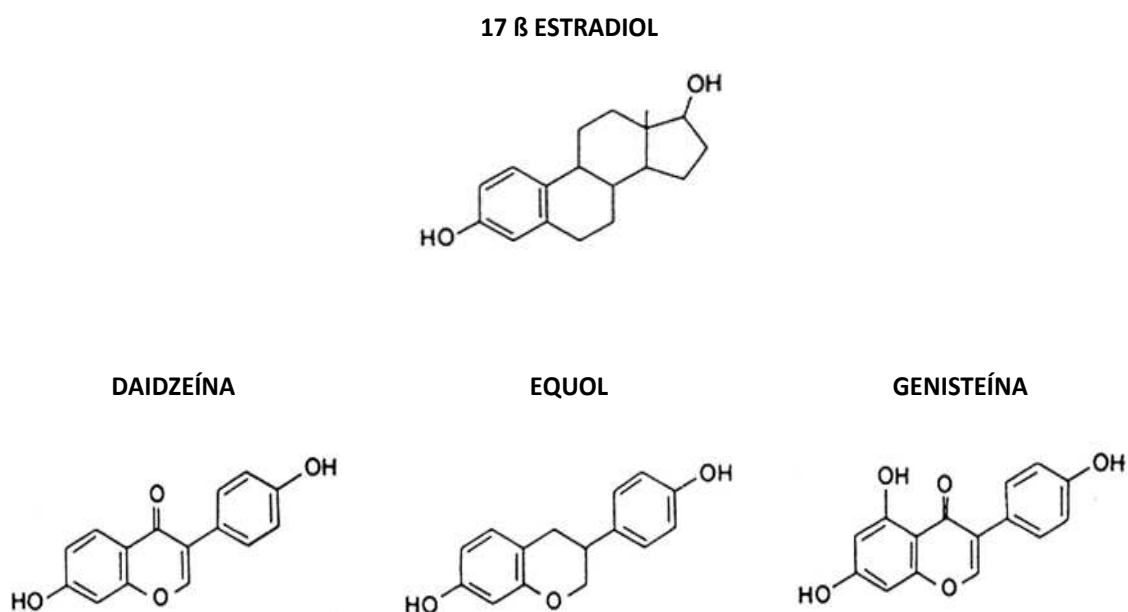


Figura 10. Comparación de la estructura química del 17 β estradiol con la de las isoflavonas daidzeína, equol y genisteína. Adaptación de las figuras propuestas por Murkies (Murkies, Wilcox & Davis 1998)

Tanto la soja como sus derivados (tabla 7) son los alimentos que aportan mayor concentración de isoflavonas en la dieta humana y su concentración plasmática está relacionada directamente con la ingesta de estos alimentos. Se estima que la concentración de isoflavonas ingerida en poblaciones asiáticas se sitúa en el rango de 25-50 mg/día, con un máximo entorno a 100 mg/día en la población anciana japonesa

(Messina, Nagata y Wu 2006), caso opuesto tienen lugar tanto en los americanos como en los europeos que sólo consumen unos pocos miligramos de isoflavonas al día (Steiner et al. 2008). Sin embargo, debido a los efectos beneficiosos de las isoflavonas, sobretodo para sobrellevar los síntomas posmenopáusicos, cada vez son más los suplementos ricos en isoflavonas para la elaboración de alimentos funcionales en estos países.

Alimentos ricos en isoflavonas

Las isoflavonas naturales son de origen vegetal y se encuentran principalmente en la familia de las leguminosas (Familia *fabaceae*, L.). En concreto, la soja (*glycine max*, L.) y sus productos derivados, son las fuente más abundante de isoflavonas (Tabla 7).

Tabla 7. Contenido de isoflavonas en productos derivados de soja.
Adaptación de (Kwon et al. 2011)

PRODUCTO	CONCENTRACIÓN
	(mg)/100 g
Miso	42,6 ± 9,2
Natto	58,9 ± 7,4
Proteína de soja	177,9 ± 12,6
Leche de soja en EE.UU.	9,6 ± 1,8
Leche de soja en Asia	25,2 ± 1,2
Doenjang	31,5 ± 9,3
Extracto de soja	97,4 ± 11,1
Variedad de soja japonesa	118,5 ± 22,2
Variedad de soja coreana	145,0 ± 10,7
Variedad de soja americana	128,4 ± 11,7
Germinado de soja	40,7 ± 8,3
Tempe	43,5 ± 8,3
Tofu	23,6 ± 6,3
Ganjang	1,0 ± 0,3

La concentración de isoflavonas en la soja depende de la variedad cultivada, así como las condiciones ambientales y/o nutricionales durante su cultivo e incluso dependiente del ataque de plagas (Caldwell, Britz & Mirecki 2005). Como consecuencia, el contenido total de isoflavonas en una misma variedad de soja puede variar hasta tres veces dependiendo de diferentes zonas geográficas y las características ambientales del año de cultivo (Caldwell, Britz & Mirecki 2005). Por su parte, el contenido de isoflavonas en los productos derivados varía sustancialmente como resultado de diferencias en los métodos de procesado (Lee et al. 2008, Xu, Chang 2008).

Absorción y metabolismo de las isoflavonas

En las plantas, las isoflavonas se encuentran unidas a azúcares formando β -D-glucósidos, forma en la que resultan biológicamente inactivas para los humanos (Setchell, 1998). Los glucósidos pueden ser hidrolizados en el intestino grueso por las β -glucosidasas de la flora intestinal liberándose así las correspondientes agliconas¹⁴, las cuales pueden ser absorbidas directamente por los colonocitos o metabolizadas de nuevo por la flora intestinal hacia otros metabolitos como el equol o el p-etilfenol (Figura 11).

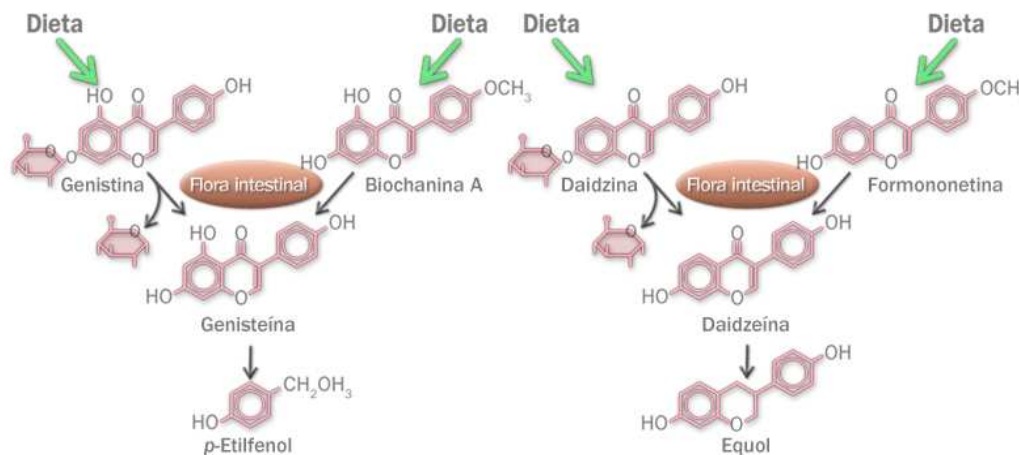


Figura 11. Metabolismo de la daidzeína y la genisteína por la flora intestinal. Las isoflavonas se encuentran en la soja en forma biológicamente inactiva como daidzina o genistina. Después de su ingesta son metabolizadas por la flora bacteriana generando agliconas biológicamente activas (Daidzeína, Genisteína y Equol).

¹⁴ Estructura química libre de glúcido. (a: sin, glicona: glúcido)

Las agliconas absorbidas en el tracto intestinal pueden ser metabolizadas tanto en las células intestinales como en las hepáticas por el sistema de detoxificación del citocromo P450 reduciendo su biodisponibilidad y facilitando así su eliminación. No obstante, isoflavonas como la daidzeína, equol y genisteína son detectadas en la sangre (Setchell 1998) donde son responsables de la bioactividad atribuible a las isoflavonas.

Las variaciones en el rango de concentraciones de isoflavonas encontradas en humanos dependen de factores intrínsecos como: el sexo, la edad del sujeto, grupo étnico, etc. Entre estos factores cabe destacar las características específicas del tracto intestinal, sobre todo las relacionadas con la capacidad de hidrólisis de las bacterias intestinales (Setchell 1998). A modo de ejemplo, en roedores, el equol representa el 70-90% de todas las isoflavonas circulantes. Sin embargo, sólo el 30% de los seres humanos son capaces de metabolizar la daidzeína a equol (Atkinson, Frankenfeld & Lampe 2005).

No está claro si la eficacia de los fitoestrógenos en reducir los riesgos de la obesidad, la diabetes, y las ECV en humanos se correlaciona con la capacidad de los individuos de metabolizar la daidzeína a equol. Sin embargo, es una posible fuente de variabilidad y por lo tanto, debería de tenerse en cuenta a la hora de realizar los ensayos clínicos o de extrapolar estudios observacionales.

Concentraciones plasmáticas

Las concentraciones de fitoestrógenos y sus metabolitos tanto en plasma como en orina han sido reportados en varios estudios en humanos. Se ha descrito que la concentración depende de los hábitos y cultura alimentaria. Así, en personas sanas que consumen dietas pobres en soja, las concentraciones plasmáticas de isoflavonas son por lo general en el rango nanomolar (<40 nmol / L) (Morton et al. 1994). Por el contrario, las concentraciones plasmáticas de isoflavonas aumentan notablemente al rango micromolar (μM) después de la ingestión de productos de soja como, por ejemplo, la leche de soja (Xu et al. 1994) o productos derivados de la fermentación de la soja (King, Bursill 1998, Watanabe et al. 1998).

Se han alcanzado niveles plasmáticos de 1-5 μM en diversos grupos de población con un consumo de alimentos ricos en isoflavonas (Morton et al. 1994, Xu et al. 2000, Adlercreutz et al. 1993, Adlercreutz, Markkanen & Watanabe 1993). Del mismo modo, la excreción urinaria de isoflavonas aumenta notablemente después de la ingestión de dietas ricas en isoflavonas (Adlercreutz, Markkanen & Watanabe 1993). Esta descrito que los niveles plasmáticos máximos tras la ingesta de isoflavonas tiene lugar entre las 4 y las 8 horas post-ingesta y que la semivida¹⁵ de las mismas es de 8 a 10 horas (Setchell et al. 2003).

Aunque parece lógico mantener este criterio de rangos de concentraciones cuando se trabaja en el ámbito del estudio de la alimentación funcional, sorprendentemente la mayoría de los trabajos *in vitro* que describen los efectos beneficiosos de las isoflavonas son realizados a dosis que superan con creces las “concentraciones fisiológicas” incluso en varios ordenes de magnitud, lo que hace muy difícil la interpretación de los resultados y su extrapolación al campo de la alimentación. Para aportar un mayor conocimiento del potencial uso de las isoflavonas como herramienta terapéutica nutricional una de las principales premisas que se mantendrá para la elaboración de esta Tesis es la de trabajar dentro del rango de “concentraciones fisiológicas”.

Las isoflavonas como moduladoras del metabolismo energético a nivel sistémico

Son muchos los estudios epidemiológicos y clínicos que demuestran efectos beneficiosos sobre el metabolismo energético debidos a la ingesta de isoflavonas de soja. Para comprender mejor su relación con la disminución del SM, a continuación se detallarán aquellos efectos considerados como los más relevantes. Se ha demostrado una reducción significativa de las concentraciones tanto de colesterol total como de LDL en el plasma de individuos que habían incorporado isoflavonas a su alimentación (Merritt 2004, Khani et al. 2011). Estas mejoras se hacen más evidentes en la población femenina. En el caso de mujeres postmenopáusicas, se ha reportado una relación directa entre el consumo de isoflavonas con la disminución del IMC (Wu et al. 2006a)

¹⁵ Se entiende por semivida al tiempo que tarda una sustancia en reducir al 50% su concentración plasmática.

y mejora en parámetros tanto del metabolismo lipídico como glucídico. Por su parte, en relación al metabolismo glucídico se ha descrito que las isoflavonas favorecen una disminución tanto de la glucemia (Hooper et al. 2009) como de la insulinemia (Jayagopal et al. 2002) importantes puntos clave para el control del desarrollo del SM.

Concretando en los efectos específicos de las isoflavonas, se ha comprobado que la suplementación de la dieta con daidzeína, equol y genisteína se correlaciona con la prevención de DMT2 en modelos animales (Choi et al. 2008). Se ha descrito que aportan mejoría de parámetros como los niveles plasmáticos de colesterol, TG, HDL y AGL en ratones insulinoresistentes (Ae Park et al. 2006). Ambos estudios describieron una reducción de la actividad de la glucosa-6-fosfatasa y un aumento de la glucoquinasa a nivel hepático, hecho relacionado con la limitación de la producción de glucosa hepática. En contraste con estos trabajos, otros autores informan de la ausencia de efectos beneficiosos de la soja sobre parámetros metabólicos tales como: peso corporal, perfil lipídico en suero, glucemia e insulinemia (Yamashita et al. 1998, Ikeda et al. 2006, Anderson, Hoie 2005, Anderson et al. 2007).

Aunque estas discrepancias dificultan la obtención de conclusiones firmes sobre los efectos de la soja relacionados con el metabolismo energético, si se analizan los trabajos en detalle, se puede comprobar que las causas subyacentes de resultados contradictorios están probablemente relacionadas con la variabilidad de los diseños experimentales, la capacidad de los individuos para producir equol y la susceptibilidad genética y epigenética. En este contexto, se evidencia importante el estudio molecular de las vías de actuación de las isoflavonas para poder estandarizar parámetros de estudios y evaluar más a fondo estos posibles efectos beneficiosos.

Posibles mecanismos de acción: modulación de la señalización celular

Los mecanismos por los cuales los fitoestrógenos ejercen sus efectos beneficiosos sobre la RI no están claros. Los primeros efectos moleculares que se describieron de las isoflavonas se fundamentaban en su similitud estructural con los estrógenos lo que les confiere la capacidad de unirse a receptores estrogénicos y modular así la transcripción de diferentes genes (Martin et al. 1978). Teoría que se mantiene

actualmente (Jackson, Greiwe & Schwen 2011, Molla, Hidalgo-Mora & Soteras 2011). En este contexto se ha descrito los fitoestrógenos, aún pudiéndose unir tanto a los receptores estrogénicos α y β , presentan una mayor afinidad por los β (Kuiper et al. 1998, Gencel et al. 2012). Es importante remarcar que, aunque las isoflavonas presenten afinidad por ER, su resultado puede ser tanto estrogénico como antiestrogénico. La dualidad de este efecto depende principalmente del tejido y de la situación fisiológica del individuo. De forma general, presentan función estrogénica en adipocitos y músculo esquelético y antiestrogénica en mama y endometrio. El hecho de que dependa de la situación fisiológica está directamente relacionado con los periodos de fertilidad del individuo ya que depende, principalmente de los niveles circulantes de estradiol endógeno. A modo de ejemplo, la genisteína presenta capacidad antiestrogénica a concentraciones de 1nM de estradiol (periodo fértil), pero el efecto es contrario cuando las concentraciones de estradiol disminuyen a concentraciones de 0,01nM (situación postmenopáusica) (Hwang et al. 2006). A los compuestos que, como las isoflavonas, presentan la capacidad de modular selectivamente la actividad de receptores estrogénicos, se les conoce como SERM's, del acrónimo inglés *selective estrogen receptor modulator*.

En cuanto a los efectos biológicos no estrogénicos, se ha sugerido que las isoflavonas pueden participar en los mecanismos de proliferación y diferenciación celular ya que influyen en la actividad de la proteína quinasa S6 (Linassier et al. 1990) y de enzimas como la ADN topoisomerasa I y II (Okura et al. 1988, Markovits et al. 1989). También se han propuesto efectos en los procesos de señalización celular ya que modulan la actividad de proteínas tirosina-quinasa (PTK) (Akiyama et al. 1987). Diferentes trabajos evidencian una relación directa entre la actividad de las PTK's y la regulación de la liberación de insulina en las células β pancreáticas (Verspohl, Tollkuhn & Kloss 1995, Hisatomi et al. 1997). Teniendo en cuenta lo que se acaba de comentar, parece evidente que las isoflavonas pueden influir también en este proceso. De hecho, en cultivo *in vitro* de células β pancreáticas, se ha demostrado que la genisteína estimula la secreción insulínica (Liu et al. 2006). Aunque las concentraciones a las que se hacen evidentes estos resultados (100 μ M) resultan en una disminución de la proliferación de las células β pancreáticas (Sorenson, Brelje & Roth 1994).

Por su parte, también se han demostrado efectos de la daidzeína sobre el incremento de la secreción de insulina de islotes de Langerhans de ratón (Kwon et al. 2011), aunque no se demostraron efectos significativos sobre las PTK's.

Se ha demostrado que la genisteína y la daidzeína son capaces de regular la actividad de enzimas vinculadas tanto con el metabolismo lipídico, como G6Pasa o la PEPCK; como del metabolismo lipídico vía CPT1 en modelos de ratón diabético (Choi et al. 2008) lo que puede explicar, en parte, los resultados de mejoras del metabolismo energético. Similares resultados fueron obtenidos por Takahasi (Takahashi, Odbayar & Ide 2009) que corroboró la capacidad de la daidzeína y de la genisteína en la regulación de la expresión de genes involucrados tanto en el metabolismo lipídico como en el glucídico. Siguiendo esta misma línea de investigación, Ha et al. demostró en cultivo *in vitro* de miotubos L6, una estimulación por parte de la genisteína, de la captación de glucosa independiente de insulina en condiciones tanto de normoglucemia como de hiperglucemia, mediado por la estimulación de la translocación de GLUT4 (Ha et al. 2011). Este fenómeno se antoja dependiente de tejido ya que se ha descrito que tanto la genisteína como la daidzeína pueden inhibir la captación de glucosa en enterocitos Caco-2 (Murota et al. 2002). En cualquier caso ambos fenómenos si se reproducen *in vivo*, podrían ayudar a reducir la hiperglucemia mejorando así parámetros de RI.

También se ha sugerido que los efectos beneficiosos de la suplementación de dietas con daidzeína, equol y genisteína puedan ser debidos a su capacidad de activar AMPK fenómeno compartido no sólo a nivel hepático sino también en el tejido adiposo blanco y el músculo esquelético (Cederroth et al. 2008). A parte, en este mismo trabajo se encontró un incremento de la expresión PPAR's en los tres tejidos estudiados y se sugirió que los fitoestrógenos podrían alterar el metabolismo mitocondrial a favor de un incremento en la eficiencia de la β -oxidación. Potencialmente, en condiciones de no obesidad la activación de PPAR conduce el cambio de utilización de glucosa a la de AGL para producir ATP, en lugar de sintetizar TG (Liang, Ward 2006). Este fenómeno podría proteger contra la esteatosis hepática, y por lo tanto, presentar capacidad para mejorar la sensibilidad a la insulina y el metabolismo de la glucosa.

A tenor de los trabajos aquí resumidos, parecen estar bien descritas y catalogadas las vías moleculares de actuación de las isoflavonas sobre la regulación del metabolismo energético. Sin embargo, estos resultados moleculares se presentan limitados para la explicación de los resultados epidemiológicos referentes a la ingesta de soja. En primer lugar, porque es difícil atribuir los efectos de la soja a un sólo tipo de biocompuestos y, en segundo lugar, porque para la elaboración de la mayoría de los trabajos no se han tenido en cuenta alguna o ninguna de las dos premisas importantes como son el control de las **dosis aplicadas** y las características propias de los **modelos** utilizados.

Por un lado, las concentraciones aplicadas en la mayoría de los estudios moleculares exceden las concentraciones fisiológicas, lo que hace poco fiable la extrapolación de los resultados. A modo de ejemplo, concentraciones plasmáticas del orden $100\mu\text{M}$ ¹⁶ de genisteína se conseguirían tras la ingesta de unos 3kg de soja al día, dosis que, a parte de ser difícil de mantener en el tiempo, son susceptibles de originar infertilidad (Chavarro et al. 2008, Dubeyl et al. 2000) a parte de otros efectos adversos atribuibles a una sobredosis de estrógenos.

Por su parte, muchos de los estudios sugieren efectos beneficiosos de las isoflavonas sobre el SM basándose en resultados obtenidos en modelos celulares sin RI. Teniendo en cuenta que los fenómenos de RI alteran la fisiología *normal* de la célula, se presenta atrevido el sugerir que los efectos obtenidos en modelos no RI pudieran servir para explicar los procesos metabólicos que tienen lugar en individuos con dicha patología.

A tenor de estas reflexiones, se hace evidente el estudio de las posibles vías de actuación de las isoflavonas no sólo a concentraciones óptimas sino que también en modelos *in vitro* de insulinoresistencia, por lo que se ha planteado estas premisas como unos de los objetivos de esta Tesis.

¹⁶ *Concentraciones medias a las que se atribuyen efectos beneficiosos de las isoflavonas en la mayoría de los artículos consultados.*

El galato de epigallocatequina

La planta del té, *Camellia sinensis*. L, es originaria de Asia donde su consumo empezó hace unos 5000 años (Uker WH 1994). Desde la antigüedad, son muchos los efectos beneficiosos que se atribuyen a la ingesta de té siendo considerada una de las hierbas fundamentales en la medicina oriental (Chan et al. 2010) lo que ha contribuido a que actualmente sea una de las bebidas más consumidas a nivel mundial. Con los avances tecnológicos se ha podido ir identificando los compuestos bioactivos del té y cada vez son más los estudios que atribuyen sus propiedades beneficiosas a su alto contenido en polifenoles (Balentine, Wiseman & Bouwens 1997).

La concentración de polifenoles en los diferentes tipos de té, depende de las particularidades del cultivo y de sus técnicas de procesado, siendo el té verde el que presenta una mayor cantidad de polifenoles monoméricos conocidos como catequinas (Mak 2012). A modo de ejemplo, una taza¹⁷ de té verde contiene aproximadamente 300mg de catequinas en las que se incluyen: (-)-epicatequina (CE), (-)-epigallocatequina (EGC), (-)-galato de epicatequina (ECG), y galato de epigallocatequina (EGCG) (Mak 2012) cuyas estructuras químicas se representan en la figura 12.

El EGCG es la catequina más abundante en el té verde ya que representa aproximadamente el 75% del contenido total de catequinas (Khan et al. 2006). Este hecho ha promovido la hipótesis de que fuera ésta catequina la principal responsable de los efectos biológicos que distingue al té verde del resto de las variedades de té (Kao, Hiipakka & Liao 2000). De hecho y como se comentará posteriormente, varios trabajos han demostrado similares efectos beneficiosos atribuidos al té verde en estudios realizados exclusivamente con EGCG.

¹⁷ Se estima que una taza de té representa una dosis de 2,5 g de té verde en 250 ml de agua caliente.

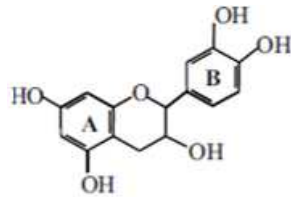
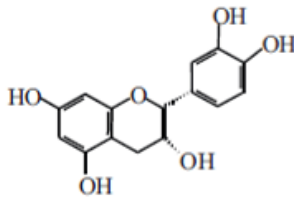
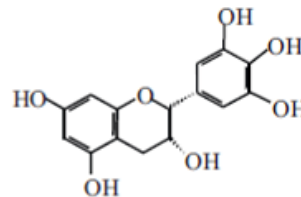
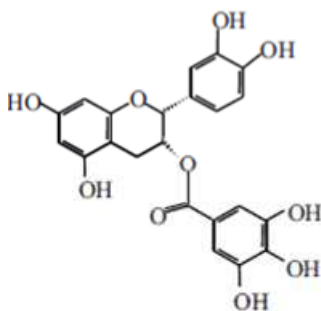
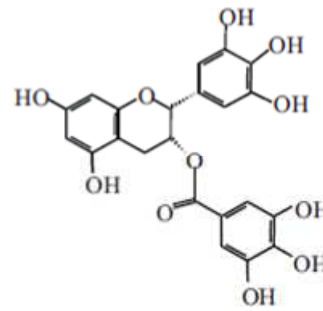
ESTRUCTURA BASE**(-)-EPICATEQUINA****GALATO DE EPICATEQUINA****EPIGALOCATEQUINA****GALATO DE EPIGALOCATEQUINA**

Figura 12. Estructura molecular de las catequinas presentes en el té verde

Absorción y metabolismo

Aunque presentes en alta concentración en el té, las catequinas ofrecen una baja biodisponibilidad en el humano ya que sólo una pequeña parte es absorbida en el intestino delgado (Miller et al. 2012). Una vez en el enterocito, las catequinas soportan una serie de transformaciones que no son del todo bien conocidas pese a que se han realizado varios estudios sobre el tema (Cheng 1995, Yang et al. 1998; Li et al. 2001, Meng et al. 2002, Meng et al. 2001). De forma general se puede decir que, dependiendo del tipo de catequina, sufrirán procesos de sulfatación, glucosilación o metilación para incrementar su solubilidad y favorecer su eliminación, antes de entrar a la circulación sistémica (Lu, Meng & Yang 2003).

En el caso del EGCG, apenas existen transformaciones debido principalmente a la presencia de un grupo galato que aporta una mayor solubilidad a la molécula, de hecho, el 70% de las que *NO* presentan este grupo sufren modificaciones (Moore, Jackson & Minihane 2009) y por esto, la mayor parte del EGCG (un 80%) se encuentra en el plasma en forma no conjugada (Lu, Meng & Yang 2003). Su concentración plasmática rara vez supera valores de 3 μ M (Lee et al. 2002). El incremento de esta concentración depende del porcentaje restante de EGCG que *SÍ* se encuentra modificado (el 20% restante) que principalmente se encuentra metilado debido a la acción de la enzima catecol-O-metiltransferasa (COMT) (Lu, Meng & Yang 2003). A modo de curiosidad, se ha sugerido un incremento de los efectos beneficiosos del té, en personas que presentan una determinada mutación en el gen de la enzima COMT (Wu et al. 2003). Esta mutación origina la sustitución de una valina por una metionina lo que resulta en una disminución considerable de su actividad (Chen et al. 2004), hecho relacionado con una disminución de la metilación del EGCG y en consecuencia un aumento de la forma no conjugada del EGCG en plasma.

Características preventivas del EGCG en el SM

Sobre la regulación del metabolismo energético en situación RI

El carácter preventivo del EGCG sobre la RI ha sido estudiado tanto en la patología inducida por la dieta como en modelos genéticos de RI. En cuanto al primer tipo de trabajos, experimentos previos realizados en el grupo donde se ha realizado esta Tesis (*resultados no publicados*) demuestran mejoras de parámetros del metabolismo energético atribuibles a la ingesta del EGCG en ratones sometidos a una dieta normocalórica. Resultados similares los obtuvo el grupo de Ramadan trabajando con una dieta hipercalórica. Demostró una reducción entorno al 30% tanto de la glucemia como de la lipidemia en ratones alimentados, durante 4 semanas, con una dieta rica en colesterol y suplementados con EGCG en la bebida. (Ramadan, El-Beih & Abd El-Ghffar 2009). En un modelo similar, se ha publicado que la suplementación de EGCG en la dieta durante 6 semanas resulta en la disminución de la glucemia, de la insulinemia, y de los niveles plasmáticos de TG, colesterol LDL y AGL (Qin et al. 2010).

En cuanto a los trabajos realizados en modelos insulinoresistentes, se ha demostrado que en ratones *ob/ob*, deficientes en los receptores de leptina, la suplementación de EGCG en la alimentación resulta en una mejora, con carácter dosis dependiente, en la tolerancia oral a la glucosa y en la disminución de la glucosa basal (Wolfram et al. 2006). En otro modelo animal insulinoresistente y obeso se demostró que la administración oral de EGCG previa a la dieta aportaba un considerable aumento (del orden del 60%) de la sensibilidad a la insulina además de reducir el índice HOMA-IR en un 20% (Serisier et al. 2008).

A parte de estas mejoras directas sobre el metabolismo energético atribuibles al consumo de EGCG, también se han descrito efectos beneficiosos en la disminución de factores de riesgo del SM que se comentan a continuación.

Efectos del EGCG sobre la obesidad

Los efectos tanto del té verde como del EGCG se han examinado en varios modelos de obesidad. A modo de resumen, se ha informado de que animales alimentados con una dieta hipercalórica aumentan de peso menos si se les administra té verde de forma oral (Hasegawa, Yamda & Mori 2003). En el mismo estudio, se reveló una disminución del peso tanto del hígado como del tejido adiposo (Hasegawa, Yamda & Mori 2003).

Varios estudios han atribuido los efectos del té verde directamente al EGCG ya que, utilizando modelos experimentales similares a los anteriores, han demostrado no sólo una reducción del peso corporal sino que también del peso del tejido adiposo visceral y del nivel de TG hepáticos (Tokimitsu 2004, Murase et al. 2002, Nomura et al. 2008, Bose et al. 2008, Wolfram et al. 2005) además de demostrar una reducción de niveles de colesterol total y de la glucemia (Murase et al. 2002). En contrapunto a estos estudios, otros autores no describen efectos sobre la disminución del peso corporal atribuibles al consumo de EGCG (Nomura et al. 2008, Raederstorff et al. 2003) aunque si que coinciden en el efecto del EGCG sobre una reducción del peso del tejido adiposo, específicamente del marrón, que se justifico por una sobreexpresión de la proteína desacopladora 1 (UCP1) dependiente de EGCG (Nomura et al. 2008, Raederstorff et al. 2003).

Aunque los efectos del EGCG sobre la reducción del peso corporal se encuentran aún en debate, la mayoría de los autores coinciden en que aporta efectos directos sobre el tejido adiposo. Sin embargo, se presenta importante el estudio de los efectos del EGCG sobre otros tejidos importantes en la regulación del metabolismo energético sistémico, como es el caso del músculo esquelético que, debido a su directa intervención en la homeostasis energética, se presenta de interés el estudio de este tejido como posible diana de actuación del EGCG.

Modulación del colesterol plasmático

Se ha demostrado que tanto el consumo de té verde como el EGCG presentan potencial en la modulación del colesterol plasmático, tanto a nivel de HDL como de VLDL, como se resume a continuación.

En un modelo *in vivo* se ha descrito una reducción entorno al 30% de la formación de placa de ateroma atribuible a la ingesta de té verde durante 21 semanas (Tijburg et al. 1997). En este mismo trabajo se atribuyó el efecto descrito a la disminución de la oxidación de las LDL que presentaban las ratas tratadas con el té verde respecto al grupo control. Estudios posteriores complementan este trabajo analizando los niveles séricos del colesterol derivado de la ingesta de té verde, ya que se ha descrito una reducción entorno al 20% de los niveles de colesterol plasmático así como un incremento del HDL rondando el 50% asociado a la ingesta de té verde (Yang, Koo 2000).

Se han descrito reducciones del orden de 60% tanto del colesterol plasmático total como del LDL, dependientes de EGCG (Bursill, Abbey & Roach 2007). En este mismo estudio se comprobó una disminución del 25% de las incursiones de colesterol en la aorta, una disminución de la síntesis de colesterol y aumento de la expresión de receptores LDL a nivel hepático.

Estos resultados indican que tanto el té verde como el EGCG presentan un importante potencial modulador del colesterol plasmático reduciendo su concentración.

Prevención de hipertensión

La presión arterial alta es otra de las patologías directamente relacionadas con el SM. Se ha demostrado que la ingesta de EGCG ayuda a reducir la presión arterial y mejorar la función endotelial en modelos *in vivo*. Potenza et al. examinaron el efecto del EGCG sobre ratas hipertensas en las que observó una disminución significativa en la presión sistólica arterial del orden de un 15% respecto la situación control y una reducción del riesgo de infarto, fruto de tratamientos con EGCG (200 mg / kg / día) durante 3 semanas (Potenza et al. 2007). Si bien es cierto que, debido a las altas dosis aplicadas, dicho efectos podrían justificar efectos beneficiosos más bien a nivel farmacológico que al derivado de la alimentación. Sin embargo, se demostraron reducciones significativas similares (10% de reducción respecto la situación control) debidas a dosis mas bajas de EGCG (30 mg / kg / día) (Ihm et al. 2009) lo que valida los efectos del EGCG sobre la hipertensión dependiente de la ingesta de te verde. En contrapunto a estos resultados se presentan los encontrados por Ikeda, que describieron que tratamientos con EGCG (0,5% en el agua) durante 10 días no ofrecían una disminución significativa de la presión arterial en comparación con el grupo control, aunque si demostraron un descenso de parámetros indicativos del riesgo de infarto (Ikeda et al. 2007). La discrepancia de los efectos en la reducción de la presión arterial podría ser debida a las particularidades de los modelos elegidos o a las diferencias de dosis y duración del tratamiento.

Otros efectos del EGCG

Aunque aquí se presentan los resultados más relevantes de los efectos de EGCG en el ámbito del SM, estos son una *pequeña* parte de los efectos atribuidos al EGCG.

De las primeras propiedades beneficiosas de las catequinas que se demostraron fue su capacidad antioxidante (Kuhnau 1976) atribuida principalmente al anillo B presente en su estructura química (figura 12) (Nanjo et al. 1996; Valcic et al. 1999). Debido a que el estrés oxidativo ha sido implicado en la patología de diferentes enfermedades son muchos los estudios que han descrito beneficios atribuibles al EGCG en este contexto (Hong et al. 2001, Zheng, Ramirez 2000, Chen et al. 2000, Du, Guo & Lou 2007).

Aparte de la capacidad antioxidante, también se le han atribuido al EGCG propiedades neuroprotectoras (Kim et al. 2007b, Jung et al. 2007, de Boer et al. 2006, Levites et al. 2002, Mercer et al. 2005), antiinflamatorias (Kawai et al. 2005, Kawai et al. 2004) antimutagénicas (Naasani et al. 2003; Singh, Shankar & Srivastava 2011) y, sobretudo, anticancerígenas (para una información adicional de las propiedades anticancerígenas atribuidas al EGCG consultar la revisión de Singh et al (2011) (Singh, Shankar & Srivastava 2011). La descripción de los mecanismos de actuación en este contexto pueden ser consultados en la revisión de Yang y Wang (2011) (Yang, Wang 2011). A modo de resumen de las características que se acaban de mencionar se presenta la tabla 8.

Tabla 8. Actividades biológicas atribuidas al EGCG

PROPIEDAD	EFEECTO	MODELO	REFERENCIA
Antioxidante	Inhibición de la LOX y de la COX	Mth. de colon	Hong et al. 2001
	Inhibición mitocondrial de síntesis de ATP	Cerebro de rata	Zheng et al. 2000
	Activación de compuestos antioxidantes	HepG2-ARE-C8	Chen et al. 2000
Neuroprotector	inhibición de la producción de IL-6, IL-8, VEGF y PEG2	Ah	Kim et al. 2007
	Atenuación de la expresión de COX-2	Ah	Kim et al. 2007
	Activación de NF-κB	Ah	Kim et al. 2007
	Inactivación de p38 y JNK	Ah	Kim et al. 2007
	Atenuación del potencial de membrana mitocondrial	PC12	Jung et al. 2007
	Inhibición de caspasa 3 y 9	HT29	Boer et al. 2006
	Estimulación de la actividad de PKC	SH-SY5Y	Levites et al. 2002
	Inhibición de la expresión de Bax, Bad y Mdn2	SH-SY5Y	Levites et al. 2002
	Antiinflamatorio	Inducción de apoptosis	Monocito
Inhibición de la expresión de CD11b		linfocitos CD8+T	Kawai et al. 2004
Activación de la vía Nrf2-Keap1		Tejido pulmonar	Narayanan et al. 2007
Antimutagénico	inhibición de la telomerasa	Mth	Naasanu et al. 2003

LOX: Lipooxigenasa

COX: Ciclooxygenasa

Mth: modelo tumoral humano

Ah: Astrocitoma humano

Mecanismos de acción del EGCG: modulación enzimática.

En cuanto a la regulación del metabolismo energético se ha demostrado que el EGCG estimula la expresión de las hexoquinas e inhibe la de la fosfoenolpiruvato carboquinasa (PEPCK) a nivel hepático (Ramadan, El-Beih & Abd El-Ghffar 2009). Este fenómeno puede explicar las mejoras en el metabolismo glucídico.

En cuanto al metabolismo lipídico, se ha sugerido que el efecto beneficioso del EGCG es debido a la capacidad ligante que presenta sobre PPAR α (Lee, Kim & Kim 2009) que resulta en la estimulación de la expresión de genes relacionados con el incremento de la β oxidación. En este contexto, Ramadan demostró un incremento de la expresión tanto de AOX como de CPT1 dependiente de EGCG (Ramadan, El-Beih & Abd El-Ghffar 2009). La activación de enzimas implicadas en el catabolismo tanto de la glucosa como de ácidos grasos podrían explicar las mejorías observadas en la homeostasis energética dependiente de la ingesta de té verde.

En cuanto a los parámetros relacionados con la regulación del tono vascular, se ha descrito que el EGCG estimula la producción de NO vía PI3K (Potenza et al. 2007). Estos efectos parece que se correlacionan con una disminución tanto de la expresión como de la actividad de la NADPH oxidasa (Morre et al. 2000) que conduce a una disminución de los niveles NO. Ambos fenómenos contribuyen a la vasodilatación demostrada en estos trabajos en modelos *in vitro*. También se ha descrito que el EGCG ofrece estos mismos resultados con un carácter dosis dependiente (Lorenz et al. 2004).

A parte de efectos sobre el control de la hipertensión se ha descrito que el EGCG previene ECV, debido a que presenta efectos sobre la modulación de varios genes que intervienen en el metabolismo del colesterol (Goto et al. 2012), lo que resulta tanto en un incremento de HDL como en una disminución de la LDL, principalmente porque el EGCG induce su oxidación (Devika, Stanely Mainzen Prince 2009). A parte de los mecanismos que se acaban de comentar, cada vez cobran más importancia las líneas de investigación que atribuyen los efectos beneficiosos de EGCG a su capacidad de activar AMPK, y debido a esto se antoja interesante describirlo en un apartado independiente.

Efectos del EGCG sobre el sensor energético celular: AMPK

Se sabe que AMPK juega un papel muy importante en la homeostasis energética celular mediante la coordinación de una serie de mecanismos encaminados a incrementar la concentración total de ATP (Kemp et al. 2003). También se ha demostrado su papel como regulador del ciclo celular en células de mamífero (Jones et al. 2005).

Durante los últimos años, los procesos de señalización de AMPK se han convertido en importantes dianas para el tratamiento de la DMT2 (Bastarrachea et al. 2008, Rashid et al. 2011, Gauthier et al. 2011). Se sabe que la activación de AMPK esta mediada por la unión alostérica de AMP a la subunidad α o por la señalización directa de LKB1 o CaMKK (Shaw et al. 2004, Murase et al. 2009) aunque también puede ser llevada a cabo farmacológicamente por compuestos como la ribosa 5-amino-imidazol-4-carboxamida (AICAR) pudiendo ofrecer resultados beneficiosos para el tratamiento de la DMT2 (Song et al. 2002).

A nivel nutricional, Hwang et al. sugirieron que diversos compuestos naturales, entre ellos el EGCG, presentan capacidad de activar AMPK (Hwang et al. 2005) y aunque actualmente no se conocen los mecanismos subyacentes a este proceso, se ha sugerido que el efecto de EGCG sobre AMPK pueda estar mediado por la activación de LKB1 (Jaleel et al. 2006), aunque se requieren más trabajos al respecto sobretodo teniendo en cuenta las dosis a aplicar ya que los resultados anteriores se realizaron a concentraciones de EGCG muy superiores a las atribuibles a la ingesta de té. Se ha postulado que la activación de AMPK es muy sensible al estrés oxidativo (Shaw et al. 2004) y se ha sugerido que las ROS pueden actuar como señal activadora de AMPK (Kemp et al. 2003). De esta manera, compuestos con la capacidad de modular la generación de ROS se presentan como importantes para su estudio en la activación de AMPK.

Muchos de los efectos beneficiosos atribuidos a diferentes compuestos de origen vegetal se explican por presentar cierto grado de *interferencia* sobre las vías de transducción de señal a nivel celular a distintos niveles, desde la activación de

receptores, por presentar una estructura química similar a la del activador específico; hasta la regulación alostérica enzimática. Sin embargo, caso curioso es el del EGCG, ya que no sólo se ha descrito un receptor específico (67LR) para este polifenol presente en las células de mamíferos (Tachibana 2008), sino que también se ha descrito la vía de señalización dependiente a la unión del EGCG con su receptor (Tachibana 2009). El por qué las células de nuestro cuerpo presenta receptores específico para el EGCG sería objeto de otra tesis, pero debido a esta particularidad merece la pena su mención.

Efectos adversos atribuidos al EGCG.

Como se ha comentado a lo largo de este apartado, son muchos los efectos beneficiosos que se le atribuyen a la ingesta de té verde y en concreto del EGCG. Sin embargo, las concentraciones testadas en modelos tanto *in vivo* como *in vitro* generalmente sobrepasan las encontradas en plasma después de la ingesta de té. A estas dosis se han descrito numerosos efectos beneficiosos para revertir los efectos del SM, pero hay que tener en cuenta que a estas mismas dosis también se observan fenómenos que hacen dudosa su aplicación en el campo farmacológico.

Debido a que las catequinas presentan la capacidad de inhibir la dihidrofolato reductasa y con ello la regeneración del ácido fólico (Navarro-Peran et al. 2005) existe la preocupación de que concentraciones farmacológicas de EGCG puedan presentar efectos adversos relacionados con estados carentes de ácido fólico, como problemas en el desarrollo del feto durante la gestación (Navarro-Peran et al. 2005). Hay varios informes que revelan casos de hepatotoxicidad relacionada con la ingesta de comprimidos a base de concentrados de EGCG o con extracto de té verde (Gloro et al. 2005, Schonthal 2011).

Estos ejemplos ponen de manifiesto la necesidad del estudio de la ingesta de concentrados de catequinas no sólo en el contexto de la descripción de beneficios para la salud sino también de las posibles complicaciones subyacentes. En este contexto cabe destacar que actualmente existen estudios clínicos en fase I y II que están valorando el potencial terapéutico de las catequinas y en concreto del EGCG para el tratamiento farmacológico de diversas enfermedades (Hara 2011).

Hipótesis

A continuación se expondrán las premisas en las que se basó la hipótesis de esta tesis.

La prevalencia del SM está alcanzado proporciones epidémicas y con ello los problemas asociados, no sólo de salud sino también socioeconómicos. Además, las previsiones para los próximos años no alientan a una tendencia a la disminución sino todo lo contrario. Debido a la necesidad de frenar esta tendencia surgió la idea de realizar esta Tesis con el fin de poder aportar conocimientos que ayuden a este propósito.

A lo largo de la introducción ha quedado patente la relación existente entre los hábitos alimentarios y los desajustes en el metabolismo energético que promueven el desarrollo del SM. Basándose en esta premisa surgió la idea de poder contribuir al control del SM mediante la modificación de la dieta.

Aunque la patogénesis del SM se presenta complicada, la resistencia a la insulina se muestra como un factor muy importante en su desarrollo y debido a esto se centró esta Tesis en el estudio de esta patología.

Es sabido que existe una baja frecuencia tanto de RI como de otros trastornos asociados al SM en poblaciones asiáticas, especialmente en la sociedad japonesa. Debido a la relación directa entre alimentación y metabolismo energético se estimó la existencia, en la dieta tradicional de esta población, de biocompuestos con capacidad potenciadora de la sensibilidad insulínica. Algunos de los alimentos más consumidos en la sociedad japonesa son la soja y derivados, y el té verde. Por lo tanto, la caracterización de los biocompuestos presentes en estos alimentos con capacidad de mejorar la sensibilidad a la insulina se sugiere importante para contribuir al tratamiento y prevención del SM.

Los antecedentes expuestos anteriormente permiten hipotetizar que ***“Compuestos bioactivos presentes en derivados vegetales de soja y té verde interaccionan, a dosis biológicamente relevantes, con mecanismos de señalización insulínica mejorando así parámetros del síndrome metabólico “***

Objetivos

Para validar la hipótesis formulada en esta Tesis Doctoral se marcaron los siguientes objetivos:

1° Estudiar el efecto de las isoflavonas derivadas de soja genisteína, daidzeína y su metabolito equol, a concentraciones dietarias, sobre la modulación de la transducción de señal insulínica en modelos celulares de músculo esquelético y tejido adiposo en condiciones de insulinoresistencia.

2° Analizar los efectos funcionales de la modulación de la vía de señalización insulínica del objetivo anterior enfatizando en el estudio del metabolismo glucídico a nivel de músculo esquelético y del metabolismo lipídico a nivel de tejido adiposo.

3° Determinar el potencial uso preventivo de las isoflavonas de soja estudiadas sobre la esteatosis hepática y las vías de señalización que controlan el metabolismo lipídico a nivel hepático en un modelo *in vitro*.

4° Estudiar la capacidad de las isoflavonas de soja como moduladoras del proceso de inflamación en un modelo celular de tejido adiposo con macrófagos activados.

5° Analizar el efecto de la principal catequina del té verde, el galato de epigallocatequina (EGCG), a concentraciones dietarias, sobre la modulación del metabolismo energético independiente de insulina, en un modelo celular de músculo esquelético.

6° Evaluar el posible efecto del EGCG en mecanismos de producción energética a nivel mitocondrial y analizar los mecanismos moleculares implicados.

Materiales y métodos

MATERIALES

Reactivos

A continuación se presenta la tabla 9 en la que se incluyen todos los reactivos utilizados para la elaboración de esta Tesis.

Tabla 9. Reactivos utilizados en la parte experimental

REACTIVO	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
2-NBDG	Invitrogen (Barcelona, España)	N13195
Acetona	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.)	4436-8
Ácido acético	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.)	45840
Ácido clorhídrico	Merck (Darmstadt, Alemania)	100,317,000
Ácido Palmítico	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.)	P0500
Acrilamida/Bisacrilamida	Bio-Rad Laboratories (Barcelona, España)	161-0158
AICAR	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.)	A9978
Azul de bromofenol	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.)	B8626
Azul de Coomassie	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.)	27815
BAPTA	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.)	16609
BHT	Merck (Darmstadt, Alemania)	822021
BSA	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.)	A7511
Catalasa	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.)	c9322
Ceramida 2	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.)	A7191
Cicloheximida	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.)	C7698 y C4859
Citocalasina B	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.)	C2743
Cloroformo	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.)	25685
Cloruro sódico	Panreact (Barcelona, España)	121659
Compound C	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.)	P5499

Daidzeína	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.)	D7802
DCFH-DA	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.)	D6883
Desoxicolato sódico	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.)	D6750
Dexametasona	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.)	D4702
DMSO	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.)	D2650
D-NAME	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.)	N4770
DNPH	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.)	D2630
DTPAC	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.)	D6518
DTT	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.)	D0632
EDTA	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.)	E4884
EGTA	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.)	E4378
Equol	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.)	454005
Estradiol	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.)	E2257
Etanol	Carlo Erba (Milan, Italia)	64-17-5
Fluoruro sódico dibásico	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.)	S7920
Fosfato sódico monobásico	Panreact (Barcelon, España)	121672
Fosfato monopotásico	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.)	P9791
Fulvestrant	Tocris (Bristol, Reino Unido)	1047
Galato de epigallocatequina	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.)	E4143
Genipina	Cayman (Ann Arbor, MI, EE.UU.)	10010622
Genisteína	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.)	G6776
Glicerol	Panreact (Barcelon, España)	131339
HEPES	Gibco (Carlsbad, CA, EE.UU.)	15630-080
Hidróxido sódico	Panreact (Barcelon, España)	131687
I-block	Applied Biosystem (Madrid, España)	A1300
IBMX	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.)	I5879

Inhibidor de proteasas	Amersham Bioscience (Madrid, España)	806501-23
Insulina	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.)	I0516
Isopropanol	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.)	19076-4
L-Glutamina	Gibco (Carlsbad, CA, EE.UU.)	25030-032
L-NAME	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.)	N5751
Lipopolisacárido	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.)	L4516
Marcador de peso molecular	Invitrogen (Barcelona, España)	LC5602
Metanol	Carlo Erba (Milan, Italia)	67-56-1
N-acetil cisteína	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.)	A9165
Ortovanadato de sodio	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.)	S6508
Oligomicina	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.)	75351
Penicilina/estreptomicina	Gibco (Carlsbad, CA, EE.UU.)	15070-063
Persulfato amónico	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.)	A3678
SDS	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.)	L5750
β Mercaptoetanol	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.)	M7154
STO-609	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.)	S1318
Substrato para detección WB	Millipore (Millford, MA, EE.UU.)	WBKLS0500
Tampón de Carga NuPAGE®	Invitrogen (Barcelona, España)	NP0008
TEMED	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.)	T9281
TNF α	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.)	T7539
Tripsina	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.)	T4049
TRIS	Panreact (Barcelona, España)	131940
TROLOX	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.)	23881-3
Tween 20	Amersham Bioscience (Madrid, España)	17-1316-01

Tampones y soluciones

Salvo especificación, todos los compuestos de los tampones fueron disueltos en agua de alta pureza (*agua Milli-Q*) en las concentraciones indicadas a continuación.

Tampón fosfato salino (PBS)

- Cloruro sódico: 137mM
- Cloruro potásico: 2,6mM
- Fosfato monopotásico: 1,5mM
- Fosfato sódico dibásico: 8,1mM

Ajustar el pH a 7,4

Tampón de lavado *previo a la lisis celular*

- PBS: 200mL
- Ortovanadato sódico: 1mM

Tampón de lisis celular (RIPA)

- Tris-HCl: 50 mM, pH 7,4
- Tween 20: 1% (v/v)
- Desoxicolato sódico: 0,25% (p/v)
- Cloruro sódico: 150 mM
- EDTA: 1 mM
- PMSF: 1 mM
- Inhibidor de proteasas: 1 µg/ml
- Ortovanadato sódico: 1 mM
- Fluoruro sódico: 1 mM

Tampón de carga

- Ácido clorhídrico 62,5 mM a pH 7,8
- SDS: 2% (p/v)
- Glicerol al 10% (v/v)
- Azul de bromofenol al 0,02% (p/v)

Tampón de electroforesis

- Tris: 25 mM
- Glicerol: 192 mM
- SDS: 0,1% (p/v)

Solución colorante de geles de acrilamida

- Azul de Coomassie al 0,1%
- Isopropanol al 25%
- Ácido acético al 10%

Solución decolorante de geles de acrilamida

- Ácido acético al 10%

Tampón de transferencia

- Tris 25 mM
- Glicerol 192 mM
- Metanol al 20% (v/v)

TBS-T

- Tris 2 mM
- Cloruro sódico 68mM
- Tween-20 al 0.1% o 0.05% (v/v) *según se requiera TBS-T 0,1 o TBS-T 0,05*

Solución de Bloqueo

- I-block
- Tween-20 al 0,1%
- Cloruro sódico: 68mM
- Fosfato sódico monobásico: 17mM
- Fosfato sódico dibásico: 68mM

Solución de Bloqueo para la detección de proteínas fosforiladas

- BSA al 5% (p/v) en TBS-T 0,1%

MÉTODOS

Cultivo celular

Antes de entrar en las especificaciones propias de cada línea celular se presenta la tabla 10 y 11 con los medios y sueros utilizados para el cultivo celular.

Tabla 10. Medios utilizados para el cultivo celular

MEDIO	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
DMEM (4,5g glucosa/L)	Gibco (Carlsbad, CA, EE.UU.)	11825-015
DMEM (1g glucosa/L)	Gibco (Carlsbad, CA, EE.UU.)	31885-023
MEM	Gibco (Carlsbad, CA, EE.UU.)	10370-047
Opti-MEM	Gibco (Carlsbad, CA, EE.UU.)	31985-047
HBSS	Gibco (Carlsbad, CA, EE.UU.)	14175129
HEPES	Gibco (Carlsbad, CA, EE.UU.)	15630-080

Tabla 11. Sueros utilizados para el cultivo celular

SUERO	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
Suero fetal bovino (FBS)	Gibco (Carlsbad, CA, EE.UU.)	10437-028
Suero de ternera (BCS)	Gibco (Carlsbad, CA, EE.UU.)	16030-074

Cuando fue necesario la descomplementación de los sueros se realizó por calor a 56 °C durante 30 minutos

A continuación se presentan las líneas celulares utilizadas y las características de cultivo realizadas. Salvo especificación, todas las líneas celulares fueron cultivadas en ambiente controlado a 37 °C y al 5% de CO₂ y cada dos días el medio de cultivo se reemplazó.

Miotubos L6

La línea celular L6 procedente de mioblastos de músculo esquelético de rata se cultivó en medio DMEM (4,5 g/L de glucosa) suplementado con FBS al 10% (v/v), 2 mM de L-glutamina y 50 µg/ml de penicilina y estreptomicina (P/S).

Para realizar la *diferenciación* de mioblastos a miotubos, las células fueron cultivadas hasta un 90% de confluencia, momento en el que se realizó un cambio de medio a DMEM suplementado con un 2% de FBS. Las células se mantuvieron en estas condiciones durante 6-8 días para su completa diferenciación.

El *modelo insulinoresistente* de miotubos L6 se creó mediante preincubación durante 2 horas con ceramida 2 (25, 50 y 100 µM) previa a la estimulación con insulina y la aplicación de los tratamientos con los compuestos a testar.

Adipocitos 3T3-L1

La *línea celular* 3T3-L1 procedente de fibroblastos *pre-adipocíticos* de ratón se mantuvo en medio DMEM (4,5 g/L de glucosa) suplementado al 10% (v/v) con suero de ternera (BCS), 2 mM de L-glutamina y 50 µg/ml de P/S.

Para *diferenciar* los pre-adipocitos a adipocitos, las células se mantuvieron bajo las condiciones anteriores dos días más al de confluencia al 100%, momento en el que se comienza la diferenciación mediante la adición al medio de mantenimiento de la línea celular 500 µM de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) 250 nM dexametasona y 5 mg/ml de insulina. Las células se cultivan dos días en este medio y posteriormente se realiza un cambio de medio a DMEM (4,5 g/L de glucosa), suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS). En este medio se mantuvieron las células hasta su completa diferenciación que será al cabo de 12-14 días.

El *modelo insulinoresistente* de adipocitos diferenciados 3T3-L1 se creó mediante preincubación durante 16 horas con TNF α (100nM) previa a la estimulación con insulina y la aplicación de los tratamientos con los compuestos a testar.

Macrófagos RAW 264.7

La *línea celular* RAW 264.7 se mantuvo en DMEM (1 g/L de glucosa) suplementado al 10% (v/v) con FBS descomplementado, 2 mM de L-glutamina y 50µg/ml de P/S. Cuando fue necesario, los macrófagos fueron activados con 5µg/mL de Lipopolisacáridos (LPS).

Hepatocitos FAO

La *línea celular* FAO procedentes de carcinoma hepático de rata se cultivo en medio DMEM (1 g/L de glucosa) suplementado al 10% (v/v) con FBS, 2 mM de L-glutamina y 50µg/ml de P/S.

Cocultivo adipocitos 3T3-L1 y macrófagos RAW 264.7

Los adipocitos y los macrófagos se cultivaron y diferenciaron de forma independiente como se describe en su correspondiente apartado y el cocultivo se realizó según el protocolo utilizado en el grupo del Dr. Kawada, como se describe en el siguiente párrafo.

Los adipocitos fueron diferenciados a una concentración de $3 \cdot 10^5$ células/mL en placas de cultivo. Una vez obtenidos los adipocitos maduros se retiró el medio de diferenciación y se sembró la misma concentración ($3 \cdot 10^5$ células/ml) de macrófagos RAW 264.7. Este cocultivo se incubó en medio DMEM (1 g/L de glucosa) suplementado con, 2 mM de L-glutamina y 50µg/ml de P/S (sin suero) y en ambiente controlado a 37 ° C con CO₂ al 5% durante 24 h.

Para la realización de los controles, tanto los macrófagos RAW 264.7 como los adipocitos 3T3-L1 se cultivaron de forma aislada bajo las mismas condiciones en las que se encontraba el cocultivo. Las isoflavonas se añadieron a los cultivos concentraciones de 0,1 y 1 µM. Después de 24 h de tratamiento, se recogió el sobrenadante del cultivo y se almacenó a -20 °C hasta su posterior análisis.

Estimación de la viabilidad celular

Para estimar la viabilidad celular se utilizó el kit comercial CellTiter 96 (ref. G3582 de Promega, Tokio, Japón.). Brevemente, las células fueron sembradas en placas Elisa a una densidad de 2×10^3 células /mL, con un total de 80µL por pocillo. Las células fueron incubadas, a excepción del control, con las isoflavonas o el EGCG durante 16h. Posteriormente, se añadió 20 µl/pocillo del reactivo MTS del kit y las células se mantuvieron en condiciones de cultivo. La toma de los datos se realizó por lectura de la placa a una longitud de onda (λ) de 490 nm y el análisis a de los resultados se realizó por comparación frente a la situación control.

Obtención de lisados celulares

En todos los experimentos con los modelos L6, 3T3-L1 y FAO, las células fueron privadas de suero durante 4 horas y cuando fue necesario se trataron con AICAR (2 mM), Compuesto C (5 µM), Cicloheximida (1 µM), Genipina (10, 50 o 100 mM), Fulvestrant (100 y 1000 µM), TROLOX (50 µM), NAC (5 µM), BAPTA-MA (50 µM) y/o STO-609 (20 µM) durante 30 min. Posteriormente se realizó la estimulación con la insulina (100 nM) y con las isoflavonas o el EGCG a concentraciones 0,5; 1; 2,5 o 5 µM durante 10 minutos en el conjunto de experimentos moleculares y durante 30 minutos en el conjunto de experimentos funcionales.

Transcurrido el tiempo de incubación pertinente, las placas de cultivo se pusieron sobre hielo y se realizaron tres lavados con PBS suplementado con ortovanadato de sodio (1 mM). Se adicionó el tampón de lisis celular (tampones y sustratos) y se disgregaron las células con la ayuda de una rasqueta celular (ref. CLS3010-100EA de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.). Los restos celulares se recogieron en nuevos viales etiquetados y mantenidos en hielo. Posteriormente, se homogeniza la muestra por sonicación (soniprep 150 de Braun Biotech, Barcelona, España) durante 10 segundos a una amplitud de 6-8 micrómetros. Por último, se cuantificaron las muestras como se describe el siguiente apartado, se alicuotaron y congelaron a -20°C hasta su posterior utilización.

Determinación de la concentración proteica

La cantidad de proteína de cada muestra se calculó mediante el método Bradford (Bradford 1976) basado en la unión que experimentan los residuos básicos y aromáticos de los aminoácidos con el azul de Coomassie. La concentración proteica de las muestras se analizó por interpolación de los datos obtenidos a partir de una recta patrón realizada con concentraciones conocidas de BSA (rango de 0 a 2 µg/µl).

Tanto las soluciones patrón de BSA como a las muestras se les añadió el reactivo de Bradford y se sometieron a agitación. Posteriormente se incubaron las muestras durante 5 minutos a TA. Finalmente se determinó la absorbancia de cada muestra por espectrofotometría a una longitud de onda de 595 nm. En cubetas de metraquilato de un cm de paso óptico.

Experimentación en placa de cultivo

En determinados experimentos, como los que se basan en análisis cinéticos, fue necesario el estudio del comportamiento celular sin lisar. En este caso, la experimentación se realizó directamente en la placa de cultivo y la preparación de la muestra se realizó como se indica en el apartado de obtención de lisados celulares obviando los pasos posteriores al lavado con PBS suplementado con ortovanadato.

Inmunodetección por *Western Blot*

La inmunodetección de las proteínas de los extractos celulares se consigue tras la aplicación de los siguientes protocolos:

Preparación de la muestra

Se realizó la obtención de lisados celulares y se cuantificó su concentración proteica siguiendo los protocolos que se acaban de definir. Posteriormente, se normalizaron las muestras con agua *Milli Q* y se les añadió el tampón de carga. A continuación, se procedió a la desnaturalización proteica por calor en un baño seco (Thermobloc Selecta, Biotech, Madrid, España) a 95°C durante 3 minutos.

Separación de proteínas por electroforesis (PAGE)

La separación de proteínas por peso molecular se realizó en geles de poliacrilamida y en presencia del detergente aniónico SDS que, a parte de participar en el proceso de desnaturalización, confiere una carga catiónica que permite una migración de las proteínas por el gel, dependiente de un campo eléctrico y en función de su longitud. Debido a la desnaturalización, la longitud está en relación directa con su peso molecular.

El gel utilizado para la electroforesis consta de dos partes: el gel apilador, que permite que las proteínas comiencen a migrar desde el mismo punto y el gel separador, que es donde se produce la separación propiamente dicha. La densidad de los geles dependerá del tamaño de las proteínas a analizar, así cuanto más pequeñas son las proteínas más denso será el gel y viceversa. En la elaboración de esta Tesis se utilizaron geles al 10 y 7.5% de acrilamida-bisacrilamida, forzados a polimerizar en presencia de los catalizadores persulfato amónico y TEMED, y cuya composición se detalla en la siguiente tabla.

Tabla 12. Composición de los geles para la electroforesis de proteínas

COMPUESTO	<i>Gel al 10%</i>		<i>Gel al 7,5%</i>	
	Separador	Apilador	Separador	Apilador
Acrilamida	10 mL	2 mL	10 mL	2 mL
Tris	1,5 M	7,5 mL	--	10 mL
	0,5 M	--	3 mL	--
Agua milliQ	12 ml	7 mL	18 mL	7 mL
SDS	300 µL	120 µL	400 µL	240 µL
Persulfato amónico	240 µL	80 µL	320 µL	160 µL
TEMED	20 µL	15 µL	20 µL	15 µL

Cantidades para la elaboración de 4 geles

Una vez polimerizados, los geles se sitúan en cubetas de electroforesis tipo *Mini-PROTEAN II* (ref. 165-2940 de BioRad, Barcelona, España) y se cubren con el tampón de electroforesis. Se cargan las muestras y el marcador de peso molecular y se aplica una corriente de 15 mA por gel, durante una hora aproximadamente.

Control de carga por tinción de geles

Una vez finalizada la electroforesis, se puede realizar un control de la homogeneidad de carga de las muestras por tinción del gel con la solución colorante (tampones y soluciones) durante 1 hora a temperatura ambiente (TA) y en agitación suave. Para eliminar el exceso de azul de Coomassie se realizan tres lavados de 30 minutos a TA con ácido acético al 10%. El color azul es proporcional a la cantidad de proteína presente en cada carril descrito por la muestra.

Electrotransferencia

Una vez separadas las proteínas en función de su peso molecular, se procedió a su transferencia a membranas de nitrocelulosa de difluoruro de polivinilo (PVDF) (ref. IPVH00010 Immobilon-P de Millipore, Bedford, MA, EE.UU.) previamente activadas con metanol al 100% durante 3 minutos y equilibradas en tampón de transferencia (tampones y soluciones) durante 15 minutos. Se coloca el gel en contacto directo con la membrana mediante un sistema de *sandwicheras* de plástico perforado que se sitúan en cubetas de transferencia (Mini Trans-Blot Transfer Cell de BioRad Laboratories, Barcelona, España) diseñadas para conseguir un campo eléctrico uniforme en toda la superficie y perpendicular al sistema membrana-gel, en dirección a la membrana. El voltaje aplicado para la transferencia fue de 100 V durante 1 hora. Este proceso desprende un calor, por lo que las cubetas se sumergen en hielo para refrigerar el sistema.

Bloqueo de la membrana

Una vez realizada la electrotransferencia, las membranas se aíslan del sistema de *sándwich* y se incuban en una solución de bloqueo específica dependiendo de si las proteínas a detectar se encuentran o no fosforiladas (Tampones y soluciones). Se incuban durante 1 hora a TA y en agitación suave. Durante este proceso se consigue *bloquear* los sitios de la membrana donde no se han unido proteínas impidiendo así la unión inespecífica de los anticuerpos que se utilizarán para la inmunodetección. Posteriormente, se realizan 3 lavados de 5 minutos de duración con TBS-T 0.05% con el objetivo de eliminar el excedente de la solución bloqueante.

Inmunodetección

Las membranas se incuban con el anticuerpo primario (tabla 13) a o/n a 4 °C y en agitación suave. Para eliminar el anticuerpo primario no unido a proteínas, se realizaron 3 lavados con TBS-T 0.1% de 5 minutos de duración. A continuación, se incuban las membranas con el anticuerpo secundario correspondiente (tabla 14) durante 1 hora, a TA y en agitación suave. El exceso de anticuerpo secundario se elimina mediante 5 lavados de 5 minutos de duración con TBS-T 0.1% en agitación rápida.

Tabla 13. Anticuerpos primarios utilizados en inmunodetección.

PROTEÍNA (antígeno)	P.M. (Kda)	CASA COMERCIAL	REFERENCIA	DILUCIÓN	ESPECIE
Acetil-CoA	280	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, EE.UU.)	3662	1:1000	Conejo
Acetil-CoA (Ser⁷⁹)	280	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, EE.UU.)	3661	1:1000	Conejo
AMPK-α	62	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, EE.UU.)	2532	1:1000	Conejo
AMPK-α (Thr¹⁷²)	62	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, EE.UU.)	2532S	1:1000	Conejo
AKT	60	Invitrogen (Ltd., Inglaterra)	44-609G	1:1000	Conejo
AKT-p (Ser⁴⁷³)	60	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, EE.UU.)	9271	1:1000	Conejo
AKT-p (Thr³⁰⁸)	60	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, EE.UU.)	4056	1:1000	Conejo
Actina	42	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.)	A5441	1:10000	Ratón
AS160	160	Millipore (Millford, MA, EE.UU.)	07-741	1:1000	Conejo
AS160 (Thr⁶⁴²)	160	Millipore (Millford, MA, EE.UU.)	07-802	1:1000	Conejo
GLUT4	45	Abcam (Cambridge, Inglaterra)	ab654	1:2500	Conejo

IRS1	160-185	Upstate (Lake Placid, NY, EE.UU.)	06-248	1 µg/µL	Conejo
IRS1 (Ser³⁰⁷)	170-110	Upstate (Lake Placid, NY, EE.UU.)	07-247	1:1000	Conejo
IRS1 (Ser⁶¹²)	180	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, EE.UU.)	3193	1:1000	Ratón
ERK1/2	42-44	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, EE.UU.)	4695	1:1000	Conejo
ERK1/2 (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴)	42-44	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, EE.UU.)	4370	1:2000	Conejo
PI3K p85	85	Millipore (Millford, MA, EE.UU.)	06-496	1 µg/µL	Conejo
UCP2	33	Abcam (Cambridge, Inglaterra)	ab32592	1:125	Conejo
UCP3	34	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.)	U7757	1:1000	Conejo

P.M. Peso Molecular

Tabla 14. Anticuerpos secundarios utilizados en inmunodetección.

ANTÍGENO	CASA COMERCIAL	REFERENCIA	DILUCIÓN	ESPECIE
Conejo	Pierce Thermo Scientific (Rockford, IL, EE.UU.)	31460	1:10000	Cabra
Ratón	GE-Healthcare (little chalfont, Inglaterra)	NA931	1:5000	Oveja

Revelado y análisis de los datos

Para el revelado se incubó la membrana durante 5 minutos y a TA, con un sustrato quimioluminiscente (*luminolTM Western Chemiluminiscent HRP* de Millipore Corporation, Billerica MA, EE.UU.), el cual en un sustrato para el complejo peroxidasa de rábano capaz unido al anticuerpo secundario. Esta unión presenta la capacidad de emitir luminiscencia que es detectada por el equipo *Molecular Imager ChemiDoc XRS* (BioRad, Munich, Alemania) y analizada con el programa *Quantity-One 4.6* (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.). La cantidad de luminiscencia obtenida es proporcional a la cantidad de proteína.

Medición de la concentración de TNF α y MCP1

Las concentraciones de TNF α y MCP1 en los sobrenadantes de los cultivos se determinaron por ELISA, que se llevó a cabo con los kits comerciales Ready-Set-Go contra TNF α y MCP1 (ref. 88-7391 y 88-7324 respectivamente de eBioscience, San Diego, CA, EE.UU.) siguiendo los pasos que se enumeran a continuación.

En primer lugar se agregaron 50 μ l de la solución del anticuerpo de captura provista por el kit, se cubrió la placa ELISA con aluminio, para prevenir la evaporación y se incubó o/n a 4 °C. Posteriormente se descartó la solución remanente en los pocillos y se lavaron dos veces con 150 μ l de la solución de lavado incluida en el kit. Se agregó 200 μ L de solución de bloqueo y se incubó durante 2 horas y media a TA. Transcurrido ese tiempo se lavó la placa 4 veces con 120 μ L de solución de lavado y se le adicionó 100 μ L tanto de los estándares como de las muestras (sobrenadante del cultivo) y se incubaron o/n a 4°C.

Al día siguiente, se realizaron 4 lavados 150 μ L de la solución de lavado, se añadió 100 μ L de la solución de anticuerpo secundario marcado con biotina provisto en kit y se incubó la reacción 1 hora y media a TA. Posteriormente se lavó 6 veces con solución de lavado, se añadió 100 μ L de la solución de peroxidasa provista en el kit y se incubó 30 minutos a TA. Por último se realizaron 5 lavados con el tampón de lavado previo a la adición de 100 μ L del substrato provisto por el kit y se incubó la reacción 15 min a TA. Transcurrido este tiempo se paró la reacción con 50 μ L de la solución *Stop* y se midió la absorbancia del color producido en espectrofotómetro a una longitud de onda de 405 nm.

Con los datos de absorbancia de los estándares de concentraciones conocidas provistos en el kit se realizó una recta patrón, definida por absorbancia y concentración. Los datos de absorbancia de las muestras se compararon con la recta patrón y para el cálculo de la concentración tanto de TNF α como de MCP-1 en las muestras.

Inhibición de la traducción génica por RNA de interferencia (siRNA)

Esta técnica se basa en la transfección celular con siRNA específicos para los genes que se quieren inhibir. El objetivo de la realización de este experimento fue el de inhibir la traducción de UCP2 en miotubos diferenciados L6. Por lo que, en primer lugar, se sembraron las células en placas de cultivo celular y se diferenciaron como se describió en el apartado de cultivo celular. Los siRNA inhibitorios de UCP2 utilizados fueron adquiridos a Applied Biosystems International. Tanto las referencias como sus secuencias se detallan en la tabla 15. Como control se utilizó el siRNA *Silencer® Select Negative Control#1* obtenido en la misma casa comercial.

Tabla 15. siRNA utilizados para la inhibición de la traducción de UCP2.

REFERENCIA	SECUENCIA	
	<i>Sentido</i>	<i>Antisentido</i>
s132619	AGAGCACUGUCGAAGCCUAtt	AUGGCUUCGACAGUGCUCUgg
s132621	CAAAGAUACUCUCCUGAAAtt	UUUCAGGAGAGUAUCUUUGat

La transfección celular con los siRNA descritos en la tabla 15 tuvo lugar transcurridos 6 días desde el comienzo de la diferenciación celular y como se describe a continuación (los cálculos representados son por reacción y para placas de cultivo de 2 cm de diámetro). En primer lugar se añadió 5µL del agente transfectante siPORT NeoFx (ref. AM4510 de Applied Biosystems International) en 100 µL de Optimem (31985-047 de Gibco, Carlsbad, CA, EE.UU.). Se incubó la mezcla 10 minutos a TA y posteriormente se añadió 0.5µL del siRNA correspondiente. Se incubó de nuevo la mezcla durante 10 minutos a TA para facilitar la formación de micelas entre el agente transfectante y el siRNA específico, este paso incrementará la eficiencia de la transfección. Posteriormente se enrasó la mezcla anterior hasta 200µL con Optimem. Se retiró el medio de cultivo a la línea celular a transfectar (L6 diferenciados), se añadieron los 200µL de la disolución realizada en Optimem y se cultivaron las células durante 24h. Transcurrido este tiempo se realizaron los tratamientos pertinentes y se recogieron las muestras a analizar según el protocolo de *obtención de lisados celulares*.

Medición de nitratos y nitritos

La cantidad de nitritos en los sobrenadantes del cultivo celular se midió utilizando el reactivo de Griess. En primer lugar se preparó la curva control a partir de una dilución seriada de 100µM a cero de NaNO₂ en agua. Posteriormente, se distribuyeron 100µL tanto de los estándares de la curva control como de las muestras a cuantificar provenientes del sobrenadante del cultivo. Se añadió un volumen equivalente de reactivo Griess (0.1% N-1-naftiletilenodiamina en agua destilada y 1% de sulfanilamida en 5% de ácido fosfórico) y se incubó la reacción durante 10 minutos a TA. Posteriormente se midió la absorbancia a 550nm y la concentración de nitritos fue calculada a partir de la estimación de los datos de la curva control de NaNO₂.

Estimación de la concentración de TG

La línea celular FAO se cultivó como se ha descrito en el apartado de cultivo celular en placas de cultivo celular de 6 pocillos, a razón de 5×10^5 células/ml y se incubaron en condiciones de ambiente controlado (37 °C y 5% CO₂) hasta confluencia de 80%. Llegado a este punto, se lavaron las células con 2mL de PBS por pocillo y posteriormente se realizó un tratamiento con una solución de palmitato 200µM disuelto en DMEM suplementado con P/S pero sin suero durante 24 h con el fin de incrementar los niveles basales de ácidos grasos. Al día siguiente, se realizó un cambio de medio para eliminar el palmitato remanente y se aplicaron los tratamientos con las isoflavonas a concentración 0,1; 1 y 5µM y con 10µM de GW7649. Se incubaron las células durante 24 horas y se realizó el protocolo de *obtención de los lisados celulares* descrito previamente y centrifugados 5 minutos a 10000 rpm para eliminar los restos celulares. Para la cuantificación de la concentración de TG se realizó dilución seriada de concentraciones conocidas de glicerol y se distribuyeron 40µL tanto de la dilución seriada como de las muestras en una placa ELISA. Posteriormente se añadieron 200 µL del reactivo provisto en el kit *TG E-test Wako* (Wako pure Chemicals, Osaka, Japón) y se incubó la placa 5 minutos a 37 °C en agitación moderada. Por último se midió la placa en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm. Con los datos de la absorbancia y las concentraciones de la dilución seriada se realizó una recta patrón y la concentración de glicerol de la muestra se calculó por triangulación de las absorbancias de las muestras con la recta patrón.

Medición de la captación de glucosa por 2-NBDG

El compuesto 2-NBDG es un análogo de la glucosa con capacidad fluorescente por lo que su utilización es válida para estimar la captación de glucosa celular (Zou, Wang & Shen 2005). Este ensayo se realizó en el modelo celular de miotubos L6 tratados como se describe a continuación. Las células fueron diferenciadas como se describe en su correspondiente apartado, en placas de cultivo celular de 24 pocillos. Una vez diferenciadas, se realizó una retirada de suero durante 4 horas y posteriormente se añadió 10 μM de una solución de citocalasina en PBS+BSA al 0.1%, durante 30 minutos con el fin de conseguir un control negativo (la citocalasina inhibe la captación de glucosa). Durante la incubación, se prepararon los tratamientos con insulina (100nM) mas las isoflavonas a 0,1; 1 2,5 y 5 μM , también en PBS+BSA al 0.1%. Se añadieron los tratamientos a las células con los que se incubaron durante 30 minutos. Por último se añadió una concentración de 80 μM de 2-NBDG a las células y se incubaron un rango de 5 a 30 minutos. Posteriormente se realizó un lavado de las placas de cultivo con PBS para eliminar el 2-NBDG remanente y se realizó una medida de la fluorescencia a 470/500 nm. Los datos de las absorbancias obtenidas de los tratamientos se contrastaron con los de la situación control y su relación se expresó en porcentaje.

Estudio de la actividad de AMPK

El análisis de la actividad de AMPK se realizó mediante el kit comercial *CycLex® AMPK kinase Assay Kit* (ref. CY-1182 de MBL International Corporation, Woburn, MA, EE.UU.) siguiendo las recomendaciones del fabricante. En la placa de ELISA donde se realizará la lectura, se añadieron 10 μl del lisado celular y 90 μL de tampón de reacción quinasa (50 μM ATP plus). Se incubó la reacción durante 30 minutos a 30 °C. Posteriormente, se lavó cinco veces la placa con el tampón de lavado provisto en el kit y se añadió 100 μL de *anti-fosfo-IRS1Ser⁷⁸⁹* (ref. AS-4C4 del kit) y se incubó 30 minutos a TA. Transcurrido el tiempo de incubación, se lavó cinco veces la placa con el tampón de lavado y se añadió 100 μL de HRP-conjugado de IgG anti-ratón. La actividad colorimétrica se inició con 100 μL de sustrato y se detuvo 10 minutos más tarde con 100 μL de solución de parada. Por último, se midió la absorbencia a 450 nm para la estimación de la actividad de la AMPK.

PCR a tiempo real

La PCR cuantitativa, qPCR, Q-PCR (del inglés *quantitative polymerase chain reaction*) o PCR en tiempo real (del inglés *real time polymerase chain reaction*) es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación de ácido desoxirribonucleico (ADN). Para ello emplea, un molde de DNA al menos un par de cebadores específicos, dNTPs, un tampón de reacción adecuado, y una DNA polimerasa termoestable; a dicha mezcla se le adiciona una sustancia marcada con un fluoróforo que, en un termociclador que albergue sensores para medir fluorescencia tras excitar el fluoróforo a la longitud de onda apropiada, permita medir la tasa de generación de uno o más productos específicos (Watson et al. 2004). En muchos casos el molde que se emplea para la PCR es ADN complementario (cDNA), de hebra simple, obtenido por retrotranscripción de ácido ribonucleico (RNA); en este caso, la técnica es una RT-PCR cuantitativa, RT-PCR en tiempo real o RT-Q-PCR. Debe evitarse la confusión con la técnica denominada «PCR tras transcripción inversa» (RT-PCR, del inglés *reverse transcriptase PCR*), en la cual existe un paso de retrotranscripción de ARN a ADN pero que no necesariamente cuantifica el producto a tiempo real.

Existen diferentes factores que afectan a la variabilidad del resultado final como la integridad de DNA o la eficiencia enzimática entre otros, por lo que se han desarrollado diferentes sistemas de estandarización. Los hay para cuantificar de forma absoluta la expresión génica, pero, de forma más común, se orientan a la cuantificación relativa del gen de estudio respecto de otro, denominado «normalizador», que se selecciona debido a mantener una expresión más o menos constante. Estos genes suelen denominarse, en inglés, *house-keeping genes* debido a que suelen estar involucrados en funciones básicas en la supervivencia celular, lo cual suele implicar una expresión constitutiva (Vandesompele et al 2002; Pfaffi et al 2002). De este modo, efectuando en cada experimento la medición de los genes de interés y dividiéndolos por la expresión del gen normalizador seleccionado es posible comparar los primeros aún sin conocer en términos absolutos su nivel de expresión.

Como se acaba de comentar fue requerida una molécula de cDNA para la realización del análisis de la expresión génica a tiempo real debida a tratamientos con las isoflavonas o con el EGCG. Para la obtención de este tipo de moléculas a partir de los cultivos celulares fue necesaria la aplicación de los protocolos que se definen a continuación.

Extracción total de ácido ribonucleico (RNA)

La extracción del RNA se realizó en dos laboratorios diferentes por lo que a continuación se comentaran los detalles de cada protocolo utilizado. En ambos casos, debido a que las moléculas de RNA son fácilmente degradables, se trabajo bajo condiciones que disminuyeran su degradación como la pulverización de la zona, el equipo y material de trabajo con etanol y un inhibidor de ribonucleasas¹⁸ (RNAsas) *RNAse Zap* (ref. R2020 de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.), la utilización de puntas con filtro y trabajar sobre hielo.

Por kit RNeasy® de Quiagen (ref. 74104)

Una vez realizados los tratamientos pertinentes, se lavaron las placas de cultivo dos veces con PBS. Posteriormente se añadió el tampón de lisis incluido en el kit y se recogieron las células con la ayuda de una rasqueta celular (ref. CLS3010-100EA de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.). Se transfirieron a viales RNAsa Free y se comenzó la homogenización de las muestras por pipeteo. Posteriormente se congelaron los lisados celulares a -80°C durante un mínimo de 15 minutos para su completa homogenización. Se añadió un volumen de etanol 70% y se mezcló por pipeteo, con la misma punta se transfirieron las muestras a las minicolumnas provistas en el kit y se colocaron en viales de 2mL también incluidos en el kit. Se centrifugaron las muestras durante 15'' a 10.000 rpm (correspondiente a 8000 g). Cuando se requirió un posterior análisis proteómico de estas muestras, en vez de en tubos de 2 mL se fijaron las columnas en viales de 2 mL donde se conservó el eluyente alícuotado y congelado a -20 °C para realizar una precipitación proteica con acetona como se describirá posteriormente en el protocolo Precipitación proteica. Cuando no fue necesario este tipo de análisis se descartó el eluyente.

¹⁸ *Enzimas que catalizan la hidrólisis del RNA facilitando así su degradación*

Para conseguir una mayor eficiencia en la RT-PCR se optó por realizar una digestión de DNA mediante el kit RNAsa-Free DNA (Quiagen ref. 79254) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, se lavaron las membranas de las columnas con 350µL de tampón de lavado RW1 provisto en el kit y se centrifugaron durante 15'' a 10.000 rpm. Posteriormente se añadieron 80 µL por columna de una solución compuesta por 10 µL DNase y 70 µL RDD, ambos provistos en kit y se incubó durante 15 minutos a TA. Por último se lavaron las membranas con 350µL de RW1 por centrifugación durante 15'' a 10.000 rpm. Para continuar con el protocolo se añadieron 500µL de RPE (con Etanol) a cada columna y se centrifugaron 15'' a 10.000 rpm, para lavar la membrana y se repitió este paso, pero esta vez durante 2 min a 10.000 rpm, para secar la membrana por centrifugación. Se colocó la columna en viales *RNAsa free* etiquetados que se centrifugaron 1 min a 10.000 rpm para proceder a la elución del RNA en 30 µL de agua libre de RNase (ref. 129114 de Quiagen). El eluyente final se congeló rápidamente en nitrógeno líquido y se conservó a -80º hasta su posterior utilización.

Por Sepasol®

Se utilizó esta técnica de extracción de RNA en el caso del estudio antiinflamatorio ya que este estudio se realizó durante la estancia en el grupo liderado por el profesor Kawada de la Universidad de Kyoto, bajo las condiciones puestas a punto en su laboratorio que se fundamentan en la extracción de ácidos nucleicos por el método Fenol-cloroformo.

En primer lugar se lavaron las células con PBS tres veces, y posteriormente se añadió 1mL de solución Sepasol (ref. 30486 de Nacalai Tesque, Tokio, Japón). Se recogieron los restos celulares en un vial de 2mL y se adicionó 200µL de cloroformo. Se mezcló suavemente durante 30 segundos y se incubó 5min a TA. Posteriormente, se centrifugaron las muestras durante 15 min a 15000 rpm y 4 °C, fruto de este paso se diferenciaron claramente dos fases en cada muestra, se recogió la fase acuosa (superior) evitando arrastrar parte de la interfase para obtener un resultado final mas puro. A la fase acuosa se le añadió 500 µL de propanol, se mezcló suavemente durante 30 segundos y posteriormente se incubó 10 min TA. Transcurrido este tiempo se

centrifugaron las muestras de nuevo durante 15 min a 15000 rpm y 4 °C y se eliminó el sobrenadante por decantación y con la ayuda de una pipeta para eliminar la mayor parte del sobrenadante. Posteriormente, se añadió etanol al 75% para precipitar el RNA y se centrifuga durante 15 min a 15000 rpm y 4 °C. Se Elimino el sobrenadante por decantación y se repitió este mismo paso para facilitar la eliminación del etanol. Los viales se dispusieron invertidos sobre un papel secante donde se dejaron hasta la total evaporación del etanol remanente (aproximadamente 20 minutos). Por último se resuspendió el pellet en agua libre de RNAsas y se conservaron las muestras a -80°C hasta su posterior utilización.

Precipitación proteica

Esta técnica se empleó cuando se necesitó la extracción de la fase proteica del eluyente obtenido en el protocolo de extracción de RNA total kit RNeasy® de Quiagen (ref. 74104). En primer lugar se añadieron 4 volúmenes de acetona previamente atemperada a 4°C y se incubó durante 30 min a 4°C. Posteriormente se centrifugaron las muestras durante 10 minutos a 15000 rpm y 4 °C. Transcurrido este proceso se descartó el sobrenadante y se incubó a TA hasta la completa evaporación de la acetona¹⁹. Posteriormente se resuspendió el pellet en el tampón de lisis celular (tampones y soluciones) al que se le añadió el tampón (tampones y soluciones) para la posterior inmunodetección por WB.

Cuantificación de la concentración de ácidos nucleicos por NANODROP®

Al tratarse de muestras de RNA, que se pueden degradar con facilidad, las muestras estuvieron en hielo durante todo el proceso y se trabajo con puntas con filtro. En primer lugar, se realizó un par de lavados del lector con 2µL de agua libre de RNAsa para eliminar posible impurezas que pudieran interferir en la lectura. Con este mismo tipo de agua se realizó el blanco y acto seguido se comenzó con la cuantificación de la concentración proteica de las muestras, para ello se dispusieron 2µL de cada muestra en el sensor con un par de lavados entre muestras.

¹⁹ Es importante no forzar la evaporación de la acetona ya que una deshidratación excesiva complicaría la posterior resuspensión de las proteínas

Se recogieron los valores tanto de la concentración de las muestras como de los ratios 260/280 y 260/230 que aportan información de la pureza de la muestra. Por último se realizó una lectura final con agua libre de RNAsas con el fin de comprobar la reproducibilidad del blanco y valorar así la posible dispersión de los datos.

Por medio de esta cuantificación se puede saber la concentración de RNA y el grado de contaminación pero no aporta datos relevantes sobre la integridad de la molécula, característica limitante a la hora de realizar la posterior PCR cuantitativa, por lo que es importante su estimación que se realizó según el siguiente protocolo.

Control de integridad de RNA por gel de agarosa

En la tabla 16 se presentan los componentes necesarios para la preparación del gel de agarosa que se elaboró como se describe a continuación. En primer lugar, se disolvió la agarosa en TBE precalentado para facilitar el proceso. Una vez atemperada la disolución se añadió el marcador de ácidos nucleicos SYBER safe²⁰ (ref. S33102 de Molecular Probes, Invitrogen, Ltd., Inglaterra). La polimerización de la agarosa se realizó en oscuridad para no excitar el SYBER safe y mantener así su eficiencia.

El tamaño de gel realizado dependió de la cantidad de muestras que se pretendía analizar a la vez. Cuando se contaba con más de 15 muestras se realizó un gel grande y en caso contrario uno pequeño

Tabla 16. Composición de geles de agarosa para la electroforesis de ácidos nucleicos

COMPUESTO	Gel pequeño	Gel grande
TBE	70 mL	100 mL
Agarosa	0.7 g	1 g
SYBER®safe	7 µL	10 µL

Mientras polimerizaba el gel se prepararon las muestras a analizar en tubos independientes libres de RNAsas. Se dispuso de una concentración mínima de 100ng de cada muestra en un volumen final de 5 µL distribuidos según se indica en la tabla 17.

²⁰ Este compuesto presenta la capacidad de unirse a los ácidos nucleicos y de excitarse a una longitud de onda entre 470 y 530 nm (rango ultravioleta) emitiendo fluorescencia a 530nm.

Tabla 17. Composición de las muestras para electroforesis.

COMPUESTO	VOLUMEN
Muestra	1 μ L
Tampón de carga	1 μ L
Agua <i>MilliQ</i>	3 μ L

Una vez polimerizado, se colocó el gel en la cubeta de electroforesis y se cubrió con TBE. Transcurridos 5 minutos²¹ se retiró el peine del gel y se introdujo el equipo en hielo para mejorar la resolución del producto final.

Se cargaron las muestras (tabla 17) en el gel de forma ordenada y se programó la electroforesis a 100V durante una hora aproximadamente. Por último, se visualizó el gel de agarosa en un equipo transiluminador (ref. VL-ECX-15.M, de Biogen científica, Madrid, España) que emite luz ultravioleta consiguiendo excitar el SYBER safe con el fin de visualizar el resultado de la electroforesis y analizar así el grado de integridad de las moléculas de RNA.

Con esta prueba generalmente sólo se consigue detectar las dos subunidades del RNA ribosómico, pero extrapolando los resultados de integridad de estas bandas, se puede hacer una idea de cómo se encuentra el RNA en general. Con las muestras de los carriles en los que se observaron claramente las dos bandas se continuó con el protocolo siguiente si, por el contrario, se visualizó un carril tipo *smir* se descartó la muestra para su posterior análisis.

Retrotranscripción reversa

Esta técnica de basa en la utilización de la enzima retrotranscriptasa reversa, propia de virus y gracias a la cual se consigue transformar RNA en cDNA que es mucho más estable para conservar y trabajar además de ser la biomolécula necesaria para la posterior realización de la PCR a tiempo real. Cabe la pena recordar que no se trata de una técnica de amplificación por lo que la estequiometría entre moléculas de RNA de partida y cDNA final ha de ser 1:1.

²¹ Tiempo necesario para rehidatar el gel y facilitar así la extracción del peine.

Para la realización de esta técnica se utilizó el kit comercial *transcriptor High Fidelity cDNA síntesis* (ref. 05081955001 de Roche, Madrid, España) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, se normalizaron las muestras en viales libres de RNAsa a una concentración final de 500 ng de RNA en 9,4 μL de agua milliQ. Posteriormente, se añadieron 2 μL de los cebadores *Anchored-oligo (dT)₁₈* suministrados en el kit y se incubaron las muestras en el tremociclador *96-Well GeneAmp® PCR System 9700* (ref. N8050200 de Applied Biosystems, CA, EE.UU) durante 10 minutos a 65°C con el objetivo de asegurar la desnaturalización de las posibles estructuras formadas entre diferentes moléculas de RNA. Mientras tanto, se preparó una *master mix* con los productos comunes para realizar la retrotranscripción de las muestras, para ello se multiplicó las concentraciones que se indican en la tabla 18 por el número total de muestras.

Tabla 18. Composición de la *Master Mix* para una reacción

REACTIVO provisto en el kit	VOLUMEN	CONCENTRACIÓN FINAL
Tampón de transcripción (5X)	4.0 μL	8mM MgCl_2
Inhibidores de RNAsas (40 U/ μL)	0.5 μL	20 U
Dexosinucleótidos (10mM)	2.0 μL	1mM
DTT	1.0 μL	5mM
Retrotranscriptasa reversa *	1.1 μL	10 U
* No añadir en el caso del CTL2.		$\Sigma = 8.6 \mu\text{L}$

A parte de las muestras se crearon dos controles: CTL1 que no contenía RNA molde y CTL2 en el que sí que se incorporó RNA pero no la retrotranscriptasa reversa. En ambos casos no se debería producir la transcripción de RNA a cDNA, el caso contrario indica contaminación o fallo durante el proceso.

El volumen total de *master mix* por muestra fue de 8.6 μL (tabla 18) que se añadió a los 11.4 μL preparados previamente (9.4 μL de las muestras normalizadas a 500 ng más

los 2 μL de los cebadores) obteniendo una mezcla con un volumen un total de 20 μL por reacción. Posteriormente se incubaron de nuevo todas las muestras en el termociclador siguiendo el programa indicado en la figura 13.

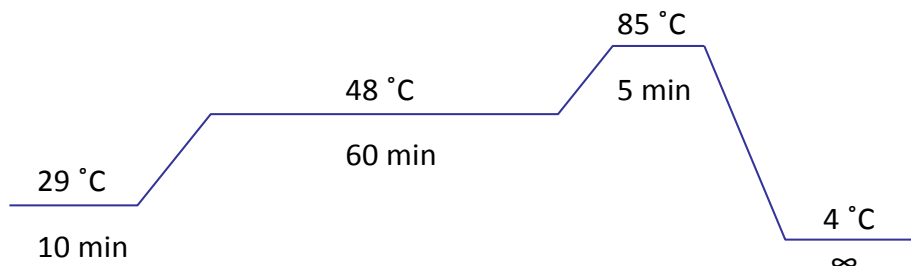


Figura 13. Programa del termociclador para la realización de una copia de cDNA a partir de mRNA

El cDNA resultante se cuantificó como se ha descrito previamente en el protocolo de *cuantificación de ácidos nucleicos por Nanodrop®*. Posteriormente se normalizaron las muestras a una concentración de 25 ng/ μL con agua milliQ, se alicuotaron y se conservaron a -20 °C hasta su posterior utilización.

Al igual que en el caso de la extracción del RNA, la técnica de RT-PCR se llevó a cabo con dos equipos y protocolos diferentes debido a que se realizaron en laboratorios distintos. Los protocolos utilizados dependieron de los genes estudiados y sus particularidades se describen a continuación.

PCR a tiempo real de la expresión de UCP2 y GADPH

Para la realización de este protocolo se necesitaron 50 ng por muestra del cDNA obtenido tras la realización de los protocolos anteriores. Debido a que las muestras fueron conservadas a una concentración de 25 ng/ μL se partió de un volumen de 2 μL . A este volumen se añadió 7 μL de agua milliQ, 10 μL de la master mix *TaqMan® Gene Expression Master Mix* (ref. 4370048 de *AppliedBioystem*) y 1 μL de la sonda específica del gen de interés que en este caso fueron UCP2 y GADPH para los cuales se utilizaron sondas comerciales de la casa *AppliedBioystem* con referencias Rn01754856_m1 y 4352338E respectivamente.

Hay que tener en cuenta que para cada gen fue requerida una reacción diferente, ya que depende de la sonda utilizada para su detección y que cada reacción se repitió un

mínimo de tres veces para incrementar la robustez estadística del análisis de los datos. Simultáneamente se realizó reacciones de PCR a una dilución seriada de un cDNA control, tanto para UCP2 como para GADPH cuyos datos finales ayudaron a estimar la eficiencia de la reacción.

Una vez añadidos incorporados todos los reactivos a los viales correspondientes se realizó una centrifugación rápida (*spin*) para disponer todos los reactivos en la base del vial y posteriormente se introdujeron en el termociclador (CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System de BioRad) con el siguiente programa (Figura 14).

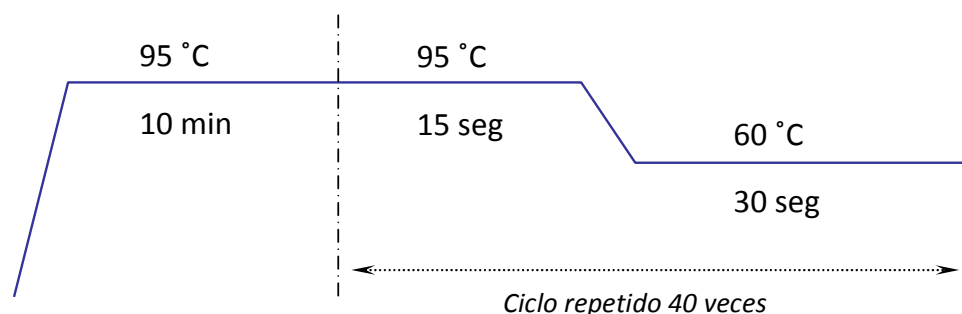


Figura 14. Programa del termociclador RT-PCR de UCP2 y GADPH

Los datos obtenidos fueron analizados con el *software* CFX Manager™ 184-5000 versión 2.1 (BioRad, Barcelona, España). Se normalizaron los valores teniendo en cuenta los datos obtenidos de gen de referencia (GADPH) y se representaron los datos en porcentaje respecto el control.

PCR a tiempo real de la expresión de TNF α - α , MCP-1, eNOS y 36B4

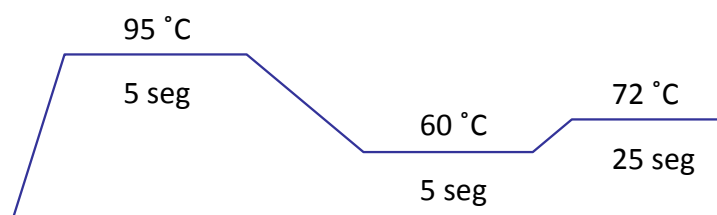
Las PCR's a tiempo real de estos genes se hicieron como parte experimental del estudio antiinflamatorio que se presenta en el apartado de *Resultados y Discusión* y que se realizó en el grupo de Ciencia y tecnología de los alimentos de la Universidad de Kyoto.

En primer lugar, Se realizó la curva patrón a partir del amplicón obtenido por PCR utilizando las mismas sondas que se utilizaron posteriormente para la RT-PCR y cuyas secuencias puede consultarse en la siguiente tabla.

Tabla 19. Secuencias y referencias de las sondas utilizadas para la PCR a tiempo real

SONDA	REFERENCIA	SECUENCIA	
		Sentido	Antisentido
mTNF-a	NM_013693	ACACTCAGATCATCTTCTCAAAATTCG	GTGTGGGTGAGGAGCACGTAGT
mMCP-1	NM_011333	ATGCAGGTCCCTGTCATGCTTC	GGCATCACAGTCCGAGTCACAC
miNOS	BC062378	CCAAGCCCTCACCTACTTCC	CTCTGAGGGCTGACACAAGG
m36B4	BC011291	TGTGTGTCTGCAGATCGGGTAC	CTTTGGCGGGATTAGTCGAAG

En segundo lugar, se realizó una Master mix con 8.4µL de agua, 0.8 µl de cada sonda sentido y antisentido de interés (tabla 19) y 8µL de SYBR green por cada reacción. Se distribuyó los viales previamente atemperados a 4°C y por último se dispensó 2µL de cDNA tanto de las curvas patrón como de las muestras a analizar (equivalente a 50ng). Se realizó una centrifugación rápida para evitar burbujas en el capilar y posteriormente se introdujeron en el termociclador *LightCycler System* (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) donde se repitió 40 veces el ciclo de la figura 15.

Figura 15. Programa del termociclador para RT-PCR de TNF α MCP1 iNOS y 36B4

En este caso se utilizó los niveles del mRNA de 36B4 como estándar interno para la determinación de la concentración del resto de los mRNA analizados.

Medición de la concentración de lactato

Una vez diferenciadas las células se realizó una retirada de suero durante 4 horas en medio Hank's. Posteriormente se estimularon con insulina (100 nM) y con los tratamientos correspondientes.

Se realizó una cinética de toma de muestra a razón de 150µL del sobrenadante cada 5 minutos con un total de 9 puntos. En el último punto se lavaron las células con PBS y se congelaron para su posterior cuantificación.

El análisis de la concentración de lactato se realizó con el kit comercial *Lactate kit* (ref 1001330, Spinreact, Girona, España) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El lactato producido por los miotubos IR estimulados con insulina y tratados con isoflavonas es secretado al medio extracelular y su concentración en el medio de cultivo es relativamente fácil de cuantificar ya que puede ser oxidado *in vitro* por la Lactato oxidasa a piruvato y peróxido de hidrógeno el cual, en presencia de peroxidasa, 4-aminofenazona y 4-clorofenol forma un producto rojo fácilmente cuantificable por espectrofotometría que puede ser cuantificado por relación directa con su absorbancia a 505nm y comparación con la medida de las diluciones de blanco, patrón (incluido en el kit) y muestra que se prepararon con los reactivos que se muestran en la tabla 20 y se incubaron 10 minutos a TA.

Tabla 20. Composición de las muestras para la cuantificación de lactato

	Blanco	Patrón	Muestra
RT (mL)	1.0	1.0	1.0
Patrón (µL)	--	10	--
Muestra (µL)	--	--	10

Tanto las soluciones de la recta patrón como las muestras se les añadió el reactivo RT se sometieron a agitación. Posteriormente se incubaron las muestras durante 5 minutos a TA. Finalmente se determinó la absorbancia de cada muestra por espectrofotometría a una longitud de onda de 405 nm.

Estudio de la captación de ácidos grasos

Este estudio se realizó en adipocitos 3T3-L1 diferenciados durante 14 días bajo las condiciones descritas en el apartado de *cultivo celular*. Debido a que la diferenciación de los adipocitos en placas de 96 pocillos resulta complicada se optó por la diferenciación adipocítica en placas de 10 cm de diámetro y transplantarlas a una placa de 96 pocillos una vez diferenciadas. Posteriormente, las células se trataron con TNF α (20ng/ μ L) o/n para crear un modelo insulinoresistente y cuando fue necesario se añadieron los inhibidores durante 30 minutos antes a la estimulación con insulina (100nM) y con las isoflavonas (0.1 1 2.5 y 5 μ M).

El estudio de la captación de ácidos grasos se realizó con el kit comercial *QBTTM* (ref. R8132 de *molecular Devices, CA, EE.UU.*) siguiendo las recomendaciones del fabricante que brevemente se resumen a continuación. Tras la aplicación de los tratamientos al cultivo celular, se adicionó 100 μ L del *Loading Buffer* provisto en el kit e inmediatamente después se realizó una medida de la fluorescencia (excitación a 485nm y emisión a 515nm) en el fluorímetro *Tecan infinite M200* (ref. 30016056 de Tecan Austria GMBH, Grödig, Austria). Se realizó una cinética para la lectura de la placa cada 20 seg durante 1,5 o 2 horas.

Debido a la complejidad del análisis de los datos se ha estimado conveniente explicarlo detalladamente en el anexo V. una vez analizados los datos se representaron en porcentaje respecto la situación control.

Tinción de TG con *oil red*

Este ensayo se realizó sobre células adipocíticas 3T3-L1 cultivadas y diferenciadas como se describe en el apartado de *Cultivo celular: adipocitos 3T3-L1* y la toma de muestra se realizó como se detalla en el apartado *Obtención de lisados celulares* a excepción del lisado celular. Este paso se sustituyó por la incubación de las células directamente en la placa de cultivo con 500 μ L paraforma aldehído durante una hora a TA con el fin de fijar las células. Mientras tanto, se preparó la solución *Oil Red* a razón de 4,2 ml de la solución madre (ref. 01516 de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) en 2,8ml de agua milliQ, se incubó la mezcla 20 minutos a TA y se filtró a tamaño de poro

de 0,2 μm . A continuación, se lavaron las células con 500 μL de isopropanol al 60% y se dejó evaporar completamente. Posteriormente, se añadió la solución OIL RED preparada previamente a razón de 200 $\mu\text{L}/\text{well}$ y se incubó 10 minutos a TA. Transcurrido este tiempo, se lavaron las células con agua milliQ un total de 5 veces para eliminar completamente los restos de la solución OIL RED y se tomaron las fotos pertinentes. Por último se eluyó el OIL RED con 750 $\mu\text{L}/\text{pocillo}$ de Isopropanol al 100% durante 10 min y se midió la absorbancia elución a 492nm.

Estimación de la actividad antioxidante por DCFH-DA

El DCFH-DA (ref. D6883 de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) se utiliza como indicador de las formación de peroxinitrito. Después de la hidrólisis de grupo diacetato de la molécula (-DA) por la acción de las esteasas intracelulares el DCDHF es oxidado por el peroxinitrito originando DCF, un compuesto con capacidad de emitir fluorescencia que puede ser motorizada a una longitud de onda de 500 nm. La incorporación del DCFH-DA en las células se realizó como se describe a continuación.

Se diferenciaron la línea celular L6 a miotubos y la obtención de los lisados celulares fruto de posterior estudio se realizó como se describe en sus correspondientes apartados. Para este ensayo se requirió añadir DCFH-DA (10 μM) a todas las muestras y cuando fue necesario, Nacetil cisteina (100 μM) y TROLOX (300U/ml). Se incubaron las células durante 30 min. Posteriormente, se lavaron las células con medio Hank's (es importante hacerlo en un medio sin fenol red para que no interfiera en la lectura colorimétrica) a razón de 500 μL por pocillo y se realizó una lectura basal en el luminómetro que previamente ha estado atemperado a 37 °C. Posteriormente se trataron las células con EGCG (0,5; 2,5 y 5 μM) y se realizó una cinética durante dos horas cada 2 minutos para la medida de la absorbancia que se realizó a 500 nm.

Los datos de las absorbancias de los tratamientos se compararon con los de la situación control y su relación se expresó en porcentaje.

Estimación de la respiración mitocondrial por consumo de oxígeno

Este estudio se realizó en células L6 diferenciadas y se llevó a cabo en el equipo de respirometría de alta resolución *Oxygraph-2K* (Oroboros, Austria) en el que el oxígeno disuelto en el medio difunde a través de una membrana de teflón y posteriormente se reduce al entrar en contacto con un electrodo de platino polarizado a 0,8V, este proceso genera una corriente eléctrica detectada por el equipo.

Para los experimentos que se presentarán en la sección de resultados y discusión se cuantificó tanto el consumo total de oxígeno en presencia de sustrato y ADP, consumo de oxígeno *ACOPLADO*, que se relaciona con la producción de de ATP y el consumo de oxígeno tras la adición de un bloqueante de la ATPasa, la oligomicina, estimando así el consumo de oxígeno *DESACOPLADO* de la producción de ATP. Los detalles del protocolo experimental se comentan a continuación.

Las células L6 se diferenciaron como se explica en el apartado de *cultivo celular: microtubos L6*. Al cabo de 7 días posteriores al inicio de la diferenciación se realizó una retirada de suero durante 4 horas en medio Hank's. Mientras tanto, se preparó una disolución 5 mM de EGCG en medio Hank's.

Una vez transcurridas las 4 horas de retirada de suero, se recogieron las células en viales estériles y se dividieron en parte iguales entre las dos cámaras del equipo que previamente habían estado atemperadas con medio Hanks a 37 °C y con agitación suave (200 rpm). Transcurridos en tiempo necesario hasta la estabilización de la señal, entre 5 y 10 minutos desde la incorporación de las células, se trataron las células de una cámara con la solución previamente preparada de EGCG a concentración final 5µM añadiendo el mismo volumen de agua en la otra cámara.

Los datos del consumo de oxígeno se recogieron tras la estabilización de la señal. Cuando fue necesario la estimación del consumo de oxígeno *desacoplado* se añadió a ambas cámaras oligomicina (1 µg/ml).

Estudio de la activación de PPAR's

Para llevar a cabo esta estimación de la actividad ligante de las isoflavonas y/o el EGCG sobre los PPAR's fue necesario la aplicación de los siguientes protocolos

Condiciones de siembra celular

Este tipo de estudios se realizó en la línea celular FAO, siguiendo las especificaciones de cultivo indicadas en el apartado de *cultivo celular: Hepatocitos FAO*. Las células se cultivaron en placas de 10 cm hasta alcanzar una confluencia del 80%. En este punto, se lavaron con PBS para retirar el suero remanente, se resuspendieron de nuevo en placas de 10 cm a una concentración de $4.5 \cdot 10^5$ células/mL, se incubaron en ambiente controlado durante 24h y se prosiguió con la transfección celular.

Transfección celular

En primer lugar se prepararon los reactivos *MIX A* (preparación de los plásmidos a transfectar) y *MIX B* (preparación del agente transfectante) de forma independiente con los componentes que se definen en la tabla 21 previamente descongelados a TA y mezclados por agitación fuerte (tipo *vortex*) para su homogenización.

Tabla 21. Composición de las Mix realizadas para la transfección celular

REACTIVO	COMPUESTO	DESCRIPCIÓN	CONCENTRACIÓN
MIX A	Optimem	<i>Medio óptimo para realizar la transfección</i>	1,5 mL
	P4XUASg-tk-luc	<i>Plásmido con Firefly luciferasa</i>	5 µg
	pRL-CMV	<i>Plásmido con Renilla luciferasa</i>	50 ng
	<i>Plus Reagent</i>	<i>Compuesto que facilita la transfección</i>	15 µL
	pM-hPPAR (α o γ)	<i>Plásmidos de interés (PPARα o γ)</i>	1 µg
MIX B	Optimem	<i>Medio óptimo para realizar la transfección</i>	1,5 mL
	lipofectamina	<i>Vehículo de transfección</i>	30 µL

Posteriormente se añadió el Mix A al Mix B y la mezcla resultante se incubó 30 minutos a TA. Transcurrida la media hora, se añadió 1.2mL de Optimem a la mezcla anterior y se homogenizó por agitación fuerte (*vortex*), el volumen total de esta mezcla se

sustituyó por el medio de cultivo celular y se incubaron las células 4 horas en ambiente controlado. Transcurrido este tiempo se continuó con el protocolo de estimulación de PPAR's.

Estimulación de PPAR's

El objetivo de este estudio fue el de analizar si los compuestos estudiados en esta Tesis (isoflavonas y EGCG) presentaban capacidad ligante, a concentraciones fisiológicas, sobre los PPAR's por lo que una vez realizada la transfección con los plásmidos de interés se trataron las células con dichos compuestos. Como control positivo se utilizaron: el compuesto GW7647, descrito como ligante específico de PPAR α , a concentraciones 0,1; 1 y 10 nM y Troglitazona, descrita como ligante específico de PPAR γ , a concentraciones 0,1; 1 y 5 μ M.

Tanto los compuestos fruto de estudio como los controles positivos se prepararon en el medio específico para el cultivo de células FAO y se distribuyeron a razón de 50 μ L por pocillo en una placa ELISA, repitiendo cada tratamiento un mínimo de 5 veces. Posteriormente se resuspendieron las células transfectadas y se normalizaron a una concentración de $6 \cdot 10^5$ células/mL de la cual se añadió 50 μ L por pocillo a la placa ELISA previamente preparada con los tratamientos. Por último se incubaron las células 24 horas en ambiente controlado. Al día siguiente se estimó el grado de activación de los PPAR α y γ mediante un ensayo luciferasa como se describe a continuación.

Ensayo Luciferasa

Este ensayo se realizó usando el kit comercial *dual luciferase system* (Promega, MO, EE.UU.) que se fundamenta en la lectura de la fluorescencia de las luciferasas incluidas en los plásmidos transfectados con la particularidad de que la activación de *Renilla* presente en el plásmido utilizado como control interno (pRL-CMV) inhibe (*quenchea*) la fluorescencia de la *Firefly* presente en los plásmido con los genes de interés. Cada luciferasa se activa con un reactivo específico provisto en el kit. En primer lugar se mide la fluorescencia de la *Firefly* excitada por el reactivo *LARII* y posteriormente el de la *Renilla* con el reactivo *STOP and GLO*. Para realizar este ensayo se siguieron las recomendaciones del fabricante que se resumen a continuación.

En primer lugar se descongelaron los reactivos *LARII* y *STOP and GLO* a TA. Mientras tanto, se lavaron las células fruto del protocolo anterior, con 150 µL de PBS por pocillo con el fin de eliminar el medio de cultivo con los tratamientos para que no interfieran en la lectura de la fluorescencia de la muestra. Se eliminó completamente el PBS, se añadieron 25µL/pocillo del tampón de lisado celular provisto en el kit y se agitó la placa a velocidad moderada durante 15 minutos y a 25°C.

Por último se colocó la placa en el luminómetro *LUMIstar OPTIMA* (BGM labtech, Tokio, Japón) y se realizó las lecturas de fluorescencia.

Estimación del ratio ADP/ATP

Para hacer este análisis se utilizó el kit comercial *ApoSENSOR ADP/ATP Ratio Assay Kit* (ref. k255-200 de BioVision, Milpitas, CA, EE.UU.) siguiendo las recomendaciones del fabricante y que se resumen a continuación. En primer lugar la obtención de las muestras se realizó como se ha descrito en el correspondiente apartado. A estas muestras se les añadió 100µL de tampón NR del kit y se incubaron durante 5 minutos a TA y en agitación constante.

Para la medida de los niveles totales de ATP en las muestras se añadió 1 µl del reactivo *ATP Monitoring Enzime* y se midió la luminiscencia en menos de un minuto (dato A). Se realizó una segunda medición al cabo de 10 minutos (dato B). La medición del ADP se realizó añadiendo al medio 1µl del reactivo *ADP Converting Enzime* y se midió la luminiscencia en menos de un minuto (dato C). Por último se calculó el ratio ADP/ATP aplicando el siguiente fórmula:

$$\text{Ratio ADP/ATP} = \frac{\text{Dato C} - \text{dato B}}{\text{Dato A}}$$

Análisis estadístico

Como prueba estadística para la valoración de las diferencias entre las medias de los grupos experimentales se utilizó un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía comprobando previamente la normalización y la igualdad de las variantes entre grupos. El nivel mínimo de significación fue de 0.05 en todas las comparaciones y el grado de significancia obtenido se representó gráficamente con * en el caso de $p < 0.05$ o ** en el caso de que $p < 0.01$. Los parámetros y las pruebas estadísticas se realizaron con el programa SPSS Statistics 17.0 (Inc. Chicago, IL, EE.UU.)

Resultados y discusión

Estudio *in vitro* de las vías moleculares de actuación de las isoflavonas como moduladoras del metabolismo energético

Son muchos los estudios clínicos que demuestran efectos beneficiosos derivados del consumo de soja en pacientes con SM. Por su parte, se han publicado trabajos en los que se intenta explicar los mecanismos moleculares por los cuales, diferentes compuestos bioactivos presentes en la soja, en especial las isoflavonas, aportan los efectos beneficiosos sobre el control del metabolismo energético. Aunque la mayoría de estos trabajos se han realizado tanto en modelos *in vivo* como *in vitro*, la extrapolación de los resultados al ámbito de la alimentación funcional se presenta limitada debido, por una parte, a que las concentraciones de isoflavonas utilizadas en la mayoría de estos trabajos se encuentran muy por encima de las concentraciones plasmáticas medidas en individuos que ingieren soja de forma habitual, por lo que los fenómenos descritos serían atribuibles más bien a nivel farmacológico que al dietario. Por otra parte, son muy escasos los estudios que se realizan en modelos celulares insulinoresistente, por lo que los resultados obtenidos poco se pueden relacionar con mejorías en situación de SM, ya que principalmente se caracteriza por una disminución de la sensibilidad insulínica.

Con intención de aportar conocimientos que ayuden a entender los fenómenos asociados al consumo de soja en las condiciones fisiopatológicas del SM se planteó una de las líneas de investigación de esta Tesis en la que se estudiaron las vías moleculares y los efectos metabólicos atribuibles directamente a las isoflavonas derivadas de la **ingesta de soja**. Para ello, se realizaron una serie de estudios *in vitro* en los que se tuvo en cuenta la biodisponibilidad de las isoflavonas en humanos y sus efectos en los principales tejidos diana de la acción insulínica como son: el músculo esquelético, el tejido adiposo y el tejido hepático. Con este fin, se utilizaron las líneas celulares miotubos L6, adipocitos diferenciados 3T3-L1 y hepatocitos FAO.

A continuación se presentan los resultados obtenidos durante la elaboración de este apartado de Tesis y la discusión de los mismos que ayudará a entender tanto la línea de actuación seguida como la interpretación de los resultados obtenidos.

Efectos de las isoflavonas a nivel de músculo esquelético: modelo de miotubos L6

Validación del modelo

La ATCC (*American Type Culture Collection*) dispone de varias líneas celulares, como: NOR-10, BLO-11, BC3H1, L8, H9c2 (2-1), G-7, C2C12, o L6, que pueden ayudar a estudiar diferentes características del músculo esquelético. Debido a que el objetivo principal de esta Tesis es el estudio del metabolismo celular se eligió la línea L6, por estar muy referenciada en la bibliografía para el estudio del metabolismo del músculo esquelético (Mandel, Pearson 1974, Richler, Yaffe 1970, Yaffe 1968, Osawa et al. 1996a, Osawa et al. 1996b). Antes de profundizar en su estudio se realizaron una serie de experimentos para poner a punto el modelo.

Validación Morfológica

Una de las principales características morfológicas de las fibras musculares es que son células cilíndricas y multinucleadas, estadio al que se llega después de la diferenciación de los mioblastos L6 siguiendo el protocolo que se describe en el correspondiente apartado de la sección de materiales y métodos y mostrado en la siguiente figura.

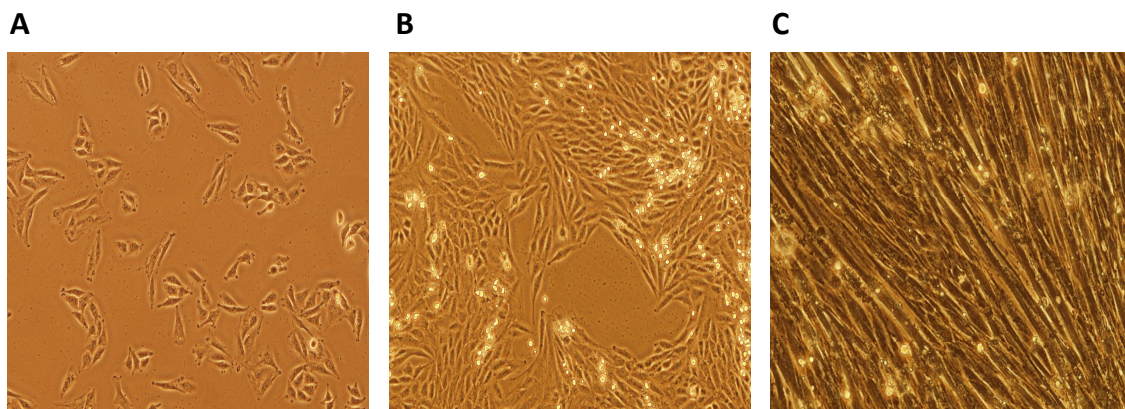


Figura 16. Cambios fenotípicos durante la diferenciación de mioblastos L6 a miotubos L6. A: imagen representativa (10X) de la siembra celular, B: imagen representativa del momento del comienzo de la diferenciación o día cero, que corresponde con un 70% de confluencia. C: imagen representativa (40X) de la situación morfológica en el momento de la aplicación de los tratamientos, que corresponde a 7 días en condiciones de diferenciación.

En la serie de imágenes de la figura 16 se pueden apreciar los cambios fenotípicos que presentan el modelo celular de mioblastos L6 desde el momento de la siembra (figura 16A) hasta la formación de los miotubos (Figura 16 C). En la figura 16B se representa el estadio fenotípico en el que se encuentran las células en el día cero, definido como tal el día que se comienza el proceso de diferenciación.

En la figura 16C se aprecia la conformación cilíndrica de las células, pero no está tan claro que dentro de estas estructuras se encuentren varios núcleos. Para comprobar este fenotipo se realizó una inmunotinción cuyo resultado se presenta en la siguiente figura.

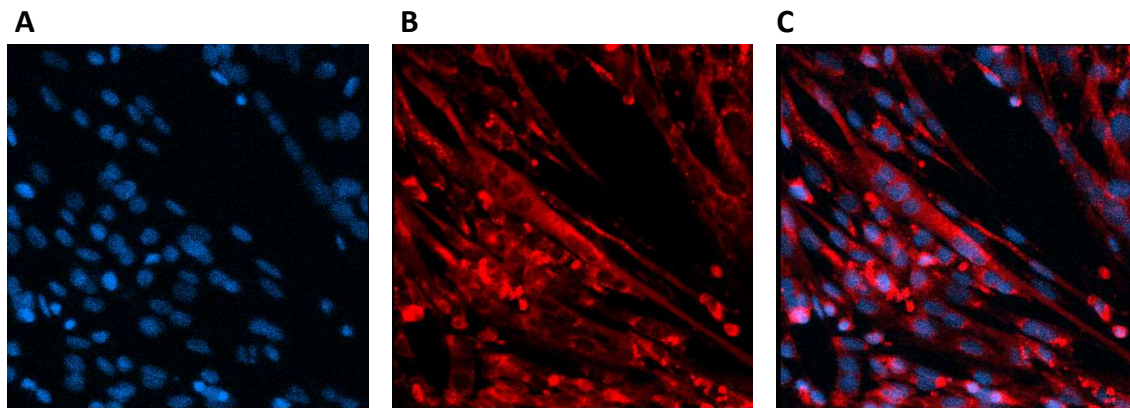


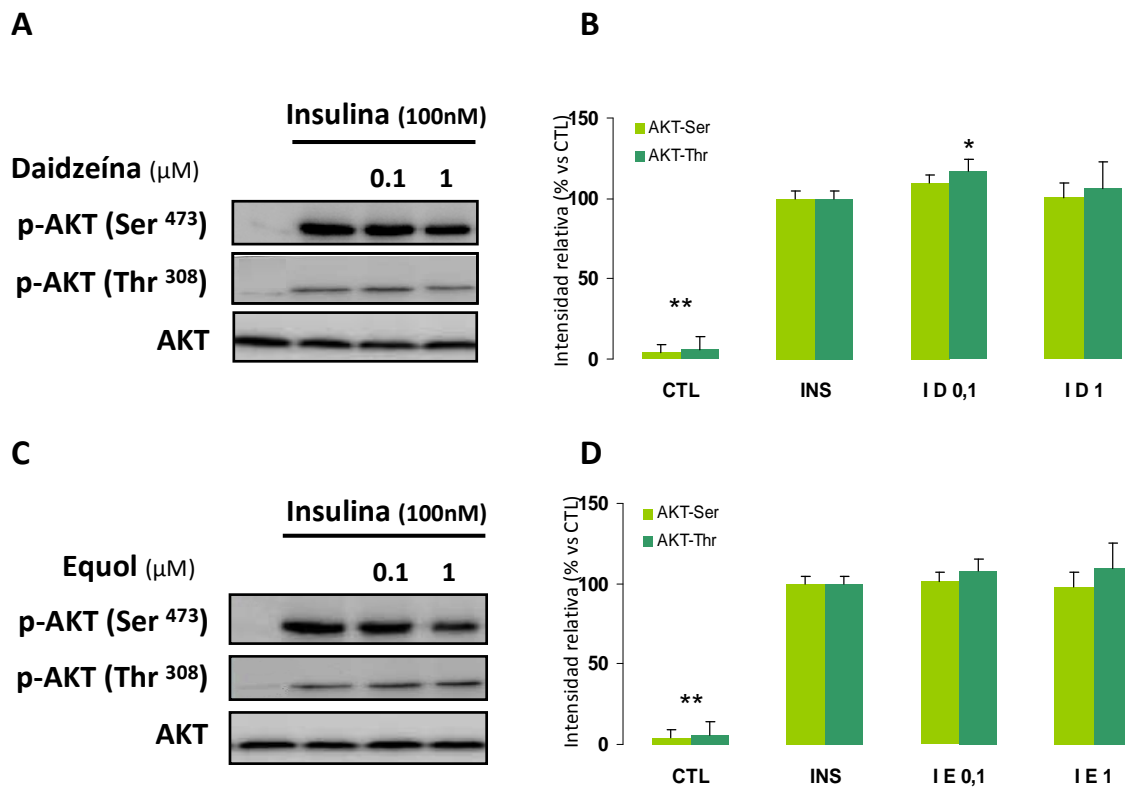
Figura 17. Caracterización morfológica multinuclear del modelo de miotubo diferenciado L6.
A: Tinción de núcleos con DAPI. B: Inmunotinción de mitocondrias D: intersección de ambas imágenes, donde se aprecia la formación del miocito.

La superposición de las imágenes de tinción nuclear (Figura 17 A) con las de tinción de mitocondrias (Figura 17 B) demuestra que las células generadas durante el proceso de diferenciación también son multinucleares (Figura 17 C), de esta se comprueba la validez fenotípica del modelo.

A parte de comprobar que fenotípicamente el modelo elegido, sometido a procesos de diferenciación durante 7 días, presenta una morfología comparable a la de la fibra muscular, es necesario corroborar que también lo es su fisiología. Está aceptado por la comunidad científica que el músculo esquelético es un tejido sensible a la acción de la insulina así que se quiso comprobar si también lo era el modelo celular elegido.

Validación Molecular: vía de señalización insulínica.

Está ampliamente descrito que la unión de la insulina a su receptor específico (IR), desencadena la transducción de señal insulínica en diferentes tejidos (Pessin, Saltiel 2000; Kruger et al. 2008). A nivel molecular, este efecto se ve reflejado en cambios en el estado de fosforilación de diferentes proteínas clave de la vía como, por ejemplo, de la AKT. La estimulación insulínica activa la fosforilación de esta quinasa en sus residuos Ser⁴⁷³ y Thr³⁰⁸ (Taniguchi, Emanuelli & Kahn 2006) por lo que se puede estimar la activación de la vía insulínica por el análisis de la fosforilación de estos residuos. En este contexto, se quiso comprobar si el modelo diferenciado presentaba insulinosensibilidad estimada por un incremento de la fosforilación de esta quinasa dependiente de insulina para lo que se estimularon los miotubos diferenciados durante 10 minutos con insulina 100 nM (Figura 18). A parte, también se quiso comprobar los posibles efectos sobre esta vía dependientes de tratamientos con daidzeína, equol y genisteína para lo que se trataron las células con estas isoflavonas durante el mismo tiempo y momento que la insulina.



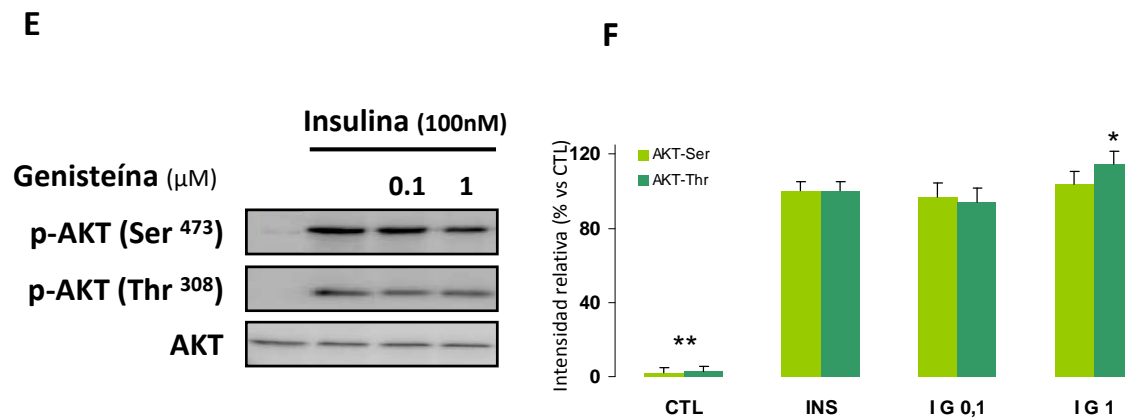


Figura 18. Efectos de daidzeína, equol y genisteína sobre la fosforilación de AKT en miotubos L6.

A/C/E: imágenes representativas de la inmunodetección de miotubos estimulados con Insulina 100nM, daidzeína, equol y genisteína a 0.1 y 1μM. La detección tanto de las fosforilaciones de AKT en la Ser⁴⁷³ y en la Thr³⁰⁸ como de las concentraciones totales de AKT fue realizada por la técnica de WB. **B/D/F:** Análisis densitométrico de la proteína fosforilada normalizada por la concentración total de la misma. Los valores se muestran como la media ± la DE (n≥3) (* p<0,05 en referencia al control). En el eje de ordenadas se indican los tratamientos de las muestras analizadas donde **CTL:** muestras tratadas con vehículo (DMSO), **INS:** con insulina 100nM, **D:** daidzeína, **E:** Equol, **G:** Genisteína, **0.1 y 1** concentración μM de isoflavonas.

En la figura 18 se puede comprobar como los miotubos L6 diferenciados presentan un importante incremento de la fosforilación de AKT tanto en la Ser⁴⁷³ como en la Thr³⁰⁸, dependiente de insulina. A tenor de los resultados, se puede aseverar que el modelo elegido presenta sensibilidad a la insulina.

Por su parte, el efecto de las isoflavonas sobre la estimulación insulínica es dependiente del residuo de AKT analizado. No varían de forma significativa la fosforilación de AKT en Ser⁴⁷³, aunque tratamientos con daidzeína 0,1 μM y con genisteína 1 μM sí que resultan en un incremento de la fosforilación de AKT en su Thr³⁰⁸. Este fenómeno sugiere que ambas isoflavonas podrían presentar efectos específicos sobre PDK1 ya que es la quinasa responsable de la fosforilación de AKT en Thr³⁰⁸. En este sentido, estacar los resultados obtenidos por Joy y colaboradores que sugieren que la daidzeína, equol y genisteína son capaces de estimular la fosforilación de AKT en la Ser⁴⁷³ (Joy et al. 2006), si bien es cierto que este potencial es sugerido por la capacidad de estas isoflavonas en estimular la producción de NO en células endoteliales, y que sólo es corroborado en el caso del equol.

Independientemente de esta disyuntiva y debido a que para la transducción de la señal insulínica se requiere la activación total de AKT en los dos residuos (Taniguchi, Emanuelli & Kahn 2006) se puede decir que, de forma general, las isoflavonas a concentraciones 0.1 y 1 μ M no aportan un incremento significativo al causado por la insulina sobre la activación total de AKT en miotubos L6.

Aunque se han comprobado el posible efecto de las isoflavonas en la fisiología “normal” de las células, es interés de esta Tesis el efecto de las isoflavonas en contexto de RI para poder estimar su efecto preventivo sobre el SM. Una vez corroborado el modelo en cuanto a parámetros de señalización insulínica, se quiso poner a punto un modelo representativo de la fisiopatología del SM que se caracteriza por una deficiente transducción de señal insulínica (Lann, Gallagher & Leroith 2008) es decir, por presentar cierto grado de RI.

Modelo de miotubos L6 insulinoresistentes

Para poner a punto el modelo de RI se testaron diferentes compuestos susceptibles de interferir en la señalización insulínica con son el factor de necrosis tumoral α (TNF α), la ceramida 2 (C2), palmitato (Palm) o H₂O₂ generado por glucosa oxidasa (GOX) en presencia de glucosa.

Una vez obtenidos los miotubos diferenciados, se realizó una deprivación de suero durante 3,5 horas y posteriormente se incubaron los miotubos durante 30 minutos con TNF α (40 ng/mL), C2 (50 μ M), Palm (2 mM) y Glucosa/GOX (100 mU/mL). La pérdida de eficiencia de transducción de señal debida a estos compuestos se valoró por la cuantificación de la pérdida de fosforilación no sólo de AKT sino que también de ERK 1 y 2, proteínas descritas como claves para la valoración de la transducción de señal inducida por la insulina (Taniguchi, Emanuelli & Kahn 2006). Para ello, transcurrida la media hora con la incubación de los inductores de RI se estimularon las células durante 10 minutos con insulina, transcurrido este tiempo se realizó la recogida de lisados celulares como se describe en el correspondiente apartado de materiales y métodos y se analizaron los resultados por WB obteniendo las imágenes que se muestran en la siguiente figura (Figura 19).

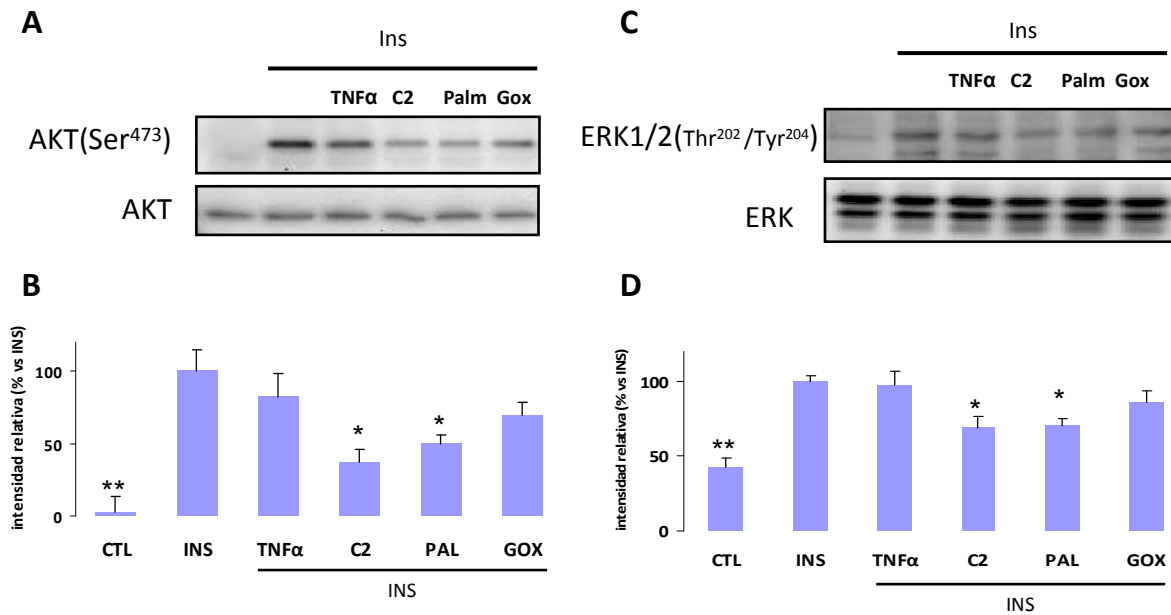


Figura 19. Efectos del TNF α , ceramida 2, palmitato y glucosa oxidasa como inductores de insulinoresistencia.

Imágenes representativas de la inmunodetección de AKT (A) y ERK 1 y 2 (B) de miotubos incubados durante media hora con TNF α 40ng/mL, Ceramida (C2) 50 μ M, Palmitato (PAL) 2mM y Glucosa Oxidasa (GOX) 100mU/mL y posteriormente con Insulina (INS) 100nM durante 10 minutos. La detección tanto de las proteínas fosforiladas como de las totales fue realizada por la técnica de WB. B/D: Análisis densitométrico de la proteína fosforilada normalizada por la concentración total de la misma. Los valores se muestran como la media \pm DE ($n \geq 3$) (* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ en referencia al grupo INS).

La estimulación de los miotubos L6 con insulina resulta en un considerable incremento de la fosforilación tanto de AKT (Figura 19 A y B) como de las ERK's (Figura 19 C y D). Dicho efecto se ve revertido con la preincubación de todos los inductores de RI testados (Figura 19), aunque sólo muestran diferencias significativas los tratamientos con C2 (50 μ M) y con Palm (2 mM). Debido a que las mayores diferencias significativas se obtuvieron con los tratamientos con C2 se eligió este compuesto como inductor de RI en miotubos L6 para los sucesivos experimentos.

En conclusión, el modelo elegido se comporta de manera similar al miotubo tanto en condiciones fisiológicas normales, ya que la insulina estimula la fosforilación de las quinasas claves de la vía de transducción de la señal, AKT y ERK 1/2, como en condiciones de resistencia a la insulina debido a la pérdida significativa de la fosforilación inducida por la insulina por parte de todos los inductores de RI testados. Puesto a punto el modelo, se pasó a comprobar los efectos de la isoflavonas en situación de IR.

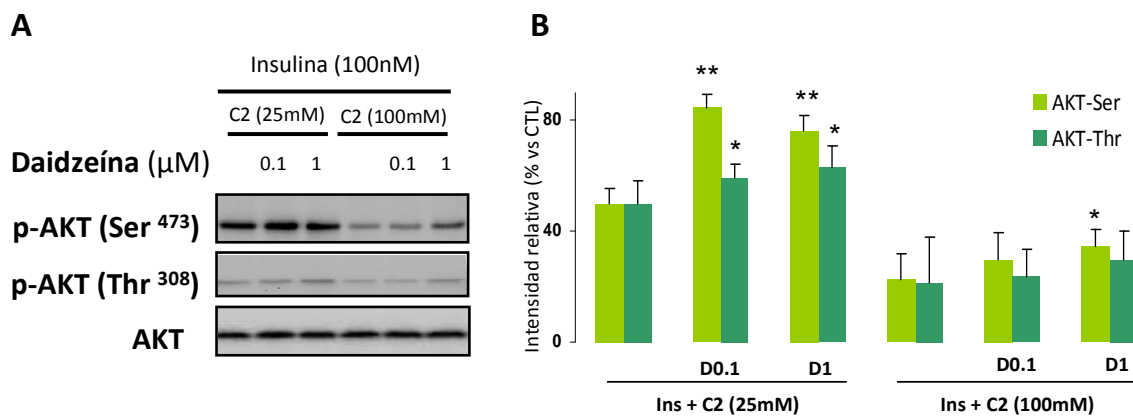
Efectos moleculares de las isoflavonas en miotubos L6 insulinoresistentes.

Para realizar este estudio se quiso comprobar si las isoflavonas eran capaces de revertir el efecto inhibitorio que causa la preincubación con ceramida, sobre las quinasas AKT y ERK1/2. Además, se quiso comprobar si existía un componente dosis dependiente tanto en los tratamientos con las isoflavonas como en la estimulación de la insulinoresistencia con ceramida.

AKT

Como se puede apreciar en la Figura 20, la adición de ceramida a concentraciones 25 y 100 μM , durante dos horas previas a la estimulación con insulina, resulta en un descenso de la fosforilación, estimulada por insulina, de esta quinasa tanto en la Ser⁴⁷³ como en la Thr³⁰⁸. Este componente dosis dependiente sugiere a la posibilidad del estudio de diferentes grados de RI mediados por la ceramida.

Por su parte, las isoflavonas son capaces de revertir los efectos del tratamiento con ceramida 25 μM , especialmente la daidzeína ($p > 0,01$; Figura 20 B) tanto a 0,1 como a 1 μM . En cuanto a los tratamientos con altas dosis de ceramida (100 μM), el efecto de reversión de las isoflavonas desaparece, sobretodo con los tratamientos a 0,1 μM (Figura 20). En este grupo, es destacable el efecto de la daidzeína ya que, a concentraciones de 1 μM , revierte de forma significativa la inhibición de fosforilación inducida por la ceramida.



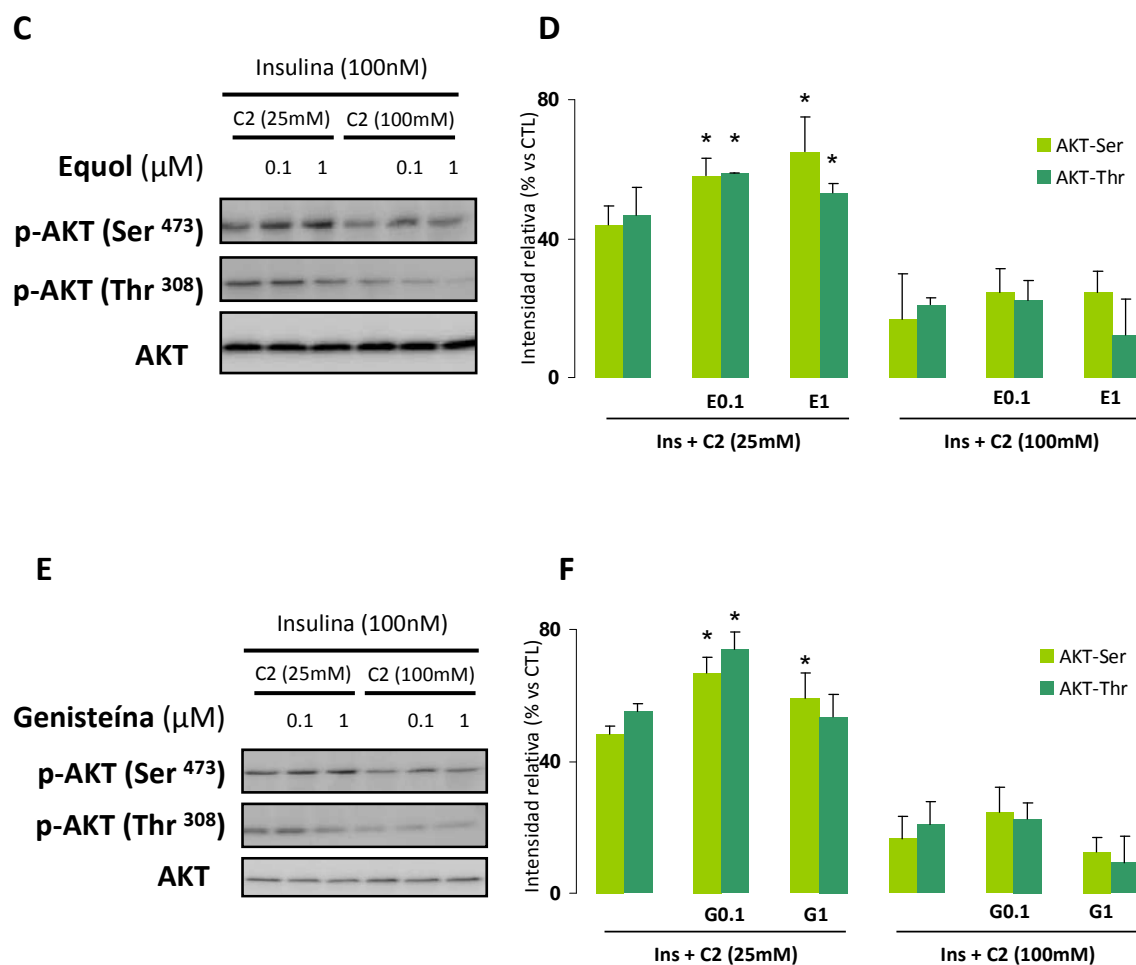


Figura 20. Efectos de daidzeína, equol y genisteína sobre la fosforilación de AKT en miotubos L6 en situación de RI.

A/C/E: imágenes representativas de la inmunodetección de miotubos RI tratados con Insulina (INS) 100nM, Ceramida (C2) 25 y 100 μM ; daidzeína (D), equol (E) y genisteína (G) a 0.1 y 1 μM . La detección tanto de las proteínas fosforiladas como de las totales fue realizada por la técnica de WB. **B/D/F:** Análisis densitométrico de la proteína fosforilada normalizada por la concentración total de la misma. Los valores se muestran como la media \pm DE ($n \geq 3$) (* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ en referencia al grupo control).

ERK1 y 2.

De forma similar a la que se acaba de presentar en los resultados sobre AKT, la preincubación de miotubos L6 con ceramida inhibe la fosforilación que aporta la insulina sobre las ERK (Figura 21). Dicho efecto es revertido de forma significativa por parte de todas las isoflavonas a excepción del tratamiento con equol a 0,1 μM (Figura 21). Cabe resaltar que las mayores diferencias se observan con los tratamientos con daidzeína 0,1 μM y genisteína 1 μM , condiciones a las cuales la reversión del efecto de la ceramida es prácticamente total, alcanzando unos niveles equiparables a los obtenidos en la situación de referencia.

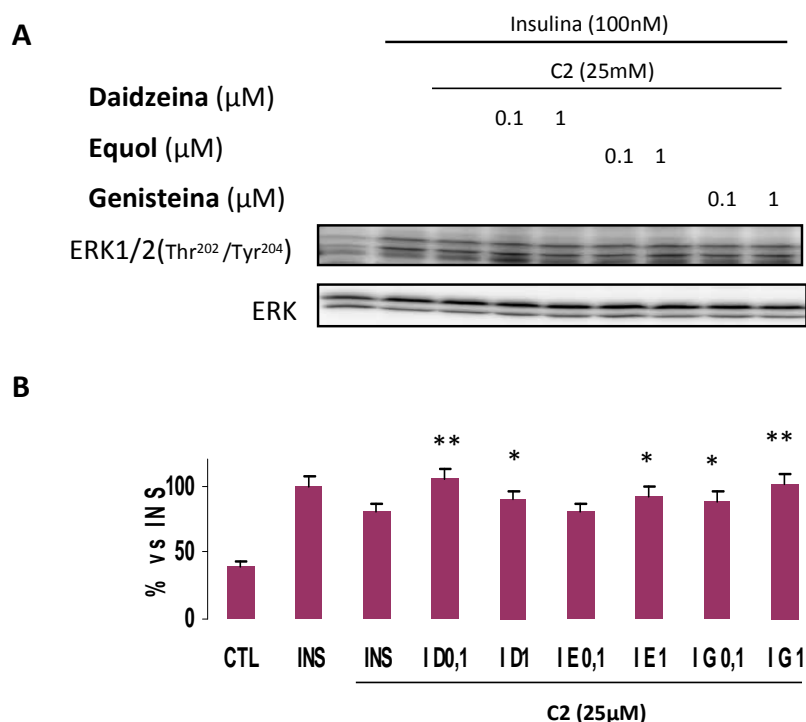


Figura 21. Efectos de daidzeína, equol y genisteína sobre la fosforilación de ERK 1 y 2 en miotubos L6 en situación RI.

A: imágenes representativas de la inmunodetección de miotubos RI tratados con Insulina (INS) 100nM, Ceramida (C2) 25 y 100μM; daidzeína (D), equol (E) y genisteína (G) a 0.1 y 1μM. La detección tanto de las proteínas fosforiladas como de las totales fue realizada por la técnica de WB. **B:** Análisis densitométrico de la proteína fosforilada normalizada por la concentración total de la misma. Los valores se muestran como la media ± DE (n≥3) (* p<0,05 ** p<0,01 en referencia al grupo control).

Debido a los resultados mostrados se puede afirmar que las isoflavonas daidzeína, equol y genisteína a dosis fisiológicas y en condiciones de RI, son capaces de estimular la actividad de tanto de AKT como de ERK1 y 2. Sin embargo, sólo con estos resultados no se puede aseverar que este fenómeno este mediado por la activación del receptor de la insulina, ya que ambas quinasas, aún siendo claves en la transducción insulínica, no son exclusivas de este proceso y pueden ser activadas por otros estímulos. A modo de ejemplo, AKT puede ser activada por el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) o el factor de crecimiento epidérmico (EGF)(Liao, Hung 2010). Por su parte ERK1 y 2 pueden ser activados por cualquier compuesto mitogénico (Cargnello, Roux 2011). Una buena estrategia para resolver si los efectos de las isoflavonas vienen mediados por acciones directas sobre la vía insulínica es realizar el estudio de otras de las proteínas involucradas en esta vía. Con este fin se estudiaron los posibles efectos de las isoflavonas en proteínas *Upstream* y *Downstream* de la vía cuyos resultados se presentan a continuación.

Efectos *Upstream*: IRS1

El sustrato del receptor de insulina 1 (IRS1) presenta una regulación compleja debida, entre otras características, a que presenta muchos residuos susceptibles de ser fosforilados (Zick 2005). Sin embargo se eligió esta proteína para el estudio *Upstream* debido a que es el punto de la transducción de la señal insulínica a partir del cual la vía se bifurca hacia la vía del AKT o de las MAPK.

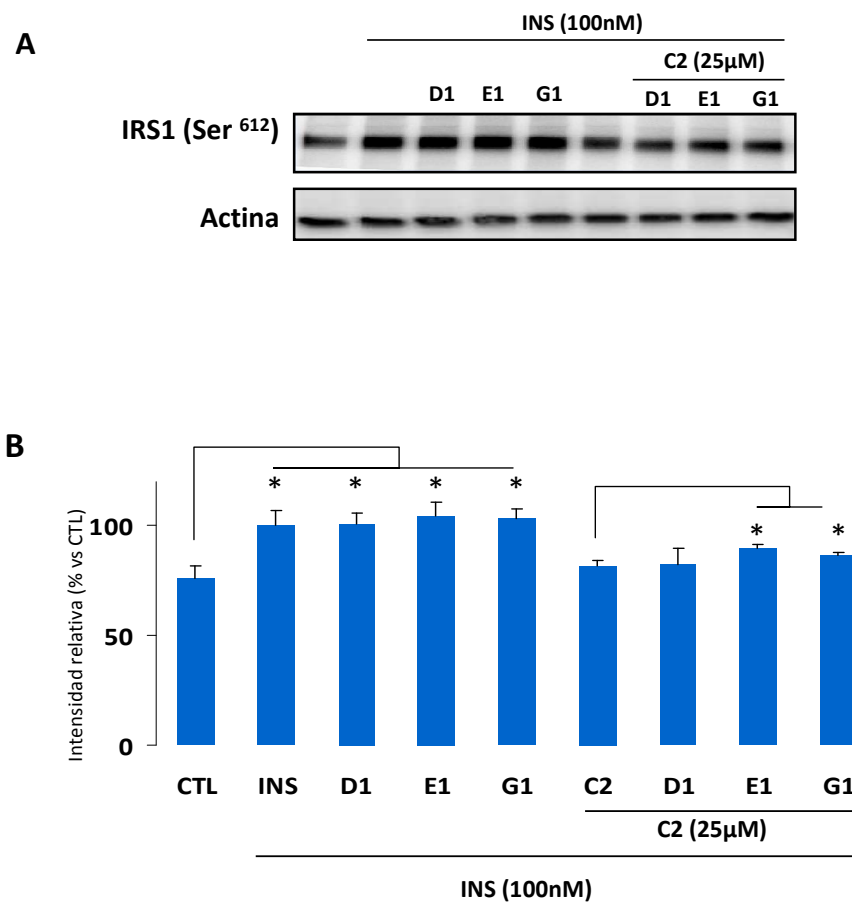


Figura 22. Efectos de la daidzeína, equol y genisteína sobre la fosforilación de IRS1 en miotubos L6 en situación normal y de RI.

A: imágenes representativas de la inmunodetección de miotubos RI tratados con Insulina (INS) 100nM, Ceramida (C2) 25 μ M; daidzeína (D), equol (E) y genisteína (G) a 1 μ M. La detección tanto de la fosforilación de IRS1 en la Ser⁶¹² como de la actina fue realizada por la técnica de WB. **B:** Análisis densitométrico de la proteína fosforilada normalizada por la concentración total de actina. Los valores se muestran como la media \pm DE ($n \geq 3$) (* $p < 0,05$ en referencia al grupo control).

Comparado con el vehiculo, los miotubos L6 tratados con insulina muestran un incremento significativo de la fosforilación de IRS-1 en la serina 612 (Ser⁶¹²) (Figura 22). Este fenómeno aporta robustez al empleo de este modelo para el estudio metabólico de miotubos estimulados con insulina.

En situación normal, la preincubación durante 10 minutos con insulina y las isoflavonas no aporta diferencias significativas respecto a la estimulación sólo con insulina. Sin embargo, cuando se adiciona ceramida al sistema, tanto el equol como la genisteína a concentraciones 1 μ M, son capaces de revertir el efecto del inductor de RI.

En relación a los efectos sobre la activación de IRS1 estimada por la fosforilación de su residuo Ser⁶¹² se puede afirmar que, aunque parece que las tres isoflavonas revierten el efecto de la pérdida de señalización por ceramida, sólo denotan cambios significativos el equol y la genisteína. Cabe la pena comentar que el hecho de que no se hayan encontrado diferencias significativas con tratamientos con daidzeína puede ser debido a una mayor variabilidad de los datos en la reproducibilidad de los experimentos, fenómeno que se puede ver reflejado en las barras que representan la desviación típica de la figura 22 B.

Efectos *Downstream*: AS160

Existen proteínas *Upstream* compartidas tanto por la vía AKT como la de ERK1/2, sin embargo, la divergencia de estas vías que se hace cada vez más evidente conforme se va transduciendo la señal, hace muy difícil la presencia de una proteína *Downstream* común. Debido a esta situación se eligió el estudio de una proteína *Downstream* que estuviese vinculada directamente con el metabolismo energético celular, objetivo principal de esta Tesis. En este sentido, se analizó el sustrato de AKT de 160 kDa, la AS160 (del inglés *AKT Substrate of 160 kDa*) muy vinculada con el metabolismo energético como se comenta a continuación.

La activación de AKT gobierna la disociación del heterodímero formado por las proteínas Rab GTPasa y AS160, por fosforilación de AS160 en la Thr⁶⁴² (Sano et al. 2003). Este fenómeno origina la *liberación* de Rab-GTPasas implicadas en la reorganización del citoesqueleto que se requiere para la translocación del transportador de glucosa GLUT4 del citosol hacia la membrana plasmática (Larance et al. 2005) incrementando así la captación de glucosa neta.

Debido a lo que se acaba de comentar, parece evidente la relación directa entre el incremento de la fosforilación de AS160 y el de la captación de glucosa. Así que se realizó un ensayo para valorar si las isoflavonas presentaban capacidad de modular la fosforilación de AS160 en situación de RI, cuyos resultados se presentan a continuación.

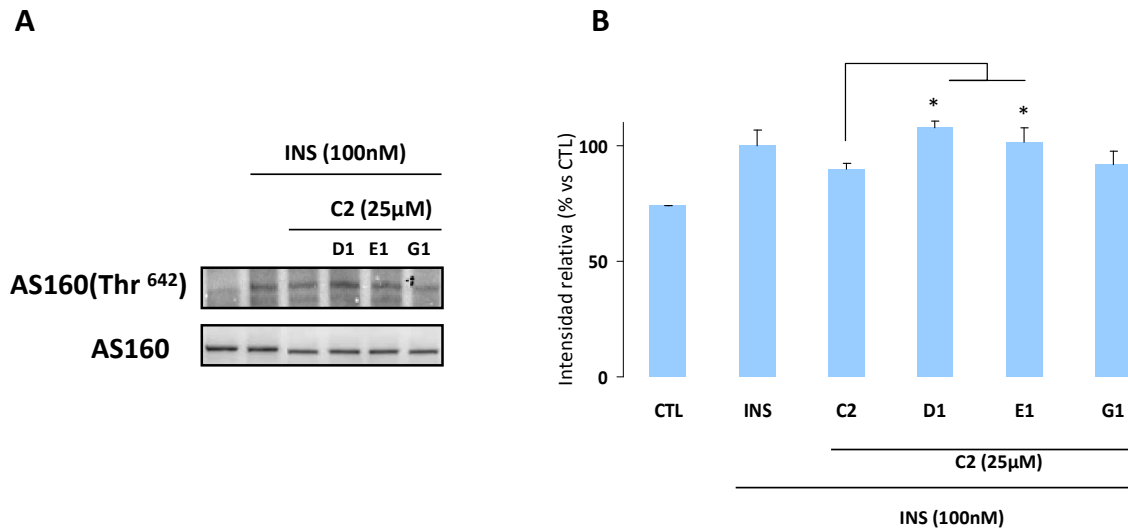


Figura 23. Efectos de la daidzeína, equol y genisteína sobre la fosforilación de AS160 en miotubos L6 en situación de RI.

A: Imágenes representativas de la inmunodetección de AS160 y de su fosforilación en la Thr⁶⁴² en miotubos RI tratados con insulina (INS) 100 nM, Ceramida (C2) 25 µM; daidzeína (D), equol (E) y genisteína (G) a 1 µM. La detección tanto de la fosforilación de AS160 como de la concentración total fue realizada por la técnica de WB. **B:** Análisis densitométrico de la proteína fosforilada normalizada por la concentración total de la misma. Las diferencias entre grupos valores se muestran como la media ± DE ($n \geq 3$) (* $p < 0,05$ en referencia al grupo C2).

Tanto los tratamientos con daidzeína como con equol presentan un incremento significativo de la fosforilación de AS160 en su Thr⁶⁴² respecto a la situación de referencia (C2) (Figura 23). Sin embargo, los tratamientos con genisteína 1 µM, aunque se insinúa un ligero incremento, no revierten el fenotipo ofrecido por la ceramida en miotubos L6 diferenciados. Sin embargo un estudio reciente realizado también en cultivo *in vitro* de miotubos L6, demuestra que la genisteína favorece el incremento de la captación de glucosa mediante la estimulación de la translocación de GLUT4 (Ha et al. 2011). Si bien es cierto que las concentraciones utilizadas son de hasta dos órdenes de magnitud superiores (10 y 100µM) a las utilizadas en esta Tesis (0,1 y 1 µM). En cualquier caso, se puede afirmar que, en situación de RI, el efecto de las isoflavonas sobre la activación de AKT (Figura 20) se reproduce sobre la fosforilación de AS160 (Figura 23).

Aunque como se ha comentado anteriormente, se puede sugerir una estimulación de la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática por un incremento de la fosforilación de AS160, se quiso comprobar si funcionalmente los miotubos RI presentan una mayor incorporación de glucosa dependiente de tratamientos con las isoflavonas. Con este fin, se estimó la captación de glucosa como se describe en materiales y métodos, por medio del compuesto 2-NBDG, un análogo fluorescente de la glucosa (Zou, Wang & Shen 2005).

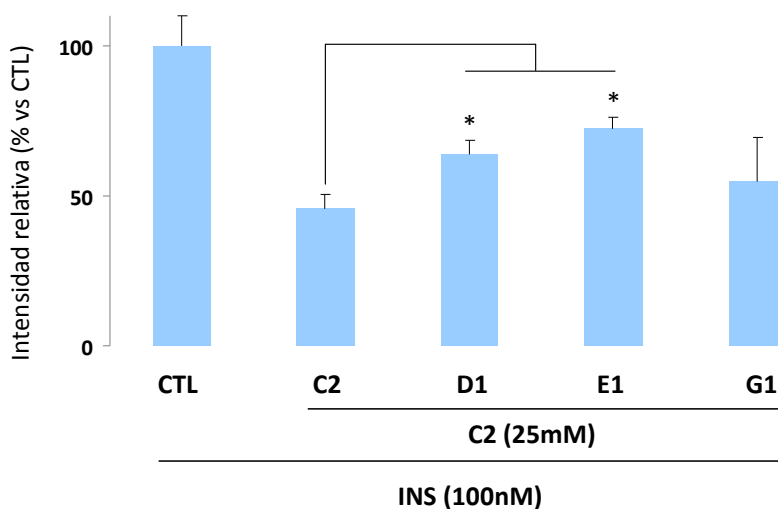


Figura 24. Efectos de daidzeína, equol y genisteína sobre la captación de 2-NBDG.

Análisis densitométrico de la captación de 2-NBDG estimulado por Insulina (INS) 100nM, daidzeína (D), equol (E) y genisteína (G) a 1 μ M y en condiciones de RI inducida por Ceramida (C2) 25 μ M. Los valores se muestran en porcentaje frente a la situación control (CTL) como la media \pm la DE ($n \geq 3$) (* $p < 0,05$ en referencia al grupo C2)

Kae Won Cho et al., demostraron que tratamientos crónicos (5 días) con daidzeína y con equol a dosis fisiológicas, incrementaban la captación de glucosa a la célula debido a que estimulaban la expresión del mRNA de GLUT4 (Cho et al. 2010). Acorde con estos resultados, en este trabajo se ha demostrado que tratamientos agudos con daidzeína y equol son capaces estimular la fosforilación de AS160 en miotubos situación de RI (Figura 23) lo que sugiere un efecto directo sobre el incremento de la captación de glucosa también a corto plazo, hecho que se comprueba en la figura 24.

Por su parte, los efectos de la genisteína no están del todo claros en cuanto al incremento de la captación de glucosa. A tenor de los resultados mostrados en la

figura anterior, no se puede sugerir que la genisteína estimule la captación de glucosa en condiciones de RI vía AS160, sin embargo un estudio reciente realizado en el mismo modelo *in vitro* de miotubos L6, demuestra que la genisteína estimula la translocación de GLUT4 y consecuentemente la captación de glucosa (Ha et al. 2011). Si bien es cierto que este estudio no se hizo en condiciones de RI y las concentraciones a las que se demostraban estos efectos se situaban entre 30 y 50 μM . Éste resultado podría sugerir que el efecto de la genisteína sobre la estimulación de la captación de glucosa vía AS160 tuviera lugar a dosis altas, pero esta afirmación tampoco es del todo correcta ya que está descrito que a concentraciones entorno a 100 μM la genisteína inhibe la translocación de GLUT4 (Al-Nakkash et al. 2010, Bazuine, van den Broek & Maassen 2005).

Con el fin de ahondar en los mecanismos de acción por los cuales las isoflavonas ofrecen estos resultados, se realizaron los estudios que se comentan a continuación.

Mecanismos de acción de las isoflavonas

Basándose en la similitud estructural entre las isoflavonas y los estrógenos, varios trabajos han descrito la capacidad de las isoflavonas para activar receptores estrogénicos, tanto α como β , y con ello de desencadenar mecanismos similares a los de los estrógenos (Martin et al. 1978, Wang, Sathyamoorthy & Phang 1996, Knight, Eden 1996). Este hecho, junto con el que existan diferencias notables en cuanto a la expresión de estos receptores dependientes de tejido (Couse et al. 1997) ha sugerido efectos de las isoflavonas tanto estrogénicos como antiestrogénicos, en función de tejido (Dang 2009).

En el músculo esquelético, se han descrito un incremento de la sensibilidad insulínica dependiente de estrógenos, (Livingstone, Collison 2002). También se ha demostrado que la señalización estrogénica resulta en un incremento de la captación de glucosa (Greising et al. 2009). Sin embargo los mecanismos por los cuales los estrógenos regulan el metabolismo en este tejido se encuentran aún bajo estudio.

Con estos antecedentes se quiso comprobar si los efectos moleculares debidos a tratamientos con isoflavonas estaban relacionados con la estimulación de receptores estrogénicos en el modelo celular de estudio. Para este fin se diseñó una serie de experimentos similares a los anteriores, en los que se preincubaron los miotubos con Fulvestrant, un inhibidor de receptores estrogénicos.

Implicación del receptores estrogénicos

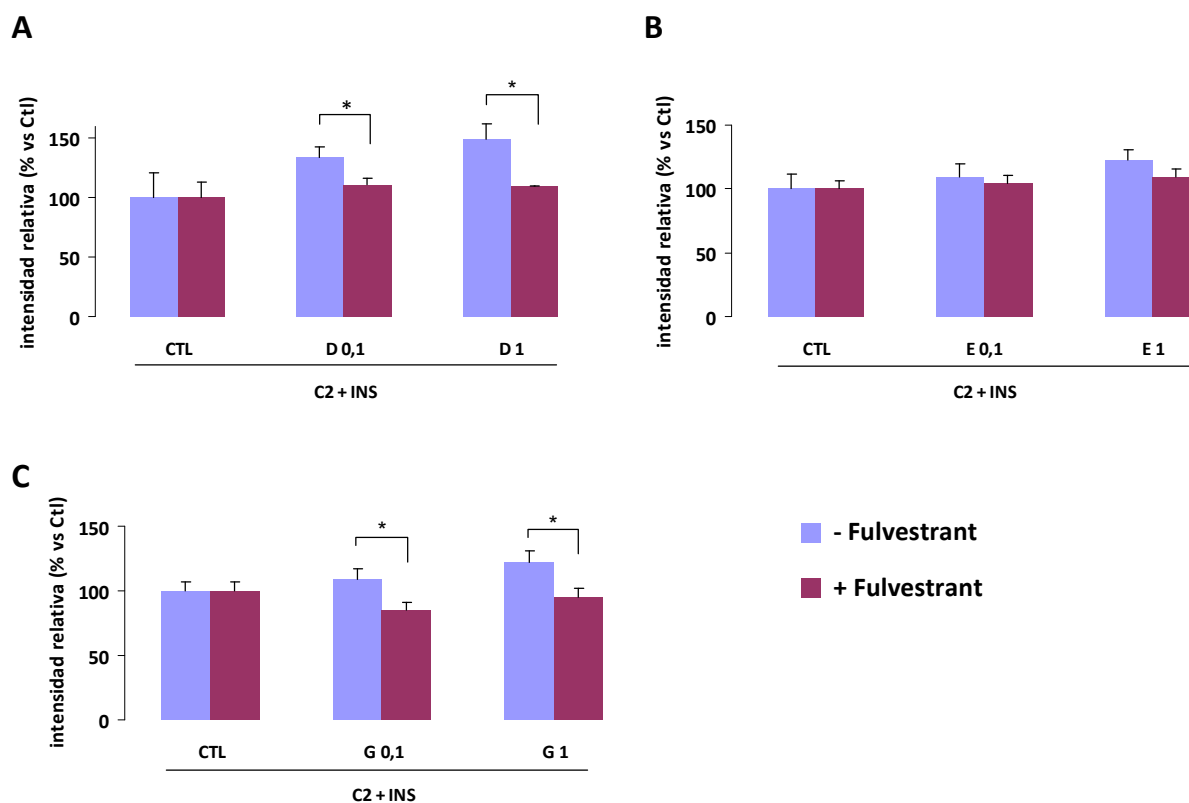


Figura 25. Efectos del fulvestrant sobre la fosforilación de AKT en la Ser⁴⁷³ inducida por daidzeína, equol y genisteína en miotubos RI.

Los miotubos fueron estimulados durante 10 minutos con Insulina (INS) 100nM, daidzeína (D), equol (E) y genisteína (G) a 1μM y en condiciones de RI inducida por Ceramida (C2) 25 μM. Previamente se inhibieron los receptores estrogénicos mediante la acción del fulvestran (F) (100μM) 30 minutos antes de la estimulación. Los valores se muestran en porcentaje frente a la situación control (CTL) como la media ± la DE (n≥3) (* p<0,05 en referencia al grupo CTL)

Los resultados representados en la figura (Figura 25) anterior muestran que el fulvestrant es capaz de anular, alcanzando prácticamente niveles basales, la reversión de la fosforilación de AKT en la Ser⁴⁷³ inducida por las isoflavonas en situación de RI. Este resultado indica que el efecto de las isoflavonas está mediada en parte por receptores estrogénicos, que se hace palpable sobretodo en el caso de la daidzeína (Figura 25 A) y genisteína (Figura 25 C).

Aunque se denota esta misma tendencia en el caso del equol, no se encontraron diferencias significativas. Debido a que el efecto del equol no queda del todo justificado que esté mediado por la activación de receptores estrogénicos, se quiso ahondar en el mecanismo por el cual esta isoflavona es capaz de estimular la fosforilación de AKT.

Implicación de la óxido nítrico sintetasa.

Existen estudios en los que se demuestra que el efecto protector atribuido a determinados polifenoles, como el resveratrol, es debido a la capacidad que presentan sobre la estimulación de la producción de NO por activación directa de la óxido nítrico sintetasa (NOS) (Bradamante et al. 2003, Thirunavukkarasu et al. 2007). Se sabe que existe una relación directa entre la producción de NO y la activación de AKT (Li, Elsasser & Kahl 2009) de hecho se ha descrito que la acción de determinados polifenoles puede estar mediado *vía* AKT-eNOS (Hattori et al. 2002, Wallerath et al. 2002). Debido a estas premisas, se hipotetizó que el efecto del Equol sobre la fosforilación de AKT podría estar mediado por la estimulación de la producción de NO. Para corroborar esta hipótesis se realizaron una serie de experimentos análogos a los anteriores en los que se estudió la posible función de la eNOS sobre la fosforilación de AKT mediada por el equol. Para ello se utilizó el compuesto *N* ω -nitro-*L*-arginina-metil-ester (L-NAME), descrito como inhibidor de la eNOS (Furfine et al. 1993) y un isómero no inhibitorio de la eNOS (D-NAME) como control. Los resultados de estos experimentos se muestran a continuación.

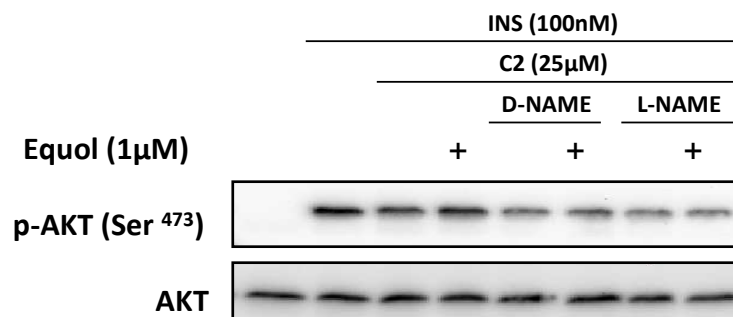


Figura 26. Imagen representativa de la inmunotinción de AKT en miotubos L6 diferenciados con RI. Los miotubos se estimularon durante 4 horas con L-NAME y D-NAME en medio sin suero, al cabo de 2 horas se añadió al sistema la Ceramida (C2) 25 μ M para crear el modelo de RI y a las dos horas siguientes las células fueron estimuladas durante 10 minutos con Insulina (INS) 100nM y equol (E) 1 μ M.

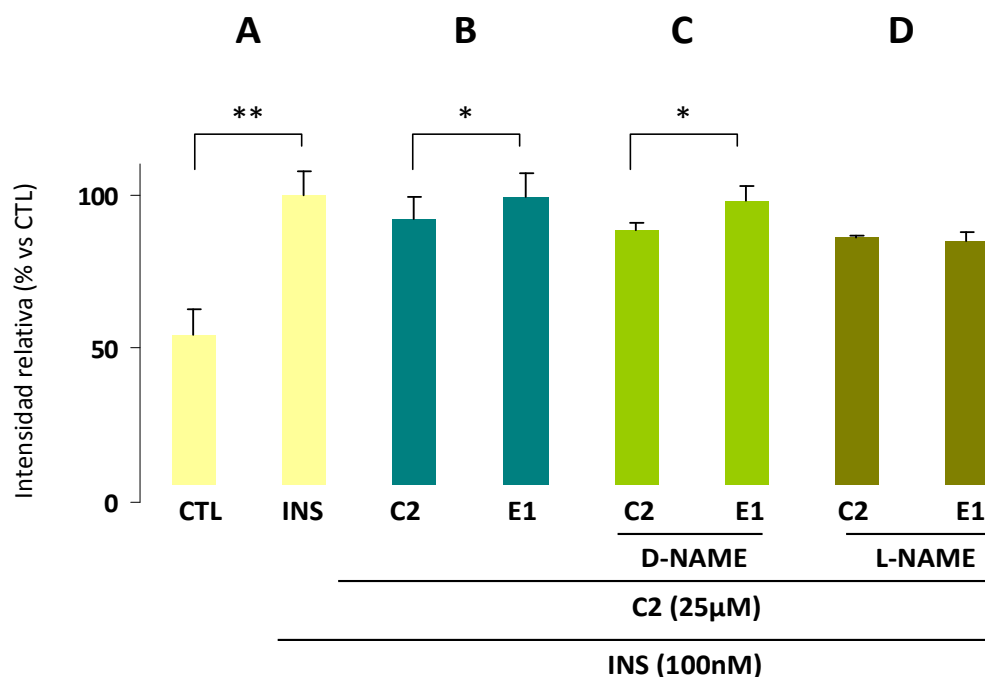


Figura 27. Análisis densitométrico de los efectos de la inhibición de la NOS sobre la fosforilación de AKT estimulada por equol.

Los miotubos se estimularon durante 4 horas con L-NAME y D-NAME en medio sin suero, al cabo de 2 horas se añadió al sistema la Ceramida (C2) 25 μ M para crear el modelo de RI y a las dos horas siguientes las células fueron estimuladas durante 10 minutos con Insulina (INS) 100nM y equol (E) 1 μ M. El análisis densitométrico se realizó de la intensidad de AKT (Ser⁴⁷³) normalizada por la intensidad de AKT total obtenidos WB. Los valores se muestran en porcentaje frente a la situación control (INS) como la media \pm la DE ($n \geq 3$) (* $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ en referencia al control de cada grupo siendo CTL el del grupo A; C2 el de B, C2+D-NAME el de C y C2+L-NAME el de D)

Como se puede observar en la figura 27, la estimulación con insulina aporta un incremento significativo de la fosforilación de AKT en Ser⁴⁷³ en miotubos L6 (Figura 27 A). La incubación previa con C2 resulta en la inhibición de esta fosforilación y este efecto es revertido con tratamientos de equol (Figura 27 B). En cuanto a los tratamientos con D-NAME (Figura 27 C), aunque se aprecia una ligera disminución de valores respecto a la sección B, se puede decir que la relación entre tratamientos en ambos casos es muy similar, de hecho en estas dos secciones existen diferencias significativas atribuibles al efecto del equol. Sin embargo, estas diferencias significativas no tienen lugar en el caso de la sección D. El hecho de que la única variante sea la sustitución de D-NAME por L-NAME, *isoforma inhibitoria de la NOS*, sugiere que el efecto *protector* que aporta el equol en el músculo esquelético puede estar en parte mediado por una estimulación de los niveles basales de NO.

Efectos funcionales de las isoflavonas sobre el modelo de RI de músculo esquelético

Como se ha comentado en la introducción uno de los problemas que derivan de la RI es el exceso de glucosa circulante llegando a niveles considerables como *tóxicos* a largo plazo para el organismo por lo que tratamientos que ayuden a regular la glucemia se presentan importantes para combatir el SM. Hasta el momento, se ha demostrado que las isoflavonas a concentraciones dietarias y en condiciones de RI son capaces de estimular, no sólo las vías de activación insulínica sino que también la captación de glucosa por parte del músculo esquelético. Teniendo en cuenta que el músculo esquelético es el responsable del 75% de la incorporación de glucosa dependiente de insulina (Henriksson 1990, Barros, Gustafsson 2011) los fenómenos que se han descrito en esta Tesis parecen más que prometedores en la prevención del SM.

A parte de corroborar un incremento de la captación de glucosa se quiso saber el efecto de las isoflavonas sobre la vía que sigue la glucosa una vez incorporada por células muscular que presenten la situación fisiopatológica de RI. Por este motivo se planteo el estudio del flujo glicolítico.

Estimación del flujo glicolítico

De forma general, una vez incorporada por la célula, la glucosa es fosforilada por la acción de las hexoquinas y posteriormente puede ser almacenada en forma de glucógeno u oxidada a piruvato por glucólisis. Dependiendo de la disponibilidad de oxígeno, el piruvato formado puede seguir dos caminos diferentes. Si no existe suficiente oxígeno o el organismo es incapaz de continuar con el proceso oxidativo, el piruvato sigue una ruta anaeróbia. En esta vía, el piruvato se reduce a lactato, con la participación de la lactato deshidrogenasa (LDH).

La estimación de la actividad de la ruta anaeróbia se puede analizar por cuantificación de los productos finales o de los intermediarios metabólicos del proceso. En este caso, la estimación del flujo glicolítico se realizó por cuantificación de la producción de lactato por miotubos en RI. El lactato producido por los miotubos RI estimulados con insulina y tratados con isoflavonas es secretado al medio extracelular y su

concentración en el medio de cultivo fue cuantificado como se describe en el correspondiente apartado de materiales y métodos.

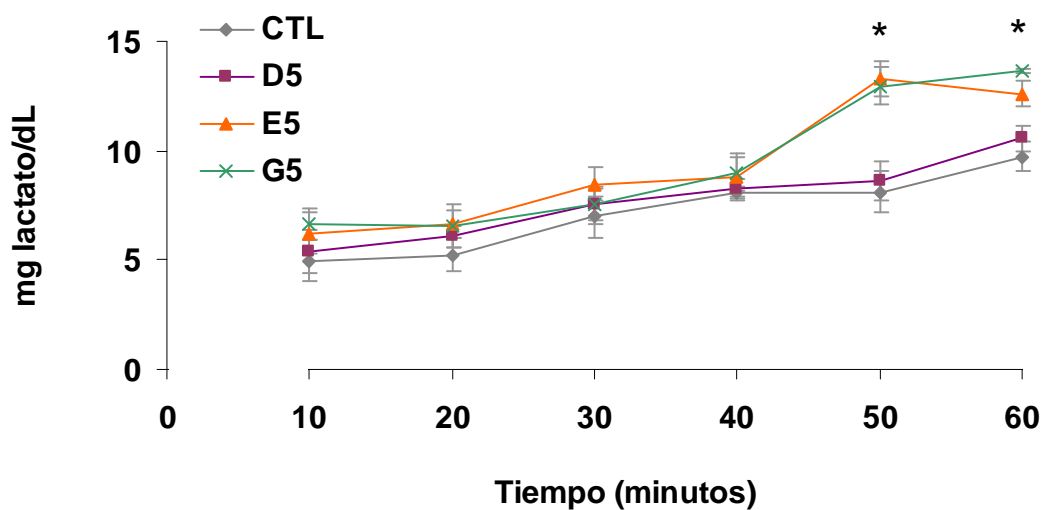


Figura 28. Efecto de las isoflavonas sobre la producción de Lactato en miotubos L6 RI.

Los miotubos fueron incubados durante 2 horas con Ceramida (C2) 25 μ M para crear el modelo de RI. Posteriormente fueron estimulados con Insulina (100nM), daidzeína (D), equol (E) y genisteína (G) a concentración 5 μ M. La toma de muestras se realizó cada 10 minutos durante 1 hora. Los valores se muestran en concentración de lactato como la media \pm la DE ($n \geq 3$) (* $p < 0,05$ en referencia a la situación control)

En los miotubos diferenciados L6 en situación IR y estimulados con insulina, tanto los tratamientos con equol como con la genisteína a concentración 5 μ M resultan en un incremento significativo de la producción de lactato del 20 y 30% respectivamente respecto la situación control (Figura 28). Este hecho sugiere que ambas isoflavonas presentan la capacidad de activación del flujo glicolítico hacia la producción de lactato a favor de la oxidación del piruvato en la mitocondria. Este fenómeno resulta en una pérdida de eficiencia energética debido a que la ganancia neta de ATP es menor por el flujo glicolítico que por la fosforilación oxidativa, hecho que conllevaría un incremento del consumo de glucosa con el fin de mantener el balance energético celular.

El incremento de la captación de glucosa podría resultar en una disminución de la glucemia y con ello una mejora de la fisiopatología del SM. Debido a que se sugiere importante el fenómeno que se acaba de describir se quiso ahondar en el mecanismo de acción de las isoflavonas sobre el incremento de la producción de lactato. Para definir la hipótesis de estudio se tuvieron en cuenta las siguientes premisas.

En primer lugar, está descrito que los receptores estrogénicos de respuesta rápida utilizan como segundo mensajero el calcio (Ca^{2+}) ya que se ha demostrado que el 17β estradiol, es capaz de regular los niveles de Ca^{2+} intracelular mediante la activación de receptores estrogénicos (Townsend et al. 2010). Por otro lado, a nivel molecular, la señalización y homeostasis intracelular del calcio se presenta compleja como se puede comprobar en la figura 30 en la que representa, de forma esquemática, diferentes vías en las que participa el Ca^{2+} como segundo mensajero, como son la de PKC, las reguladas por proteínas G o en las que interviene la Calmodulina. Este hecho, permite que sean muy variadas las funciones en las que se encuentra implicado el Ca^{2+} ; a modo de ejemplo, destacar que interviene directamente en la contracción muscular (Ozawa 2011), en la liberación de neurotransmisores (Grover y Teyler, 1990; Impey et al, 1996) o que es imprescindible para la coagulación de la sangre (Morel et al 2011), entre otras.

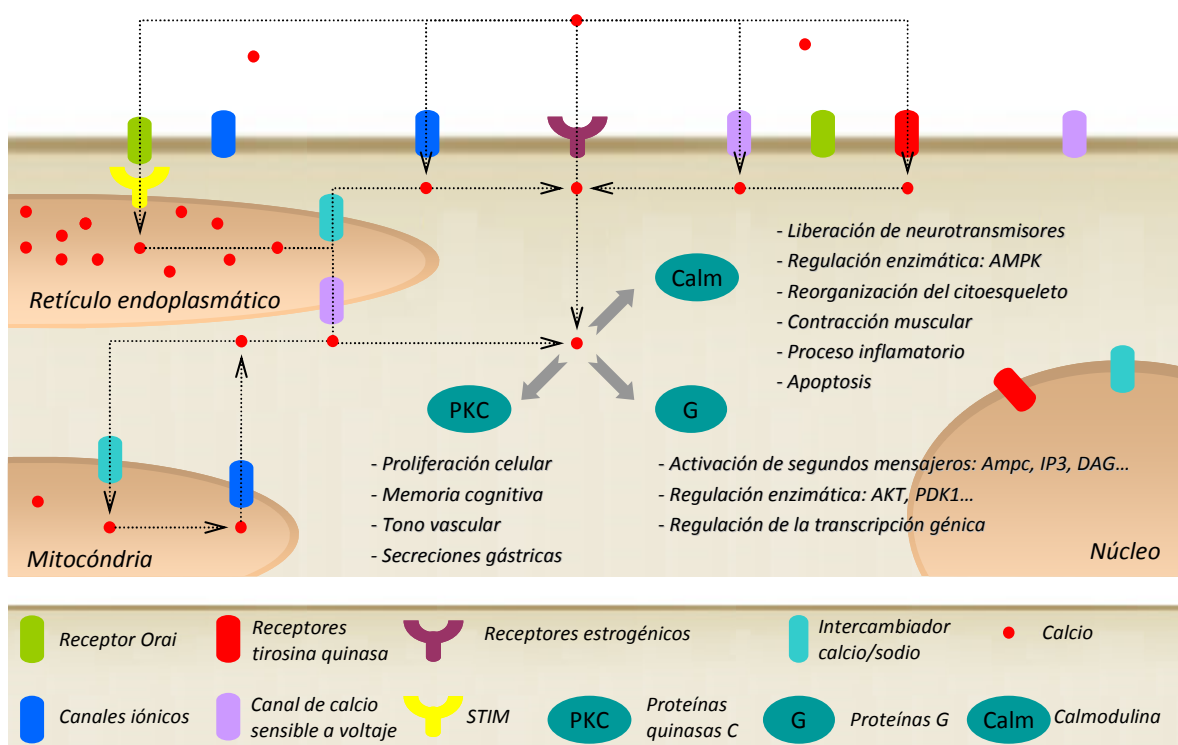


Figura 29. Esquema de la señalización intracelular del calcio.

Por su parte, en esta Tesis se ha demostrado que los efectos de las isoflavonas sobre la fosforilación de AKT a nivel de músculo esquelético son sensibles a Fulvestran lo que sugiere que las isoflavonas presentan efectos estrogénicos por lo que se hipotetizó que el incremento de la producción de lactato observado por los tratamientos con equol y genisteína pudiera estar relacionado cambios en el Ca^{2+} intracelular. Para corroborar

esta hipótesis se realizó un estudio de la producción de lactato, similar al anterior, incluyendo al sistema EGTA como agente quelante de Ca^{2+} .

Implicación del Ca^{2+}

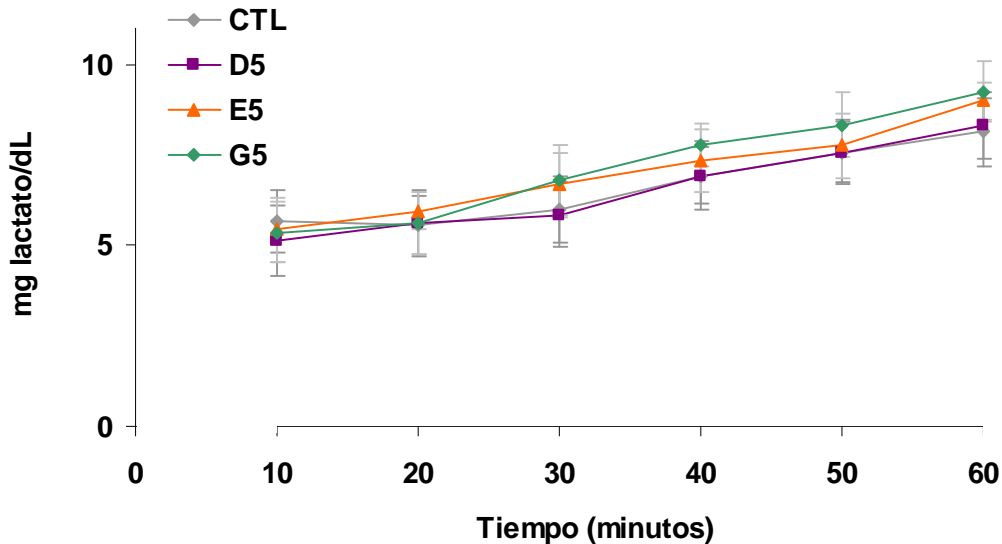


Figura 30. Efecto del EGTA sobre la producción de Lactato en miotubos L6 RI estimulada por isoflavonas.

Los miotubos fueron incubados durante 2 horas con ceramida (C2) $25 \mu\text{M}$ para crear el modelo de RI y durante 30 minutos con EGTA (5mM). Posteriormente fueron estimulados con Insulina (100nM), daidzeína (D), equol (E) y genisteína (G) a concentración $5\mu\text{M}$. La toma de muestras se realizó cada 10 minutos durante 1 hora. Los valores se muestran en concentración de lactato como la media \pm la DE ($n \geq 3$) (* $p < 0,05$ en referencia a la situación control)

Las isoflavonas genisteína y equol a concentración $5\mu\text{M}$ estimulan la producción de lactato en miotubos L6 (Figura 28). El hecho de que este efecto quede revertido por la preincubación de EGTA (Figura 30) sugiere que la vía de actuación de las Isoflavonas sobre el incremento de la producción de lactato esté relacionada con la regulación de los niveles de calcio intracelular debido a la capacidad que presentan las isoflavonas para activar receptores estrogénicos de efecto rápido aunque más estudios al respecto deben de ser realizados para obtener una conclusión firme del mecanismo de actuación.

En cualquier caso, se puede afirmar que tanto el equol como la genisteína, promueven un incremento de la glicólisis en miotubos L6 diferenciados que se encuentran en situación fisiopatológica IR, y que este fenómeno es dependiente de los niveles de Ca^{2+} intracelular, posiblemente regulados por la activación de receptores estrogénicos de respuesta rápida por parte de las isoflavonas.

Resumen de este estudio: isoflavonas en músculo esquelético.

Aunque varios estudios atribuyen efectos beneficiosos al consumo de soja sobre la disminución de la fisiopatología del SM, son pocos los estudios *in vitro* realizados para valorar los efectos de las isoflavonas derivadas directamente de la ingesta de soja, dependientes de insulina y en condición de RI, uno de los principales factores de riesgo en el desarrollo del SM.

En este estudio se han aportado importantes datos para dilucidar los mecanismos por lo cuales las isoflavonas de origen dietario pueden explicar los efectos beneficiosos demostrados por estudios epidemiológicos en individuos con SM. Se ha demostrado que las isoflavonas daidzeína, equol y genisteína a concentraciones plasmáticas derivadas de la ingesta de soja, aportan efectos beneficiosos sobre el metabolismo energético en situaciones de RI en músculo esquelético. Se ha descrito un efecto potenciador de la transducción de señal insulínica en condiciones de RI estimado por un incremento de fosforilación de proteínas claves de la vía a diferentes niveles. Intentando ahondar en el mecanismo, se ha demostrado que estos efectos moleculares están mediados por receptores estrogénicos, sobretodo en el caso de la daidzeína y de la genisteína. Por su parte, se ha sugerido como importante el vínculo entre el equol y el NO para la explicación de sus resultados moleculares.

También se ha demostrado que los efectos moleculares descritos se correlacionan con el efecto funcional de la captación de glucosa tanto a corto plazo, por una estimulación de la translocación del transportador GLUT4, como a largo plazo por la estimulación del flujo glicolítico, hecho que resulta en una pérdida de eficiencia en el metabolismo energético que conllevaría a un aumento del consumo de glucosa con el fin de mantener el balance energético celular. En ambos casos la estimulación de la captación de glucosa resultaría en una disminución de la glucemia, y con ello de los fenómenos de glucotoxicidad que, como se ha descrito en el correspondiente apartado de la introducción, tan relacionados están con el desarrollo del SM.

Efectos en el tejido adiposo: modelo de adipocitos maduros 3T3-L1.

El tejido adiposo es el principal almacén de TG del cuerpo. Es un órgano dinámico que cambia a lo largo de la vida en respuesta a las necesidades metabólicas del individuo. Ante determinados estímulos, regula la captación de los AGL y también su liberación para su posterior utilización en otros tejidos, interviniendo directamente en la lipidemia, hecho que pone de manifiesto la importancia de este tejido en el metabolismo energético a nivel sistémico. En situaciones de RI, esta capacidad de adaptación del tejido adiposo se ve comprometida principalmente por presentar un limitado control de la homeostasis energética, que resulta en problemas en el metabolismo lipídico como hiperlipidemias, muy relacionadas con las ECV por la capacidad aterogénica de los AGL; o acumulación ectópica de TG, entre otros.

Entender los mecanismos asociados al almacenamiento y liberación de energía en el tejido adiposo se presenta necesario para desarrollar una estrategia que permita prevenir y tratar no solo la obesidad sino también sus patologías asociadas, principales factores de riesgo en el desarrollo de RI.

Validación del modelo

Una de las principales características de las que depende la capacidad de adaptación del tejido adiposo ante un exceso de nutrientes energéticos, es que puede modular la capacidad de almacenaje energético total, tanto a nivel celular, aumentando su tamaño; como a nivel de tejido, promoviendo la diferenciación de nuevos adipocitos. Este último, es un proceso complejo en el que los preadipocitos deben interrumpir su proliferación y salir del ciclo celular para poder diferenciarse a adipocitos maduros funcionales. Este proceso de diferenciación, supone cambios cronológicos en la expresión de numerosos genes, de manera que se van expresando aquellos genes característicos de los adipocitos, al mismo tiempo que se van reprimiendo genes que son inhibitorios de la adipogénesis o que son innecesarios para la función del adipocito maduro. Todos estos cambios conducen finalmente a la adquisición del fenotipo característico del adipocito maduro (MacDougald, Lane 1995).

Aunque los fenómenos moleculares implicados en la diferenciación de los adipocitos no son totalmente conocidos, se ha sugerido que uno de los modelos celulares que mejor reproduce *in vitro* este proceso es el adipocito 3T3-L1 (Richon, Lyle & McGehee 1997, Shao, Lazar 1997, Cao, Umek & McKnight 1991) así, al igual que en el caso de los miotubos, el primer objetivo fue la validación de este modelo.

Validación Morfológica

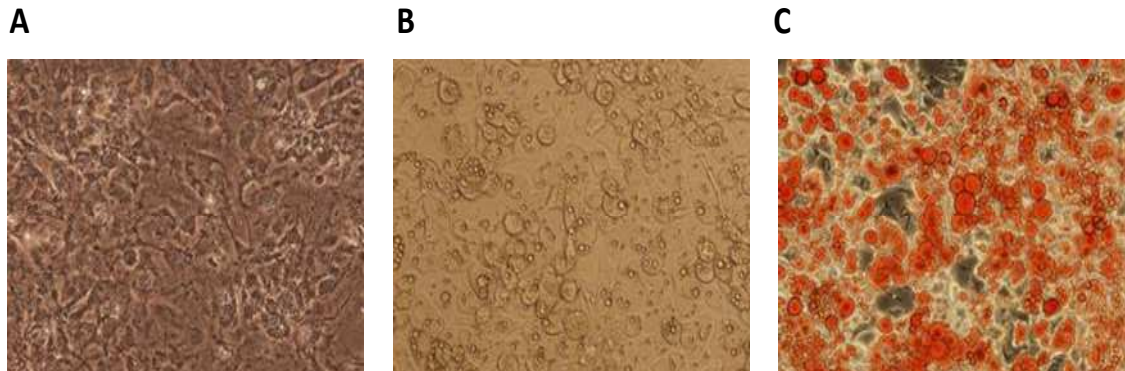


Figura 31. Cambios fenotípicos durante la diferenciación adipocítica de la línea 3T3-L1.

A: imagen representativa (10X) del estadio en el que se comienza la diferenciación (día cero). B: cambios fenotípicos al cabo de 7 días de diferenciación. C: imagen representativa de la tinción con Oil red en el momento de la diferenciación total a adipocitos maduros (14 días).

En la figura 31 se observan distintos estadios durante el proceso de diferenciación adipocítica de la línea celular 3T3-L1. En resumen, la figura 31 A muestra el estado en el que se encuentran los preadipocitos en el momento de iniciar la diferenciación. Transcurridos 7 días son apreciables no sólo cambios morfológicos, las células adquieren forma globosa, si no que también se distinguen los depósitos de TG en forma de vesículas redondeadas más o menos brillantes debido al incremento de refracción que experimenta la luz en superficies oleaginosas. Estos depósitos van incrementando de tamaño y fusionándose durante el proceso de diferenciación, hasta ocupar prácticamente la totalidad del volumen adipocítico como se puede comprobar en la tinción de TG realizada con oil red (Figura 31 C), momento en el cual son considerados adipocitos maduros.

Diferentes estudios han demostrado que las isoflavonas favorecen el proceso de diferenciación adipocítica (Cho et al. 2010) sin embargo, los mecanismos moleculares por el cual se origina ese fenómeno aún se encuentran en estudio.

Es de interés en esta tesis, no tanto el estudio de los mecanismos por los cuales las isoflavonas son capaces de estimular la diferenciación adipocítica sino de cómo pueden modular la capacidad de almacenaje de los adipocitos ya maduros en situación de RI, fenómeno que ayudaría a normalizar la lipidemia y a prevenir la acumulación ectópica de TG, patologías directamente vinculadas con el desarrollo del SM. En consecuencia, se requiere la validación del modelo adipocítico en contexto de RI. Para este fin se eligió como inductor de RI el TNF α por estar ampliamente documentado para este fin en la bibliografía (Swaroop, Rajarajeswari & Naidu 2012, Lele 2010, Nieto-Vazquez et al. 2008, Wang, O'Brien & Brindley 1998, Ryden, Arner 2007)

Validación molecular del modelo adipocítico de RI

Para validar la eficiencia del TNF α en inducir RI en el modelo se siguieron los mismos criterios moleculares que en el caso de los miotubos L6 insulinoresistentes. Es decir, se estimaron los efectos mediados por la preincubación de TNF α sobre la fosforilación de las proteínas AKT y ERK inducida por la insulina.

En la figura 32 se muestra como la estimulación con insulina a concentración 100nM durante 10 minutos resulta en un considerable aumento de la fosforilación tanto de AKT en la Ser⁴⁷³ (Figura 32 A) como de las ERK (Figura 32 C) en el modelo adipocítico elegido, lo que sugiere una correcta transducción de señal insulínica. Además, este efecto se logra revertir con la incubación previa con TNF α (10 μ g/mL) con el que se consigue una reversión del efecto insulínico de aproximadamente un 20% (Figura 32) lo que valida el modelo elegido para el estudio de la pérdida de sensibilidad a la insulina en el tejido adiposo.

Efectos moleculares de las isoflavonas en el modelo adipocítico con RI

A nivel del tejido adiposo, se ha sugerido que el efecto de las isoflavonas derivadas de la ingesta de productos de soja resulta en un incremento no sólo de la fosforilación de AKT, sino también de otras proteínas claves en la transducción de señal insulínica (Kwon et al. 2011, Kwon et al. 2006) lo que sugiere que las isoflavonas presentan capacidad de incrementar la sensibilidad a la insulina en el tejido adiposo. Estos resultados han sido posteriormente corroborados en otros trabajos como el realizado

por Claussnitzer, destacado entre otros, por la similitud en modelo y concentraciones con las utilizadas en esta Tesis ya que describen efectos de las isoflavonas a concentraciones $1\mu\text{M}$ y en un modelo *in vitro* de adipocitos diferenciados 3T3-L1. En el trabajo de Claussnitzer no sólo se demuestra un incremento de la fosforilación de las proteínas claves de la vía de señalización insulínica sino también un aumento la captación de glucosa dependiente de isoflavonas (Claussnitzer et al. 2011). Sin embargo el hecho de no realizarlo en un modelo de RI limita la extrapolación de los resultados en el ámbito del SM. Con la intención limitar esta incertidumbre y debido a que no existen estudios que sugieran estos resultados en el contexto RI, en este trabajo se testaron tratamientos a dosis $1\mu\text{M}$ de las isoflavonas daidzeína, equol y genisteína en el modelo previamente validado de tejido adiposo RI.

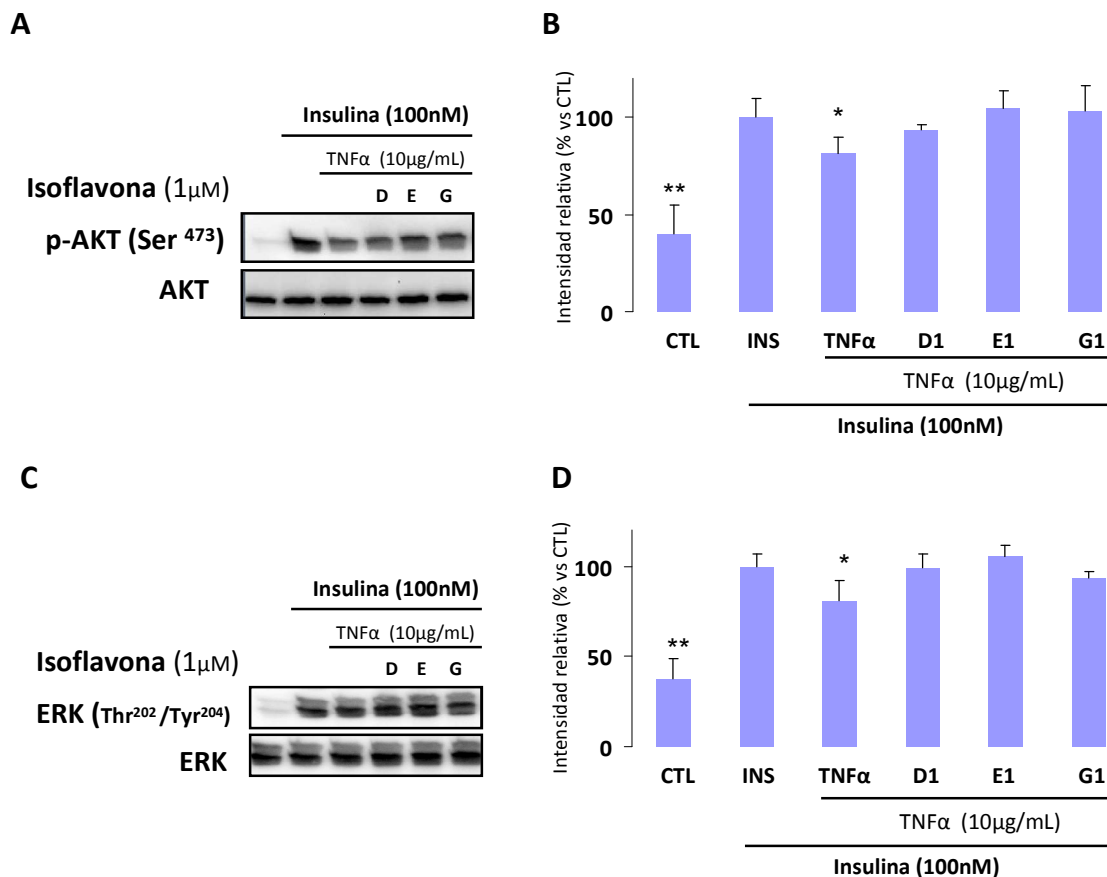


Figura 32. Efectos de daidzeína, equol y genisteína sobre la fosforilación de AKT y ERK 1 y 2 en adipocitos 3T3-L1 en situación RI.

A/C: imágenes representativas de la inmunodetección de adipocitos tratados TNF α 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o/n y estimulados con Insulina (INS) 100nM, daidzeína (D), equol (E) y genisteína (G) 1 μM . La detección tanto de las proteínas fosforiladas como de las totales fue realizada por la técnica de WB. **B/D:** Análisis densitométrico de las proteína fosforiladas normalizada por la concentración total de la misma. Los valores se muestran como la media \pm DE ($n \geq 3$) (* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ en referencia al grupo INS).

El hecho de que no existan diferencias significativas entre la situación INS y los tratamientos con isoflavonas en situación de RI estimulada por TNF α (Figura 32) demuestra que, en todos los casos, las isoflavonas revierten el efecto del TNF α alcanzando niveles de fosforilación de ambas quinasas equiparables a los niveles previos a la inducción de IR. Estos resultados complementan los trabajos obtenidos por Claussnitzer y colaboradores, no sólo demostrando lo que ellos sugieren sino aportando, debido a la obtención de estos resultados en un modelo RI, mayor robustez a la interpretación y extrapolación de los resultados en el ámbito del SM.

Mecanismos de acción

Implicación de receptores estrogénicos

En el tejido adiposo se expresan tanto ER α como ER β lo que le confiere la capacidad de ser tejido diana de la acción de los estrógenos (Matthews, Gustafsson 2003). Sus funciones en este tejido se encuentran aún bajo estudio aunque se ha descrito que su activación por estrógenos interviene en la prevención de varios factores de riesgo vinculados al SM (Clegg et al. 2006). Debido a la similitud química entre isoflavonas y estrógenos se diseñaron una serie de experimentos encaminados a comprobar el posible efecto estrogénico de las isoflavonas sobre el tejido adiposo con RI.

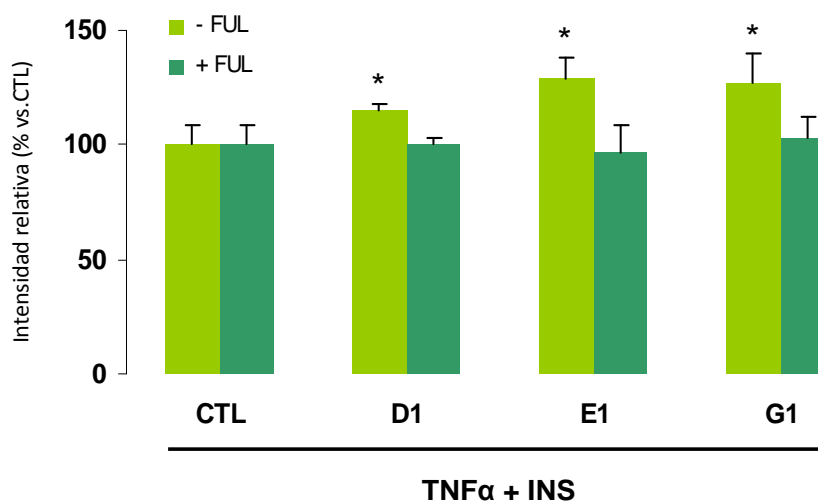


Figura 33. Efectos del fulvestrant sobre la fosforilación de AKT inducida por daidzeína, equol y genisteína. Análisis densitométrico de la intensidad de AKT (Ser⁴⁷³) normalizada por la intensidad de AKT total obtenidas por inmunotinción. Los adipocitos maduros fueron tratados con TNF α 10 μ g/mL o/n para crear el modelo IR, con fulvestrant (F) (100 μ M) 30 minutos para inhibir los receptores estrogénicos y posteriormente estimulados durante 10 minutos con Insulina (INS) 100nM, daidzeína (D), equol (E) y genisteína (G) a 1 μ M. Los valores se muestran en porcentaje frente a la situación control (CTL) como la media \pm la DE ($n \geq 3$) (* $p < 0,05$ en referencia al grupo CTL).

En todos los casos, el fulvestrant revierte de manera significativa los efectos de las isoflavonas sobre la fosforilación de AKT en el modelo de adipocitos con sensibilidad a la insulina comprometida, alcanzando niveles basales (Figura 33). Este hecho sugiere que el efecto de las isoflavonas sobre la estimulación de la fosforilación de AKT en adipocitos insulinoresistentes, está mediado en gran parte por receptores estrogénicos.

Se han obtenido resultados similares en modelos *in vitro* de no insulinoresistencia. En concreto, la genisteína es la isoflavona más estudiada en este contexto. Existen estudios que demuestran que la genisteína presenta capacidad de activación tanto de los ER α (Kuiper et al. 1998) como ER β (Morito et al. 2001, Morito et al. 2002) presentando una mayor afinidad por estos últimos (Morito et al. 2002). Sin embargo el resultado de estos fenómenos a nivel adipocítico se encuentran aún en debate. Se ha sugerido que los efectos de la genisteína dependen tanto de las dosis aplicadas como de la concentración plasmática de estrógenos endógenos (Dang, Lowik 2005). Por su parte, otros trabajos ponen en duda que los efectos de la genisteína sobre el tejido adiposo sea vía receptores estrogénicos ya que han demostrado que estos efectos pueden ser mitigados por la activación de otras vías (Naaz et al. 2003) lo que pone de manifiesto la complejidad de regulación.

En este trabajo se demuestran que los efectos moleculares no sólo de la genisteína sino que también de la daidzeína y de su metabolito equol, dependen de la activación de receptores estrogénicos en el tejido adiposo. El hecho de que se haya realizado este estudio en condiciones de insulinoresistencia aporta datos importantes sobre las vías de actuación sugeridas pero no comprobadas hasta el momento, de los mecanismos de acción de las isoflavonas en este tejido cuando se encuentra en situaciones comprometidas de sensibilidad a la insulina.

Una vez comprobamos estos efectos moleculares se quiso estudiar los funcionales focalizando, principalmente, en la función de reservorio energético que desempeña el tejido adiposo.

Efectos funcionales de las isoflavonas sobre el modelo de adipositos con RI

Captación de ácidos grasos

En el tejido adiposo, la energía es almacenada en forma de TG que son sintetizados a partir de los AGL plasmáticos o *resintetizados* en el interior del adipocito a partir de la lipólisis de los TG de los quilomicrones y/o de las VLDL. Estos productos, son transportados al interior de la célula de forma muy eficiente a través de un sistema de proteínas transportadoras específicas denominadas FATP's (*Fatty Acid Transporter Proteins*). En situación de exceso energético mantenido en el tiempo, esta capacidad de incorporación de AGL se satura (Kazantzis, Stahl 2011) hecho que resulta en un incremento de la lipemia que limita aún mas la captación de AGL creando así un *circulo vicioso* que favorece la perdida de homeostasis energética.

Compuestos que ayuden a reestablecer los mecanismos de incorporación de AGL en el tejido adiposo se presenta como línea terapéutica importante de estudio para prevenir y/o controlar el desarrollo de RI. Debido a esta hipótesis, otro de los objetivos que se planteó en esta Tesis fue el estudio de las isoflavonas como posibles moduladoras de la captación de AGL en adipositos con RI. Para abordar este objetivo se llevó a cabo ensayos basados en la incorporación de AGL al adipocito, como se describe en el correspondiente apartado de la sección materiales y métodos.

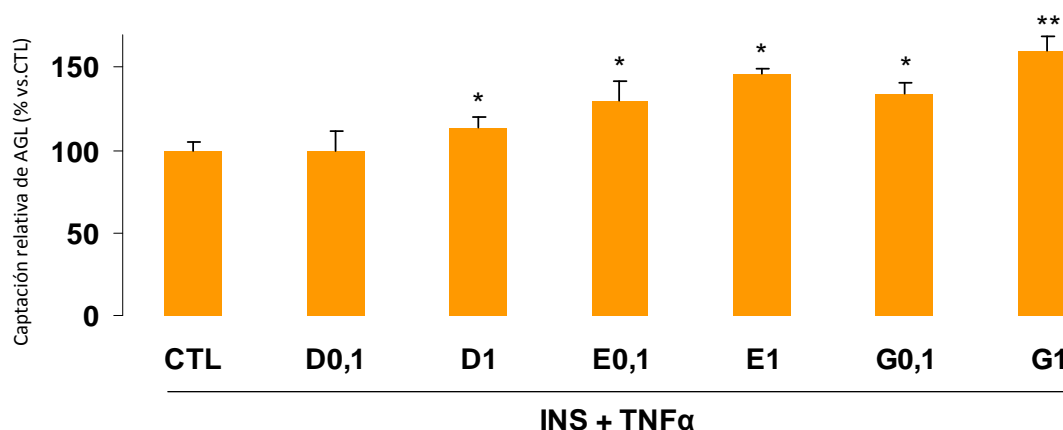


Figura 34. Efecto de las isoflavonas sobre la captación de AGL dependiente de insulina en adipocitos maduros RI.

Representación grafica de la integración de los resultados obtenidos por análisis cinético de la captación de AGL de adipocitos maduros tratados con $TNF\alpha$ $10\mu g/mL$ o/n para crear el modelo IR y posteriormente estimulados durante 10 con insulina (INS) $100nM$, daidzeína (D), equol (E) y genisteína (G) a 0.1 y $1\mu M$. Los valores se muestran en porcentaje frente a la situación control (CTL) como la media \pm la DE ($n\geq 3$) (* $p < 0,05$ en referencia al grupo CTL).

Las isoflavonas presentan un efecto potenciador de la acción de la insulina, con un componente dosis dependiente, sobre la captación de AGL en adipocitos con IR inducida por TNF α (Figura 34). Cabe destacar que así como con los tratamientos con daidzeína se alcanzan incrementos del 10%, respecto al control, estos valores se sitúan entorno al 50% cuando los tratamientos se realizan tanto con equol (46,5%) como con genisteína (60,1%) a concentraciones de 1 μ M. Consistentes con estos resultados son los presentados en la figura 32, en los que se puede observar que tanto el equol como la genisteína son las isoflavonas que más estimulan la fosforilación de AKT de adipocitos insulinoresistentes.

Aunque existen diferentes transportadores de AGL en las células, está descrito que FATP1, FATP4 y ACSL1 se pueden considerar los transportadores típicos del tejido adiposo (Lobo et al. 2007). De estos transportadores, FATP1 se encuentra ampliamente distribuido en adipocitos maduros 3T3-L1 (Stahl et al. 2002). De forma análoga a lo que ocurre con el transportador de glucosa GLUT4, existe un reservorio de FATP1 que se encuentra en el citoplasma en vesículas, las cuales son translocadas hacia la membrana plasmática ante determinados estímulos como el insulínico (Wu et al. 2006b). Teniendo en cuenta estas premisas y los resultados obtenidos hasta el momento se puede sugerir que el efecto de las isoflavonas sobre el incremento de la captación de AGL en adipocitos RI (Figura 34) está mediado por la capacidad que presentan las mismas sobre la estimulación de la transducción insulínica, estimada por un incremento de la fosforilación de AKT (Figura 32). Fenómeno que resultaría en una mayor translocación del transportador FATP1 hacia la membrana plasmática y que explicaría el incremento observado de la captación de AGL. Esta hipótesis gana robustez si se tiene en cuenta que las isoflavonas que aportan una mayor fosforilación de AKT, son las que también inducen una mayor incorporación de AGL.

Teniendo en cuenta la relación que se acaba de sugerir entre AKT y FATP1, si el TNF α es capaz de revertir los efectos de las isoflavonas sobre la fosforilación de AKT (Figura 33), mediante su interacción con receptores estrogénicos, parece lógico pensar que también se inhibiría la captación de AGL demostrada en la figura 34.

Implicación de receptores estrogénicos

En este caso, se planteo un experimento de incorporación de AGL similar al anterior pero introduciendo en el sistema fulvestrant con el fin de estimar la incorporación de AGL independiente de receptores estrogénicos.

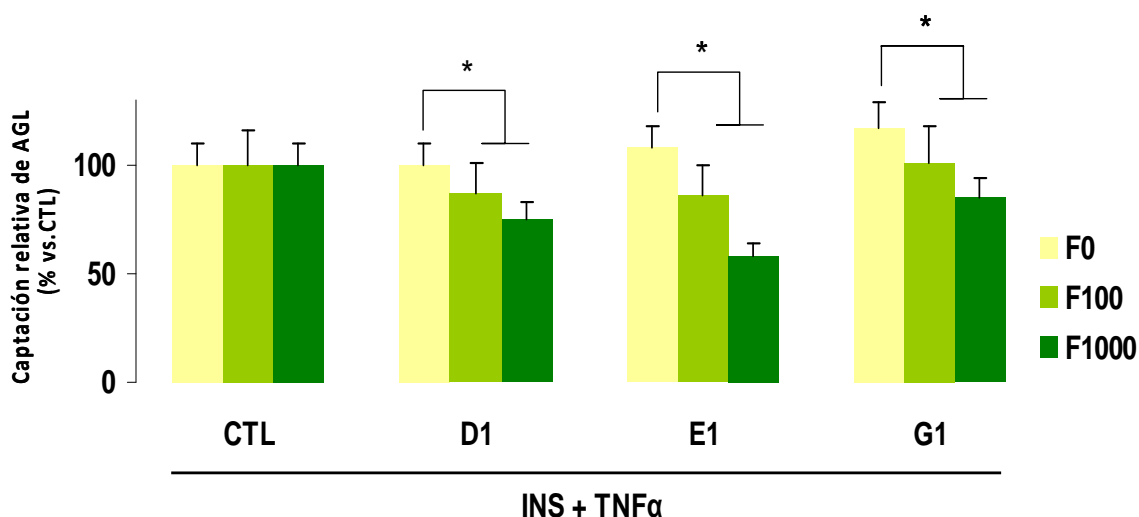


Figura 35. Efecto del Fulvestrant sobre la captación de AGL estimulada por isoflavonas en adipocitos maduros insulinoresistentes.

Representación grafica de la integración de la resultados obtenidos por análisis cinético de la captación de AGL de adipocitos maduros tratados con $TNF\alpha$ ($10\mu g/mL$) o/n, con Fulvestrant (F) 100 (F100) y 1000nM (F1000) 30 minutos y posteriormente estimulados durante 10 minutos con Insulina (INS) 100nM, daidzeína (D), equol (E) y genisteína (G) a 0.1 y $1\mu M$. Los valores se muestran en porcentaje frente a la situación control (CTL) como la media \pm la DE ($n \geq 3$) (* $p < 0,05$ en referencia al grupo control de cada grupo).

Los resultados presentados en la figura anterior (Figura 35) revelan que el fulvestrant revierte, con un carácter dosis dependiente, los efectos de la isoflavonas sobre la captación de ácidos grasos. Con lo que queda demostrada la hipótesis de que la captación de AGL estimulada por isoflavonas en adipocitos insulinoresistentes está mediada en gran parte por receptores estrogénicos.

Efecto señalizador del NO

A parte de los efectos sobre el metabolismo energético, está descrito que la insulina puede estimular la expresión y actividad de la oxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) (Aljada, Dandona 2000) y con ello incrementar la producción de NO.

Entre otras funciones, el NO generado interviene como señalizador en la regulación del tono vascular ya que estimula la vasodilatación (Zeng et al. 2000), fenómeno esta relacionado directamente con funciones antiaterogénicas²².

En situaciones de RI aumenta el riesgo de generación de placas de ateroma a parte de verse comprometida la circulación sanguínea (Wang et al. 2006). Por un lado, el incremento de la lipidemia fomenta la generación de placas de ateroma debido al aumento de la concentración de LDL que presentan un alto grado de adhesión a la íntima de las arterias; y por otro lado, la disminución de la producción de NO limita la vasodilatación y con ello un aumento de la resistencia vascular.

En este contexto se quiso comprobar, no tanto si las isoflavonas eran capaces de incrementar la liberación de NO, fenómeno que ya se encuentra descrito (Hamalainen et al. 2007, Yang et al. 2010), sino comprobar si existe una relación entre la estimulación de la captación de AGL inducida por las isoflavonas, con la regulación de niveles de NO. Para este fin se realizaron una serie de experimentos similares a los presentados anteriormente para cuantificar la captación de AGL, pero en este caso se comprometió la producción de NO con un inhibidor de la *óxido nítrico sintetasa*, el L-NAME, y se utilizó como control experimental de referencia el isómero inactivo D-NAME que no afecta a la función de la enzima. Los resultados de la aplicación de esta serie de experimentos se muestran en la Figura 36 y se discuten a continuación.

En ninguno de los tratamientos con las isoflavonas, la inhibición de la NOS revirtió de forma significativa los efectos sobre la incorporación de AGL, aunque si que existe una tendencia a una modesta disminución en todos los casos a excepción del equol. Dato interesante puesto que en el modelo de miotubos insulinoresistentes la acción del equol sobre la fosforilación de AKT se encontraba comprometida debida a tratamientos con L-NAME. Este resultado sugiere que la relación entre el equol y la *óxido nítrico sintetasa* presenta un componente dependiente de tejido. Aunque futuros análisis al respecto se evidencian necesarios para dilucidar este vínculo.

²² Funciones que previenen la formación de placa de ateroma, causa principal del desarrollo de aterosclerosis.

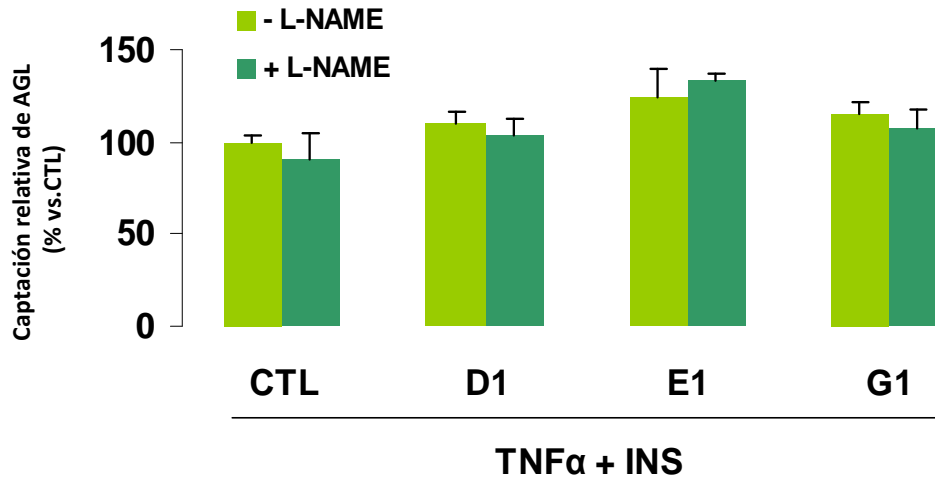


Figura 36. Efecto de la inhibición de la NOS sobre la captación de AGL estimulada por isoflavonas en adipocitos maduros insulinoresistentes.

Representación gráfica de la integración de los resultados obtenidos por análisis cinético de la captación de AGL de adipocitos maduros tratados con $TNF\alpha$ (10 μ g/mL) o/n, con L-NAME y D-NAME durante 30 minutos y posteriormente estimulados durante 10 minutos con Insulina (INS) 100nM, daidzeína (D), equol (E) y genisteína (G) a concentración 1 μ M. Los valores se muestran en porcentaje frente a la situación control (CTL) como la media \pm la DE ($n \geq 3$).

Resumen de este estudio: isoflavonas en tejido adiposo

En el tejido adiposo, la insulina gobierna el control de la homeostasis energética debido a que estimula la captación tanto de la glucosa como de los lípidos (Stahl et al. 2002). En individuos con sensibilidad a la insulina comprometida esta capacidad se ve limitada lo que conlleva a un incremento tanto de la glucemia como de la lipidemia *con todos los problemas relacionados de este efecto*, por lo que la búsqueda de biocompuestos que ayuden a regular estos fenómenos se presenta como interesante.

A nivel del tejido adiposo se sabe que las isoflavonas favorecen la captación de glucosa ya que se ha descrito que las isoflavonas promueven tanto la translocación de GLUT4 como la estimulación de su expresión génica (Clausnitzer et al. 2011). Sin embargo no existen estudios que demuestren estos efectos en situación de RI.

En este trabajo, se han testado las isoflavonas en un modelo adipocítico insulinoresistente. Se ha demostrado un incremento de la fosforilación tanto de AKT como de ERK 1y2 dependiente de tratamientos con isoflavonas a dosis fisiológicas y en condiciones de RI, lo que confiere la capacidad de estimular la captación de glucosa vía GLUT4, potencialmente en individuos con sensibilidad a la insulina comprometida.

Debido a que el fulvestrant es capaz de revertir estos efectos, se sugiere que el mecanismo de acción de las isoflavonas esté mediado por receptores estrogénicos. Apoyando esta teoría está la capacidad de los estrógenos para estimular la captación de glucosa en adipocitos maduros 3T3-L1 (Muraki, Okuya & Tanizawa 2006) y la capacidad de las isoflavonas para activar receptores estrogénicos, fundamentado en la similitud estructural entre las isoflavonas y los estrógenos (Cooke, Naaz 2005).

En relación al metabolismo lipídico, se ha demostrado que las isoflavonas estimulan la captación de AGL en adipocitos con RI y se sugiere que este fenómeno esté mediado por la capacidad que presentan las mismas sobre la estimulación de la señalización insulínica, estimada por un incremento de la fosforilación de AKT. Fenómeno que resultaría en una mayor translocación del transportador FATP1 hacia la membrana plasmática y que explicaría el incremento observado de la captación de AGL.

Los resultados aquí presentados no excluyen la posibilidad de otras vías involucradas en este proceso pero la hipótesis origen del estudio gana cada vez mas robustez si se tiene en cuenta que las isoflavonas que aportan una mayor fosforilación de AKT, son las que también inducen una mayor incorporación de AGL. El hecho de que el fulvestrant, inhibe tanto la fosforilación de AKT como la captación de AGL evidencia que el efecto está mediado por ER.

Una vez demostrado que las isoflavonas son biocompuestos susceptibles de incrementar la incorporación de AGL por parte del tejido adiposo en situación de RI se quiso comprobar su potencial capacidad de reducir la hiperlipidemia. Para ello se evaluó el efecto de las isoflavonas sobre la modulación de los procesos susceptibles de estimular la β oxidación en hepatocitos FAO ya que el hígado puede ser considerado como el principal órgano implicado en la regulación del metabolismo lipídico.

Efectos a nivel hepático: modelo de hepatocitos FAO

Existen estudios que atribuyen los beneficios de la ingesta de soja sobre el metabolismo lipídico a nivel hepático, a la capacidad de sus biocompuestos para actuar como ligandos sobre determinados receptores nucleares (Xiao et al. 2007, Shukla et al. 2007, Xiao, Wood & Gilani 2006). En concreto está descrita la relación entre la ingesta de soja y la mejora del metabolismo lipídico, con la activación de PPAR (Patel, Barnes 2010, Simmen et al. 2010) pero existe controversia en la identidad de los biocompuestos responsables de este efecto ya que son atribuidos tanto a la parte proteica (Hashidume et al. 2011, Ronis et al. 2009; Torre-Villalvazo et al. 2008) como a la fracción metanólica (Carrara et al. 2009) donde se encuentran las isoflavonas.

Existen trabajos que atribuyen capacidad ligante de los PPAR directamente a las isoflavonas (Cho et al. 2010, Leng, Jiang & Ji 2011, Medjakovic, Mueller & Jungbauer 2010). Aunque parece bien descritos estos resultados, son pocos los experimentos que han demostrado estos efectos en el rango de dosis óptimos para su validación en el campo de la alimentación, y por eso se incluyó su estudio en esta Tesis. Debido a las premisas que se acaban de comentar, y con el interés de abordar el objetivo principal de esta tesis, se planteó el estudio de la capacidad ligante de receptores PPAR por parte de isoflavonas de soja, a concentraciones dietarias.

Estudio de la capacidad ligante de las isoflavonas sobre PPAR α

Como control positivo se utilizó el compuesto GW7647, descrito como agonista de PPAR α y con el cual se observa una estimulación con carácter dosis dependiente de la actividad luciferasa (Figura 37). Por su parte las isoflavonas presentan una marcada función como ligandos de PPAR α en hepatocitos FAO tanto a concentraciones de 0.1 como de 1 μ M. Aportan un incremento medio del 53% respecto a la situación control. El rango varía entre el 21% en el caso de tratamientos con Genisteína 0.1 μ M hasta valores del 71% alcanzados por los tratamientos con Equol a dosis 1 μ M. En cualquier caso se denota un componente dosis dependiente que se hace más evidente en el caso de los tratamientos con el equol y la genisteína.

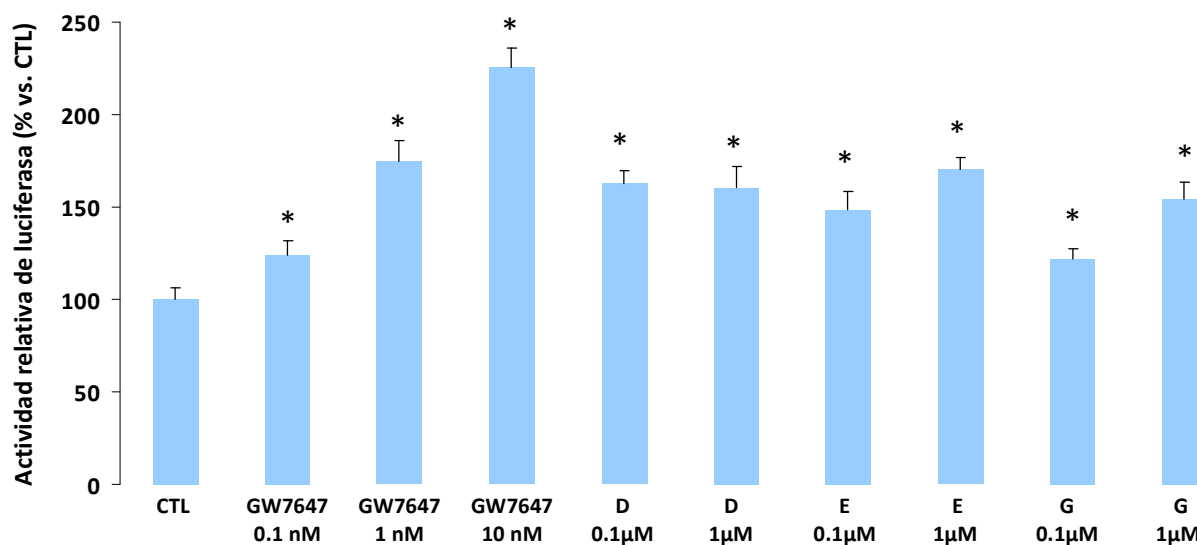


Figura 37. Capacidad de las isoflavonas para actuar como ligandos de PPAR α en hepatocitos FAO.

Representación gráfica de la actividad luciferasa de hepatocitos transfectados con PPAR α y estimulados con **GW7647** (de 0,1 a 10 nM) como control positivo y con daidzeína (**D**), equol (**E**) y genisteína (**G**) a concentraciones 0,1 y 1 μ M. Los valores se muestran en porcentaje frente a la situación control (**CTL**) como la media \pm la DE ($n \geq 3$). (* $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ en referencia al grupo CTL).

PPAR α está principalmente expresado en los tejidos susceptibles de realizar el catabolismo lipídico, tal como el músculo esquelético, el tejido adiposo y el hígado (Chinetti, Fruchart & Staels 2000, Mandard, Muller & Kersten 2004). En concreto, se ha publicado que la activación de PPAR α incrementa la β -oxidación de los TG a nivel hepático (Staels et al. 1998, Peters et al. 1997) lo que sugiere la disminución de la lipidemia en pacientes obesos. Teniendo en cuenta estas premisas, el hecho de que las isoflavonas presenten capacidad ligante de PPAR α (Figura 37) sugiere un importante potencial a las isoflavonas para la regulación de la β oxidación a nivel hepático. Para corroborar esta hipótesis se realizaron una serie de experimentos en los que se valoró el efecto de las isoflavonas sobre la β oxidación. En primer lugar se realizaron estudios con palmitato marcado radiactivamente con el fin de identificar y cuantificar el CO_2 generado a partir de su β oxidación. De este trabajo se sugirió un incremento de la β oxidación estimulado por isoflavonas (*resultados no mostrados*) pero la complejidad de la técnica dificultó la reproducibilidad de los resultados por lo que se planteó el estudio de la β oxidación, en vez de por cuantificación de la creación de producto, por la cuantificación de la pérdida de sustrato, como se expone a continuación.

Efectos de las isoflavonas sobre la β oxidación

Como se ha presentado en la figura 37, las isoflavonas son capaces de estimular la actividad de PPAR α y, a tenor de los trabajos que se acaban de comentar, este fenómeno esta relacionado con un incremento de la β -oxidación. Por consiguiente, parece lógico pensar que la concentración total de ácidos grasos en hepatocitos tratados con isoflavonas ha de ser menor que en el caso control. Para corroborar esta hipótesis se analizó la concentración total de TG en hepatocitos tratados con isoflavonas.

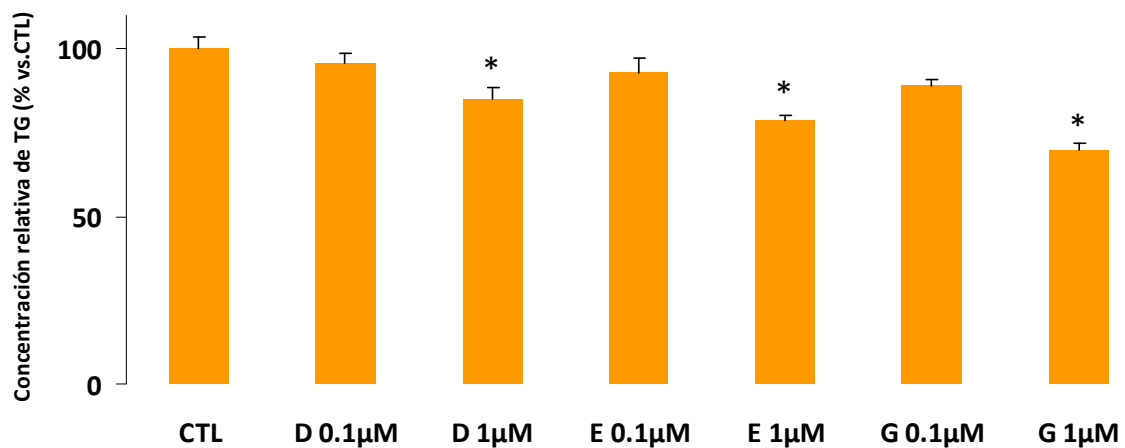


Figura 38. Concentración de TG en hepatocitos FAO tratados con isoflavonas.

Representación gráfica de la concentración final de TG en hepatocitos FAO incubados con palmitato (200µM) durante 24 horas y posteriormente con daidzeína (D), equol (E) y genisteína (G) a concentraciones 0.1 y 1µM durante 24 horas más. Los valores se muestran en porcentaje frente a la situación control (CTL) como la media \pm la DE ($n \geq 3$). (* $p < 0,05$ en referencia al grupo CTL).

Acorde a la hipótesis planteada, en la figura 38 se puede comprobar como todos los tratamientos con isoflavonas sobre hepatocitos FAO resultan en una reducción de la concentración final de TG. Estas diferencias se hacen estadísticamente significativas en todos los tratamientos de concentración 1µM. A estas concentración, las reducciones de la concentración de TG, se encuentra entre el 15% (con la daidzeína) respecto a la situación control y del doble, 30%, en el caso de la genisteína. Curiosamente, así como las isoflavonas a todas las concentraciones actúan como ligando de PPAR α (Figura 37) son sólo a dosis 1 µM las que demuestran un descenso significativo de la concentración de TG (Figura 38).

Más sorprendente es el efecto de la genisteína ya que aún presentando un menor nivel ligante de PPAR α (Figura 37) es el que aporta una mayor estimulación de la β oxidación (Figura 38). Esta correlación inversa sugiere que el efecto de la genisteína sobre la estimulación de la β oxidación a nivel hepático pueda estar mediado en parte por la activación de PPAR α pero también por otras vías, como por ejemplo la del AMPK ya que se ha comprobado que la genisteína es capaz de incrementar la actividad de esta quinasa (Hwang et al. 2005) y que su activación se relaciona directamente con un incremento de la β oxidación a nivel del hígado (Puljak et al. 2008).

Efectos sobre la regulación de la expresión génica

Una vez se comprobada la correlación que aportan las isoflavonas entre la activación de PPAR α y la reducción de los TG intracelulares, se quiso indagar sobre los mecanismos específicos de actuación.

Es bien conocido que las mitocondrias, al igual que los peroxisomas, son los únicos orgánulos celulares capaces de realizar procesos de β oxidación de ácidos grasos (Lazarow, De Duve 1976). Se sabe que PPAR α actúa como factor de transcripción de genes relacionados con la β oxidación tanto a nivel de mitocondria como de peroxisoma. A nivel mitocondrial, la activación de PPAR α se relaciona con una estimulación de la expresión de genes involucrados en la β oxidación como el transportador de ácidos grasos al interior mitocondrial, la carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT-1) (Lefebvre et al. 2006). A nivel de peroxisoma, se ha comprobado que estimula la expresión de Acetil CoA oxidasa (AOX) (Roepstorff et al. 2005).

Teniendo en cuenta estos antecedentes se hipotetizó que el efecto de las isoflavonas sobre la reducción de la concentración de TG podría estar mediado por a la regulación de la expresión génica tanto de CPT1 como de AOX lo que resultaría en un incremento de la β -oxidación.

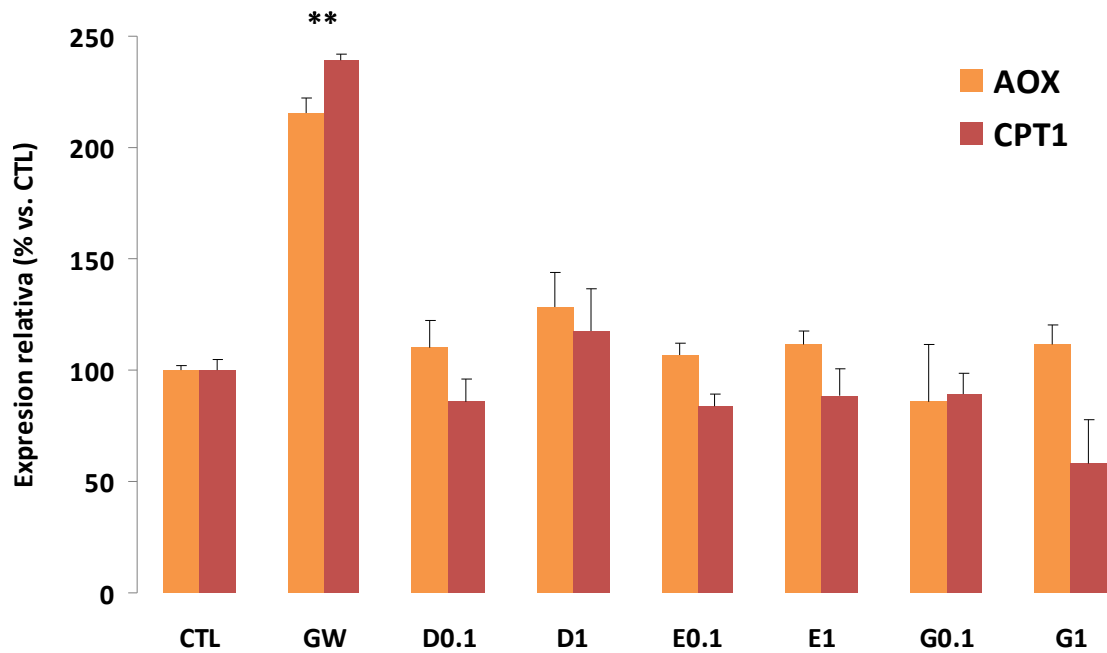


Figura 39. Efectos de las isoflavonas sobre la estimulación de la expresión génica de CPT-1 y AOX. Representación gráfica de la expresión relativa de CPT-1 y AOX obtenida por RT-PCR del mRNA de hepatocitos FAO incubados con durante 24 horas con posteriormente con GW7647 (GW) 1 nM, como control positivo, y con la isoflavonas daidzeína (D), equol (E) y genisteína (G) a concentraciones 0.1 y 1 μ M. Los valores se muestran en porcentaje frente a la situación control (CTL) como la media \pm la DE ($n \geq 3$). (** $p < 0,001$ en referencia al grupo CTL).

Contrariamente a lo esperado, el análisis cuantitativo de la RT-PCR reveló que las isoflavonas a concentraciones 0.1 y 1 μ M no estimulan, de forma significativa, la expresión ni de CPT1 ni de AOX en hepatocitos FAO (Figura 39). Aunque de forma particular los tratamientos con daidzeína 1 μ M sí que ofrecen un incremento de la expresión de ambos genes y, de forma general, las isoflavonas estimulan más la expresión de AOX que de CPT1, en ningún caso las diferencias son estadísticamente significativas. Contrariamente a los resultados aquí presentados sobre CPT1 son los obtenidos por Eui Seok Shin y colaboradores, que demostraron, en un modelo similar (hepatocitos HEPG2) un incremento tanto de la actividad como de la expresión de CPT1 debida a tratamientos con daidzeína y con genisteína (Shin et al. 2006) si bien es cierto que las dosis mínimas de isoflavonas a las que se demuestran estos resultados son más del doble de las utilizadas en el presente trabajo. El hecho de observar una tendencia al incremento de la expresión de AOX más que de CPT1 sugiere que las isoflavonas presentan un mayor efecto a nivel de peroxisoma que de mitocondria aunque se requieren más experimentos para asegurar esta relación.

Estudio de la capacidad ligante de las Isoflavonas sobre PPAR γ

En el tejido hepático se encuentra principalmente expresada la isoforma α de los PPAR, pero estudios recientes demuestran una interesante relación entre el PPAR γ hepático y el metabolismo glucídico (Zhang et al. 2011). Como el objetivo de esta Tesis es el estudio de la potencial capacidad de las isoflavonas sobre la modulación del balance energético, principalmente en el metabolismo lipídico y glucídico, y el hígado participa activamente y ambos procesos metabólicos, se presentó interesante el estudio de las isoflavonas como posibles ligandos de PPAR γ .

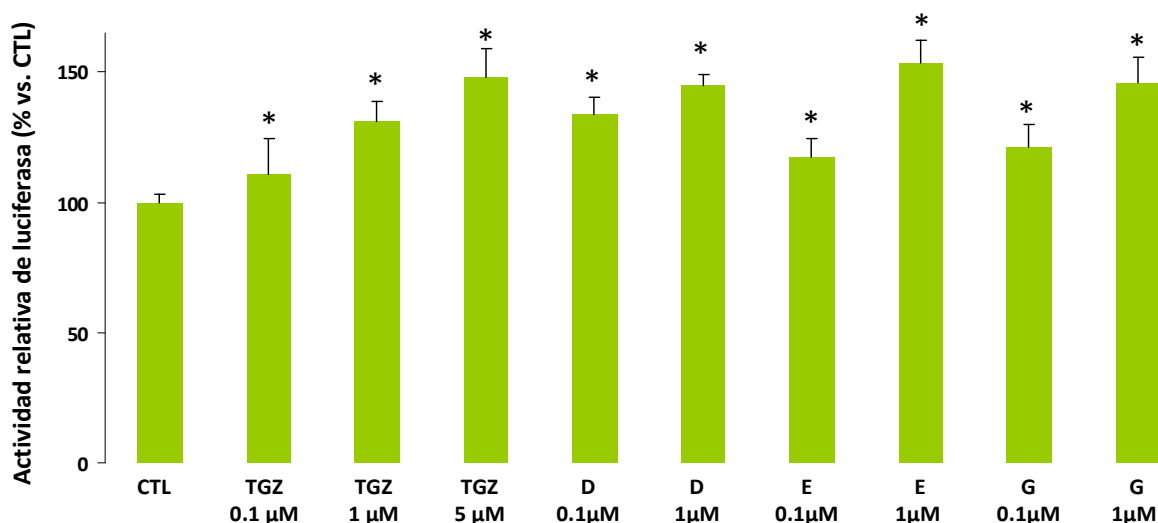


Figura 40. Capacidad de las isoflavonas para actuar como ligandos de PPAR γ en hepatocitos FAO. Representación gráfica de la actividad luciferasa de hepatocitos transfected con PPAR γ y estimulados con troglitazona (TGZ) (de 0.1 a 5 μ M) como control positivo y con daidzeína (D), equol (E) y genisteína (G) a concentraciones 0.1 y 1 μ M. Los valores se muestran en porcentaje frente a la situación control (CTL) como la media \pm la DE ($n \geq 3$). (* $p < 0,05$ y en referencia al grupo CTL).

En este caso, se utilizó la troglitazona como control positivo ya que es conocido su efecto sobre la activación de PPAR γ (Rogue et al. 2011). Este hecho se corrobora en células FAO ya que presenta una activación dosis dependiente de PPAR γ (Figura 40). Más sorprendentes son aún los resultados obtenidos puesto que, en todos los casos, las isoflavonas incrementan la actividad de PPAR γ de manera significativa y con componente dosis dependiente. Este comportamiento se ve claramente diferenciado en el caso de los tratamientos con equol y genisteína ya que el aumento de un orden de magnitud en la dosis repercute en un incremento de la actividad de PPAR γ del 36% y 25% respectivamente.

Resumen de este estudio: isoflavonas en hepatocitos FAO

En el parénquima hepático, la interrelación entre el metabolismo de lípidos y de carbohidratos está regulada en gran parte por PPAR. Estos receptores coordinan varias vías metabólicas involucradas en establecer la homeostasis energética, mediante el control de la expresión de proteínas clave en las vías, como: la LPL, la acil-CoA oxidasa, FATP, acil-CoA deshidrogenasa, CPT1, etc. con el fin de propiciar la adaptación del organismo a diversos estímulos ambientales, tales como el aumento de la ingesta de lípidos y / o hidratos de carbono a medio y largo plazo.

Datos epidemiológicos y estudios de intervención en humanos demuestran que un mayor consumo de soja se correlaciona con una menor incidencia de la diabetes y una mayor sensibilidad a la insulina (Jayagopal et al. 2002, Hermansen et al. 2001). En los estudios *in vitro* se demuestra la capacidad de los biocompuestos de soja sobre la modulación de la activación de PPAR, (Rogue et al. 2011) y sobre la expresión de su posterior genes diana (Mezei et al. 2003, Dang, Lowik 2004). Sin embargo, no está claro que estos efectos sean debidos a las proteínas, a las isoflavonas o a otro tipo de biocompuestos derivado de soja. Además, los estudios que atribuyen estas propiedades a las isoflavonas, han sido realizados a concentraciones muy superiores a las óptimas para su futura validación en el campo de la alimentación funcional.

En esta Tesis se demuestra que las isoflavonas, a concentraciones dietarias, presentan capacidad ligante dual tanto de PPAR α como γ en hepatocitos FAO. Como respuesta de la activación de PPAR α , se ha demostrado que las isoflavonas repercuten en la disminución de los niveles de TG intracelular lo que sugiere que su efecto se vía estimulación de la β oxidación. Sin embargo, no se han encontrado diferencias significativas en cuanto a la estimulación de la expresión de genes relacionados directamente con este proceso (CPT1 y AOX). Aunque puede ser que el efecto sea debido, no tanto a un incremento de la expresión, como a una estimulación de la actividad de dichas enzimas. Shin y colaboradores demostraron que tanto la genisteína como la daidzeína a dosis cercanas a las fisiológicas (10 μ M) eran capaces de incrementar la actividad de la enzima CPT-1 (Shin et al. 2006). Sin embargo en esta

Tesis no se han encontrado diferencias significativas al respecto aunque si se denota una tendencia estimuladora de la expresión sobretodo a nivel de AOX, hecho que sugiere que los efectos de las isoflavonas sobre la β oxidación pueden estar más involucrados a nivel de peroxisoma que de mitocondria, aunque más estudios al respecto serian necesarios para aclarar esta hipótesis.

Aunque a menor escala que en el caso del metabolismo lipídico, el tejido hepático también interviene en la regulación del metabolismo glucídico vía PPAR γ . En este trabajo se ha demostrado que las isoflavonas presentan actividad ligante no sólo en PPAR α , sino también en la isoforma γ . Coherente a estos resultados, Ronis et al. demostraron en un modelo *in vivo* que la ingesta durante 14 días de una dieta a base de soja resultaba en un incremento no sólo de la actividad de PPAR γ sino también de genes involucrados en la regulación del metabolismo glucídico frente a otras dietas control (Ronis et al. 2009) aunque no queda claro que el efecto sea atribuido a un determinado tipo de biocompuesto derivado de la soja. Teniendo en cuenta los resultados de presentado en esta Tesis, se puede estimar que el efecto descrito por Ronis puede ser debido a los efectos de las isoflavonas mas que de la fracción proteica de la soja.

Otros autores atribuyen que los efectos beneficiosos de la soja dietaria sobre el metabolismo energético a nivel hepático, a la capacidad de activación de receptores SREBP (Torre-Villalvazo et al. 2008). Resultados que se sugieren complementarios y que seria importante estudiar *in vitro* para poder identificar los biocompuestos específicos responsables de este fenómeno.

Estudio *in vitro* de las isoflavonas sobre la modulación de la respuesta inflamatoria

Los resultados que se han mostrado hasta el momento ayudan a entender los mecanismos por los cuales la ingesta de soja, en concreto de las isoflavonas, está asociada a la disminución de la fisiopatología insulinoresistente, lo que demuestra su potencial efecto terapéutico para el tratamiento de esta patología. Pero, de todos es sabido que tanto o más importante es la prevención de una enfermedad que la curación, por lo que se planteó como otro objetivo de esta Tesis el estudio de la capacidad preventiva de la RI atribuible a la ingesta de isoflavonas de soja.

Cada vez son más los trabajos que vinculan el desencadenamiento de la obesidad con el proceso de inflamación, especialmente en el tejido adiposo, y con ello favorecer el desarrollo del SM (Guha, Mackman 2001, Muoio, Newgard 2006, de Ferranti, Mozaffarian 2008). Aunque las causas de la inflamación relacionada con la obesidad no han sido completamente dilucidadas, se ha puesto de manifiesto que la infiltración de los macrófagos en el tejido adiposo, parece jugar un papel clave en la fisiopatología de la inflamación (Weisberg et al. 2003, Xu et al. 2003) proceso que se representa en la figura 41 y que se resume a continuación.

En los primeros estadios del proceso inflamatorio, los macrófagos se infiltran en el tejido adiposo inducidos por el efecto señalizador de MCP1 y posteriormente activados por los AGL secretados por los adipocitos maduros. Una vez infiltrados y activados, los macrófagos secretan TNF α lo que induce una secreción adicional de MCP-1 y de AGL por parte de los adipocitos maduros, originando así un *círculo vicioso* que agrava la inflamación en el tejido adiposo y con ello la resistencia a la insulina (Suganami, Nishida & Ogawa 2005, Suganami et al. 2007, Hirai et al. 2010) (Figura 41). De este modo, el “bloqueo” de esta retroalimentación positiva se revela como un importante diana de actuación para el control de la inflamación del tejido adiposo y con ello la prevención de la insulinoresistencia.

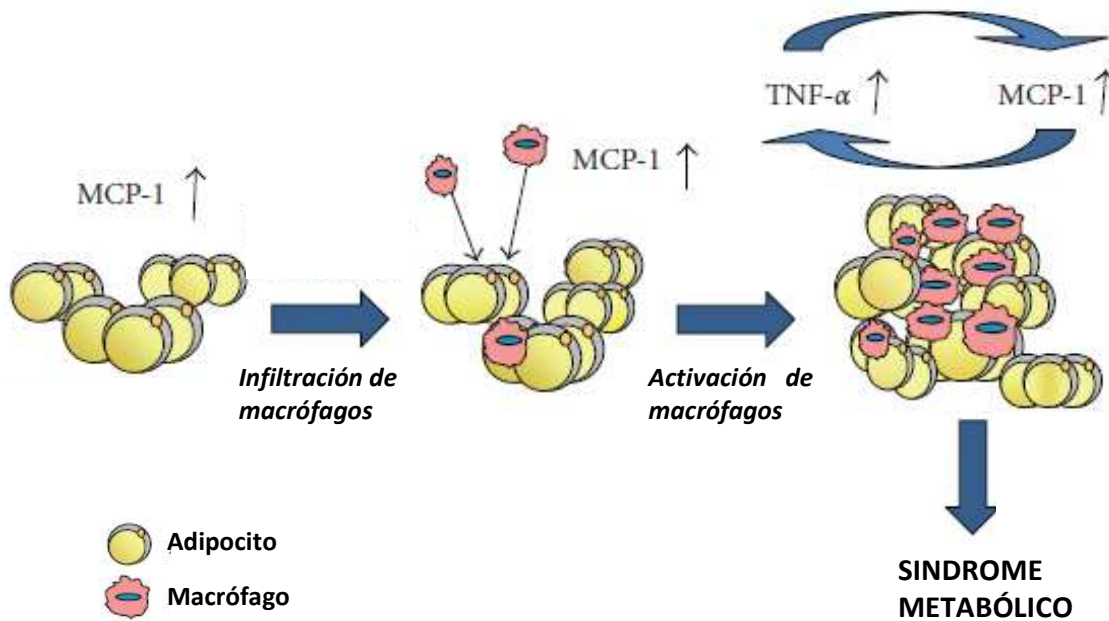


Figura 41. Esquema del desarrollo del círculo vicioso de inflamación entre adipocitos y macrófagos.
Adaptación de la propuesta por Hirai (Hirai et al. 2010)

Aunque todavía está bajo estudio, diferentes autores suponen que el efecto beneficioso de las isoflavonas sobre la prevención de determinadas enfermedades, pueda ser debido a la modulación del proceso inflamatorio (Rimbach et al. 2008). Trabajos recientes han reportado que estos mismos biocompuestos presentan la capacidad de regular la expresión genética de biomarcadores de inflamación (Blay et al. 2010). Pero aún está por estudiar el papel de las isoflavonas sobre la regulación del proceso de inflamación del tejido adiposo.

Teniendo en cuenta estos argumentos se plantearon el estudio de las isoflavonas de soja a concentraciones dietarias, como posibles moduladores de los estadios de inflamación del tejido adiposo que, como se acaba de comentar, está definido como desencadenante de los principales mecanismos de RI. Este trabajo fue llevado a cabo en uno de los grupos líderes en el estudio de la regulación del proceso inflamatorio del tejido adiposo por biocompuestos de origen vegetal, el grupo de biotecnología de los alimentos, liderado por el Prof. Dr. Kawada, de la Universidad de Kyoto (Japón).

Para abordar este estudio se realizaron diferentes trabajos *in vitro*. En primer lugar, se analizó la producción de los mediadores inflamatorios: MCP1, TNF α y NO, en un modelo de cocultivo en contacto directo entre adipocitos maduros 3T3-L1 y macrófagos RAW 264.7. Posteriormente, para concretar los efectos específicos de las isoflavonas sobre cada tipo celular, se realizaron análisis de cultivos aislados, pero tratados con medio condicionado proveniente de la línea celular complementaria.

Estudio en modelo de cocultivo directo entre adipocitos 3T3-L1 y macrófagos RAW 264.7

En primer lugar se validó el modelo de cocultivo en contacto directo entre adipocitos diferenciados 3T3-L1 y macrófagos RAW 264.7 siguiendo el sistema optimizado por el grupo donde se realizó este trabajo y explicado en el correspondiente apartado de materiales y métodos. Posteriormente se realizaron los tratamientos con las isoflavonas y se estimó su capacidad para regular el proceso inflamatorio mediante la cuantificación de los mediadores inflamatorios MCP1, TNF α y NO en el medio de cultivo y cuyos resultados se presentan a continuación (Figura 42).

Como control del modelo experimental se contrastaron los mediadores inflamatorios basales detectados en adipocitos 3T3-L1 diferenciados con los producidos en el cocultivo de la misma línea celular con macrófagos RAW 264.3. El modelo de cocultivo reveló un marcado incremento en la secreción de todos los mediadores inflamatorios analizados (Figuras 42 A-C) por lo que queda validado para el estudio de la regulación de, al menos, TNF α , MCP1 y NO. En cuanto a los tratamientos con las isoflavonas, todas mostraron una marcada disminución la secreción de TNF α (Figura 42 B). La misma tendencia se observó en la reducción de los niveles de NO aunque sólo mostraron diferencias significativas los tratamientos a concentración 1 μ M (Figura 42C). Por su parte, el equol y la genisteína provocaron una disminución significativa en los niveles de MCP1 (Figura 42A).

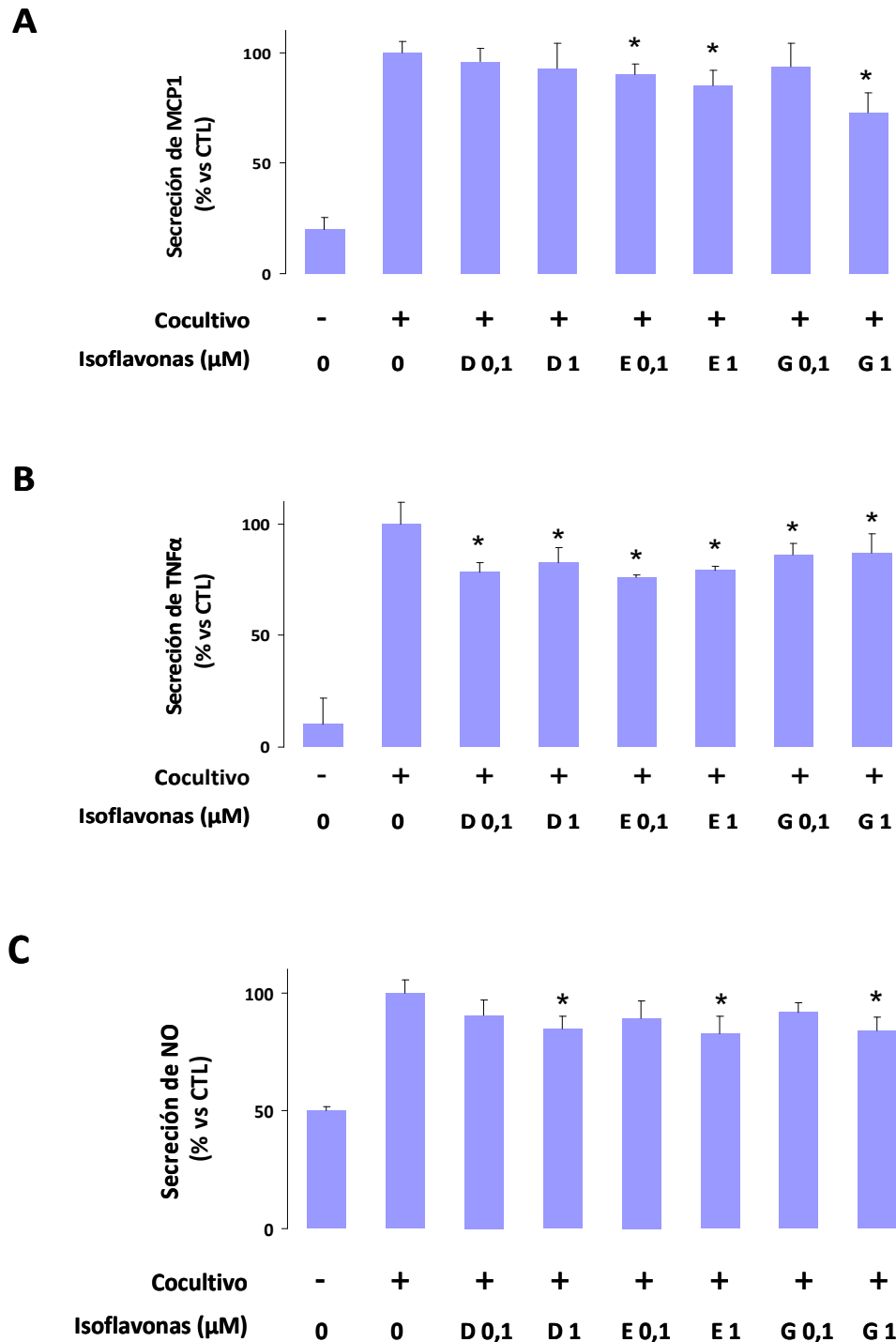


Figura 42. Niveles de los mediadores inflamatorios MCP1 (A), TNF α (B) y NO (C) dependientes de isoflavonas en modelo de cocultivo.

Una vez creado el sistema de cocultivo en contacto directo entre adipocitos y macrófagos, se trató el sistema con las isoflavonas daidzeína (D), equol (E) y genisteína (G) a concentración 0.1 y 1 μM durante 24 horas. Posteriormente se recogió el medio de cultivo donde se analizó la concentración de MCP1 y TNF α por ELISA y el NO utilizando el reactivo de Griess. Los valores se muestran en porcentaje frente a la situación control (CTL) como la media \pm la DE ($n \geq 3$). (* $p < 0,05$ en referencia al grupo sin tratamiento con isoflavonas).

Para descartar que el resultado observado de disminución de los marcadores inflamatorios no fuera debido a posibles efectos de los compuestos sobre la supervivencia celular, se estimó la viabilidad de las mismas mediante la técnica CellTiter96 (Promega, WC, EE.UU.) siguiendo las recomendaciones del fabricante, como se describe en materiales y métodos. De esta manera se comprobó que las isoflavonas a las concentraciones utilizadas: 0,1 y 1 μM ; no disminuyen la viabilidad celular del modelo de cocultivo entre 3T3-L1 y a RAW 264.7 (Figura 43).

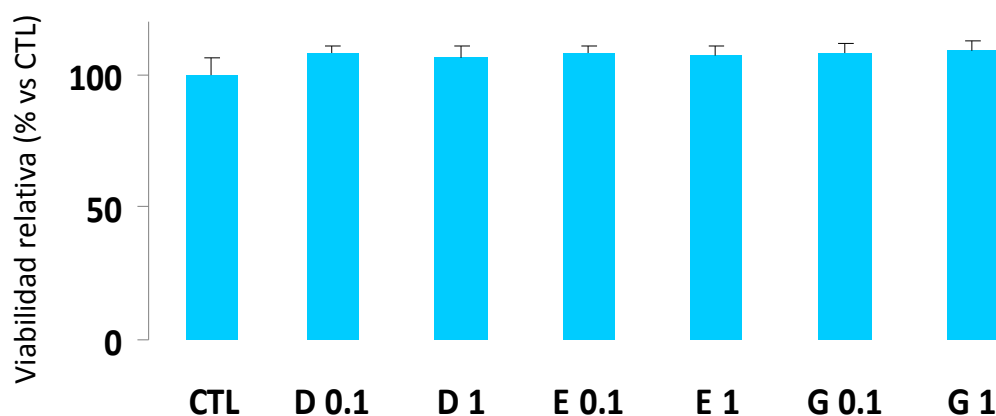


Figura 43. Viabilidad celular dependiente de isoflavonas en modelo de cocultivo.

La incubación de las células diferenciadas con las isoflavonas daidzeína (D), equol (E) y genisteína (G) a concentración 0.1 y 1 μM se realizó en condiciones de privación de suero durante 24h y la estimación de la viabilidad celular se realizó por medio de la técnica CellTiter96 siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los valores se muestran en porcentaje frente a la situación control (CTL) como la media \pm la DE ($n \geq 3$)

Posteriormente, para dilucidar si los efectos evidenciados sobre los mediadores inflamatorios eran específicos de modelo celular, se realizaron estudios similares en cultivos aislados pero bajo condiciones de inflamación creadas con el medio condicionado del modelo celular complementario.

Estudio de los efectos de las isoflavonas dependientes del tipo celular

Debido a que se realizaron cultivos aislados se pudo analizar, no sólo la concentración de MCP1, TNF α y NO en medio de cultivo sino también la modulación de la expresión génica, estimulada por los tratamientos con isoflavonas, de los mismos mediadores inflamatorios.

Efectos en adipocitos 3T3-L1 cultivados con medio condicionado de macrófagos RAW 264.7.

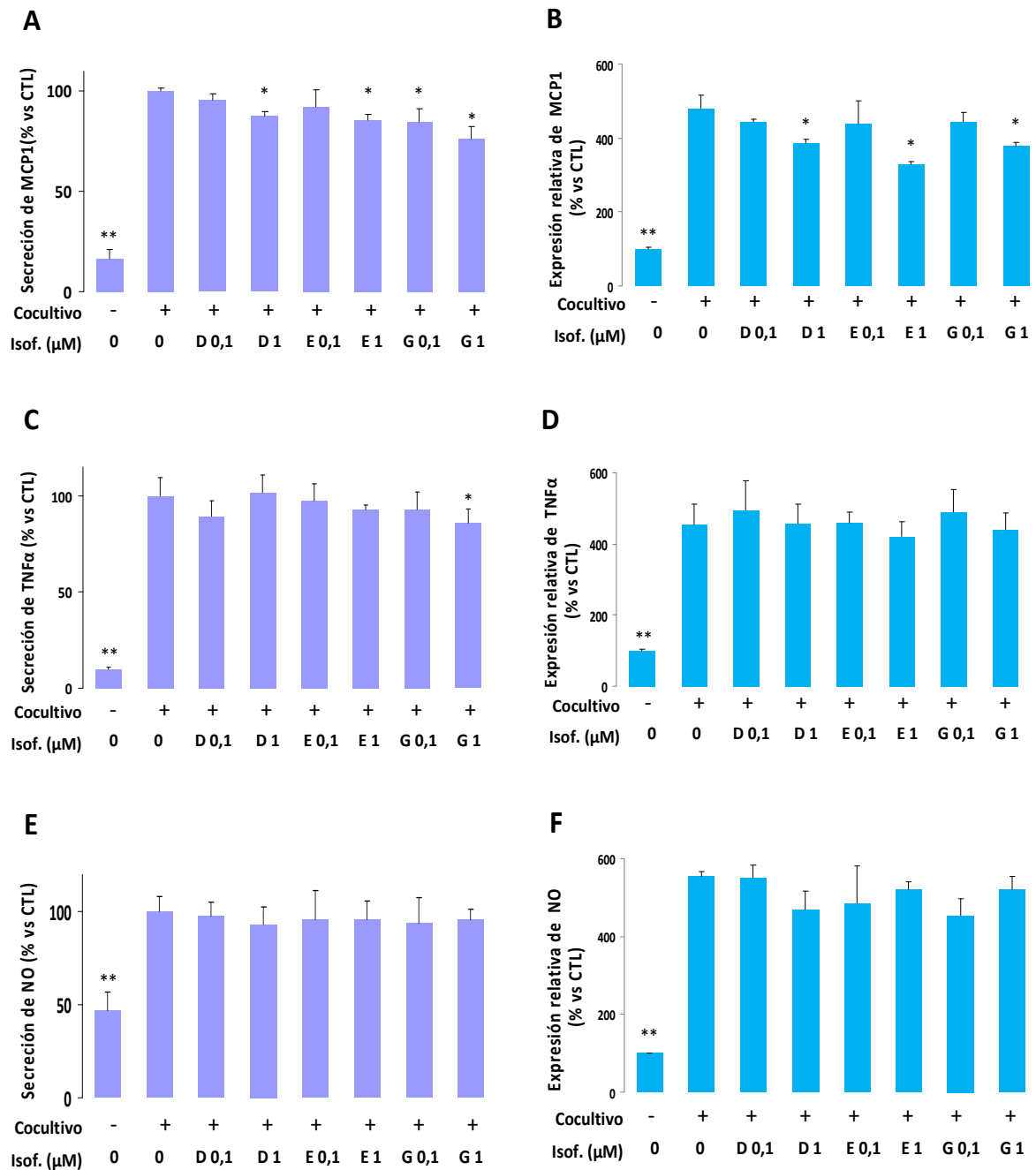


Figura 44. Efecto de las isoflavonas sobre la estimulación y la expresión génica de MCP-1 (A y B), TNF-α (C y D) y NO (E y F) en adipocitos cultivados con medio condicionado por macrófagos activados

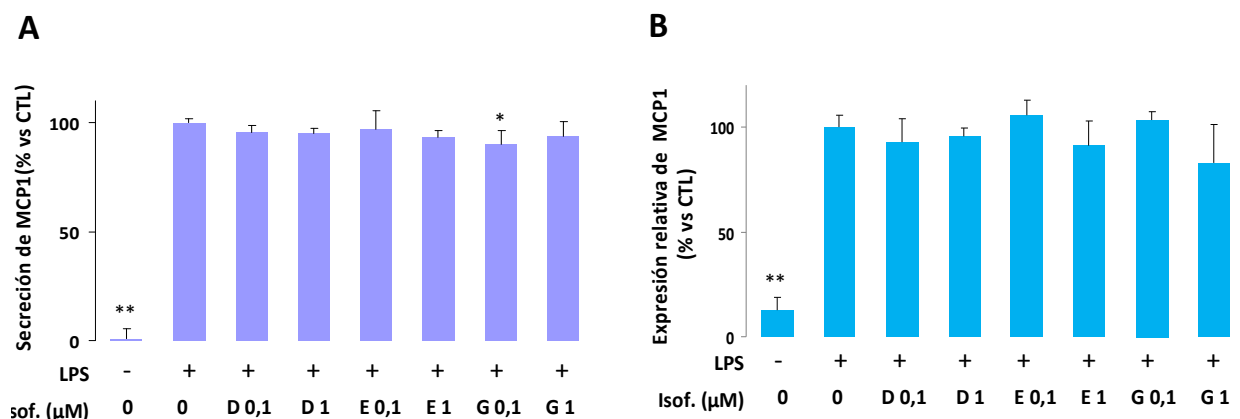
Los adipocitos maduros se incubaron durante 24h con el medio condicionado de macrófagos RAW 264.7 y suplementado con las isoflavonas (Isof.) daidzeína (D), equol (E) y genisteína (G) a concentraciones 0,1 y 1μM. Los niveles de TNF-α y de MCP-1 del medio de cultivo se midieron por ELISA y la producción de NO fue estimada utilizando el reactivo de Griess. La expresión relativa del mRNA fue medida por Real Time PCR (RT-PCR). Los valores se muestran en porcentaje frente a la situación control (CTL) como la media ± la DE (n≥3). (* p<0.05 y ** p<0.01 en referencia al grupo control sin tratamiento con isoflavonas)

En este caso, el modelo experimental analizado consistió en la adición del medio condicionado de macrófagos RAW 264.7 activados con lipopolisacáridos (LPS), al cultivo de adipocitos maduros 3T3-L1. En todos los casos la incorporación del medio condicionado provocó un aumento significativo de los niveles de TNF α , MCP1 y NO respecto al control (Figura 44 A, C y E). Por su parte, los niveles de expresión de mRNA de los mediadores también se incrementaron por el efecto del medio condicionado (Figura 44 B, D y F). Sin embargo, aunque sí se denota una tendencia a la reversión, los tratamientos con las isoflavonas sólo disminuyeron de forma significativa tanto los niveles como la expresión de MCP1, con una tendencia dosis dependiente (Figura 44 A y B). Resultados similares fueron obtenidos por Hye Yeon Cho et al. en un modelo celular endotelial, (Cho et al. 2011) pero, a parte de las características específicas del modelo elegido, que distan de las actuaciones paracrinas mediadas por el tejido adiposo, se utilizaron concentraciones de hasta dos órdenes de magnitud superiores a las utilizadas en este trabajo, lo que hace difícil la extrapolación de los resultados al ámbito de la alimentación funcional.

A continuación se presentan los resultados referentes al estudio de las isoflavonas sobre la línea celular de macrófagos RAW 264.7

Efectos en macrófagos RAW 264.7 activados por LPS

Para concluir esta parte del estudio inflamatorio del tejido adiposo, se investigó el efecto antiinflamatorio de las isoflavonas sobre los macrófagos RAW 264.7 activados con LPS cuyos resultados se exponen en la figura 45.



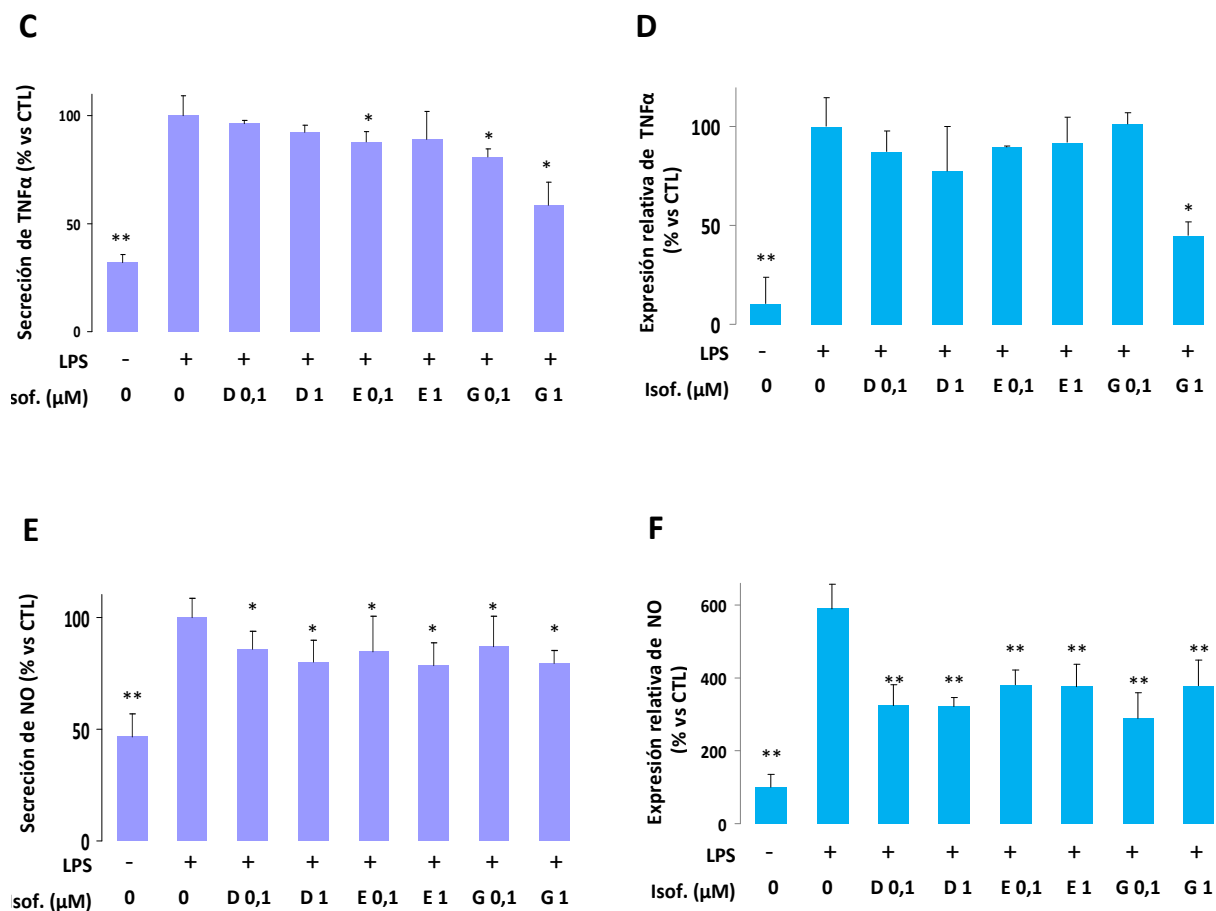


Figura 45. Efecto de las isoflavonas sobre la estimulación y la expresión génica de MCP-1 (A y B) TNF- α (C y D) y NO (E y F) en macrófagos activados con LPS

Los macrófagos fueron activados con LPS (5 μ g/mL) y suplementados con las isoflavonas (Isof.) daidzeína (D), equol (E) y genisteína (G) a concentraciones 0,1 y 1 μ M. Los niveles de TNF- α y de MCP-1 del medio de cultivo se midieron por ELISA y la producción de NO fue estimada utilizando el reactivo de Griess. La expresión relativa del mRNA fue medida por Real Time PCR (RT-PCR). Los valores se muestran en porcentaje frente a la situación control (CTL) como la media \pm la DE ($n \geq 3$). (* $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ en referencia al grupo control sin tratamiento con isoflavonas)

La adición de LPS resultó en un considerable aumento del nivel de la secreción de TNF- α , MCP-1 y NO respecto al control (Figura 45 A, C y D). Por su parte, a excepción de los tratamientos con genisteína a concentración 0.1 μ M, los tratamientos con las isoflavonas no mostraron diferencias significativas ni en los niveles de MCP-1 ni en su expresión génica, aunque sí denotaron una tendencia a la disminución (Figura 45 A y B). El tratamiento con genisteína disminuyó significativamente la secreción de TNF α de una manera dosis-dependiente (Figura 45 C) suprimiendo también la expresión del mRNA de TNF α (Figura 45 D).

La activación de los macrófagos con LPS resultó en un considerable incremento de la producción de NO (Figura 45 E) que se ve claramente revertida debido al efecto de las isoflavonas con valores entorno al 20% en cuanto a los niveles de liberación de NO (Figura 45 E) y del orden del 50% en cuanto a la expresión genética de la forma inducible de la sintasa de óxido nítrico (iNOS) (Figura 45 F). Estos resultados indican que las isoflavonas presentan efectos anti-inflamatorios en macrófagos activados con LPS sobretodo relacionados con la disminución de la liberación de NO. En un modelo similar Blay y colaboradores demostraron una reducción tanto de los niveles de NO como de la expresión de eNOS debida a tratamientos de equol y genistéina, tanto si se administraban previamente como posteriormente a la activación de los macrófagos con LPS (Blay et al. 2010). Sin embargo, las dosis empleadas en este trabajo, aunque cercanas a las fisiológicas, estaban fuera del rango óptimo para la extrapolación de los resultados a la ingesta de soja.

Resumen del estudio: *Isoflavonas en la respuesta inflamatoria del tejido adiposo*

En este apartado se demuestra que tratamientos a dosis dietarias de isoflavonas suprimen, de manera significativa y sin comprometer la viabilidad celular, la producción de los mediadores pro-inflamatorios: TNF α , MCP1 y NO en un sistema de cocultivo en contacto directo entre adipocitos maduros 3T3-L1 y macrófagos RAW 264.7. Sin embargo, no se obtiene el mismo resultado en los experimentos realizados a los tipos celulares cultivados de forma aislada. Lo que explicaría un efecto de las isoflavonas dependientes de tipo celular.

Cabe destacar que los estudios en cocultivo revelaron que las isoflavonas presentan un efecto más eficaz en la inhibición de los mediadores inflamatorios analizados, sobretodo en el caso del TNF α , que cuando se realizó el análisis en los cultivos aislados. Este dato sugiere que el sistema de cocultivo es menos efectivo que la estimulación con LPS en la activación de macrófagos debido, posiblemente, al efecto que presenta el LPS sobre la activación del receptor TLR-4 (Aderem, Ulevitch 2000). Este fenómeno resulta en la activación de la biosíntesis de diversos mediadores inflamatorios, (Medzhitov, Janeway 2000) que conllevaría un alto grado de inflamación difícilmente

revertido por las isoflavonas y no alcanzable en el sistema de cocultivo, siendo este último más representativo de la fisiopatología *in vivo*. Independientemente, hay que tener en cuenta que son tanto o más importante las relaciones paracrinias existentes entre ambos tipos celulares que los efectos a nivel individual, debido al círculo vicioso que se establece entre adipocitos y macrófagos que desencadena la IR (Suganami, Nishida & Ogawa 2005, Suganami et al. 2007). En este aspecto, se ha demostrado que las isoflavonas son capaces de bloquear este circuito quedando evidente su potencial usos para el tratamiento de la inflamación del tejido adiposo y con ello de la resistencia a la insulina.

En los experimentos realizados en adipocitos maduros cultivados con medio condicionado, los tratamientos con las isoflavonas sólo mostraron diferencias significativas en los niveles de MCP1, eso sí, tanto de secreción como de expresión génica, pero no de TNF α ni de NO. Este hecho invita a pensar que la modulación de estos mediadores venga por parte del efecto de las isoflavonas sobre los macrófagos, hecho que concuerda con los resultados obtenidos en los experimentos con macrófagos activados con LPS. En este caso, sí que se evidencian diferencias significativas tanto en los niveles secretados como en la expresión relativa especialmente de NOS, pero también de TNF α .

En conclusión, las isoflavonas derivadas de soja, disminuyen la producción de mediadores proinflamatorios como el TNF α , MCP1, y NO en un sistema de cocultivo entre adipocitos 3T3-L1 y macrófagos RAW 264.7. En este estudio también se ha demostrado que la reducción de los niveles de MCP-1 se debe principalmente al efecto de las isoflavonas sobre los adipocitos, mientras que la disminución tanto de los niveles de TNF- α como de NO en cocultivo se puede atribuir a los efectos sobre los macrófagos. Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que las isoflavonas derivadas de la soja pueden ser incluidas como ingredientes bioactivos en alimentos funcionales ya que se ha demostrado su efecto en la regulación del componente inflamatorio del tejido adiposo lo que resultaría en la atenuación tanto de la RI como de sus manifestaciones patológicas, especialmente el SM.

Estudio *in vitro* de las vías moleculares de actuación del EGCG como modulador del metabolismo energético independiente de insulina

Como se ha comentado en la introducción, varios trabajos atribuyen los efectos beneficiosos del té verde sobre el control del SM, a su elevada concentración en catequinas, en especial de EGCG. Se ha demostrado que el EGCG es eficaz en modelos animales diabéticos ya que aumenta notablemente la tolerancia a la glucosa y mejora diferentes parámetros tanto del metabolismo glucídico como del lipídico. Sin embargo, los mecanismos subyacentes a estos fenómenos se encuentran aún bajo estudio, y aunque si que se han propuesto diferentes mecanismos, son muy pocos los trabajos que los certifican a concentraciones óptimas para poder ser atribuibles a la ingesta de té verde. En consecuencia, en esta parte del trabajo, se presentaran los resultados derivados de la hipótesis de esta Tesis con el fin de aportar conocimiento sobre las vías de actuación molecular del EGCG en un modelo de músculo esquelético.

En la literatura son diferentes las vías de actuación que se sugieren para explicar los efectos del EGCG pero muy pocas las que lo hacen trabajando dentro del rango de concentraciones encontradas en plasma después de la ingesta de té. De hecho, dependiendo de las dosis utilizadas, los resultados obtenidos del tratamiento con EGCG se presentan muy variados. A modo de ejemplo, tratamientos a dosis iguales o superiores a 20 μ M están relacionados con la estimulación de apoptosis en diferentes líneas celulares (Lambert, Yang 2003, Yang et al. 2006, Waltner-Law et al. 2002) lo que sugiere un efecto beneficioso del EGCG en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer. Sin embargo, estos datos se pueden atribuir a tratamientos farmacológicos con EGCG no derivados de la ingesta de té, ya que catequinas como el EGCG presentan una limitada biodisponibilidad en el ser humano lo que hace prácticamente imposible encontrar concentraciones de EGCG superiores a 5 μ M en plasma tras la ingesta de té de forma habitual (Lee et al. 2002).

Por su parte, se ha descrito que a concentraciones inferiores al 5 μ M el efecto del EGCG sobre la regulación del metabolismo energético viene mediada por la activación de la vía de AMPK y no tanto por la estimulación de la vía insulínica (Collins et al. 2007). Debido a que en este estudio el objetivo es trabajar a concentraciones dietarias de EGCG, se planteó el estudio del EGCG como modulador de la vía AMPK.

Efectos sobre la modulación de la vía AMPK

Efectos del EGCG sobre AMPK

Experimentos previos realizados en el laboratorio donde se ha llevado a cabo esta tesis, revelaron un incremento de AMPK en músculo esquelético de ratón, dependiente de la ingesta de una bebida a base de té verde. Posteriormente, se obtuvieron resultados similares substituyendo el té por su principal catequiza, el EGCG (*datos no publicados*). Para completar este trabajo, se planteó el estudio *in vitro* del EGCG con el fin de esclarecer si su efecto estaba relacionado no sólo con el incremento de la expresión génica de las proteínas que forman el heterodímero AMPK sino que también con el de su actividad.

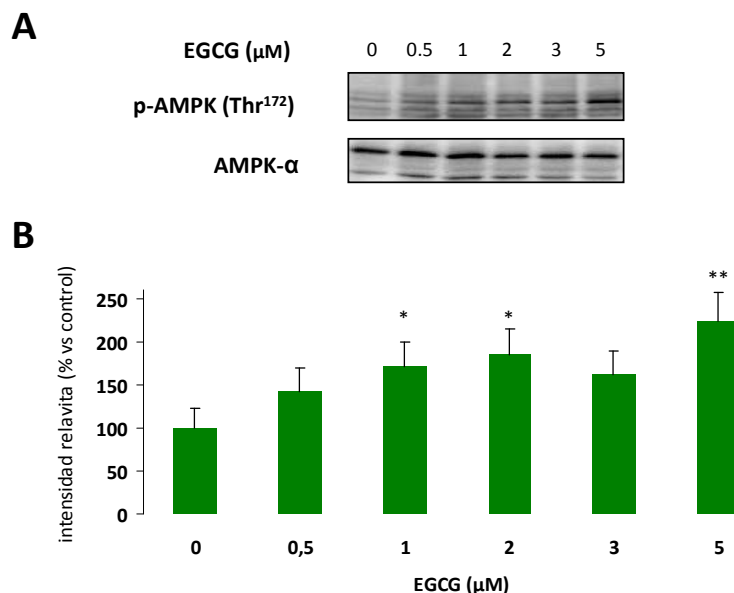


Figura 46. Efectos del EGCG sobre la fosforilación de AMPK en miotubos L6.

A: imagen representativas de la inmunodetección de AMPK total y fosforilado en su Thr^{172} en miotubos diferenciados L6 estimulados durante 10 minutos con **EGCG** a concentraciones de rango 0.5 a 5 μ M. **B:** Análisis densitométrico de la proteína fosforilada normalizada por la concentración total de la misma. Los valores se muestran como la media \pm DE ($n \geq 3$) (* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ en referencia al grupo control estimado como tal el no tratado con EGCG).

El EGCG induce la fosforilación de AMPK- α en miotubos L6 con un componente dosis dependiente (Figura 46). La interpretación de estos resultados indica que tratamientos agudos con EGCG resultan en un incremento de actividad de AMPK α . Resultados similares fueron obtenidos por Takatoshi y colaboradores (Murase et al. 2009) no sólo en modelo *in vitro* de músculos esquelético sino que también en modelo de tejido adiposo y hepático, lo que supondría un efecto sobre la regulación del metabolismo de tres de los tejidos más implicados en la regulación de la homeostasis energética. Sin embargo, aunque prometedores, estos resultados son de difícil extrapolación al ámbito de la alimentación, ya que el rango de concentraciones utilizado variaba entre 50 a 150 μ M.

Teniendo en cuenta la reproducibilidad de los resultados de Takatoshi en diferentes tejidos, se puede sugerir que los resultados mostrados en la figura 46 podrían ser igualmente reproducibles tanto a nivel adipocítico como hepático, lo que confiere un importante potencial de acción sobre la regulación energética atribuible a la EGCG dietario aunque se requieren experimentos específicos en estos tejidos para corroborar esta hipótesis.

La activación de AMPK resulta en una estimulación de los procesos metabólicos relacionados tanto con el incremento de la producción de ATP como con el descenso de los que lo hidrolizan (Hardie et al. 2003). En la actualidad se acepta como marcador de la activación de AMPK la fosforilación de la subunidad α (AMPK α) en su treonina 172 (Thr¹⁷²) (Hardie 2008), de hecho esta fosforilación se ha considerado como diana terapéutica para el tratamiento de pacientes diabéticos; fruto de este trabajo han surgido diferentes fármacos como la metformina (Knowler et al. 2002) o el AICAR (Taylor, Goodyear 2007) capaces de inducir la fosforilación de AMPK en su residuo Thr¹⁷². Teniendo en cuenta, no sólo que está descrita la activación de AMPK por AICAR, sino que este fenómeno resulta en efectos beneficiosos en la regulación del metabolismo energético (Russell et al. 1999) se quiso comprobar si el efecto del EGCG era comparable al del AICAR.

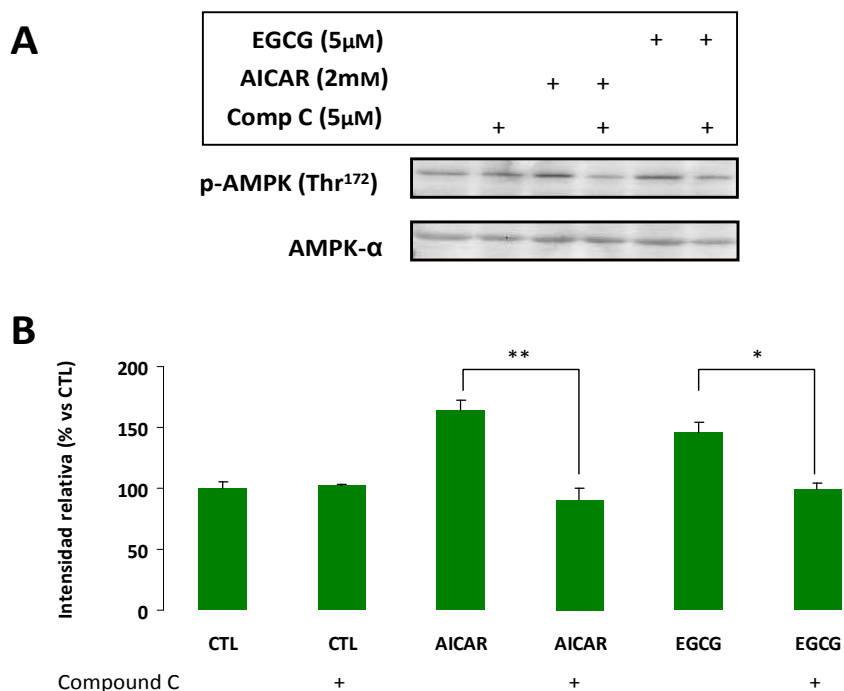


Figura 47. Efectos del AICAR y del EGCG sobre la fosforilación de AMPK en miotubos L6.

A: imagen representativa de la inmunodetección de AMPK total y fosforilado en su treonina 172 (Thr¹⁷²) en miotubos diferenciados L6 tratados durante 30 minutos con Compound C (5 μ M) y estimulados durante 10 minutos con EGCG (5 μ M) o AICAR (2mM). **B:** Análisis densitométrico de la proteína fosforilada normalizada por la concentración total de la misma. Los valores se muestran como la media \pm DE ($n \geq 3$) (* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ en referencia al grupo control de cada grupo estimado como tales los no tratados con compound C).

A tenor de los resultados mostrados en la figura 47, se puede afirmar que el comportamiento del EGCG es similar al del AICAR sobre la activación de AMPK, hecho también corroborado mediante la incorporación al sistema del compound C, inhibidor de la fosforilación de AMPK, que revierte el efecto de tanto del AICAR como del EGCG.

Aunque se puede estimar la activación de AMPK por la fosforilación de su Thr¹⁷² (Hardie 2008) es importante estudiar otros puntos clave de la vía del AMPK debido a que su regulación presenta complicada (para un análisis más detallado de la vía consultar anexo IV: Vía AMPK). En consecuencia, se ponen de manifiesto las limitaciones de valorar la estimulación de todos los fenómenos relacionados con la activación de AMPK sólo por la fosforilación de su residuo Thr¹⁷².

Efectos del EGCG sobre ACC

Entre las diferentes vías de actuación que gobierna AMPK, se puede destacar la fosforilación de la acetil coenzima A carboxilasa (ACC) en su serina 79 (Ser⁷⁹) por estar directamente relacionada con el metabolismo lipídico²³ y por ser la diana susceptible de fosforilación por la activación de AMPK. Debido a esto se quiso comprobar si el efecto de EGCG sobre AMPK resultaba en la inhibición por fosforilación de la actividad de ACC.

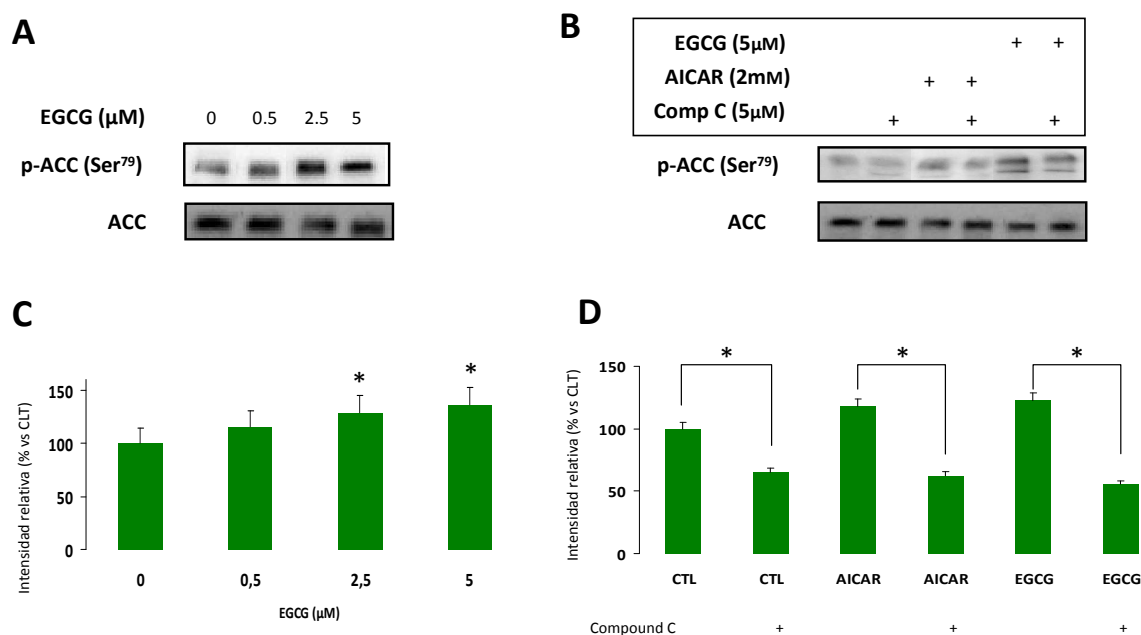


Figura 48. Efectos del EGCG y del AICAR sobre la fosforilación de ACC en miotubos L6.

A/B: imágenes representativas de la inmunodetección de ACC total y fosforilado en su Serina 79 (Ser⁷⁹) en miotubos diferenciados L6 tratados durante 30 minutos con Compound C (5μM) y estimulados durante 10 minutos con EGCG (5μM) o AICAR (2mM). **C/D:** Análisis densitométrico de la proteína fosforilada normalizada por la concentración total de la misma. Los valores se muestran como la media ± DE (n≥3) (* p<0,05 en referencia al grupo control de cada grupo estimado como tales los no tratados con compound C).

El EGCG favorece la fosforilación de ACC en la Ser⁷⁹ con un componente dosis dependiente (Figura 48 C) y este fenómeno es comparado al que ofrece el AICAR (Figura 48 D). La coherencia de estos resultados con los mostrados en las figuras 46 y 47, aportan robustez a la estimación de la actividad derivada de la fosforilación de AMPK por EGCG ya que repercute directamente sobre la activación de la β oxidación por inhibición de la actividad de la ACC por fosforilación.

²³ El Malonil CoA inhibe la CPT1 y con ello el transporte de AGL al interior mitocondrial limitando así la β oxidación, pero la fosforilación de ACC inhibe la transformación de Acil CoA en Malonil CoA.

Aunque no existen trabajos en los que se hayan valorado la fosforilación de ACC por acción del EGCG, si que se ha publicado efectos de esta catequina sobre determinadas quinasas activadoras de AMPK (Murase et al. 2009). Las quinasas descritas como activadoras directas de AMPK son LKB1 y CaMKK (Shaw et al. 2004) y en concreto, se ha sugerido que el efecto del EGCG sobre AMPK pueda estar mediado por la activación de LKB1 (Murase et al. 2009) si bien es cierto que estas conclusiones se obtuvieron con la aplicación de EGCG a dosis muy superiores ($150\mu\text{M}$) a las testadas para la elaboración de esta tesis.

A parte de comprobar los efectos moleculares de EGCG a dosis dietarias, sobre la vía de AMPK, se quiso corroborar los efectos metabólicos de estos resultados y en primer lugar se quiso estimar si los efectos de EGCG sobre AMPK repercuten directamente sobre la concentración de ATP.

Análisis de la modulación del ratio ATP/ADP

La activación de AMPK resulta en la activación-inactivación de diferentes procesos celulares con el fin de incrementar el ratio ATP/ADP. Debido a que se ha demostrado un incremento de la activación de AMPK dependiente de EGCG, parece lógico pensar que también incrementará los niveles totales de ATP, y con ello del ratio ATP/ADP. Para comprobar esta hipótesis se realizó un análisis de la concentración de ATP y ADP.

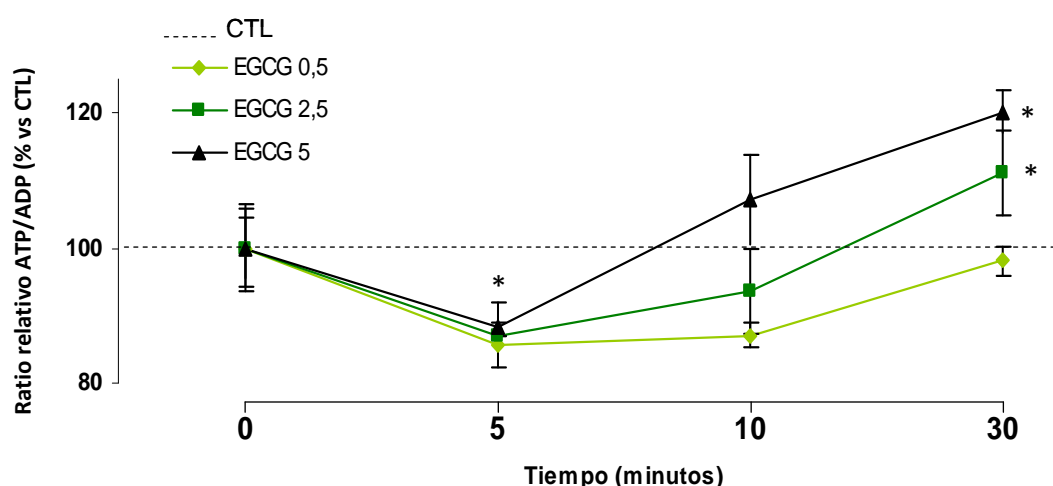


Figura 49. Efectos del EGCG sobre la modulación del ratio ATP/ADP.

La toma de dato se realizó como se describe en el correspondiente apartado de materiales y métodos a partir de miotubos diferenciados L6 tratados durante 5 10 y 30 minutos con **EGCG** ($5\mu\text{M}$). Los valores se muestran como la media \pm DE ($n \geq 3$) (* $p < 0,05$ en referencia al grupo CTL).

El estudio de la curso temporal del ratio ATP/ADP en presencia de EGCG (Figura 49) corroboró la hipótesis del incremento de la concentración de ATP mediado por EGCG, ya que al cabo de 30 minutos de tratamiento, se denotaron incrementos del 10 y 20% atribuidos a concentraciones de EGCG de 2.5 y 5 μM respectivamente, lo que también demuestra el efecto dosis-dependiente. Resultado interesante fue el encontrado a los 5 minutos de tratamiento puesto que en todos los casos, el EGCG mostraba una disminución significativa, del orden del 10%, de la concentración total de ATP respecto la situación control (Figura 49). Dicho resultado sugirió la idea de que fuera ésta disminución inicial de ATP provocada por el EGCG la señal que activaría posteriormente AMPK y cuya consecuencia sería incrementar los niveles de ATP al cabo de 30 minutos como se muestra en la figura 49. La interpretación de este resultado suscitó una nueva pregunta en el grupo de investigación ¿cómo el EGCG es capaz de disminuir la concentración de ATP a los 5 minutos de tratamiento? Para intentar dar solución a esta pregunta se planteó la hipótesis de que el EGCG podría influir sobre las vías implicadas en el balance energético celular del músculo esquelético y para analizarlo se estudió las posibles variaciones en el flujo glicolítico y/o en la respiración mitocondrial, dependientes de EGCG.

Efecto sobre la actividad metabólica

Análisis del flujo glicolítico

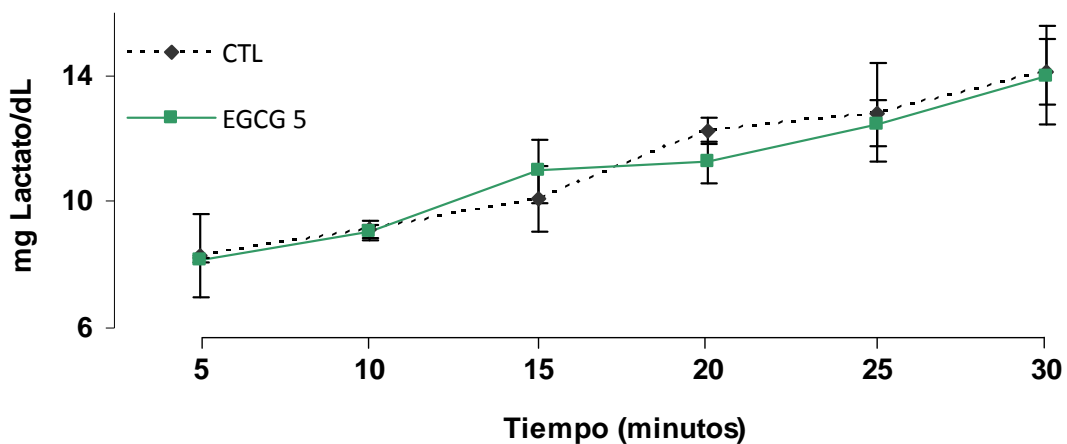


Figura 50. Efecto del EGCG sobre la producción de lactato en miotubos L6.

Los miotubos fueron incubados con EGCG (5 μM) y la toma de muestras se realizó cada 5 minutos durante media hora. Los valores se muestran en concentración de lactato como la media \pm la DE ($n \geq 3$) (* $p < 0,05$ en referencia a la situación control)

El estudio de la cinética de producción de lactato dependiente del tratamiento con EGCG a dosis 5 μ M no revela diferencias significativas en el flujo glicolítico respecto a la situación control (Figura 50). Aunque si que hay trabajos que describen una modulación del flujo glicolítico en cardiomiocitos tratados con EGCG, no estimada por la producción de lactato sino atribuida a un incremento de la actividad de la LDH (Li et al. 2010). Como es de costumbre en los trabajos que describen las vías moleculares de actuación del EGCG, las dosis aplicadas son de hasta dos órdenes de magnitud a las utilizadas para la elaboración de esta tesis, con las complicaciones que esto supone para extrapolar los resultados a la ingesta de té.

Siguiendo con la hipótesis establecida, se pasó al estudio del EGCG sobre la posible modulación de la respiración mitocondrial.

Análisis de la respiración mitocondrial

De acuerdo con la hipótesis quimiosmótica propuesta por Mitchell en 1961 (MITCHELL 1961) que le ayudo a ser galardonado con el premio Nobel en 1978, los protones son transportados desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana por una serie de reacciones conocidas como la cadena de transporte de electrones (CTE) donde el oxígeno es el ultimo aceptor de estos electrones formando una molécula de agua.

El retorno de los protones hacia la matriz mitocondrial tiene lugar, principalmente, a través de la ATPasa que aprovecha la energía liberada en este proceso para fosforilar ADP formando así ATP. De esta manera, se dice que la CTE está *Acoplado* a la fosforilación de ATP y en este caso se puede estimar la concentración de ATP por el consumo de oxígeno mitocondria. Este fenómeno no es eficiente al 100% ya que, de forma fisiológica, existen *fugas* de protones que no regresan a la matriz a través de la ATPasa por lo que no se genera ATP, en este caso se dice que la CTE y la formación de ATP, se encuentran *desacopladas* de manera que aún existiendo un consumo de oxígeno no hay síntesis de ATP. Sin embargo, inhibiendo el paso total de protones a través de la ATPasa, fenómeno que se consigue con tratamientos con oligomicina, se puede estimar el consumo de oxígeno que no está *acoplado* a la producción de ATP.

Teniendo en cuenta este proceso que se acaba de resumir se quiso analizar el efecto del EGCG sobre la respiración mitocondrial tanto *acoplada* como *desacoplada* o resistente a oligomicina.

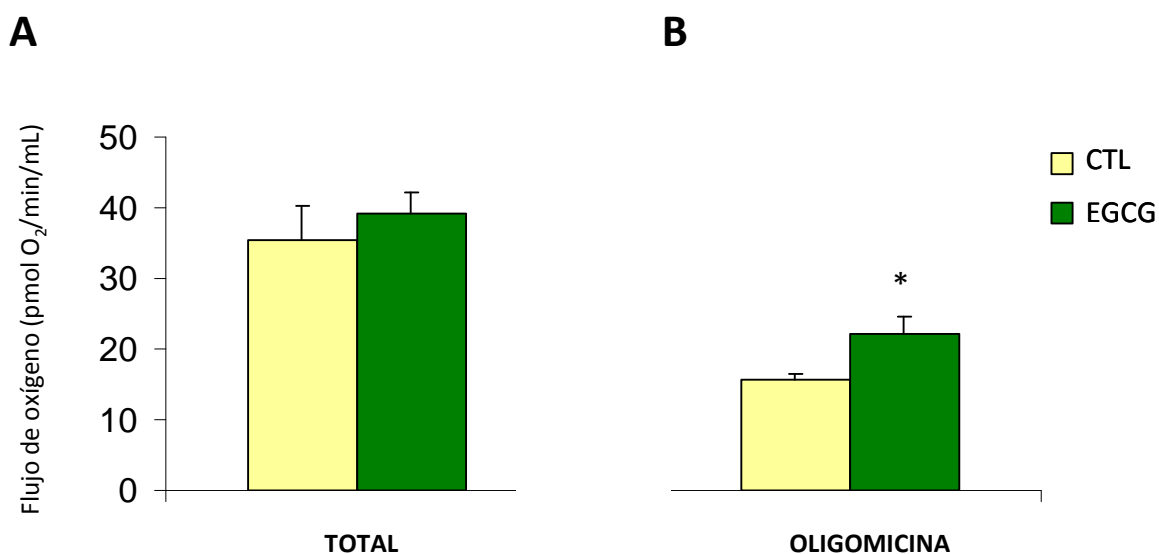


Figura 51. Efecto del EGCG sobre la respiración mitocondrial

El consumo de oxígeno por parte de los miotubos L6 tratados con **EGCG** 5 μ M y en medio HBSS fue determinado por Respirometría de alta resolución como se describe en el correspondiente apartado de la sección materiales y métodos utilizando Oligomicina (1 μ g/mL) cuando fue necesario. Los valores se muestran como la media \pm la DE ($n \geq 3$) (* $p < 0,05$ en referencia a la situación control)

En situación de acoplamiento (Figura 51 A) se insinúa un incremento del consumo de oxígeno mitocondrial dependiente de EGCG, aunque no se revela como estadísticamente significativo. Sin embargo, este incremento si que se muestra estadísticamente significativo en el caso del consumo de oxígeno dependiente de oligomicina (Figura 51 B). Este resultado sugiere un cierto grado de desacoplamiento entre el CTE y la formación de ATP debido al EGCG que explicaría la inicial bajada de ATP que se muestra en la figura 49. El mecanismo por el cual el EGCG es capaz de inducir este grado de desacoplamiento se explica a continuación.

Descripción de los mecanismos de acción del EGCG

Efecto sobre las proteínas desacopladoras (UCP's)

El mecanismo que explica la fuga de protones relacionada con el desacoplamiento se encuentra aún bajo estudio, aunque está aceptado que el proceso esta mediado, en gran parte, por unas proteínas que permiten el retorno de los protones a la matriz

mitocondrial independientemente de la formación de ATP, causando así el desacoplamiento entre CTE y la formación de ATP. Debido a este fenómeno dichas proteínas fueron bautizadas con el nombre de proteínas desacopladoras (UCP's) (Nicholls, Bernson & Heaton 1978, Klingenberg, Huang 1999). A tenor de los resultados mostrados en la figura anterior (Figura 51), en la que se muestra un incremento del consumo de oxígeno vinculado al proceso de desacoplamiento; se sugiere que el EGCG podría presentar algún efecto sobre la regulación o modulación de las UCP's.

En la actualidad se conocen 5 isoformas de UCP's : 1, 2, 3, 4 (SLC25A27) y 5 (SLC25A27) (Nedergaard, Ricquier & Kozak 2005) su localización en los tejidos depende de la isoforma, así la UCP1 se encuentra ampliamente distribuida en el tejido adiposo marrón (Nicholls, Bernson & Heaton 1978) mientras que las más representativas del músculo esquelético son la UCP2 y la UCP3 (Schrauwen, Hesselink 2002) debido a que el modelo *in vitro* utilizado es de músculo esquelético, se quiso analizar si el EGCG ofrecía algún efecto sobre estas últimas proteínas.

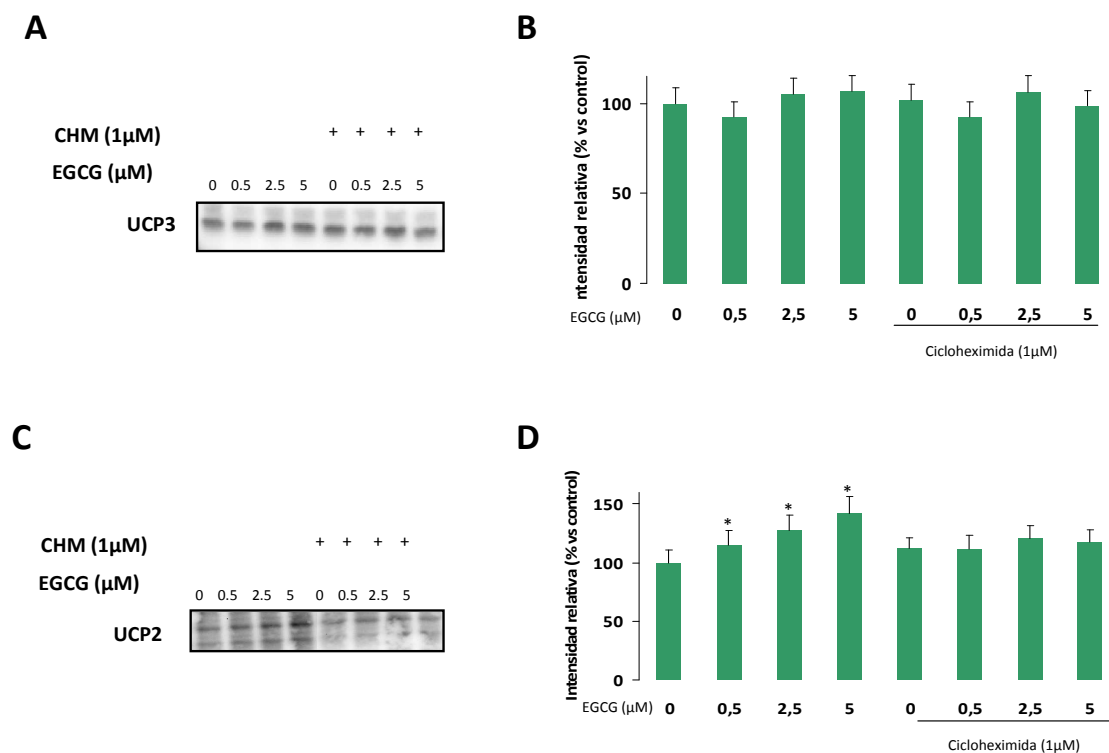


Figura 52. Efectos del EGCG sobre la expresión de las proteínas desacopladoras UCP2 y UCP3 en miotubos L6.

A/C: imágenes representativas de la inmunodetección de UCP3 y UCP2 en miotubos diferenciados L6 tratados durante 30 minutos con cicloheximida (1 μ M) y estimulados durante 10 minutos con EGCG (0.5, 2.5 y 5 μ M). **B/D:** Análisis densitométrico de la proteína UCP3 y 2 respectivamente. Los valores se muestran como la media \pm DE ($n \geq 3$) (* $p < 0,05$ en referencia al grupo control).

Tratamientos agudos con EGCG promueven un incremento los niveles de UCP2 con carácter dosis dependiente (Figura 52 C). Sin embargo, este fenómeno no se observa en la isoforma 3 (Figura 52 A). Esta diferencia puede explicarse debido a que, aunque ambas UCP están relacionadas con la regulación del balance energético del músculo esquelético, la función de UCP3 está más vinculada con la regulación de la termogénesis (Costford et al. 2007) este fenómeno podría explicar la falta de variación en la concentración de UCP3 debida a EGCG (Figura 52 A).

Por su parte, la expresión de UCP2 está más relacionada con la neutralización de las especies reactivas de oxígenos (ROS) (Zaninovich 2005) que se producen a lo largo de la CTE, debido a esto existen mecanismos que otorgan a UCP2 una capacidad rápida de modulación. Dichos mecanismos se han descrito tanto a nivel transcripcional (Chan et al. 2009) como a nivel traduccional (Hurtaud et al. 2007) pero debido a que 10 minutos se antoja poco tiempo para provocar efectos a nivel de expresión proteica dependientes de la transcripción génica, se analizó si los efectos del EGCG sobre el incremento de UCP2 estaban mediados por estimulación de su traducción. Con este fin se repitió el experimento incluyendo tratamientos con cicloheximida como inhibidor del proceso de la traducción. Los resultados que se muestran en la figura 52 indican que EGCG estimula un incremento de la concentración de UCP2. El hecho de que la cicloheximida revierta este efecto indica que los efectos del EGCG sobre UCP2 estén mediados por una estimulación de la traducción del mRNA de UCP2 que se resuelve en un incremento de sus niveles proteicos.

También se comprobó una reversión de la fosforilación de AMPK inducida por EGCG con tratamientos con cicloheximida (*datos no mostrados*) pero, aunque apoya la hipótesis de que el efecto del EGCG sobre la activación de AMPK venga mediado por la regulación de la transducción de UCP2, parece lógico que se inhiba la fosforilación de AMPK con la inhibición de la síntesis proteica ya que es un proceso que requiere ATP y si se inhibe este procesos y no se gasta ATP, no se activará AMPK. Para poder dilucidar esta hipótesis se realizó el estudio de si la activación de AMPK era sensible a genipina, un inhibidor de la actividad de UCP2.

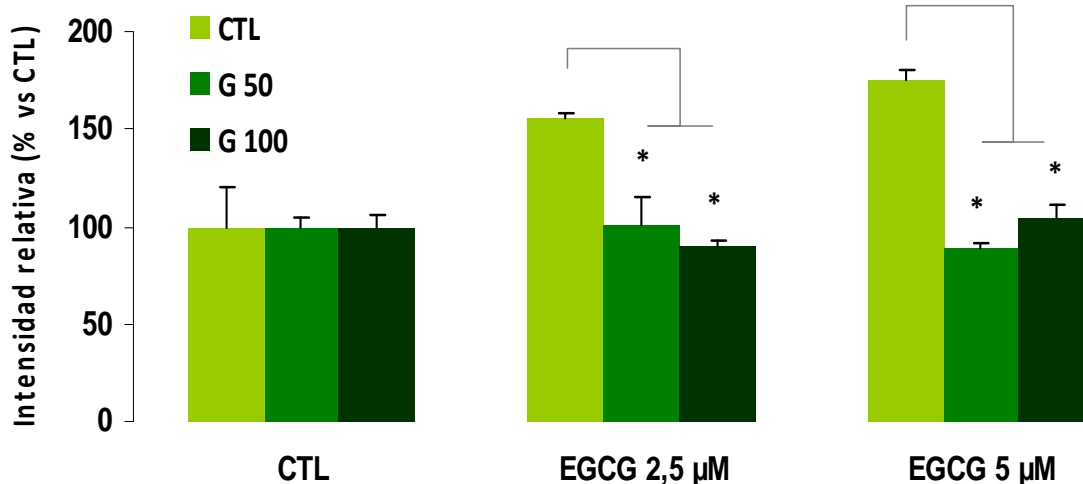


Figura 53. Efectos de la Genipina sobre el incremento de actividad de AMPK estimulada por EGCG en miotubos L6.

La actividad de la AMPK se estimó según se detalla en el correspondiente apartado de la sección de materiales y métodos, a partir de miotubos L6 tratados durante 30 minutos con genipina (G) a concentración 50 y 100 μM y estimulados durante 10 minutos con **EGCG** (2.5 y 5 μM). Los valores se muestran como la media \pm DE ($n \geq 3$) (* $p < 0,05$ en referencia al grupo CTL).

La genipina, a concentración 50 y 100 μM , inhibe el efecto del EGCG sobre la actividad de AMPK en miotubos L6 prácticamente hasta alcanzar niveles basales (Figura 53). Estos resultados validan la hipótesis de que el efecto del EGCG sobre la activación de AMPK está mediado a corto plazo por la regulación de la transcripción de UCP2.

El hecho de que la genipina inhiba la función de UCP2 pero no su síntesis pone de manifiesto la necesidad de corroborar la vía de la traducción genética para dilucidar completamente esta hipótesis. De este modo, se planteó un estudio basado en la técnica de *silenciamiento génico* por siRNA para comprobar si la inhibición específicamente de la traducción de UCP2 resultaba también en un descenso de la activación de AMPK estimulada por EGCG, ya que se ha sugerido que los efectos del EGCG puedan venir vía activación de UCP2 y que, como se demuestra en la figura 52, la inhibición de la transcripción de revierte los efectos del EGCG sobre UCP2.

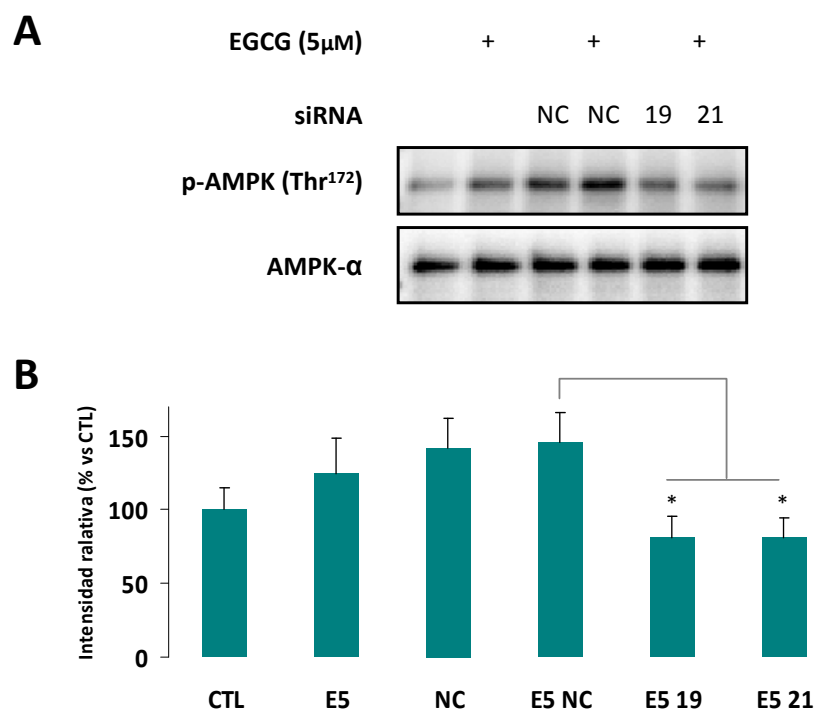


Figura 54. Efectos de los siRNA NC, 19 y 21 en la activación de AMPK estimulada por EGCG en miotubos L6.

A imagen representativa de la inmunodetección de AMPK en miotubos diferenciados L6 transfectados con los siRNA 19 y 20 que inhiben la traducción de mRNA de UCP2, y estimulados durante 10 minutos con EGCG (5 μ M) como control negativo del silenciamiento génico se utilizó el siRNA NC. B: Análisis densitométrico de la proteína fosforilada normalizada por la concentración total de la misma. Los valores se muestran como la media \pm DE ($n \geq 3$) (* $p < 0,05$ en referencia al grupo control definido en este caso como el tratamiento con EGCG y con el siRNA NC).

Los tratamientos con siRNA específicos que presentan complementariedad con diferentes regiones de UCP2 (siRNA 19 y 21) disminuyen de forma significativa la activación de AMPK α estimulada por EGCG (Figura 54). Como control del proceso se realizaron dos aproximaciones. Para la primera se analizaron los datos de la supresión de la transcripción mediada por los siRNA por la técnica de RT-PCR (figura 55) en la que se demuestra el efecto de los siRNA en la reversión de la concentración del mRNA de UCP2. Por otro lado, en ambos procesos se utilizó como referencia para la normalización de los datos, un siRNA que no presenta complementariedad con el mRNA de UCP2 (NC) por lo que no inhibe su traducción. De esta manera se pudo concluir que los efectos del EGCG sobre la activación de AMPK están regulados por la activación de la transcripción de UCP2.

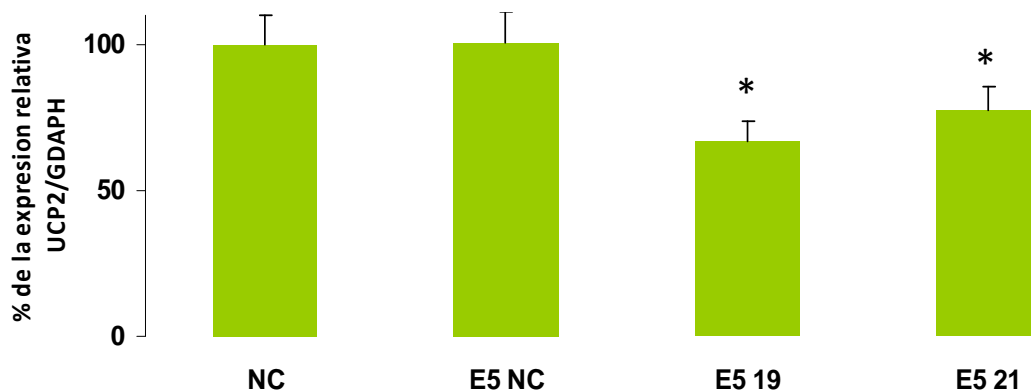


Figura 55. Efectos de los siRNA NC, 19 y 21 sobre la expresión de UCP2.

Los miotubos diferenciados se transfectaron con los siRNA NC, 19 y 20 y estimulados durante 10 minutos con EGCG (5 μ M). La expresión relativa del mRNA fue medida por Real Time PCR (RT-PCR) como se describe en el correspondiente apartado de la sección de materiales y métodos. Los valores se muestran en porcentaje frente a la situación control (CTL) como la media \pm la DE ($n \geq 3$). (* $p < 0.05$ en referencia al grupo NC)

El hecho que se obtengan resultados muy similares utilizando dos siRNA que *bloquean* el mRNA de UCP2 por complementación en dos regiones diferentes, siRNA 19 y 21, (Figura 54 y 55) aporta más validez a la hipótesis.

Psteriormente, se quiso ahondar un poco más en la descripción del mecanismo por el cual EGCG presentaba una especificidad sobre el incremento de la transducción de UCP2. Como se ha comentado anteriormente, la expresión de UCP2 aumenta en situaciones de estrés oxidativo (Zaninovich 2005) así que el siguiente objetivo estaba encaminado al estudio del origen de dicho estrés y el papel que juega el EGCG en este proceso.

Efectos sobre la producción de ROS

En el contexto de estrés oxidativo, la mayoría de los estudios realizados sugieren un efecto antioxidante al EGCG tanto en modelos *in vivo* como en modelos *in vitro* (Lee et al. 2002) Sin embargo se quiso comprobar si el EGCG producía algún efecto en la estimulación de la generación de ROS y con ello de estrés oxidativo bajo las condiciones experimentales que se han llevado a cabo para la elaboración de este estudio.

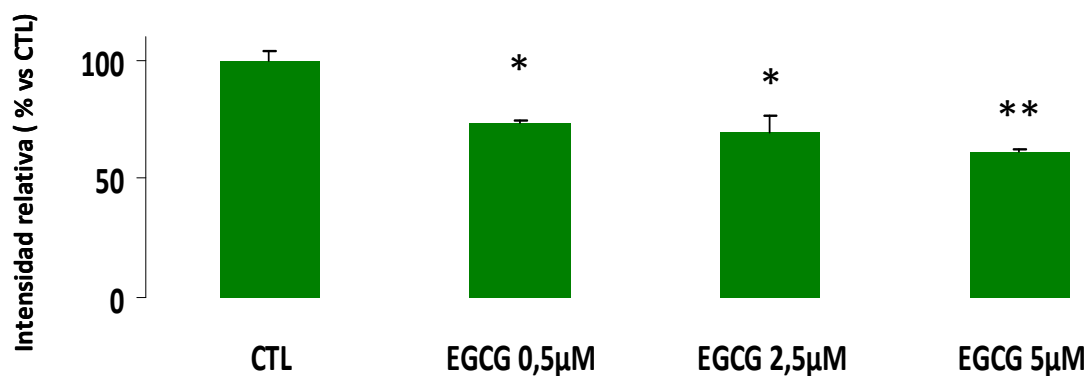


Figura 56. Efectos del EGCG sobre la producción de ROS en miotubos L6.

Los miotubos diferenciados fueron tratados con DCFH-DA ($10\mu\text{M}$) durante 30 minutos y posteriormente estimulados durante 10 minutos con EGCG (0.5 , 2.5 y $5\mu\text{M}$). La estimación de la capacidad antioxidante se realizó por DCFH-DA como se detalla en el correspondiente apartado de la sección de materiales y métodos. Los valores se muestran en porcentaje frente a la situación control (CTL) como la media \pm la DE ($n \geq 3$). (* $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ en referencia al grupo CTL)

El EGCG presenta capacidad antioxidante a dosis de 0.5 a $5\mu\text{M}$ con carácter dosis dependiente en miotubos L6 (Figura 56). Este resultado no parecía coherente con lo estipulado *a priori*, ya que si la traducción de UCP2 se incrementa debido a un aumento del estrés oxidativo no parece lógico que lo haga también en presencia de EGCG cuando, como se acaba de comprobar, éste compuesto presenta capacidad antioxidante.

Repasando el concepto de antioxidante, como aquel compuesto con capacidad para retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas debido a que se oxidan ellos mismos; se pone de manifiesto que los subproductos de esta primera autooxidación puedan ser los responsables de, a parte de evitar la oxidación de otras moléculas, activar diferentes mecanismos con capacidad de reducir el daño oxidativo. En definitiva de actuar como un preconditionamiento que prepararía a la célula para un futuro ataque oxidativo. Este fenómeno explicaría el aumento del UCP2 en respuesta a EGCG debido a un inicial proceso de autooxidación del EGCG. De hecho existen estudios que demuestran efectos *prooxidativos* del EGCG (Suh et al. 2010).

Debido a las particularidades de la técnica elegida para la obtención de los resultados mostrados en la figura 56, resultó muy difícil la estimación de los efectos *prooxidantes* del EGCG a corto plazo. Así que para poder confirmar esta hipótesis se sugirió que el

tratamiento con antioxidantes que disminuyen la autooxidación del EGCG, podrían limitar los efectos a corto plazo sobre UCP2 y con ello la activación de AMPK α . Para abordar esta hipótesis se realizó un experimento con Trolox, forma soluble del antioxidante, vitamina E (Nair et al. 2003) y con N-acetilcisteína (NAC) por su capacidad de incrementar los niveles de glutatión (Atkuri et al. 2007) descrito como uno de los principales antioxidantes naturales celulares (Pompella et al. 2003).

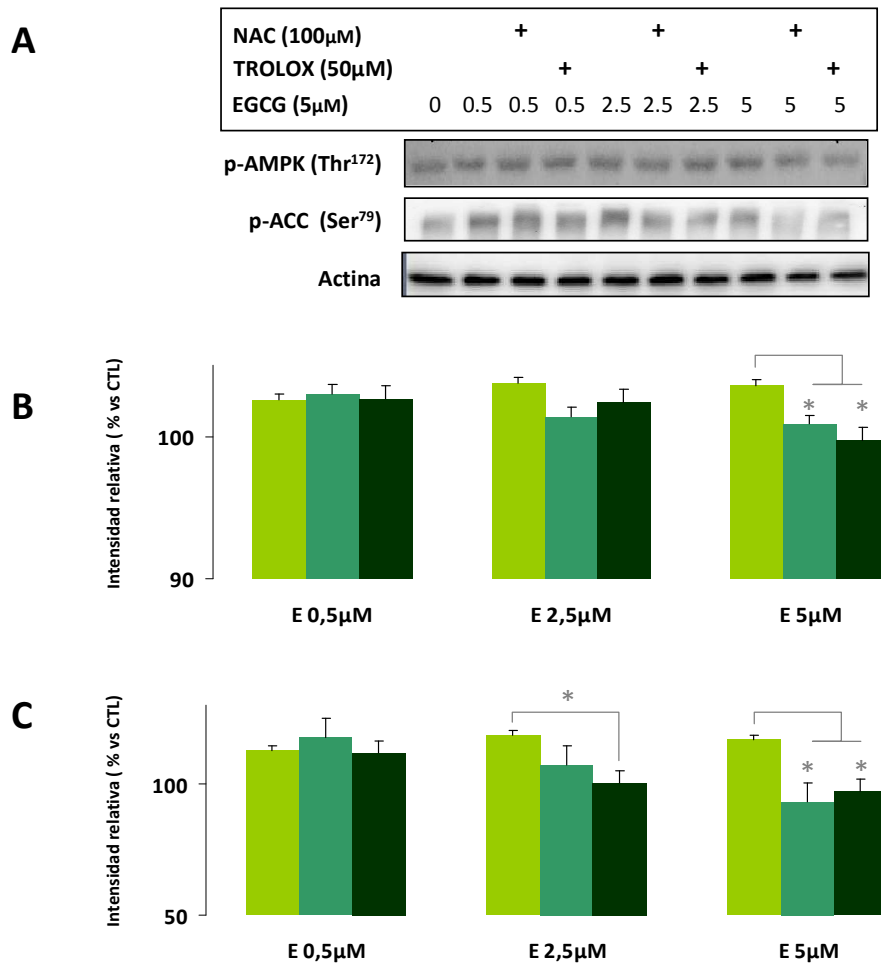


Figura 57. **Efectos de los antioxidante NAC y TROLOX sobre la fosforilación de AMPK y ACC.** Imágenes representativas de la inmunodetección de la fosforilación de AMPK y ACC en miotubos diferenciados L6 tratados durante 30 minutos con N-acetil cisteína (NAC) 100 μ M o TROLOX (50 μ M) y estimulados durante 10 minutos con EGCG (0.5 2.5 y 5 μ M). **B/C:** Análisis densitométrico de las proteína fosforilada AMPK y ACC respectivamente y normalizada por la concentración total actina. Los valores se muestran como la media \pm DE ($n \geq 3$) (* $p < 0,05$ en referencia al grupo control de cada grupo estimado como tales los no tratados con compound C).

Tanto la fosforilación de AMPK como la de ACC estimulada por EGCG son parcialmente inhibidos por Trolox y N-acetil-cisteína (Figura 57). Aunque los efectos sobre la disminución de la fosforilación se observa en ambas proteínas, es en el caso del ACC donde se presentan las mayores diferencias (Figura 57 C).

Implicación del Ca²⁺

Como se ha comentado anteriormente existen dos quinasas con capacidad de fosforilar AMPK en su parte catalítica, que son LKB1 y CamKK. Es conocido que la activación de la CamKK es sensible a los niveles de Ca²⁺. Se ha descrito que a través de la UCP3 se puede liberar el calcio del retículo endoplasmático hacia el citoplasma (De Marchi U 2011). Por su parte, la mitocondria actúa, al igual que el retículo endoplasmático, como reservorio de Ca²⁺. Con estas premisas se sugiere se pueda liberar parte del Ca²⁺ almacenado en la mitocondria, a través UCP2, y que este incremento del Ca²⁺ citoplasmático resultaría en una activación de la CamKK y con ello la posterior activación de AMPK. Para corroborar esta hipótesis se realizó un experimento en el que se inhibió la activación de CamKK dependiente de calcio, utilizando el compuesto STO-609.

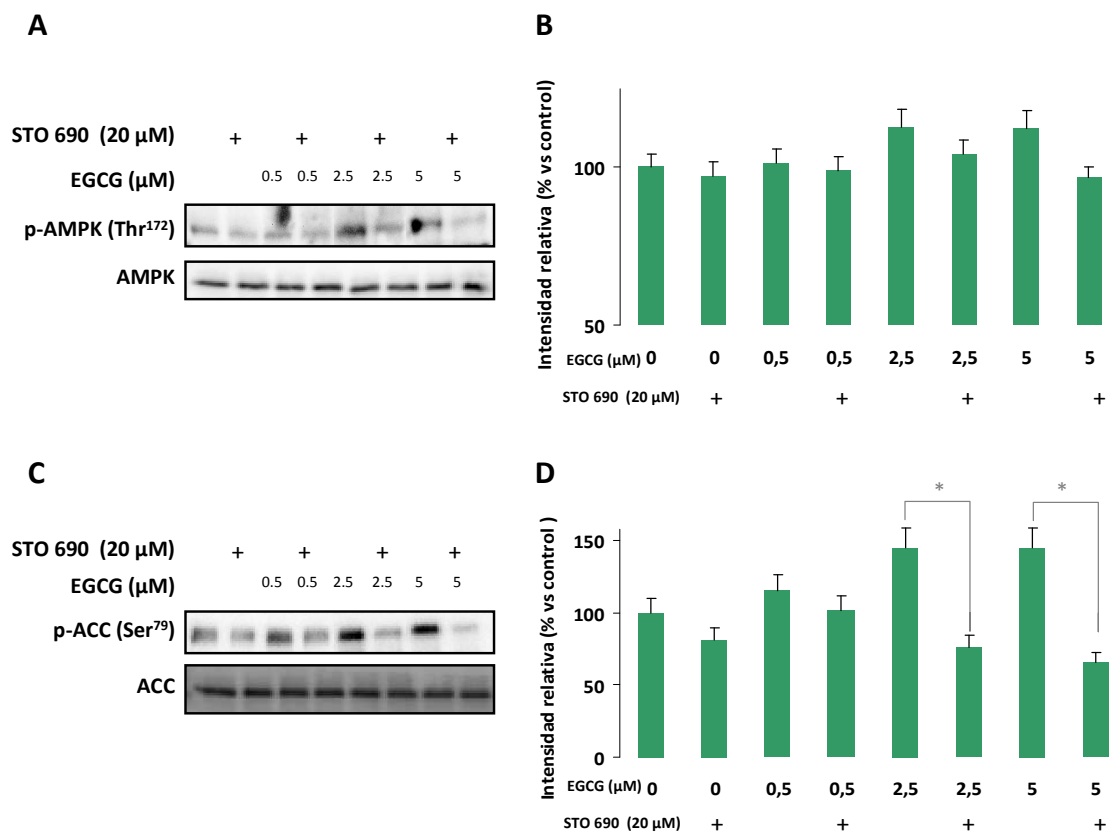


Figura 58. Efectos del STO-609 sobre la inducción de la fosforilación de AMPK y ACC estimuladas por EGCG en miotubos L6.

A/C: imágenes representativas de la inmunodetección de la fosforilación de AMPK en miotubos diferenciados L6 tratados durante 30 minutos con STO-609 (20 μM) y estimulados durante 10 minutos con EGCG (0.5, 2.5 y 5 μM). **B/D:** Análisis densitométrico de las proteínas fosforiladas normalizadas por la concentración total de la misma. Los valores se muestran como la media ± DE (n ≥ 3) (* p < 0,05 en referencia al grupo control de cada grupo).

Aunque se denota una clara tendencia a la disminución de la fosforilación estimulada por EGCG sobre AMPK dependiente de tratamientos con STO 609 (Figura 58 A), el análisis estadístico de los resultados obtenidos por la densitometría revelan que no son estadísticamente diferentes (Figura 58 B). Sin embargo, si se analizan los datos de la fosforilación de ACC se puede observar, a parte de una clara reversión de la fosforilación debida al STO 609 (Figura 58 C), que son diferencias significativas en el caso de los tratamientos a concentraciones de 2,5 y 5 μM de EGCG (Figura 58 D) con un componente dosis dependiente que puede ser observado desde dosis 0.5 μM de EGCG.

Resumen del estudio: *EGCG como regulador del metabolismo energético en músculo esquelético*

Son variados los trabajos que evidencian una relación directa en la activación de AMPK con tratamientos con EGCG (Hwang et al. 2005, Zhang et al. 2011, Collins et al. 2007, Chen et al. 2012, Lee et al. 2012, Zhang et al. 2010) pero escasos los que sugieren un mecanismo de actuación al respecto.

Se ha descrito que el efecto de EGCG sobre AMPK esta mediado por la activación de LKB1 (Jaleel et al. 2006) aunque las dosis aplicadas exceden las atribuibles a la ingesta de té verde, por lo que la mayoría de los trabajos publicados sobre AMPK y EGCG son extrapolables al campo farmacológico más que al de la alimentación funcional, interés de esta Tesis.

En la elaboración de esta parte experimental se ha demostrado que los tratamientos con EGCG presenta un mecanismo de acción doble sobre la activación de AMPK ya que se movilizan vías diferentes. En primer lugar, su rápida oxidación estimula un incremento de la traducción de UCP2, que se sitúa en membrana mitocondrial causando un desacoplamiento en el proceso de la fosforilación oxidativa. Este fenómeno resulta en una inicial reducción intracelular de los niveles de ATP señal que resulta en la posterior activación de AMPK.

Por otra parte, el hecho de que el STO-609 sea capaz de revertir este efecto sugiere que el incremento de la transducción de UCP2 pueda estar directamente relacionado con un incremento de la liberación de Ca^{2+} de la mitocondria hacia el citoplasma, lo que comportaría una activación de CaMKK que contribuiría a la activación de AMPK.

Como resumen de este apartado, se presenta un esquema del posible mecanismo de actuación del EGCG sobre la activación de AMPK.

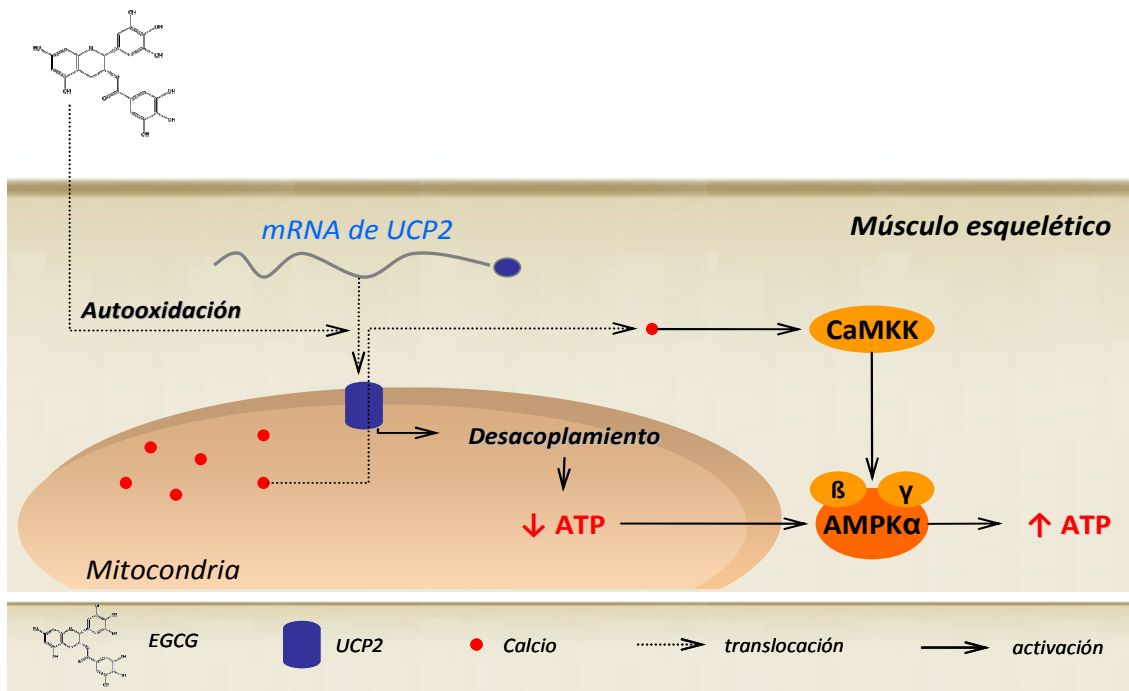


Figura 59. **Propuesta de mecanismo de acción del EGCG sobre la activación de AMPK**

Conclusiones

1° Las isoflavonas de soja, genisteína, daidzeína, y su metabolito equol, en el rango de 0,1 a 5 μ molar, revierten la pérdida de transducción de señal insulínica asociada a la insulinoresistencia, con intervención de receptores estrogénicos, en modelos *in vitro* de músculo esquelético (miotubos L6) y de tejido adiposo (adipocitos 3T3-L1).

2° A nivel del músculo esquelético con RI, las isoflavonas estudiadas estimulan la fosforilación de AS160, favoreciendo la captación de glucosa de forma asociada a un aumento del flujo glicolítico.

3° A nivel de tejido adiposo con RI, las isoflavonas estudiadas estimulan la captación de AGL. Fenómeno mediado en parte por receptores estrogénicos.

4° Las isoflavonas estudiadas presentan una marcada función como ligandos de PPAR α y PPAR γ en hepatocitos FAO. Este fenómeno resulta en una reducción del contenido intracelular de TG sin incremento en la expresión de CPT1 ni de AOX .

5° En cuanto a la modulación del proceso inflamatorio, las isoflavonas estudiadas disminuyen la producción y expresión génica de TNF α , MCP1 y NO en un cocultivo de adipocitos 3T3-L1 y macrófagos RAW264.7. La reducción de los niveles de MCP1 se debe principalmente al efecto de las isoflavonas sobre los adipocitos, mientras que la disminución de los niveles de TNF α y NO se puede atribuir a la respuesta de los macrófagos.

Globalmente, las conclusiones anteriores pueden resumirse en que los mecanismos mediados por isoflavonas de soja pueden contribuir a una mejora de la hiperglucemia, la hiperlipidemia, la esteatosis hepática y la inflamación, importantes componentes de la fisiopatología del síndrome metabólico en humanos.

6° El polifenol mayoritario del té verde, el EGCG, en el rango del 0,5 a 5 μM , promueve un aumento la fosforilación de AMPK con carácter dosis dependiente, a consecuencia de un descenso inicial de los niveles de ATP en miotubos L6.

7° El EGCG, en miotubos L6, aumenta el desacoplamiento mitocondrial sin variar el flujo glicolítico, proponiéndose que esta catequina induce una pérdida en la eficiencia de la fosforilación oxidativa.

8° El aumento de desacoplamiento mitocondrial inducido por EGCG se debe a un incremento en los niveles proteicos de UCP2. Este fenómeno se da a nivel traduccional, por un mecanismo sensible al estrés oxidativo y con participación de Ca^{2+} .

Globalmente, las conclusiones anteriores pueden resumirse en que el EGCG actúa, a través de su autooxidación, como señalizador celular, induciendo un cambio en la dotación de UCP2 mitocondrial, que finalmente se compensa a través de un incremento de la fosforilación de AMPK. Estos hallazgos pueden contribuir a explicar parte de los efectos beneficiosos en el metabolismo asociados al consumo de té verde.

Anexos

ANEXO I: Controversia de criterios para el diagnóstico de SM.

Para poder entender mejor la controversia respecto al SM se detallaran a continuación los criterios establecidos por cada institución para su diagnóstico.

Criterios OMS (1998) (Alberti, Zimmet 1998)

Se considera que existe SM si se dan los siguientes criterios: intolerancia a la glucosa (>100 mg/dL), DM tipo 2 o RI junto con 2 o más de las siguientes alteraciones:

- Obesidad central o visceral (cociente cintura/cadera: ♂ $\geq 0,9$ ♀ $\geq 0,85$ cm o $IMC > 30 \text{ kg/m}^2$)
- Hipertrigliceridemia ≥ 150 mg/dl o descenso del colesterol HDL (♂ 35 mg/dl; ♀ 39 mg/dl)
- Presión arterial $\geq 140/90$ mm Hg
- Microalbuminuria $\geq 20\mu\text{g/min.}$ o cociente albúmina/creatinina > 30 mg/g

Criterios EGIR (1999) aplicados a la población no diabética (Balkau, Charles 1999)

Presencia de RI o hiperinsulinemia en ayunas (superior al percentil 75), y dos o más de las siguientes alteraciones:

- Obesidad central (cociente cintura/cadera ♂ ≥ 94 cm; ♀ ≥ 80 cm o $IMC > 30 \text{ kg/m}^2$)
- Dislipemia (triglicéridos ≥ 180 mg/dl o c-HDL < 40 mg/dl)
- Hiperglucemia (glucemia en ayunas ≥ 110 mg/dl, pero no en el rango diabético)
- Presión arterial $\geq 140/90$ mm Hg o estar recibiendo tratamiento para hipertensión.

Criterios ATPIII/NCEP (2001) (Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults 2001)

Presencia de tres o más de los siguientes criterios:

- Obesidad abdominal: diámetro de la cintura > 102 cm en ♂ y > 88 cm en ♀
- Hipertrigliceridemia ≥ 150 mg/dl
- cHDL < 40 mg/dl en ♂ o < 50 mg/dl en ♀
- Presión arterial $\geq 130/85$ mm Hg
- Glucemia basal ≥ 100 mg/dl

Criterios AACE (2003) (Einhorn et al. 2003)

Presencia de tres o más de los siguientes criterios:

- Obesidad/sobrepeso: BMI \geq 25 kg/m²
- Hipertrigliceridemia \geq 150 mg/dl
- cHDL $<$ 40 mg/dL en ♂ o $<$ 50 mg/dl en ♀
- Presión arterial \geq 130/85 mm Hg
- Glucemia tras sobrecarga oral de glucosa (2 h) \geq 140
- Otros factores de riesgo: Historia familiar de diabetes tipo 2, hipertensión o enfermedad coronaria. Síndrome de Ovario Poliquístico, Sedentarismo, Edad avanzada, historia personal de diabetes mellitus tipo 2 o de enfermedad coronaria, pertenecer a un grupo étnico de alto riesgo.

Criterios AHA/NHLBI (2004) (Grundy et al. 2004)

Presencia de tres o más de los siguientes criterios:

- Obesidad abdominal: diámetro de la cintura $>$ 102 cm en ♂ y $>$ 88 cm en ♀
- Hipertrigliceridemia \geq 150 mg/dl
- cHDL $<$ 40 mg/dl en ♂ o $<$ 50 mg/dl en ♀
- Presión arterial \geq 130/85 mm Hg
- Glucemia basal \geq 100 mg/dl

Criterios IDF (2005) (Alberti et al. 2005)

Dependiendo del grupo étnico, presentar un diámetro de cintura que no exceda los límites de la tabla 2, y la presencia de dos o más de los siguientes criterios:

- Nivel de triglicéridos $>$ 150 mg/dL
- cHDL $<$ 40 mg/dL en ♂ o $<$ 50 mg/dl en ♀
- Presión arterial \geq 130/85 mm Hg
- Glucemia basal \geq 100 mg/dl o diagnóstico previo de DMT2

La falta de concordancia entre los criterios ha motivado una crítica severa al propio concepto de SM. Los argumentos más destacados que se ponen encima de la mesa para alimentar esta controversia son principalmente la falta de una fisiopatología común que englobe y defina todos los componentes del SM, ya que ni la IR ni la obesidad abdominal se ha determinado en todos los casos de SM (Kahn et al. 2005) y la falta de relación causa-efecto entre el SM y los factores de riesgo cardiovasculares (Koskinen et al. 2009).

ANEXO II: Prevalencia del SM según criterios IDF y ATPIII.

Tabla 22. Prevalencia del SM por países según criterios IDF y ATPIII

País	POBLACIÓN		CRITERIOS						
	Espacio muestral	Rango (años)	IDF			ATPIII/ NCEP			Referencia
			Total	Masculino	Femenino	Total	Masculino	Femenino	
Alemania	35.869	19-99	30,3	40,3	28	18,7	22,7	18	(Moebus et al. 2007)
Australia	11,247	≥25	30,7	27,1	34,3	22,1	18,8	25,4	(Cameron et al. 2007)
Austria	1,518	40-70		25,8	19,5		18,9	17	(Sandhofer et al. 2007)
China	15.838	35-74	16,5	10	23,3	23,3	17,7	29,1	(Yang et al. 2007)
China	5.819 ND	25-74		12,0 (10,8–13,2)	15,0 (13,7–16,3)		7,9 (6,9–8,9)	10,3 (9,2–11,4)	(DECODA Study Group 2007)
China	4.000.000	≥20				7,3	5,27	8,99	(Lao et al. 2012)
Corea	6.601	≥20	19,5 ± 0,5	15 ± 0,8	23,9 ± 0,7	18,8 ± 0,8	17,8 ± 0,8	20,5 ± 0,7	(Choi et al. 2007)
Corea	4.452 ^{**}	≥20	23,8	16,5	28,8	26,7	24,6	28,1	(Kim et al. 2007a)
Corea	3288 ^{PL}	≥19		25,5	15,9				(Myong et al. 2012)
Eslovaquia	1.517	≥18				20,1	15,9	23,9	(Mokan et al. 2008)

Etiopia	1.935 ^{PL}	24-55	17,9	14	24	12,5	10	16	(Tran et al. 2011)
Finlandia	3.495	45-64		55,6	45,3		52,6	39,1	(Hu et al. 2008)
Francia	3.441	35-64					23	16,9	(Dallongeville et al. 2006)
Grecia	9.669	46 ^{EM}	43,4			24,5			(Athyros et al. 2010)
Hong Kong	1.513 ^{PL}	18-66	7,4	7,3	8,8	6,1	6,5	5,6	(Ko et al. 2006, Ko et al. 2005)
Hungría	13.383	20-90	11,5	14,9	8,6	8,3	6,7	9,8	(Csaszar et al. 2006)
India	3.405 ND	25-74		13,2 (9,4–17,0)	20,3 (15,9–24,7)		12,6 (9,0–16,2)	15,8 (12,2–19,4)	(DECODA Study Group 2007)
India	475	20-75				41,1	36,4	46,5	(Ramachandran et al. 2003)
India	1.800	20-75	48,3			31,4			(Das, Pal & Ghosh 2011b)
Irán	10.368	≥20	32,1	21	41	33,2	24	40,5	(Zabetian, Hadaegh & Azizi 2007)
Islas Mauricio	5.258 ND	25-74		12,8 (11,5–14,1)	17,0 (15,6–18,4)		12,6 (9,0–16,2)	13,9 (12,6–15,2)	(DECODA Study Group 2007)
Japón	1.834 ND	35-74		13,8* 7,6 **	2,5 * 8,5 **		5,1 (3,5–6,6)	5,6 (4,2–6,9)	(DECODA Study Group 2007)
Méjico	844		59,7	32,1	67,7				(Isordia-Salas et al. 2012)
Nigeria		35-85	41,6						(Ogbera 2010)
Noruega	10.206	20-89	29,6	29	30,3	25,9	26,8	25	(Hildrum et al. 2007)

Países bajos	486	35-60	28,8	31,2	26,5	16,9	17,2	16,5	(Bindraban et al. 2008)
Pakistan	867	≥25	34,8			49			(Hydrie et al. 2009)
Polonia	3.862		39,5						(Janszky et al. 2011)
Portugal	1.433	18-98	41,9	37,8	44,4	24	18,7	27,2	(Santos, Severo & Barros 2010)
Seychelles	1.255	25-64		25,1	35,4		24	32,2	(Kelliny et al. 2008)
Tailandia	19.256	≥20	23,2	19,5	26,8				(Aekplakorn et al. 2011)
Taiwán	4.666 ^{PL}	≥20	8,2	14	2,1				(Tsai, Cheng & Lai 2011)
Turquía	1.568	45 ^{EM}	42	46	48	38	41	43	(Can, Bersot 2007)

ND: Población no diabética

PL: Población laboral

EM: edad media del grupo poblacional

* Población con perímetro de cintura (pc) ♂≥85 ♀≥90 cm

** Población con pc ♂≥90 ♀≥80 cm

ANEXO III: Métodos e índices para el estudio de la resistencia a la insulina

Basados en la exploración física

EVALUACIÓN DEL GRADO DEL GRADO DE OBESIDAD

Probablemente, desde un punto de vista asistencial, sea el método más utilizado para estimar la resistencia a la insulina, ya que, en su aproximación más sencilla, sólo precisa *pesar y medir* al individuo. Es bien conocido desde hace décadas que la obesidad se asocia con insulino resistencia e hiperinsulinemia (Karam *et al.*, 1963; Rabinowitz y Zierler, 1962). Además, diferentes índices de obesidad, como el índice de masa corporal (IMC) o el porcentaje de peso ideal, guardan relación con la insulinoresistencia (Annuzzi *et al.*, 2010; Malik *et al.*, 2010).

Sin embargo, presenta limitaciones importantes. El grado de correlación es débil, por lo que en un individuo en concreto la situación en cuanto a la resistencia insulínica no se puede precisar (Ferrannini *et al.*, 1997). Además, si bien es cierto que los individuos obesos suelen ser más insulinoresistentes, la situación en los no obesos es menos fiable, ya que hasta un 20% de individuos no obesos, determinados por el índice de masa corporal, presentan una insulinoresistencia similar a los obesos, así como el resto de características del síndrome metabólico (Caro, 1991; Kahn *et al.*, 1993). Por tanto, es un método poco preciso que, aunque pueda ser de utilidad clínicamente, no lo es desde el punto de vista del investigador.

Basados en datos basales

Después de una noche de ayuno, el análisis bioquímico del plasma, aporta información del estado metabólico glucídico en un individuo en concreto. El desarrollo de los ensayos bioquímicos para la determinación tanto de la insulina como de la glucosa en plasma hizo posible analizar en qué medida estos parámetros se correlacionan con las estimaciones de insulinoresistencia medidas por métodos más complejos como el clamp, el minimal model o el HOMA, los cuales serán comentados mas adelante, ya que son los que más esfuerzo requieren para su obtención.

INSULINEMIA BASAL

El desarrollo de los ensayos bioquímicos para la determinación de la insulina en plasma (Yalow y Berson, 1959; Yalow y Berson, 1960) hizo posible analizar, a partir de entonces, en qué medida la insulinemia se correlaciona con las estimaciones de IR por métodos más complejos como el clamp. A medida que aumenta la RI las células beta responden con un aumento compensador de la secreción de esta (Bergman, 1989). El hecho de que sea sencillo su medida promovió que este método haya sido muy utilizado para el estudio de la insulinorresistencia (Del Prato, 1999).

Su correlación con índices más complejos es, en general, buena, tanto con el camp (Hosker *et al.*, 1985; Laakso, 1993), como con el Minimal Model (Legro *et al.*, 1998) o el HOMA (Matthews *et al.*, 1985), los cuales serán comentados más adelante. Además, la elevación de la insulinemia es un claro predictor del desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 (*Consensus Development Conference on Insulin Resistance. 5-6 November 1997. American Diabetes Association, 1998*). Estas evidencias, junto con el resultado de estudios epidemiológicos amplios hacen que numerosos autores consideren la insulinemia basal como una razonable aproximación al grado de insulinorresistencia sobre todo en pacientes no diabéticos (Yeni-Komshian *et al.*, 2000).

Sus inconvenientes son también claros, existe un considerable solapamiento entre los resultados de individuos normales e insulinresistentes (*Consensus Development Conference on Insulin Resistance. 5-6 November 1997. American Diabetes Association, 1998*). Además, su validez decae en individuos con intolerancia a la glucosa y, sobretodo en diabéticos, en los que la insulinemia puede ser baja a consecuencia de un defecto secretor a pesar de que la resistencia a la insulina sea alta (Caro, 1991).

RATIO GLUCOSA/INSULINA

Diferentes estudios (Legro *et al.*, 1998; Silfen *et al.*, 2001; Vuguin *et al.*, 2001) entre otros, utilizan la medida del ratio de la Glucosa/Insulina como buen índice de resistencia a la insulina. La razón es que a mayor insulinemia para mantener una misma glucemia basal menor es la sensibilidad a la insulina (el cociente desciende) y por tanto, mayor la resistencia a esta (Caro, 1991).

Sin embargo, el cociente Glucosa/Insulina no refleja adecuadamente la fisiología subyacente a los determinantes de la sensibilidad a la insulina (Quon, 2001), ya que a medida que aumenta la resistencia a la insulina también aumenta la glucemia basal (aunque se mantenga dentro de los límites normales en las primeras fases) y, por tanto, el incremento, tanto del numerador como del denominador deja sin efecto los cambios (Duncan *et al.*, 1995; Matsuda y DeFronzo, 1999).

MODELO HOMEOSTÁTICO CON DATOS BASALES (HOMA: HOMEOSTASIS MODEL ASSESSMENT).

Desarrollado en 1985 (Matthews *et al.*, 1985), es un modelo de interacción entre las dinámicas de la glucosa y de la insulina. Su base metodológica es un modelo matemático desarrollado a partir de datos conocidos en humanos en cuanto a la relación de interdependencia entre la glucemia y la insulinemia (homeostasis).

$$\text{HOMA} = \text{Insulina basal } (\mu\text{U/L}) \times [\text{Glucemia basal (mmol/L)/22.5}]$$

Este modelo se basa en que cuando existe un déficit secretor de insulina, la insulinemia puede mantenerse cerca de lo normal a expensas de tener una glucemia basal elevada y viceversa, cuando existe resistencia a la insulina, la glucemia basal tiende a mantenerse cerca de lo normal gracias a una hiperinsulinemia compensadora (Turner *et al.*, 1982). Un complejo desarrollo matemático lleva al aspecto metodológico más importante de esta técnica: una determinada combinación de insulinoresistencia y defecto secretor de insulina se corresponde con una combinación única de glucemia e insulinemia, con lo que a partir de una muestra simultánea para glucosa e insulina plasmáticas se pueden estimar la resistencia a la insulina (HOMA-R) y la capacidad secretora del individuo (Turner *et al.*, 1982).

Sus resultados guardan una buena correlación con los del clamp, tanto en pacientes *normotolerantes*, como en diabéticos tipo 2 de edades y grados de obesidad diferentes (Bonora *et al.*, 2000; Emoto *et al.*, 1999; Haffner *et al.*, 1997; Matsuda y DeFronzo, 1999; Turner *et al.*, 1982). Además, ha demostrado capacidad predictiva en cuanto al desarrollo futuro de intolerancia a la glucosa y diabetes tipo 2 en estudios

prospectivos (Haffner *et al.*, 1996; Lillioja *et al.*, 1993). Todo ello hace que sea un buen método para estudios epidemiológicos amplios.

Como inconveniente, es un método menos reproducible que los más complejos, alcanzando su variación intraindividual niveles del 30% debido a la pulsatilidad de la secreción de insulina y a la influencia del estrés o el ejercicio sobre la misma (Matthews *et al.*, 1985). Otro punto en contra es que refleja fundamentalmente la resistencia a nivel hepático que es la que predomina en ayunas y no la muscular (Matsuda y DeFronzo, 1999). Esto es perfectamente compatible con tener una buena correlación con la insulinoresistencia global determinada por el clamp, ya que habitualmente la resistencia hepática forma una importante parte del total; sin embargo, este aspecto se debe tener en cuenta, dado que la fisiopatología de la intolerancia a la glucosa y la diabetes tipo 2 es heterogénea y el grado de participación de la resistencia hepática a la insulina no es el mismo en todos los individuos y situaciones. Por último, los resultados entre los diferentes centros no son comparables por no estar estandarizado el ensayo de la insulina (Bonora *et al.*, 2000).

Aparte de la insulinemia basal, el cociente glucemia/insulinemia, y el HOMA ya comentados, han ido surgiendo otros índices que tienen en común el basarse en el producto o la suma de la glucemia e insulinemia basales como parte fundamental de su fórmula de cálculo.

QUICKI (“quantitative insulin sensitivity check index”)

Es un índice de sensibilidad a la insulina que se calcula matemáticamente aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{QUICKI} = 1 / [\log (\text{Insulina ayunas}) + \log (\text{Glucemia en ayunas})]$$

Según los autores, la transformación logarítmica hace que los resultados correlacionen mejor con los del clamp (Katz *et al.*, 2000).

ISI ("insulin sensitivity index")

Consiste en multiplicar la glucemia y la insulinemia basales, siendo el resultado el denominador de una fracción donde el numerador es 10.000; por tanto, a menor glucemia e insulinemia, mayor es el índice que corresponde a una mayor sensibilidad a la insulina (Sluiter *et al.*, 1976).

$$ISI = 10,000 / [\text{Raíz (Glucemia}_{0\text{min}} \times \text{Insulina}_{0\text{min}}) * (\text{Media Glucemia}_{0-120\text{min}} \times \text{Media Insulina}_{0-120\text{min}})]$$

En algunos estudios epidemiológicos se ha mostrado una correlación moderada con el resultado del clamp (alrededor de 0,6) y capacidad predictiva del desarrollo de diabetes en análisis prospectivos.

Basados en la tolerancia oral a la glucosa (TTOG)*INSULINEMIA ESTIMULADA*

La insulinemia a los 120 minutos del TTOG o bien el área bajo la curva reflejando su secreción integrada se ha utilizado como parámetro de resistencia a la insulina (Laakso, 1993). Sin embargo, la utilidad de estos índices es fiable cuando la población estudiada no es diabética diabética (Yeni-Komshian *et al.*, 2000). Por tanto, y sobre todo cuando la población incluye este tipo de pacientes, se prefiere la insulinemia basal.

Basados en estímulos endovenosos*ESTUDIOS DE PINZAMIENTO*

Desde su descripción inicial por DeFronzo y colaboradores (DeFronzo *et al.*, 1979) esta técnica está considerada como el *estándar de oro* en el estudio de la insulinoresistencia. Por lo que, la validación del resto de los métodos e índices para la evaluación de la resistencia a la insulina deben pasar por la comparación de sus resultados con los obtenidos por el clamp.

El método consiste en la infusión endovenosa de insulina para mantener una insulinemia permanentemente elevada por encima de la correspondiente al período de ayuno; simultáneamente se van realizando determinaciones de glucemia cada 2-5 minutos para infundir glucosa a un ritmo tal que permita mantener una glucemia alrededor de 5 mmol/L de forma estable. El ritmo de infusión de glucosa necesario será proporcional a la sensibilidad a la insulina, y por tanto, inversamente proporcional a la insulinresistencia. El resultado se expresa como mg/kg/min o bien en forma de coeficiente, siendo el valor 1 el resultado del clamp promedio en el grupo de edad de menos de 35 años y con 90-110% del peso.

Sus ventajas son múltiples, mide la *acción de la insulina* sin que puedan interferir factores de confusión derivados de la secreción endógena de insulina o de niveles variables de glucemia. Su *grado de reproducibilidad* es el más alto de todas las técnicas disponibles, situándose su coeficiente de variación intraindividual entre el 5 y el 15% (Bokemark *et al.*, 2000; Soop *et al.*, 2000) según los autores.

A pesar de ser la técnica más precisa y reproducible, no está exenta de inconvenientes. La situación que se reproduce es fija en cuanto a la relación entre glucemia e insulinemia, y por tanto nada fisiológica, ya que en realidad son parámetros dependientes entre sí pero en constante cambio en el organismo (Bokemark *et al.*, 2000). Esto, junto con la complejidad de aplicación de la técnica, hace que esté al alcance de pocos laboratorios y que no sea factible su uso en grandes muestras de población.

MINIMAL MODEL

Fue desarrollado por Bergman y colaboradores (Bergman *et al.*, 1987) en un intento por encontrar una forma más simple que el clamp de estudio de la resistencia y secreción insulínicas, los dos grandes componentes responsables de la tolerancia a la glucosa. La base metodológica es un test de tolerancia endovenosa a la glucosa. Los datos obtenidos son procesados por un programa informático, diseñado a partir de estudios experimentales y clínicos, que calcula el índice de sensibilidad a la insulina a

partir de las relaciones dinámicas entre las curvas de desaparición plasmática de la glucosa y de concentración de insulina (Bergman, 1989).

En general, sus resultados ofrecen una buena correlación con los del clamp, llegando en algunos estudios a ser el coeficiente de correlación de 0,89 (Bergman *et al.*, 1987) y ha sido un método muy utilizado en diferentes poblaciones (Johnston *et al.*, 1987).

Sin embargo, también tiene inconvenientes. El más importante es que su precisión y validez decae mucho a medida que desciende la capacidad secretora de insulina del individuo, por lo que es poco útil en personas diabéticas (Saad *et al.*, 1994). El motivo es que este tipo de pacientes tiene disminuida la secreción inicial de insulina, importante componente del modelo matemático

MODELO HOMEOSTÁTICO-CIGMA (continuos infusión of glucose with model assessment)

Desarrollado por los mismos autores que el HOMA y con el mismo modelo matemático (Hosker *et al.*, 1985), esta técnica es un análisis de la relación entre glucemia e insulinemia, pero a diferencia del HOMA, tras la infusión de glucosa. Consiste en la infusión de 5 mg/kg/minuto de glucosa durante 60 minutos. Con la media de los resultados para glucemia e insulinemia se aplica el modelo matemático ya comentado. Los autores que lo desarrollaron argumentan que se trata de un modelo más fisiológico de estudio que los otros dinámicos existentes: por un lado, la dosis de glucosa es más fisiológica que la utilizada por ejemplo en el *Minimal Model*, y por otro, la insulinemia resultante es endógena, y por tanto, transportada inicialmente por la circulación portal hacia el hígado, a diferencia del clamp en que la insulina se aporta por vía periférica (Hosker *et al.*, 1985).

Sus resultados guardan una buena correlación con el clamp euglicémico tanto en diabéticos como en no diabéticos (coeficiente alrededor de 0,85). Respecto al más simple HOMA, la diferencia fundamental es la precisión, ya que el coeficiente de variación intraindividual es de alrededor del 20% (Hosker *et al.*, 1985).

Al igual que el resto de los métodos también presenta diferentes inconvenientes, como que el modelo matemático parte de varias premisas que no son completamente ciertas, la más importante de las cuales es que aplica proporciones iguales de insulinoresistencia a los componentes hepático y musculares (Hosker *et al.*, 1985) cuando no tienen que ser así necesariamente.

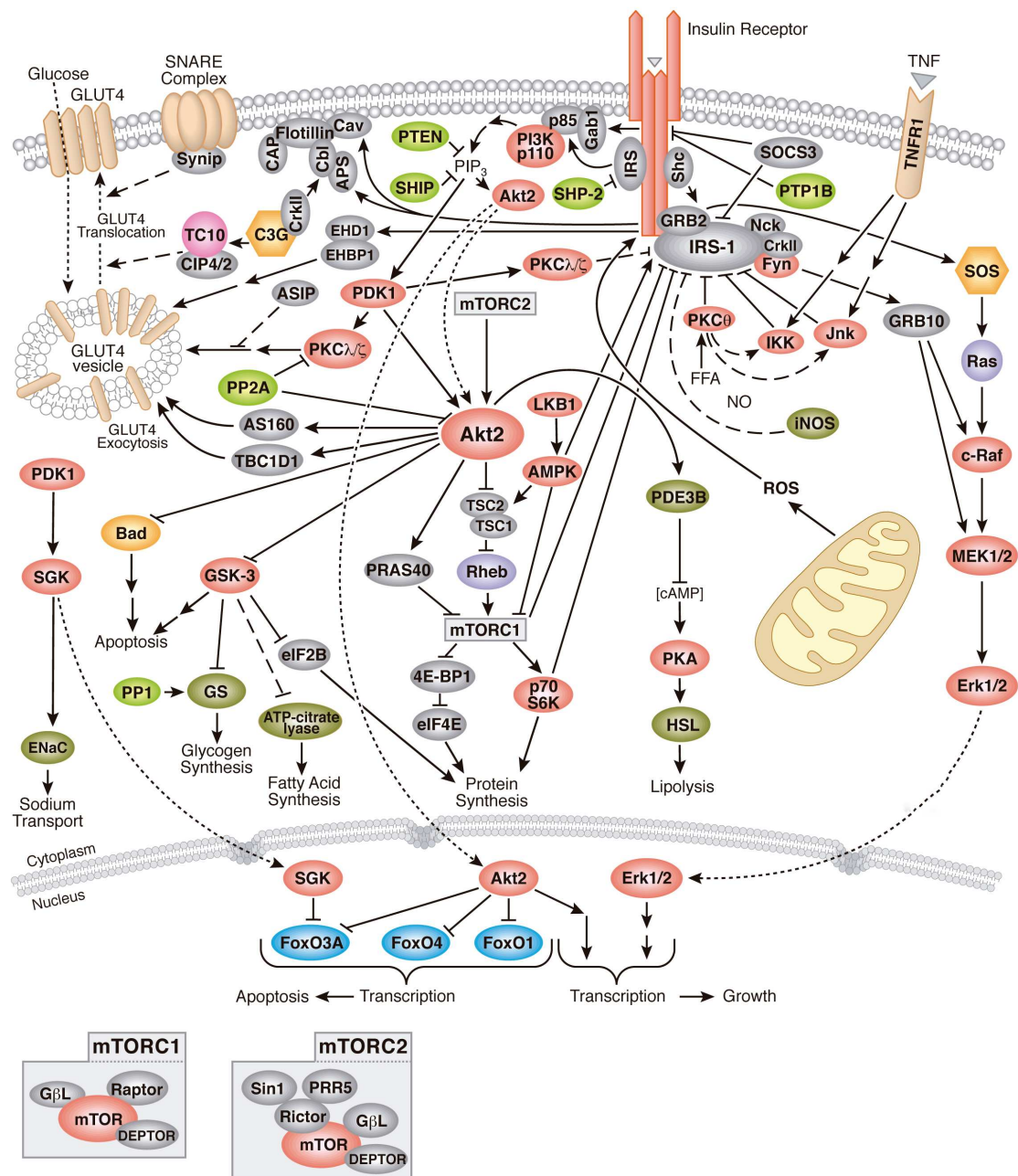
TEST DE TOLERANCIA A LA INSULINA

Consiste en la infusión endovenosa de una dosis de insulina (habitualmente 0,1U/kg) para medir el descenso de la glucemia obteniendo una constante denominada constante de descenso de la glucemia (KITT) (Del Prato, 1999). A mayor descenso menor es la resistencia a la insulina. Aunque sus resultados guarden correlación con los del clamp, es un método *poco utilizado* en comparación con otros, por varios motivos. En primer lugar, tiene el riesgo de hipoglucemia para el individuo (Del Prato, 1999) además, es un método que parece menos preciso y reproducible que otros más utilizados, como el modelo homeostático (HOMA-CIGMA) o el “Minimal Model” (Hermans *et al.*, 1999).

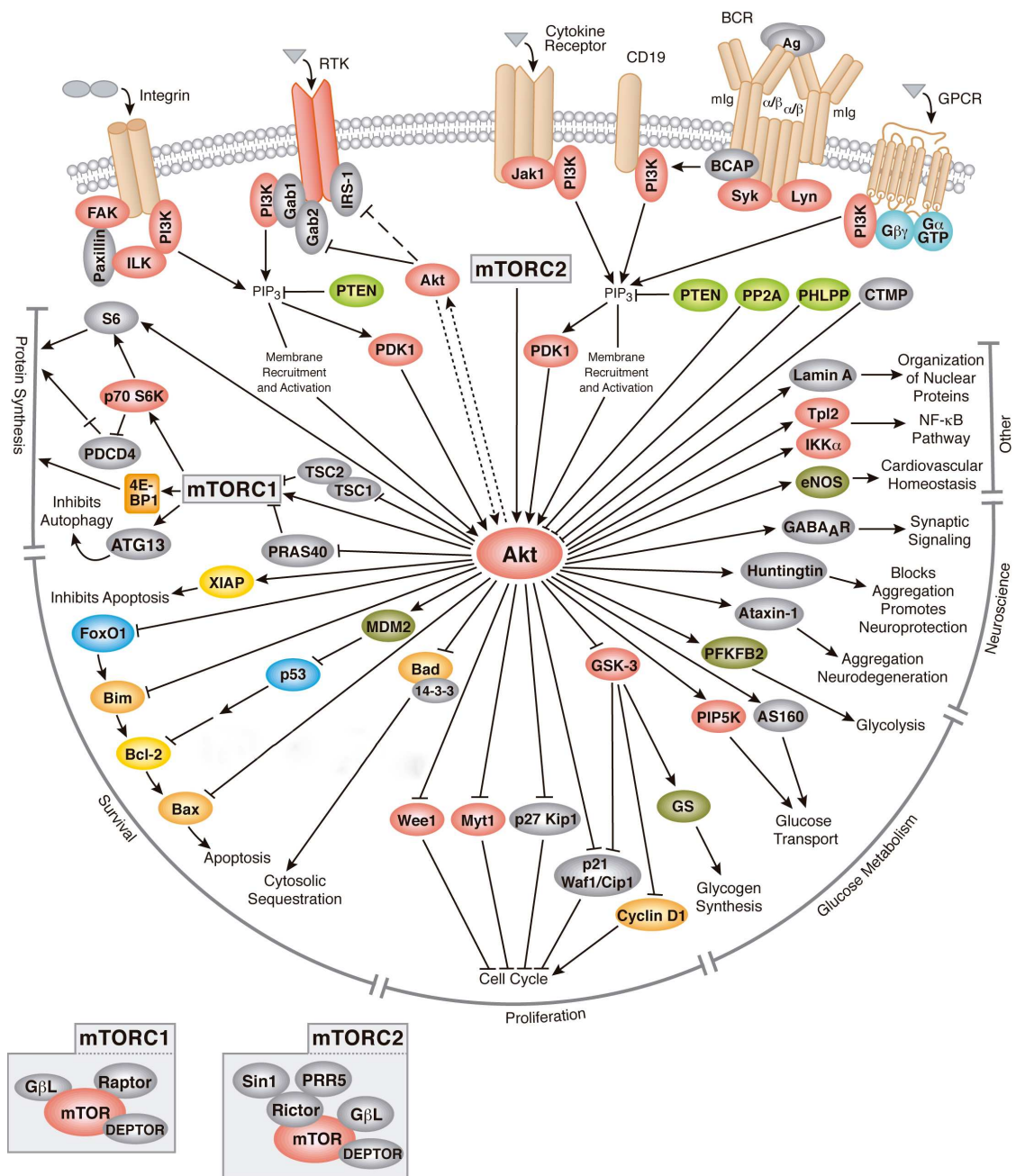
ANEXO IV: Vías de señalización relacionadas con el metabolismo energético celular

A continuación se presentan las vías de señalización relacionadas con el metabolismo energético celular adaptadas de las propuestas por la compañía *Cell signaling Technology*[®] en el apartado *pathways* de su web (<http://www.cellsignal.com/>). En la última hoja de este anexo se puede consultar la leyenda de los gráficos representados.

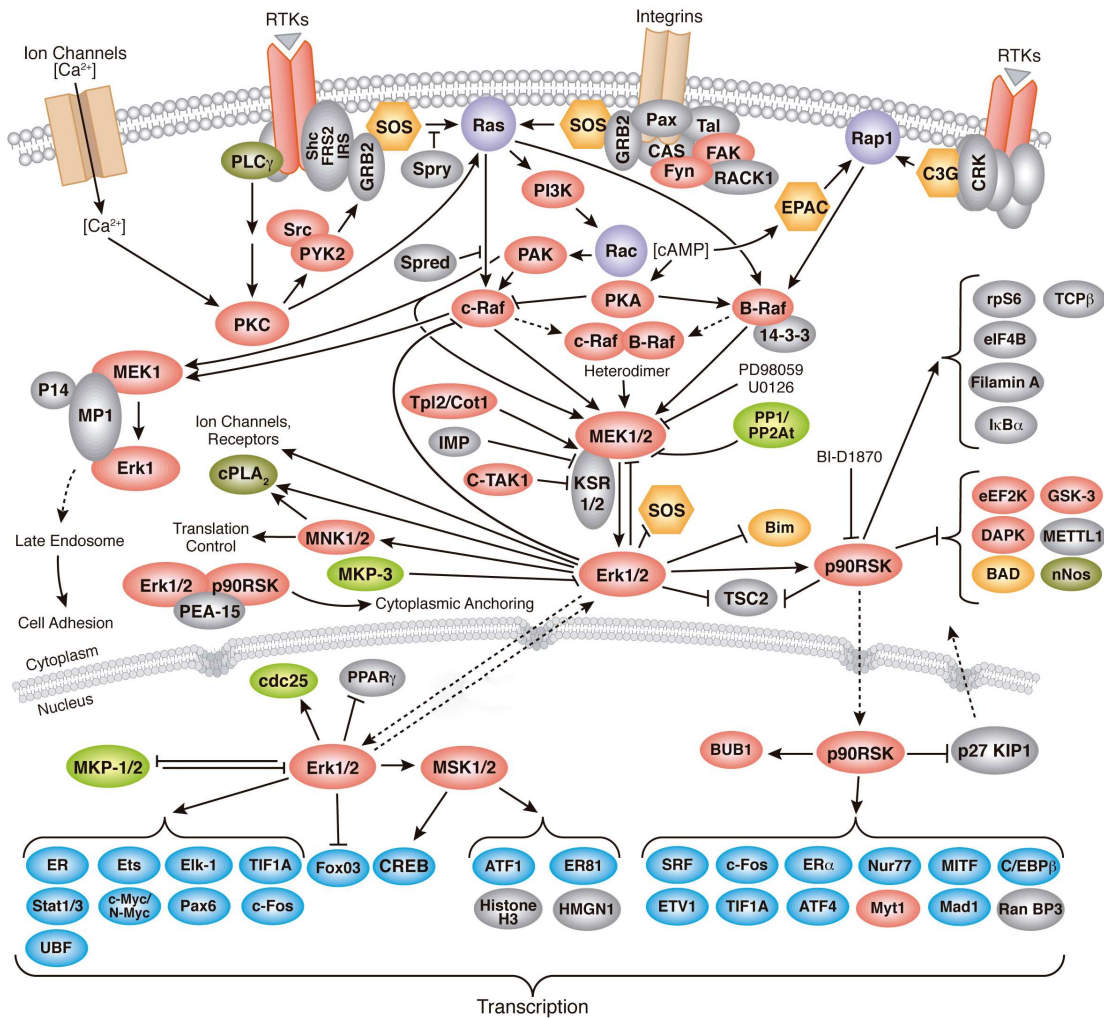
Vía de señalización insulínica



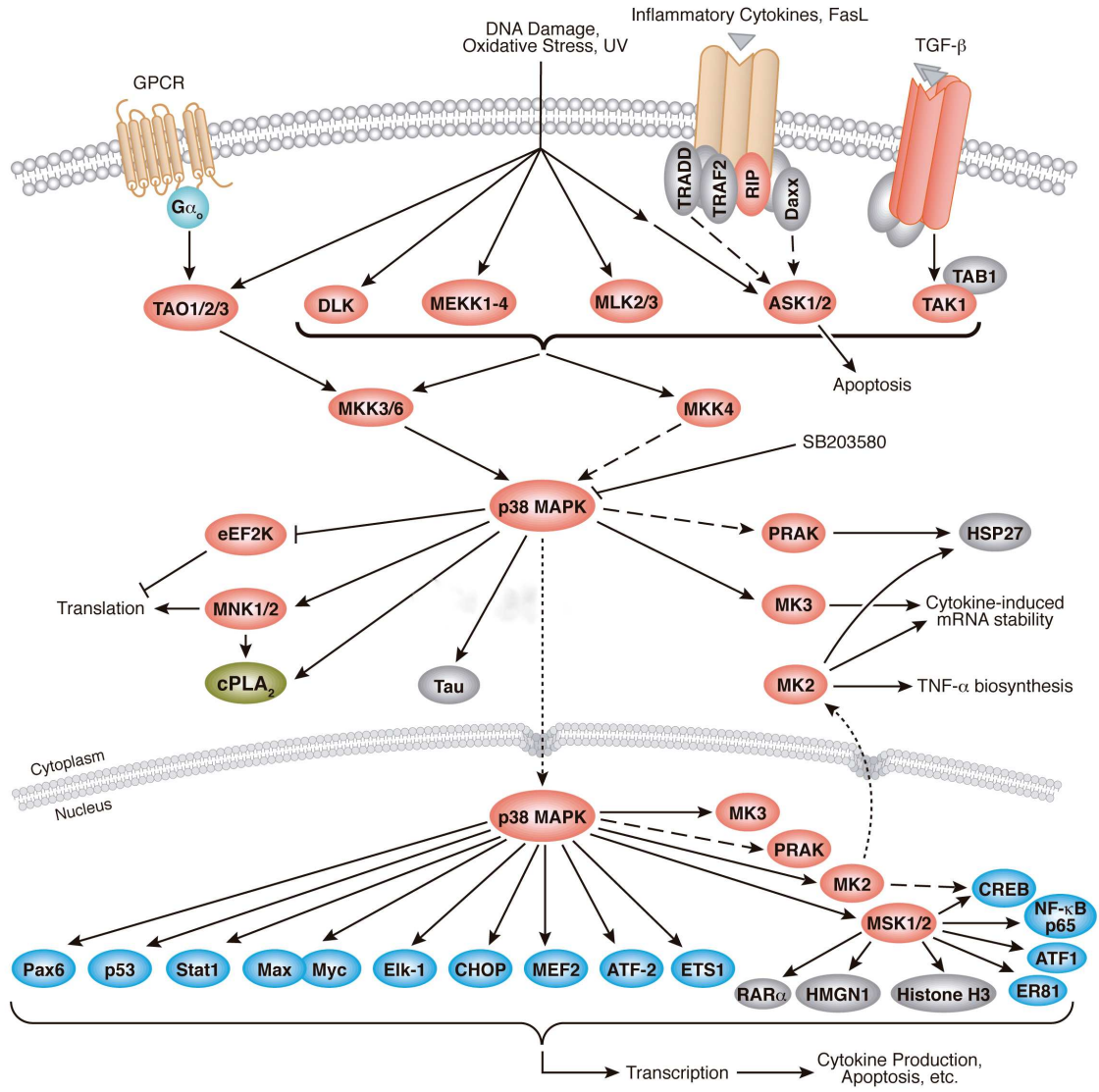
Vía del AKT/PKB



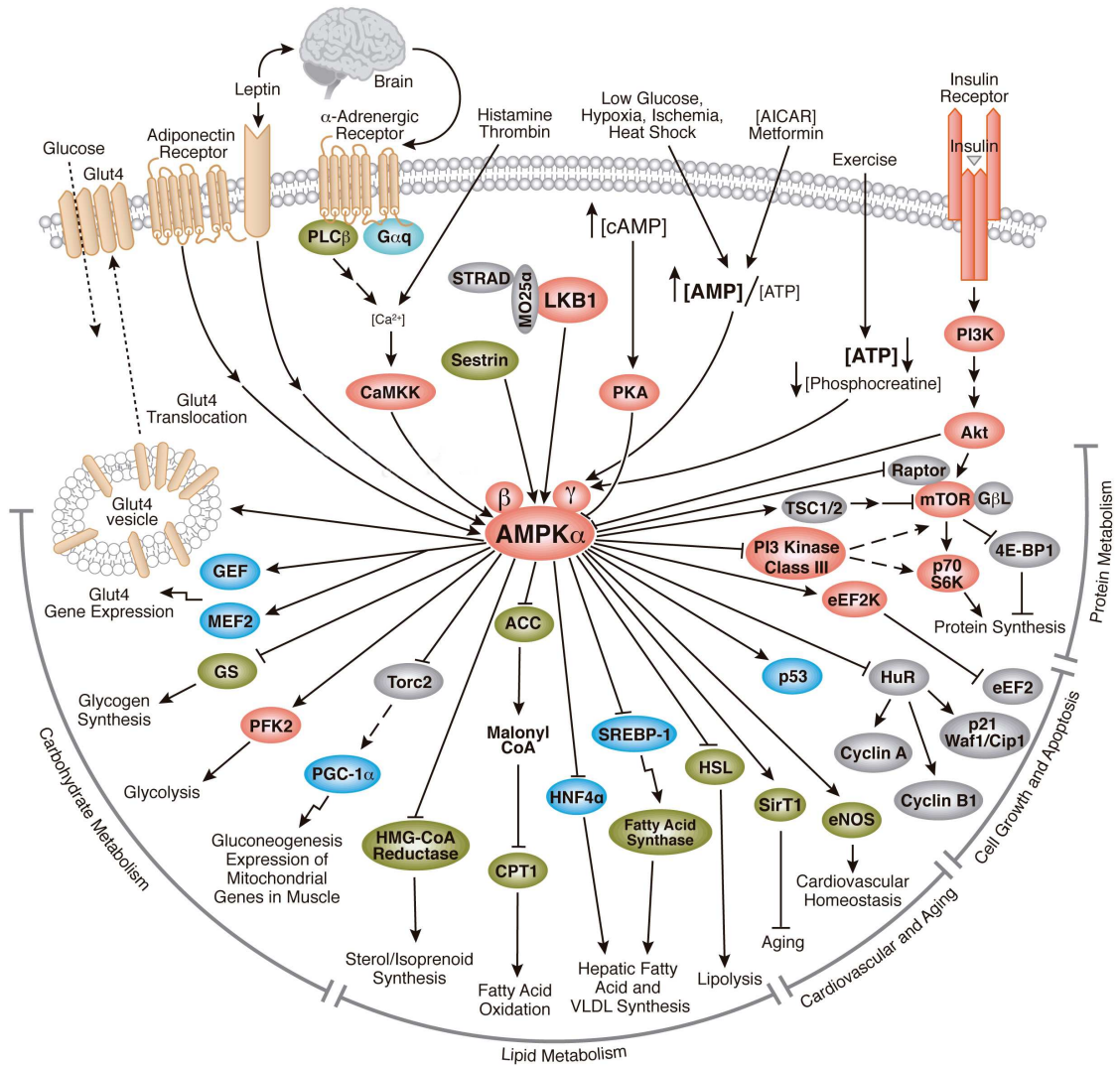
Vía de las ERK 1 y 2

























Vía de las MAPK



Vía de la AMPK



Leyenda

	Quinasa		Estimulación directa
	Fosfatasa		Inhibición directa
	Factor de transcripción		Estimulación por varias vías
	Caspasa		Inhibición por varias vías
	Receptor		Estimulación transcripcional
	Enzima		Inhibición transcripcional
	Ciclina apoptótica		Translocación
	Ciclina de supervivencia		Separación de subunidades
	GAP/GEF		Unión de subunidades
	GTPasa		
	Proteína G		
	Acetilasa		
	Desacetilasa		


ANEXO V: Tratamiento y análisis de datos obtenidos por QBT™

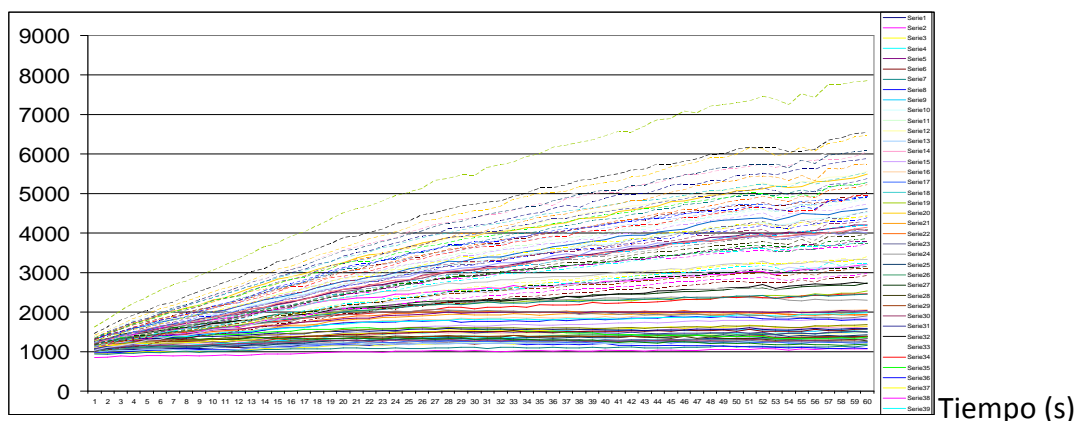
El tratamiento de los datos se realizó en un libro Excel con 4 pestañas: Protocolo, Data, ABC y ABCsin, cuyas particularidades se describen a continuación.

PROTOCOLO

Consta de diferentes apartados en los que se resume: la hipótesis de trabajo, los antecedentes que no se han hecho plantear la hip., el objetivo del experimento, el protocolo detallado, un esquema representativo, la distribución de las muestras, un apartado de observaciones y, por último, los cálculos que se han realizado para obtener las concentraciones de estudio.

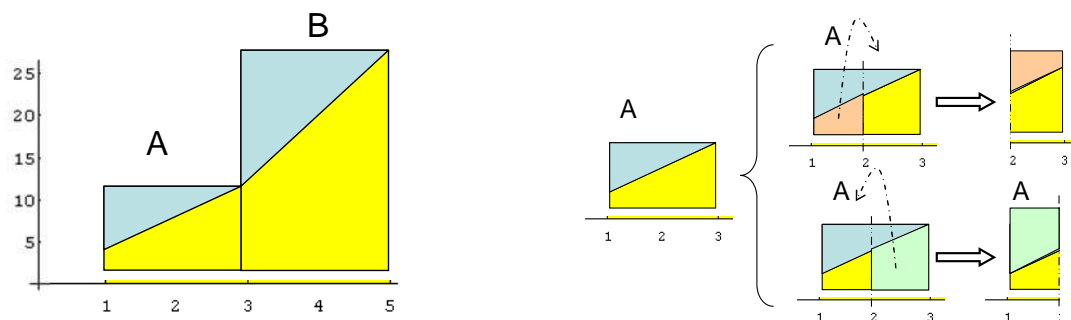
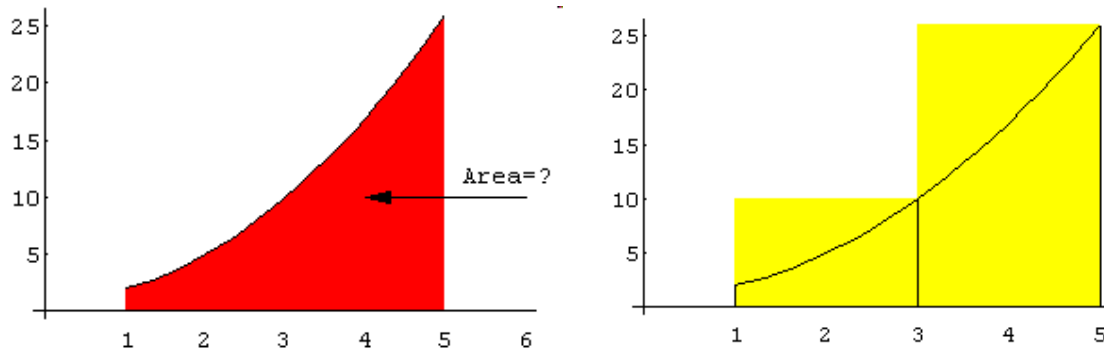
DATA

En esta hoja se recogen los datos originales que se tienen del experimento, en este caso, los datos directos del fluorímetro y una representación gráfica de los mismos,  la cual se genera seleccionando los valores y realizar el gráfico tipo Líneas y seleccionando Rango de datos en Filas.



ABC

Como vemos en la representación anterior, los datos definen una gráfica con una pendiente más o menos constante. Para analizar estos datos calculamos el Área Bajo la Curva de la gráfica que definen los datos. Para realizarlo nos basamos en la triangulación.



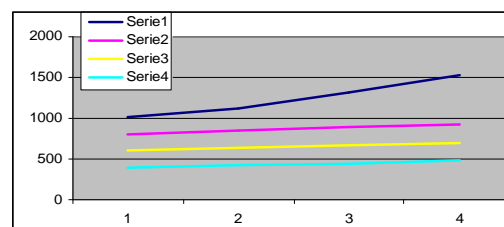
Área= área de A + área de B= Σ áreas parciales

$$\text{Área de A} = \text{base} \times \text{altura} = [(\Delta x)/2] (y_1 + y_3)$$

$$\text{Área de B} = [(\Delta x)/2] (y_3 + y_5)$$

Para los datos son los que trabajamos nosotros, en los que tenemos aprox. 60 puntos, lo que hacemos es el sumatorio del ABC de cada segmento, siendo el parámetro Y el dato de fluorescencia y X el tiempo (en segundos).

Cycle Nr.	1	2	3	4
Time [s]	0	120	240	360
Temp. [°C]	37,1	37,1	36,9	37,2
A1	1017	1117	1325	1525
A2	800	850	900	930
A3	600	630	660	700
A4	400	420	440	480



El área $A_x = \Sigma$ de las áreas en cada tramo, por lo que tenemos que calcular las ABC en cada punto aplicando la fórmula que acabamos de mencionar, y realizar el sumatorio de las mismas.

Cycle Nr.	1	2	3	4	
Time [s]	0	120	240	360	
Temp. [°C]	37,1	37,1	36,9	37,2	
A1	1017	1117	1325	1525	Σ ABC
	128040	146520	171000	91500	537060
A2	800	850	900	930	
	99000	105000	109800	55800	369600
A3	600	630	660	700	
	73800	77400	81600	42000	274800
A4	400	420	440	480	
	49200	51600	55200	28800	184800

$(120/2) \times (400+420)$ $(120/2) \times (1325+1525)$

Para realizar esta hoja copiamos solamente los datos de la hoja anterior (DADES) e incluimos una fila entre cada fila de datos, con el objetivo de ir calculando el área bajo la curva de cada sección, incluimos una última columna para el sumatorio de las ABC parciales.

En casi todos los casos la medida de los datos se realiza por duplicado o triplicado, por lo que tendremos que añadir las columnas de MEDIA y DESVIACIÓN TÍPICA.

	Σ ABC	ABC mean	std desviation
	537060		
	369600	393820	132796,962
	274800		

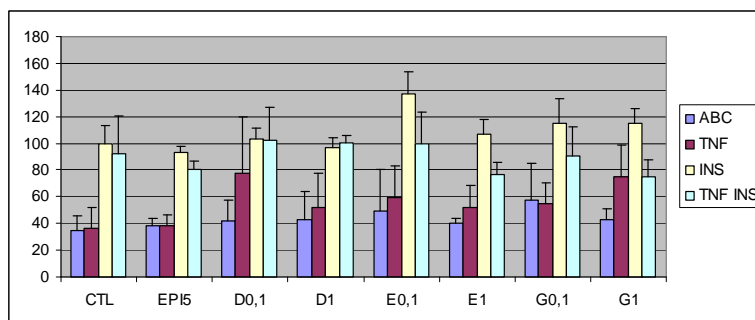
Ahora colocaremos los datos para trabajar con ellos de forma práctica. Para lo cual copiamos los datos correspondientes a cada tratamiento, de ABC medio y la desviación típica.

	ABC mean	%	std desviation	% std desv.	
CTL	10000162	77,81	1338371	13,38	Porcentaje que representa la desviación sobre la media: $(1338371 * 100 / 10000162)$
D 1	9898512	77,02	664472,629	6,71	
INS	12851970	100,00	1935639,54	15,06	
INS D 1	13470570	104,81	4896480,86	36,35	

$13470570 * 100 / 12851970$ → Es el valor de nuestro control, que en este caso es el tratamiento con INSULINA

Una vez generada la tabla con los valores ordenados, pasamos a representar la gráfica de barras, tomando los valores de porcentaje tanto de las medias como de las

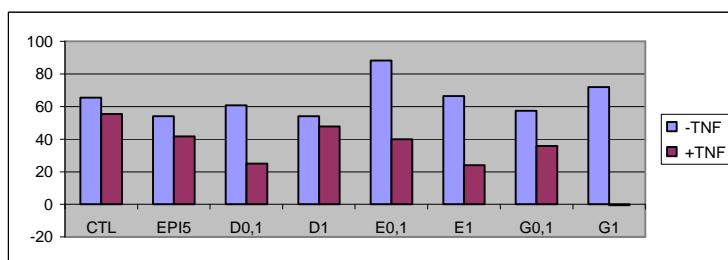
desviaciones (estas últimas serán los valores que representaremos como error) ya que de esta manera podremos comparar los resultados entre diferentes experimentos.



A veces lo que nos interesa es ver los efectos debidos a un parámetro (en nuestro caso generalmente es el debido a la *Insulina*) para lo que generamos una tabla con los datos obtenidos de la resta de de los tratamientos con insulina menos los mismos tratamientos sin insulina.

DEPENDIENTE DE INSULINA

	-TNF	+TNF
CTL	65,52	55,44
EPI5	54,21	41,69
D0,1	60,83	24,95
D1	54,13	47,78
E0,1	88,31	40,03
E1	66,50	24,02
G0,1	57,55	35,75
G1	71,99	-0,46



ABC sin

A veces, las diferentes repeticiones de los mismos tratamientos ofrecen resultados muy dispersos, lo que hace que la desviación sea grande y a su vez, también, el error que cometemos. Para disminuir este tipo de error lo que realizamos es la eliminación de lo *OUTLIERS*.

Para la eliminación de estos valores existen diferentes herramientas estadísticas, como *Dixon's Q test*, que se ajusta a espacios muestrales con muchas repeticiones. En nuestro caso tenemos tres repeticiones por lo que identificamos los *OUTLIERS* como aquellos valores de desviación típica cuyos porcentajes sean mayores de 20%

	ABC mean	%	std desviation	% std desv.
CTL	10000162	77,81	1338371	13,38
D 1	9898512	77,02	664472,629	6,71
INS	12851970	100,00	1935639,54	15,06
INS D 1	13470570	104,81	4896480,86	36,35

Valores por encima del 20% nos indican gran dispersión de los datos.

Para disminuir la desviación de los datos, copiamos los valores obtenidos en la hoja ABC y eliminamos los datos correspondientes a desviaciones altas.

ABC	ABC mean	std desviation	std desviation %	ABC	ABC mean	std desviation	std desviation %
13784220				13784220			
14278410	17164290	5432094,715	31,64765169	14278410	14031315	349445,1002	2,490465792
23430240				23430240			

Eliminamos el valor mas alejado de los otros dos, o aquel que ofrezca una desviación mayor

Una vez realizada la corrección de los datos volvemos a graficar los resultados como en la hoja anterior (ABC).

Bibliografía

- Abumrad, N., Harmon, C. & Ibrahimi, A. 1998, "Membrane transport of long-chain fatty acids: evidence for a facilitated process", *Journal of lipid research*, vol. 39, no. 12, pp. 2309-2318.
- Abumrad, N.A., el-Maghrabi, M.R., Amri, E.Z., Lopez, E. & Grimaldi, P.A. 1993, "Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36", *The Journal of biological chemistry*, vol. 268, no. 24, pp. 17665-17668.
- Aderem, A. & Ulevitch, R.J. 2000, "Toll-like receptors in the induction of the innate immune response", *Nature*, vol. 406, no. 6797, pp. 782-787.
- Adlercreutz, H., Fotsis, T., Lampe, J., Wahala, K., Makela, T., Brunow, G. & Hase, T. 1993, "Quantitative determination of lignans and isoflavonoids in plasma of omnivorous and vegetarian women by isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry", *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. Supplementum*, vol. 215, pp. 5-18.
- Adlercreutz, H., Markkanen, H. & Watanabe, S. 1993, "Plasma concentrations of phyto-oestrogens in Japanese men", *Lancet*, vol. 342, no. 8881, pp. 1209-1210.
- Ae Park, S., Choi, M.S., Cho, S.Y., Seo, J.S., Jung, U.J., Kim, M.J., Sung, M.K., Park, Y.B. & Lee, M.K. 2006, "Genistein and daidzein modulate hepatic glucose and lipid regulating enzyme activities in C57BL/KSJ-db/db mice", *Life Sciences*, vol. 79, no. 12, pp. 1207-1213.
- Aekplakorn, W., Kessomboon, P., Sangthong, R., Chariyalertsak, S., Putwatana, P., Inthawong, R., Nitiyanant, W., Taneepanichskul, S. & NHES IV study group 2011, "Urban and rural variation in clustering of metabolic syndrome components in the Thai population: results from the fourth National Health Examination Survey 2009", *BMC public health*, vol. 11, pp. 854.
- Ajuwon, K.M. & Spurlock, M.E. 2005, "Palmitate activates the NF-kappaB transcription factor and induces IL-6 and TNFalpha expression in 3T3-L1 adipocytes", *The Journal of nutrition*, vol. 135, no. 8, pp. 1841-1846.
- Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., Shibuya, M. & Fukami, Y. 1987, "Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases", *The Journal of biological chemistry*, vol. 262, no. 12, pp. 5592-5595.
- Al-Bermani, A., Desha, Y.H., Morgan, J., Soobrah, R., Symonds, C.S. & Taylor, R. 2005, "Management of incidental hyperglycaemia in acute medical emergencies", *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*, vol. 22, no. 7, pp. 937-941.
- Alberti, K.G., Zimmet, P., Shaw, J. & IDF Epidemiology Task Force Consensus Group 2005, "The metabolic syndrome--a new worldwide definition", *Lancet*, vol. 366, no. 9491, pp. 1059-1062.
- Alberti, K.G. & Zimmet, P.Z. 1998, "Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation", *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*, vol. 15, no. 7, pp. 539-553.
- Alegria, E., Cordero, A., Laclaustra, M., Grima, A., Leon, M., Casasnovas, J.A., Luengo, E., del Rio, A., Ferreira, I. & Investigadores del registro MESYAS 2005, "Prevalence of metabolic syndrome in the Spanish working population: MESYAS registry", *Revista espanola de cardiologia*, vol. 58, no. 7, pp. 797-806.
- Aljada, A. & Dandona, P. 2000, "Effect of insulin on human aortic endothelial nitric oxide synthase", *Metabolism: clinical and experimental*, vol. 49, no. 2, pp. 147-150.

- Al-Nakkash, L., Markus, B., Batia, L., Prozialeck, W.C. & Broderick, T.L. 2010, "Genistein induces estrogen-like effects in ovariectomized rats but fails to increase cardiac GLUT4 and oxidative stress", *Journal of medicinal food*, vol. 13, no. 6, pp. 1369-1375.
- Alvarez Leon, E.E., Ribas Barba, L. & Serra Majem, L. 2003, "Prevalence of the metabolic syndrome in the population of Canary Islands, Spain", *Medicina clinica*, vol. 120, no. 5, pp. 172-174.
- Anai, M., Funaki, M., Ogihara, T., Terasaki, J., Inukai, K., Katagiri, H., Fukushima, Y., Yazaki, Y., Kikuchi, M., Oka, Y. & Asano, T. 1998, "Altered expression levels and impaired steps in the pathway to phosphatidylinositol 3-kinase activation via insulin receptor substrates 1 and 2 in Zucker fatty rats", *Diabetes*, vol. 47, no. 1, pp. 13-23.
- Anderson, J.W., Fuller, J., Patterson, K., Blair, R. & Tabor, A. 2007, "Soy compared to casein meal replacement shakes with energy-restricted diets for obese women: randomized controlled trial", *Metabolism: clinical and experimental*, vol. 56, no. 2, pp. 280-288.
- Anderson, J.W. & Hoie, L.H. 2005, "Weight loss and lipid changes with low-energy diets: comparator study of milk-based versus soy-based liquid meal replacement interventions", *Journal of the American College of Nutrition*, vol. 24, no. 3, pp. 210-216.
- Antithrombotic Trialists' Collaboration 2002, "Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients", *BMJ (Clinical research ed.)*, vol. 324, no. 7329, pp. 71-86.
- Aranceta, J., Perez Rodrigo, C., Serra Majem, L., Ribas Barba, L., Quiles Izquierdo, J., Vioque, J., Tur Mari, J., Mataix Verdu, J., Llopis Gonzalez, J., Tojo, R., Foz Sala, M. & Grupo colaborativo para el Estudio de la Obesidad en Espana 2003a, "Prevalence of obesity in Spain: results of the SEEDO 2000 study", *Medicina clinica*, vol. 120, no. 16, pp. 608-612.
- Aranceta, J., Perez Rodrigo, C., Serra Majem, L., Ribas Barba, L., Quiles Izquierdo, J., Vioque, J., Tur Mari, J., Mataix Verdu, J., Llopis Gonzalez, J., Tojo, R., Foz Sala, M. & Grupo colaborativo para el Estudio de la Obesidad en Espana 2003b, "Prevalence of obesity in Spain: results of the SEEDO 2000 study", *Medicina clinica*, vol. 120, no. 16, pp. 608-612.
- Aranceta, J., Perez Rodrigo, C., Serra Majem, L., Ribas, L., Quiles Izquierdo, J., Vioque, J. & Foz, M. 1998, "Prevalence of obesity in Spain: the SEEDO'97 study. Spanish Collaborative Group for the Study of Obesity", *Medicina clinica*, vol. 111, no. 12, pp. 441-445.
- Ascaso, J.F., Romero, P., Real, J.T., Lorente, R.I., Martinez-Valls, J. & Carmena, R. 2003, "Abdominal obesity, insulin resistance, and metabolic syndrome in a southern European population", *European journal of internal medicine*, vol. 14, no. 2, pp. 101-106.
- Athyros, V.G., Ganotakis, E.S., Tziomalos, K., Papageorgiou, A.A., Anagnostis, P., Griva, T., Kargiotis, K., Mitsiou, E.K., Karagiannis, A. & Mikhailidis, D.P. 2010, "Comparison of four definitions of the metabolic syndrome in a Greek (Mediterranean) population", *Current medical research and opinion*, vol. 26, no. 3, pp. 713-719.
- Atkinson, C., Frankenfeld, C.L. & Lampe, J.W. 2005, "Gut bacterial metabolism of the soy isoflavone daidzein: exploring the relevance to human health", *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, vol. 230, no. 3, pp. 155-170.
- Atkuri, K.R., Mantovani, J.J., Herzenberg, L.A. & Herzenberg, L.A. 2007, "N-Acetylcysteine--a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency", *Current opinion in pharmacology*, vol. 7, no. 4, pp. 355-359.

- Avruch, J. 1998, "Insulin signal transduction through protein kinase cascades", *Molecular and cellular biochemistry*, vol. 182, no. 1-2, pp. 31-48.
- Balentine, D.A., Wiseman, S.A. & Bouwens, L.C. 1997, "The chemistry of tea flavonoids", *Critical reviews in food science and nutrition*, vol. 37, no. 8, pp. 693-704.
- Balkau, B. & Charles, M.A. 1999, "Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR)", *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*, vol. 16, no. 5, pp. 442-443.
- Baron, A.D. & Brechtel, G. 1993, "Insulin differentially regulates systemic and skeletal muscle vascular resistance", *The American Journal of Physiology*, vol. 265, no. 1 Pt 1, pp. E61-7.
- Barros, R.P. & Gustafsson, J.A. 2011, "Estrogen receptors and the metabolic network", *Cell metabolism*, vol. 14, no. 3, pp. 289-299.
- Bastarrachea, R.A., Montero, J.C., Saavedra-Gajardo, I., Cerda-Flores, R., Machado-Dominguez, A. & Comuzzie, A.G. 2008, "Molecular targets for new drug discovery to treat type 2 diabetes and obesity", *Revista medica de Chile*, vol. 136, no. 1, pp. 107-117.
- Bazuine, M., van den Broek, P.J. & Maassen, J.A. 2005, "Genistein directly inhibits GLUT4-mediated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes", *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 326, no. 2, pp. 511-514.
- Bertacca, A., Ciccarone, A., Cecchetti, P., Vianello, B., Laurenza, I., Maffei, M., Chiellini, C., Del Prato, S. & Benzi, L. 2005, "Continually high insulin levels impair Akt phosphorylation and glucose transport in human myoblasts", *Metabolism: clinical and experimental*, vol. 54, no. 12, pp. 1687-1693.
- Bindraban, N.R., van Valkengoed, I.G., Mairuhu, G., Holleman, F., Hoekstra, J.B., Michels, B.P., Koopmans, R.P. & Stronks, K. 2008, "Prevalence of diabetes mellitus and the performance of a risk score among Hindustani Surinamese, African Surinamese and ethnic Dutch: a cross-sectional population-based study", *BMC public health*, vol. 8, pp. 271.
- Binnert, C., Koistinen, H.A., Martin, G., Andreelli, F., Ebeling, P., Koivisto, V.A., Laville, M., Auwerx, J. & Vidal, H. 2000, "Fatty acid transport protein-1 mRNA expression in skeletal muscle and in adipose tissue in humans", *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, vol. 279, no. 5, pp. E1072-9.
- Blay, M., Espinel, A.E., Delgado, M.A., Baiges, I., Blade, C., Arola, L. & Salvado, J. 2010, "Isoflavone effect on gene expression profile and biomarkers of inflammation", *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, vol. 51, no. 2, pp. 382-390.
- Bonow, R.O. & Eckel, R.H. 2003, "Diet, obesity, and cardiovascular risk", *The New England journal of medicine*, vol. 348, no. 21, pp. 2057-2058.
- Bose, M., Lambert, J.D., Ju, J., Reuhl, K.R., Shapses, S.A. & Yang, C.S. 2008, "The major green tea polyphenol, (-)-epigallocatechin-3-gallate, inhibits obesity, metabolic syndrome, and fatty liver disease in high-fat-fed mice", *The Journal of nutrition*, vol. 138, no. 9, pp. 1677-1683.
- Bost, F., Aouadi, M., Caron, L., Even, P., Belmonte, N., Prot, M., Dani, C., Hofman, P., Pages, G., Pouyssegur, J., Le Marchand-Brustel, Y. & Binetruy, B. 2005, "The extracellular signal-regulated kinase isoform ERK1 is specifically required for in vitro and in vivo adipogenesis", *Diabetes*, vol. 54, no. 2, pp. 402-411.

- Bouzakri, K., Roques, M., Gual, P., Espinosa, S., Guebre-Egziabher, F., Riou, J.P., Laville, M., Le Marchand-Brustel, Y., Tanti, J.F. & Vidal, H. 2003, "Reduced activation of phosphatidylinositol-3 kinase and increased serine 636 phosphorylation of insulin receptor substrate-1 in primary culture of skeletal muscle cells from patients with type 2 diabetes", *Diabetes*, vol. 52, no. 6, pp. 1319-1325.
- Boyer, J. & Liu, R.H. 2004, "Apple phytochemicals and their health benefits", *Nutrition journal*, vol. 3, pp. 5.
- Bradamante, S., Barenghi, L., Piccinini, F., Bertelli, A.A., De Jonge, R., Beemster, P. & De Jong, J.W. 2003, "Resveratrol provides late-phase cardioprotection by means of a nitric oxide- and adenosine-mediated mechanism", *European journal of pharmacology*, vol. 465, no. 1-2, pp. 115-123.
- Bradford, M.M. 1976, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Analytical Biochemistry*, vol. 72, pp. 248-254.
- Brazil, D.P., Yang, Z.Z. & Hemmings, B.A. 2004, "Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts", *Trends in biochemical sciences*, vol. 29, no. 5, pp. 233-242.
- Bursill, C.A., Abbey, M. & Roach, P.D. 2007, "A green tea extract lowers plasma cholesterol by inhibiting cholesterol synthesis and upregulating the LDL receptor in the cholesterol-fed rabbit", *Atherosclerosis*, vol. 193, no. 1, pp. 86-93.
- Caldwell, C.R., Britz, S.J. & Mirecki, R.M. 2005, "Effect of temperature, elevated carbon dioxide, and drought during seed development on the isoflavone content of dwarf soybean [Glycine max (L.) Merrill] grown in controlled environments", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, no. 4, pp. 1125-1129.
- Cameron, A.J., Magliano, D.J., Zimmet, P.Z., Welborn, T. & Shaw, J.E. 2007, "The metabolic syndrome in Australia: prevalence using four definitions", *Diabetes research and clinical practice*, vol. 77, no. 3, pp. 471-478.
- Camps, M., Castello, A., Munoz, P., Monfar, M., Testar, X., Palacin, M. & Zorzano, A. 1992, "Effect of diabetes and fasting on GLUT-4 (muscle/fat) glucose-transporter expression in insulin-sensitive tissues. Heterogeneous response in heart, red and white muscle", *The Biochemical journal*, vol. 282 (Pt 3), no. Pt 3, pp. 765-772.
- Can, A.S. & Bersot, T.P. 2007, "Analysis of agreement among definitions of metabolic syndrome in nondiabetic Turkish adults: a methodological study", *BMC public health*, vol. 7, pp. 353.
- Cao, Z., Umek, R.M. & McKnight, S.L. 1991, "Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells", *Genes & development*, vol. 5, no. 9, pp. 1538-1552.
- Cargnello, M. & Roux, P.P. 2011, "Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases", *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, vol. 75, no. 1, pp. 50-83.
- Carrara, V.S., Amato, A.A., Neves, F.A., Bazotte, R.B., Mandarino, J.M., Nakamura, C.V., Filho, B.P. & Cortez, D.A. 2009, "Effects of a methanolic fraction of soybean seeds on the transcriptional activity of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR)", *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ...[et al.]*, vol. 42, no. 6, pp. 545-550.
- Cederroth, C.R., Vinciguerra, M., Gjinovci, A., Kuhne, F., Klein, M., Cederroth, M., Caille, D., Suter, M., Neumann, D., James, R.W., Doerge, D.R., Wallimann, T., Meda, P., Foti, M., Rohner-Jeanrenaud,

- F., Vassalli, J.D. & Nef, S. 2008, "Dietary phytoestrogens activate AMP-activated protein kinase with improvement in lipid and glucose metabolism", *Diabetes*, vol. 57, no. 5, pp. 1176-1185.
- Chan, E., Tan, M., Xin, J., Sudarsanam, S. & Johnson, D.E. 2010, "Interactions between traditional Chinese medicines and Western therapeutics", *Current opinion in drug discovery & development*, vol. 13, no. 1, pp. 50-65.
- Chan, S.H., Wu, C.A., Wu, K.L., Ho, Y.H., Chang, A.Y. & Chan, J.Y. 2009, "Transcriptional upregulation of mitochondrial uncoupling protein 2 protects against oxidative stress-associated neurogenic hypertension", *Circulation research*, vol. 105, no. 9, pp. 886-896.
- Chan, T.O., Rittenhouse, S.E. & Tschlis, P.N. 1999, "AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation", *Annual Review of Biochemistry*, vol. 68, pp. 965-1014.
- Chavarro, J.E., Toth, T.L., Sadio, S.M. & Hauser, R. 2008, "Soy food and isoflavone intake in relation to semen quality parameters among men from an infertility clinic", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 23, no. 11, pp. 2584-2590.
- Chavez, J.A., Knotts, T.A., Wang, L.P., Li, G., Dobrowsky, R.T., Florant, G.L. & Summers, S.A. 2003, "A role for ceramide, but not diacylglycerol, in the antagonism of insulin signal transduction by saturated fatty acids", *The Journal of biological chemistry*, vol. 278, no. 12, pp. 10297-10303.
- Cheatham, B. & Kahn, C.R. 1995, "Insulin action and the insulin signaling network", *Endocrine reviews*, vol. 16, no. 2, pp. 117-142.
- Chen, C., Yu, R., Owuor, E.D. & Kong, A.N. 2000, "Activation of antioxidant-response element (ARE), mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and caspases by major green tea polyphenol components during cell survival and death", *Archives of Pharmacal Research*, vol. 23, no. 6, pp. 605-612.
- Chen, D., Pamu, S., Cui, Q., Chan, T.H. & Dou, Q.P. 2012, "Novel epigallocatechin gallate (EGCG) analogs activate AMP-activated protein kinase pathway and target cancer stem cells", *Bioorganic & medicinal chemistry*, vol. 20, no. 9, pp. 3031-3037.
- Chen, J., Lipska, B.K., Halim, N., Ma, Q.D., Matsumoto, M., Melhem, S., Kolachana, B.S., Hyde, T.M., Herman, M.M., Apud, J., Egan, M.F., Kleinman, J.E. & Weinberger, D.R. 2004, "Functional analysis of genetic variation in catechol-O-methyltransferase (COMT): effects on mRNA, protein, and enzyme activity in postmortem human brain", *American Journal of Human Genetics*, vol. 75, no. 5, pp. 807-821.
- Chen, W.S., Xu, P.Z., Gottlob, K., Chen, M.L., Sokol, K., Shiyanova, T., Roninson, I., Weng, W., Suzuki, R., Tobe, K., Kadowaki, T. & Hay, N. 2001, "Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene", *Genes & development*, vol. 15, no. 17, pp. 2203-2208.
- Cheng, X. 1995, "Structure and function of DNA methyltransferases", *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, vol. 24, pp. 293-318.
- Chinetti, G., Fruchart, J.C. & Staels, B. 2000, "Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation", *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ...[et al.]*, vol. 49, no. 10, pp. 497-505.
- Cho, H., Mu, J., Kim, J.K., Thorvaldsen, J.L., Chu, Q., Crenshaw, E.B., 3rd, Kaestner, K.H., Bartolomei, M.S., Shulman, G.I. & Birnbaum, M.J. 2001a, "Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome

- in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta)", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 292, no. 5522, pp. 1728-1731.
- Cho, H., Thorvaldsen, J.L., Chu, Q., Feng, F. & Birnbaum, M.J. 2001b, "Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice", *The Journal of biological chemistry*, vol. 276, no. 42, pp. 38349-38352.
- Cho, H.Y., Park, C.M., Kim, M.J., Chinzorig, R., Cho, C.W. & Song, Y.S. 2011, "Comparative effect of genistein and daidzein on the expression of MCP-1, eNOS, and cell adhesion molecules in TNF-alpha-stimulated HUVECs", *Nutrition research and practice*, vol. 5, no. 5, pp. 381-388.
- Cho, K.W., Lee, O.H., Banz, W.J., Moustaid-Moussa, N., Shay, N.F. & Kim, Y.C. 2010, "Daidzein and the daidzein metabolite, equol, enhance adipocyte differentiation and PPARgamma transcriptional activity", *The Journal of nutritional biochemistry*, vol. 21, no. 9, pp. 841-847.
- Choi, K.M., Kim, S.M., Kim, Y.E., Choi, D.S., Baik, S.H., Lee, J. & International Diabetes Federation 2007, "Prevalence and cardiovascular disease risk of the metabolic syndrome using National Cholesterol Education Program and International Diabetes Federation definitions in the Korean population", *Metabolism: clinical and experimental*, vol. 56, no. 4, pp. 552-558.
- Choi, M.S., Jung, U.J., Yeo, J., Kim, M.J. & Lee, M.K. 2008, "Genistein and daidzein prevent diabetes onset by elevating insulin level and altering hepatic gluconeogenic and lipogenic enzyme activities in non-obese diabetic (NOD) mice", *Diabetes/metabolism research and reviews*, vol. 24, no. 1, pp. 74-81.
- Claussnitzer, M., Skurk, T., Hauner, H., Daniel, H. & Rist, M.J. 2011, "Effect of flavonoids on basal and insulin-stimulated 2-deoxyglucose uptake in adipocytes", *Molecular nutrition & food research*, vol. 55 Suppl 1, pp. S26-34.
- Clegg, D.J., Brown, L.M., Woods, S.C. & Benoit, S.C. 2006, "Gonadal hormones determine sensitivity to central leptin and insulin", *Diabetes*, vol. 55, no. 4, pp. 978-987.
- Colas, R., Sassolas, A., Guichardant, M., Cugnet-Anceau, C., Moret, M., Moulin, P., Lagarde, M. & Calzada, C. 2011, "LDL from obese patients with the metabolic syndrome show increased lipid peroxidation and activate platelets", *Diabetologia*, vol. 54, no. 11, pp. 2931-2940.
- Collins, Q.F., Liu, H.Y., Pi, J., Liu, Z., Quon, M.J. & Cao, W. 2007, "Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a green tea polyphenol, suppresses hepatic gluconeogenesis through 5'-AMP-activated protein kinase", *The Journal of biological chemistry*, vol. 282, no. 41, pp. 30143-30149.
- Combettes-Souverain, M. & Issad, T. 1998, "Molecular basis of insulin action", *Diabetes & metabolism*, vol. 24, no. 6, pp. 477-489.
- Contor, L. 2001, "Functional Food Science in Europe", *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD*, vol. 11, no. 4 Suppl, pp. 20-23.
- Cooke, P.S. & Naaz, A. 2005, "Effects of estrogens and the phytoestrogen genistein on adipogenesis and lipogenesis in males and females", *Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology*, vol. 73, no. 7, pp. 472-473.
- Costford, S.R., Seifert, E.L., Bezaire, V., Gerrits, M., Bevilacqua, L., Gowing, A. & Harper, M.E. 2007, "The energetic implications of uncoupling protein-3 in skeletal muscle", *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme*, vol. 32, no. 5, pp. 884-894.

- Couse, J.F., Lindzey, J., Grandien, K., Gustafsson, J.A. & Korach, K.S. 1997, "Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse", *Endocrinology*, vol. 138, no. 11, pp. 4613-4621.
- Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M. & Hemmings, B.A. 1995, "Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B", *Nature*, vol. 378, no. 6559, pp. 785-789.
- Csaszar, A., Kekes, E., Abel, T., Papp, R., Kiss, I. & Balogh, S. 2006, "Prevalence of metabolic syndrome estimated by International Diabetes Federation criteria in a Hungarian population", *Blood pressure*, vol. 15, no. 2, pp. 101-106.
- Cucuianu, M. & Brudasca, I. 2008, "Lipolytic enzymes, metabolic syndrome and atherosclerosis (revisiting and revising a 40 years old study)", *Romanian journal of internal medicine = Revue roumaine de medecine interne*, vol. 46, no. 2, pp. 99-104.
- Cusi, K., Maezono, K., Osman, A., Pendergrass, M., Patti, M.E., Pratipanawatr, T., DeFronzo, R.A., Kahn, C.R. & Mandarino, L.J. 2000, "Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle", *The Journal of clinical investigation*, vol. 105, no. 3, pp. 311-320.
- Dallongeville, J., Gruposso, M.C., Cottel, D., Ferrieres, J., Arveiler, D., Bingham, A., Ruidavets, J.B., Haas, B., Ducimetiere, P. & Amouyel, P. 2006, "Association between the metabolic syndrome and parental history of premature cardiovascular disease", *European heart journal*, vol. 27, no. 6, pp. 722-728.
- Damiao, R., Castro, T.G., Cardoso, M.A., Gimeno, S.G., Ferreira, S.R. & Japanese-Brazilian Diabetes Study Group 2006, "Dietary intakes associated with metabolic syndrome in a cohort of Japanese ancestry", *The British journal of nutrition*, vol. 96, no. 3, pp. 532-538.
- Danforth, E., Jr 2000, "Failure of adipocyte differentiation causes type II diabetes mellitus?", *Nature genetics*, vol. 26, no. 1, pp. 13.
- Dang, Z. & Lowik, C.W. 2004, "The balance between concurrent activation of ERs and PPARs determines daidzein-induced osteogenesis and adipogenesis", *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, vol. 19, no. 5, pp. 853-861.
- Dang, Z.C. 2009, "Dose-dependent effects of soy phyto-oestrogen genistein on adipocytes: mechanisms of action", *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*, vol. 10, no. 3, pp. 342-349.
- Dang, Z.C. & Lowik, C. 2005, "Dose-dependent effects of phytoestrogens on bone", *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, vol. 16, no. 5, pp. 207-213.
- Dankel, S.N., Staalesen, V., Bjorndal, B., Berge, R.K., Mellgren, G. & Burri, L. 2011, "Tissue-specific effects of bariatric surgery including mitochondrial function", *Journal of obesity*, vol. 2011, pp. 435245.
- Das, M., Pal, S. & Ghosh, A. 2011a, "Prevalence of cardiovascular disease risk factors by habitat: a study on adult Asian Indians in West Bengal, India", *Anthropologischer Anzeiger; Bericht uber die Biologisch-Anthropologische Literatur*, vol. 68, no. 3, pp. 253-264.
- Das, M., Pal, S. & Ghosh, A. 2011b, "Prevalence of the metabolic syndrome in people of Asian Indian origin: outcomes by definitions", *Cardiovascular journal of Africa*, vol. 22, no. 6, pp. 303-305.

- de Boer, V.C., de Goffau, M.C., Arts, I.C., Hollman, P.C. & Keijer, J. 2006, "SIRT1 stimulation by polyphenols is affected by their stability and metabolism", *Mechanisms of ageing and development*, vol. 127, no. 7, pp. 618-627.
- de Ferranti, S. & Mozaffarian, D. 2008, "The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences", *Clinical chemistry*, vol. 54, no. 6, pp. 945-955.
- de Ferranti, S.D., Gauvreau, K., Ludwig, D.S., Neufeld, E.J., Newburger, J.W. & Rifai, N. 2004, "Prevalence of the metabolic syndrome in American adolescents: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey", *Circulation*, vol. 110, no. 16, pp. 2494-2497.
- DECODA Study Group 2007, "Prevalence of the metabolic syndrome in populations of Asian origin. Comparison of the IDF definition with the NCEP definition", *Diabetes research and clinical practice*, vol. 76, no. 1, pp. 57-67.
- Devika, P.T. & Stanely Mainzen Prince, P. 2009, "Preventive effect of (-)epigallocatechin gallate on lipids, lipoproteins, and enzymes of lipid metabolism in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats", *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, vol. 23, no. 6, pp. 387-393.
- Dixon, J.B., Zimmet, P., Alberti, K.G., Rubino, F. & International Diabetes Federation Taskforce on Epidemiology and Prevention 2011, "Bariatric surgery: an IDF statement for obese Type 2 diabetes", *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*, vol. 28, no. 6, pp. 628-642.
- Doyon M, L.J. 2008, "Functional foods: A conceptual definition" in , ed. british food journal vol.110 n.11, pp. 1133-1149.
- DREAM (Diabetes REDuction Assessment with ramipril and rosiglitazone Medication) Trial Investigators, Gerstein, H.C., Yusuf, S., Bosch, J., Pogue, J., Sheridan, P., Dinccag, N., Hanefeld, M., Hoogwerf, B., Laakso, M., Mohan, V., Shaw, J., Zinman, B. & Holman, R.R. 2006, "Effect of rosiglitazone on the frequency of diabetes in patients with impaired glucose tolerance or impaired fasting glucose: a randomised controlled trial", *Lancet*, vol. 368, no. 9541, pp. 1096-1105.
- Du, K., Herzig, S., Kulkarni, R.N. & Montminy, M. 2003, "TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 300, no. 5625, pp. 1574-1577.
- Du, Y., Guo, H. & Lou, H. 2007, "Grape seed polyphenols protect cardiac cells from apoptosis via induction of endogenous antioxidant enzymes", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 55, no. 5, pp. 1695-1701.
- Dubeyl, R.K., Rosselli, M., Imthurn, B., Keller, P.J. & Jackson, E.K. 2000, "Vascular effects of environmental oestrogens: implications for reproductive and vascular health", *Human reproduction update*, vol. 6, no. 4, pp. 351-363.
- Dyck, D.J. 2009, "Adipokines as regulators of muscle metabolism and insulin sensitivity", *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme*, vol. 34, no. 3, pp. 396-402.
- Ebenhoh, O. & Heinrich, R. 2001, "Evolutionary optimization of metabolic pathways. Theoretical reconstruction of the stoichiometry of ATP and NADH producing systems", *Bulletin of mathematical biology*, vol. 63, no. 1, pp. 21-55.
- Egan, B.M., Greene, E.L. & Goodfriend, T.L. 2001, "Insulin resistance and cardiovascular disease", *American journal of hypertension*, vol. 14, no. 6 Pt 2, pp. 116S-125S.

- Einhorn, D., Reaven, G.M., Cobin, R.H., Ford, E., Ganda, O.P., Handelsman, Y., Hellman, R., Jellinger, P.S., Kendall, D., Krauss, R.M., Neufeld, N.D., Petak, S.M., Rodbard, H.W., Seibel, J.A., Smith, D.A. & Wilson, P.W. 2003, "American College of Endocrinology position statement on the insulin resistance syndrome", *Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists*, vol. 9, no. 3, pp. 237-252.
- Elchebly, M., Payette, P., Michaliszyn, E., Cromlish, W., Collins, S., Loy, A.L., Normandin, D., Cheng, A., Himms-Hagen, J., Chan, C.C., Ramachandran, C., Gresser, M.J., Tremblay, M.L. & Kennedy, B.P. 1999, "Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 283, no. 5407, pp. 1544-1548.
- Elliott, W.J. & Meyer, P.M. 2007, "Incident diabetes in clinical trials of antihypertensive drugs: a network meta-analysis", *Lancet*, vol. 369, no. 9557, pp. 201-207.
- Elsas LJ. 2012, *metabolismo*. Available: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/002257.htm> .
- Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults 2001, "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 : the journal of the American Medical Association*, vol. 285, no. 19, pp. 2486-2497.
- Fernandez-Berges, D., Cabrera de Leon, A., Sanz, H., Elosua, R., Guembe, M.J., Alzamora, M., Vega-Alonso, T., Felix-Redondo, F.J., Ortiz-Marron, H., Rigo, F., Lama, C., Gavrilá, D., Segura-Fragoso, A., Lozano, L. & Marrugat, J. 2012, "Metabolic Syndrome in Spain: Prevalence and Coronary Risk Associated With Harmonized Definition and WHO Proposal. DARIOS Study", *Revista española de cardiología*, vol. 65, no. 3, pp. 241-248.
- Fernandez AM., Torres-Alemán I. (2012) The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain. *Nat Rev Neurosci.*;13(4), pp. 225-39.
- Ferrannini, E., Natali, A., Capaldo, B., Lehtovirta, M., Jacob, S. & Yki-Jarvinen, H. 1997, "Insulin resistance, hyperinsulinemia, and blood pressure: role of age and obesity. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR)", *Hypertension*, vol. 30, no. 5, pp. 1144-1149.
- Ford, E.S., Giles, W.H. & Dietz, W.H. 2002, "Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey", *JAMA : the journal of the American Medical Association*, vol. 287, no. 3, pp. 356-359.
- Ford, E.S., Mokdad, A.H., Giles, W.H. & Brown, D.W. 2003, "The metabolic syndrome and antioxidant concentrations: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey", *Diabetes*, vol. 52, no. 9, pp. 2346-2352.
- Foster, F.M., Traer, C.J., Abraham, S.M. & Fry, M.J. 2003, "The phosphoinositide (PI) 3-kinase family", *Journal of cell science*, vol. 116, no. Pt 15, pp. 3037-3040.
- Frame, S. & Cohen, P. 2001, "GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery", *The Biochemical journal*, vol. 359, no. Pt 1, pp. 1-16.
- Franssen, R., Monajemi, H., Stroes, E.S. & Kastelein, J.J. 2011, "Obesity and dyslipidemia", *The Medical clinics of North America*, vol. 95, no. 5, pp. 893-902.
- Furfine, E.S., Harmon, M.F., Paith, J.E. & Garvey, E.P. 1993, "Selective inhibition of constitutive nitric oxide synthase by L-NG-nitroarginine", *Biochemistry*, vol. 32, no. 33, pp. 8512-8517.

- Gao, T., Furnari, F. & Newton, A.C. 2005, "PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth", *Molecular cell*, vol. 18, no. 1, pp. 13-24.
- Gauthier, M.S., O'Brien, E.L., Bigornia, S., Mott, M., Cacicedo, J.M., Xu, X.J., Gokce, N., Apovian, C. & Ruderman, N. 2011, "Decreased AMP-activated protein kinase activity is associated with increased inflammation in visceral adipose tissue and with whole-body insulin resistance in morbidly obese humans", *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 404, no. 1, pp. 382-387.
- Gencil, V.B., Benjamin, M.M., Bahou, S.N. & Khalil, R.A. 2012, "Vascular effects of phytoestrogens and alternative menopausal hormone therapy in cardiovascular disease", *Mini reviews in medicinal chemistry*, vol. 12, no. 2, pp. 149-174.
- George, S., Rochford, J.J., Wolfrum, C., Gray, S.L., Schinner, S., Wilson, J.C., Soos, M.A., Murgatroyd, P.R., Williams, R.M., Acerini, C.L., Dunger, D.B., Barford, D., Umpleby, A.M., Wareham, N.J., Davies, H.A., Schafer, A.J., Stoffel, M., O'Rahilly, S. & Barroso, I. 2004, "A family with severe insulin resistance and diabetes due to a mutation in AKT2", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 304, no. 5675, pp. 1325-1328.
- Ghosh, D. & Konishi, T. 2007, "Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts: role in diabetes and eye function", *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, vol. 16, no. 2, pp. 200-208.
- Ginsberg, H.N. 2000, "Insulin resistance and cardiovascular disease", *The Journal of clinical investigation*, vol. 106, no. 4, pp. 453-458.
- Gloro, R., Hourmand-Ollivier, I., Mosquet, B., Mosquet, L., Rousselot, P., Salame, E., Piquet, M.A. & Dao, T. 2005, "Fulminant hepatitis during self-medication with hydroalcoholic extract of green tea", *European journal of gastroenterology & hepatology*, vol. 17, no. 10, pp. 1135-1137.
- Golberg, I. 1994, *Functional Foods: Designer Foods, Pharmafoods, Nutraceuticals*, Diet Therapy edn, Springer.
- Goldberg, R.B., Temprosa, M., Haffner, S., Orchard, T.J., Ratner, R.E., Fowler, S.E., Mather, K., Marcovina, S., Saudek, C., Matulik, M.J., Price, D. & Diabetes Prevention Program Research Group 2009, "Effect of progression from impaired glucose tolerance to diabetes on cardiovascular risk factors and its amelioration by lifestyle and metformin intervention: the Diabetes Prevention Program randomized trial by the Diabetes Prevention Program Research Group", *Diabetes care*, vol. 32, no. 4, pp. 726-732.
- Goodman-Gruen, D. & Kritz-Silverstein, D. 2001, "Usual dietary isoflavone intake is associated with cardiovascular disease risk factors in postmenopausal women", *The Journal of nutrition*, vol. 131, no. 4, pp. 1202-1206.
- Goto, T., Saito, Y., Morikawa, K., Kanamaru, Y. & Nagaoka, S. 2012, "Epigallocatechin gallate changes mRNA expression level of genes involved in cholesterol metabolism in hepatocytes", *The British journal of nutrition*, vol. 107, no. 6, pp. 769-773.
- Greising, S.M., Baltgalvis, K.A., Lowe, D.A. & Warren, G.L. 2009, "Hormone therapy and skeletal muscle strength: a meta-analysis", *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, vol. 64, no. 10, pp. 1071-1081.
- Grima Serrano, A., Alegria Ezquerro, E. & Jover Estelles, P. 1999, "The prevalence of classic cardiovascular risk factors in a working Mediterranean population of 4996 men", *Revista española de cardiología*, vol. 52, no. 11, pp. 910-918.

- Grover LM, Teyler TJ. (1990) Two components of long-term potentiation induced by different patterns of afferent activation. *Nature*. Oct 4;347(6292):477-9.
- Grundy, S.M., Brewer, H.B., Jr, Cleeman, J.I., Smith, S.C., Jr, Lenfant, C., National Heart, Lung, and Blood Institute & American Heart Association 2004, "Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition", *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 24, no. 2, pp. e13-8.
- Guha, M. & Mackman, N. 2001, "LPS induction of gene expression in human monocytes", *Cellular signalling*, vol. 13, no. 2, pp. 85-94.
- Ha, B.G., Nagaoka, M., Yonezawa, T., Tanabe, R., Woo, J.T., Kato, H., Chung, U.I. & Yagasaki, K. 2011, "Regulatory mechanism for the stimulatory action of genistein on glucose uptake in vitro and in vivo", *The Journal of nutritional biochemistry*, .
- Haffner, S.M. 1997, "Epidemiology of hypertension and insulin resistance syndrome", *Journal of hypertension. Supplement : official journal of the International Society of Hypertension*, vol. 15, no. 1, pp. S25-30.
- Hall, J.E., Guyton, A.C., Smith, M.J., Jr & Coleman, T.G. 1980, "Blood pressure and renal function during chronic changes in sodium intake: role of angiotensin", *The American Journal of Physiology*, vol. 239, no. 3, pp. F271-80.
- Hamalainen, M., Nieminen, R., Vuorela, P., Heinonen, M. & Moilanen, E. 2007, "Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF-kappaB activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF-kappaB activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages", *Mediators of inflammation*, vol. 2007, pp. 45673.
- Hancock, J.F. & Parton, R.G. 2005, "Ras plasma membrane signalling platforms", *The Biochemical journal*, vol. 389, no. Pt 1, pp. 1-11.
- Hanhineva, K., Torronen, R., Bondia-Pons, I., Pekkinen, J., Kolehmainen, M., Mykkanen, H. & Poutanen, K. 2010, "Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism", *International journal of molecular sciences*, vol. 11, no. 4, pp. 1365-1402.
- Hara, Y. 2011, "Tea catechins and their applications as supplements and pharmaceuticals", *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*, vol. 64, no. 2, pp. 100-104.
- Hardie, D.G. 2008, "AMPK: a key regulator of energy balance in the single cell and the whole organism", *International journal of obesity (2005)*, vol. 32 Suppl 4, pp. S7-12.
- Hardie, D.G., Scott, J.W., Pan, D.A. & Hudson, E.R. 2003, "Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system", *FEBS letters*, vol. 546, no. 1, pp. 113-120.
- Hasegawa, N., Yamada, N. & Mori, M. 2003, "Powdered green tea has antilipogenic effect on Zucker rats fed a high-fat diet", *Phytotherapy Research : PTR*, vol. 17, no. 5, pp. 477-480.
- Hashidume, T., Sasaki, T., Inoue, J. & Sato, R. 2011, "Consumption of soy protein isolate reduces hepatic SREBP-1c and lipogenic gene expression in wild-type mice, but not in FXR-deficient mice", *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, vol. 75, no. 9, pp. 1702-1707.

- Hattori, R., Otani, H., Maulik, N. & Das, D.K. 2002, "Pharmacological preconditioning with resveratrol: role of nitric oxide", *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, vol. 282, no. 6, pp. H1988-95.
- Henriksson, J. 1990, "The possible role of skeletal muscle in the adaptation to periods of energy deficiency", *European journal of clinical nutrition*, vol. 44 Suppl 1, pp. 55-64.
- Hermansen, K., Sondergaard, M., Hoie, L., Carstensen, M. & Brock, B. 2001, "Beneficial effects of a soy-based dietary supplement on lipid levels and cardiovascular risk markers in type 2 diabetic subjects", *Diabetes care*, vol. 24, no. 2, pp. 228-233.
- Hers, I., Vincent, E.E. & Tavaré, J.M. 2011, "Akt signalling in health and disease", *Cellular signalling*, vol. 23, no. 10, pp. 1515-1527.
- Higashi, Y., Sasaki, S., Nakagawa, K., Matsuura, H., Oshima, T. & Chayama, K. 2002, "Endothelial function and oxidative stress in renovascular hypertension", *The New England journal of medicine*, vol. 346, no. 25, pp. 1954-1962.
- Hildrum, B., Mykletun, A., Hole, T., Midthjell, K. & Dahl, A.A. 2007, "Age-specific prevalence of the metabolic syndrome defined by the International Diabetes Federation and the National Cholesterol Education Program: the Norwegian HUNT 2 study", *BMC public health*, vol. 7, pp. 220.
- Himsworth, H.P. 1936, "Management of Diabetes Mellitus", *British medical journal*, vol. 2, no. 3942, pp. 188-190.
- Hirai, S., Takahashi, N., Goto, T., Lin, S., Uemura, T., Yu, R. & Kawada, T. 2010, "Functional food targeting the regulation of obesity-induced inflammatory responses and pathologies", *Mediators of inflammation*, vol. 2010, pp. 367838.
- Hirashima, Y., Tsuruzoe, K., Kodama, S., Igata, M., Toyonaga, T., Ueki, K., Kahn, C.R. & Araki, E. 2003, "Insulin down-regulates insulin receptor substrate-2 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway", *The Journal of endocrinology*, vol. 179, no. 2, pp. 253-266.
- Hirosumi, J., Tuncman, G., Chang, L., Gorgun, C.Z., Uysal, K.T., Maeda, K., Karin, M. & Hotamisligil, G.S. 2002, "A central role for JNK in obesity and insulin resistance", *Nature*, vol. 420, no. 6913, pp. 333-336.
- Hisatomi, M., Hayakawa, T., Hidaka, H. & Niki, I. 1997, "Modulation of tyrosine kinase activity has multiple actions on insulin release from the pancreatic beta-cell: studies with lavendustin A", *Japanese journal of pharmacology*, vol. 74, no. 2, pp. 203-208.
- Hogan, M.C. & Welch, H.G. 1984, "Effect of varied lactate levels on bicycle ergometer performance", *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology*, vol. 57, no. 2, pp. 507-513.
- Holvoet, P. 2008, "Relations between metabolic syndrome, oxidative stress and inflammation and cardiovascular disease", *Verhandelingen - Koninklijke Academie voor Geneeskunde van België*, vol. 70, no. 3, pp. 193-219.
- Hong, J., Smith, T.J., Ho, C.T., August, D.A. & Yang, C.S. 2001, "Effects of purified green and black tea polyphenols on cyclooxygenase- and lipoxygenase-dependent metabolism of arachidonic acid in human colon mucosa and colon tumor tissues", *Biochemical pharmacology*, vol. 62, no. 9, pp. 1175-1183.

- Hu, G., Lindstrom, J., Jousilahti, P., Peltonen, M., Sjöberg, L., Kaaja, R., Sundvall, J. & Tuomilehto, J. 2008, "The increasing prevalence of metabolic syndrome among Finnish men and women over a decade", *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, vol. 93, no. 3, pp. 832-836.
- Hurtaud, C., Gelly, C., Chen, Z., Levi-Meyrueis, C. & Bouillaud, F. 2007, "Glutamine stimulates translation of uncoupling protein 2mRNA", *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, vol. 64, no. 14, pp. 1853-1860.
- Hwang, C.S., Kwak, H.S., Lim, H.J., Lee, S.H., Kang, Y.S., Choe, T.B., Hur, H.G. & Han, K.O. 2006, "Isoflavone metabolites and their in vitro dual functions: they can act as an estrogenic agonist or antagonist depending on the estrogen concentration", *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, vol. 101, no. 4-5, pp. 246-253.
- Hwang, J.T., Park, I.J., Shin, J.I., Lee, Y.K., Lee, S.K., Baik, H.W., Ha, J. & Park, O.J. 2005, "Genistein, EGCG, and capsaicin inhibit adipocyte differentiation process via activating AMP-activated protein kinase", *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 338, no. 2, pp. 694-699.
- Hydrie, M.Z., Shera, A.S., Fawwad, A., Basit, A. & Hussain, A. 2009, "Prevalence of metabolic syndrome in urban Pakistan (Karachi): comparison of newly proposed International Diabetes Federation and modified Adult Treatment Panel III criteria", *Metabolic syndrome and related disorders*, vol. 7, no. 2, pp. 119-124.
- Ihm, S.H., Lee, J.O., Kim, S.J., Seung, K.B., Schini-Kerth, V.B., Chang, K. & Oak, M.H. 2009, "Catechin prevents endothelial dysfunction in the prediabetic stage of OLETF rats by reducing vascular NADPH oxidase activity and expression", *Atherosclerosis*, vol. 206, no. 1, pp. 47-53.
- Ikedo, M., Suzuki, C., Umegaki, K., Saito, K., Tabuchi, M. & Tomita, T. 2007, "Preventive effects of green tea catechins on spontaneous stroke in rats", *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, vol. 13, no. 2, pp. BR40-5.
- Ikedo, Y., Iki, M., Morita, A., Kajita, E., Kagamimori, S., Kagawa, Y. & Yoneshima, H. 2006, "Intake of fermented soybeans, natto, is associated with reduced bone loss in postmenopausal women: Japanese Population-Based Osteoporosis (JPOS) Study", *The Journal of nutrition*, vol. 136, no. 5, pp. 1323-1328.
- Impey S, Mark M, Villacres EC, Poser S, Chavkin C, Storm DR. (1996) Induction of CRE-mediated gene expression by stimuli that generate long-lasting LTP in area CA1 of the hippocampus. *Neuron*. May;16(5):973-82.
- Isordia-Salas, I., Santiago-German, D., Rodriguez-Navarro, H., Almaraz-Delgado, M., Leanos-Miranda, A., Anaya-Gomez, F., Borrayo-Sanchez, G. & Majluf-Cruz, A. 2012, "Prevalence of metabolic syndrome components in an urban Mexican sample: comparison between two classifications", *Experimental diabetes research*, vol. 2012, pp. 202540.
- Jackson, R.L., Greiwe, J.S. & Schwen, R.J. 2011, "Emerging evidence of the health benefits of S-equol, an estrogen receptor beta agonist", *Nutrition reviews*, vol. 69, no. 8, pp. 432-448.
- Jaleel, M., Villa, F., Deak, M., Toth, R., Prescott, A.R., Van Aalten, D.M. & Alessi, D.R. 2006, "The ubiquitin-associated domain of AMPK-related kinases regulates conformation and LKB1-mediated phosphorylation and activation", *The Biochemical journal*, vol. 394, no. Pt 3, pp. 545-555.
- Janszky, I., Vatten, L., Romundstad, P., Laugsand, L.E., Bjorngard, J.H., Manczuk, M. & Zatonski, W.A. 2011, "Metabolic syndrome in Poland - the PONS Study", *Annals of Agricultural and Environmental Medicine : AAEM*, vol. 18, no. 2, pp. 270-272.

- Jayagopal, V., Albertazzi, P., Kilpatrick, E.S., Howarth, E.M., Jennings, P.E., Hepburn, D.A. & Atkin, S.L. 2002, "Beneficial effects of soy phytoestrogen intake in postmenopausal women with type 2 diabetes", *Diabetes care*, vol. 25, no. 10, pp. 1709-1714.
- Jialal, I., Huet, B.A., Kaur, H., Chien, A. & Devaraj, S. 2012, "Increased Toll-Like Receptor Activity in Patients With Metabolic Syndrome", *Diabetes care*, vol. 35, no. 4, pp. 900-904.
- Jones, R.G., Plas, D.R., Kubek, S., Buzzai, M., Mu, J., Xu, Y., Birnbaum, M.J. & Thompson, C.B. 2005, "AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint", *Molecular cell*, vol. 18, no. 3, pp. 283-293.
- Jove, M., Planavila, A., Laguna, J.C. & Vazquez-Carrera, M. 2005, "Palmitate-induced interleukin 6 production is mediated by protein kinase C and nuclear-factor kappaB activation and leads to glucose transporter 4 down-regulation in skeletal muscle cells", *Endocrinology*, vol. 146, no. 7, pp. 3087-3095.
- Joy, S., Siow, R.C., Rowlands, D.J., Becker, M., Wyatt, A.W., Aaronson, P.I., Coen, C.W., Kallo, I., Jacob, R. & Mann, G.E. 2006, "The isoflavone Equol mediates rapid vascular relaxation: Ca²⁺-independent activation of endothelial nitric-oxide synthase/Hsp90 involving ERK1/2 and Akt phosphorylation in human endothelial cells", *The Journal of biological chemistry*, vol. 281, no. 37, pp. 27335-27345.
- Julius, U. 2003, "Influence of plasma free fatty acids on lipoprotein synthesis and diabetic dyslipidemia", *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*, vol. 111, no. 5, pp. 246-250.
- Jung, J.Y., Mo, H.C., Yang, K.H., Jeong, Y.J., Yoo, H.G., Choi, N.K., Oh, W.M., Oh, H.K., Kim, S.H., Lee, J.H., Kim, H.J. & Kim, W.J. 2007, "Inhibition by epigallocatechin gallate of CoCl₂-induced apoptosis in rat PC12 cells", *Life Sciences*, vol. 80, no. 15, pp. 1355-1363.
- Kahn, R., Buse, J., Ferrannini, E., Stern, M., American Diabetes Association & European Association for the Study of Diabetes 2005, "The metabolic syndrome: time for a critical appraisal: joint statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes", *Diabetes care*, vol. 28, no. 9, pp. 2289-2304.
- Kalupahana, N.S., Claycombe, K.J. & Moustaid-Moussa, N. 2011, "(n-3) Fatty acids alleviate adipose tissue inflammation and insulin resistance: mechanistic insights", *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)*, vol. 2, no. 4, pp. 304-316.
- Kao, Y.H., Hiipakka, R.A. & Liao, S. 2000, "Modulation of obesity by a green tea catechin", *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 72, no. 5, pp. 1232-1234.
- Katz, D.L., Doughty, K. & Ali, A. 2011, "Cocoa and chocolate in human health and disease", *Antioxidants & redox signaling*, vol. 15, no. 10, pp. 2779-2811.
- Kawai, K., Tsuno, N.H., Kitayama, J., Okaji, Y., Yazawa, K., Asakage, M., Hori, N., Watanabe, T., Takahashi, K. & Nagawa, H. 2004, "Epigallocatechin gallate attenuates adhesion and migration of CD8⁺ T cells by binding to CD11b", *The Journal of allergy and clinical immunology*, vol. 113, no. 6, pp. 1211-1217.
- Kawai, K., Tsuno, N.H., Kitayama, J., Okaji, Y., Yazawa, K., Asakage, M., Sasaki, S., Watanabe, T., Takahashi, K. & Nagawa, H. 2005, "Epigallocatechin gallate induces apoptosis of monocytes", *The Journal of allergy and clinical immunology*, vol. 115, no. 1, pp. 186-191.
- Kazantzis, M. & Stahl, A. 2011, "Fatty acid transport proteins, implications in physiology and disease", *Biochimica et biophysica acta*, .

- Keller, U. 2011, "Dietary proteins in obesity and in diabetes", *International journal for vitamin and nutrition research. Internationale Zeitschrift für Vitamin- und Ernährungsforschung. Journal international de vitaminologie et de nutrition*, vol. 81, no. 2-3, pp. 125-133.
- Kelliny, C., William, J., Riesen, W., Paccaud, F. & Bovet, P. 2008, "Metabolic syndrome according to different definitions in a rapidly developing country of the African region", *Cardiovascular diabetology*, vol. 7, pp. 27.
- Kemp, B.E., Stapleton, D., Campbell, D.J., Chen, Z.P., Murthy, S., Walter, M., Gupta, A., Adams, J.J., Katsis, F., van Denderen, B., Jennings, I.G., Iseli, T., Michell, B.J. & Witters, L.A. 2003, "AMP-activated protein kinase, super metabolic regulator", *Biochemical Society transactions*, vol. 31, no. Pt 1, pp. 162-168.
- Khan, N., Afaq, F., Saleem, M., Ahmad, N. & Mukhtar, H. 2006, "Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate", *Cancer research*, vol. 66, no. 5, pp. 2500-2505.
- Khani, B., Mehrabian, F., Khalesi, E. & Eshraghi, A. 2011, "Effect of soy phytoestrogen on metabolic and hormonal disturbance of women with polycystic ovary syndrome", *Journal of research in medical sciences : the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*, vol. 16, no. 3, pp. 297-302.
- Kim, H.M., Kim, D.J., Jung, I.H., Park, C. & Park, J. 2007a, "Prevalence of the metabolic syndrome among Korean adults using the new International Diabetes Federation definition and the new abdominal obesity criteria for the Korean people", *Diabetes research and clinical practice*, vol. 77, no. 1, pp. 99-106.
- Kim, S.J., Jeong, H.J., Lee, K.M., Myung, N.Y., An, N.H., Yang, W.M., Park, S.K., Lee, H.J., Hong, S.H., Kim, H.M. & Um, J.Y. 2007b, "Epigallocatechin-3-gallate suppresses NF-kappaB activation and phosphorylation of p38 MAPK and JNK in human astrocytoma U373MG cells", *The Journal of nutritional biochemistry*, vol. 18, no. 9, pp. 587-596.
- King, R.A. & Bursill, D.B. 1998, "Plasma and urinary kinetics of the isoflavones daidzein and genistein after a single soy meal in humans", *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 67, no. 5, pp. 867-872.
- Klein, R., Klein, B.E. & Moss, S.E. 1996, "Relation of glycemic control to diabetic microvascular complications in diabetes mellitus", *Annals of Internal Medicine*, vol. 124, no. 1 Pt 2, pp. 90-96.
- Klingenberg, M. & Huang, S.G. 1999, "Structure and function of the uncoupling protein from brown adipose tissue", *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1415, no. 2, pp. 271-296.
- Knight, D.C. & Eden, J.A. 1996, "A review of the clinical effects of phytoestrogens", *Obstetrics and gynecology*, vol. 87, no. 5 Pt 2, pp. 897-904.
- Knowler, W.C., Barrett-Connor, E., Fowler, S.E., Hamman, R.F., Lachin, J.M., Walker, E.A., Nathan, D.M. & Diabetes Prevention Program Research Group 2002, "Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin", *The New England journal of medicine*, vol. 346, no. 6, pp. 393-403.
- Ko, G.T., Cockram, C.S., Chow, C.C., Yeung, V., Chan, W.B., So, W.Y., Chan, N.N. & Chan, J.C. 2005, "High prevalence of metabolic syndrome in Hong Kong Chinese--comparison of three diagnostic criteria", *Diabetes research and clinical practice*, vol. 69, no. 2, pp. 160-168.

- Ko, G.T., Cockram, C.S., Chow, C.C., Yeung, V.T., Chan, W.B., So, W.Y., Chan, N.N. & Chan, J.C. 2006, "Metabolic syndrome by the international diabetes federation definition in Hong Kong Chinese", *Diabetes research and clinical practice*, vol. 73, no. 1, pp. 58-64.
- Koonen, D.P., Glatz, J.F., Bonen, A. & Luiken, J.J. 2005, "Long-chain fatty acid uptake and FAT/CD36 translocation in heart and skeletal muscle", *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1736, no. 3, pp. 163-180.
- Koskinen, J., Kahonen, M., Viikari, J.S., Taittonen, L., Laitinen, T., Ronnema, T., Lehtimäki, T., Hutri-Kahonen, N., Pietikainen, M., Jokinen, E., Helenius, H., Mattsson, N., Raitakari, O.T. & Juonala, M. 2009, "Conventional cardiovascular risk factors and metabolic syndrome in predicting carotid intima-media thickness progression in young adults: the cardiovascular risk in young Finns study", *Circulation*, vol. 120, no. 3, pp. 229-236.
- Kruger, M., Kratchmarova, I., Blagoev, B., Tseng, Y.H., Kahn, C.R. & Mann, M. 2008, "Dissection of the insulin signaling pathway via quantitative phosphoproteomics", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 105, no. 7, pp. 2451-2456.
- Kuhnau, J. 1976, "The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition", *World review of nutrition and dietetics*, vol. 24, pp. 117-191.
- Kuiper, G.G., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., Safe, S.H., van der Saag, P.T., van der Burg, B. & Gustafsson, J.A. 1998, "Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta", *Endocrinology*, vol. 139, no. 10, pp. 4252-4263.
- Kwon, D.Y., Hong, S.M., Ahn, I.S., Kim, M.J., Yang, H.J. & Park, S. 2011, "Isoflavonoids and peptides from meju, long-term fermented soybeans, increase insulin sensitivity and exert insulinotropic effects in vitro", *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, vol. 27, no. 2, pp. 244-252.
- Kwon, D.Y., Jang, J.S., Lee, J.E., Kim, Y.S., Shin, D.H. & Park, S. 2006, "The isoflavonoid aglycone-rich fractions of Chungkookjang, fermented unsalted soybeans, enhance insulin signaling and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity in vitro", *BioFactors (Oxford, England)*, vol. 26, no. 4, pp. 245-258.
- Lambert, J.D. & Yang, C.S. 2003, "Mechanisms of cancer prevention by tea constituents", *The Journal of nutrition*, vol. 133, no. 10, pp. 3262S-3267S.
- Langin, D. 2006, "Adipose tissue lipolysis as a metabolic pathway to define pharmacological strategies against obesity and the metabolic syndrome", *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*, vol. 53, no. 6, pp. 482-491.
- Lann, D., Gallagher, E. & Leroith, D. 2008, "Insulin resistance and the metabolic syndrome", *Minerva medica*, vol. 99, no. 3, pp. 253-262.
- Lao, X.Q., Zhang, Y.H., Wong, M.C., Xu, Y.J., Xu, H.F., Nie, S.P., Ma, W.J., Thomas, G.N. & Yu, I.T. 2012, "The prevalence of metabolic syndrome and cardiovascular risk factors in adults in southern China", *BMC public health*, vol. 12, pp. 64.
- Larance, M., Ramm, G., Stockli, J., van Dam, E.M., Winata, S., Wasinger, V., Simpson, F., Graham, M., Junutula, J.R., Guilhaus, M. & James, D.E. 2005, "Characterization of the role of the Rab GTPase-activating protein AS160 in insulin-regulated GLUT4 trafficking", *The Journal of biological chemistry*, vol. 280, no. 45, pp. 37803-37813.

- Lazarow, P.B. & De Duve, C. 1976, "A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes; enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 73, no. 6, pp. 2043-2046.
- Lee, M.J., Maliakal, P., Chen, L., Meng, X., Bondoc, F.Y., Prabhu, S., Lambert, G., Mohr, S. & Yang, C.S. 2002, "Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-gallate by humans: formation of different metabolites and individual variability", *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, vol. 11, no. 10 Pt 1, pp. 1025-1032.
- Lee, M.S., Kim, C.T. & Kim, Y. 2009, "Green tea (-)-epigallocatechin-3-gallate reduces body weight with regulation of multiple genes expression in adipose tissue of diet-induced obese mice", *Annals of Nutrition & Metabolism*, vol. 54, no. 2, pp. 151-157.
- Lee, S.H., Kim, B.J., Choi, H.J., Cho, S.W., Shin, C.S., Park, S.Y., Lee, Y.S., Lee, S.Y., Kim, H.H., Kim, G.S. & Koh, J.M. 2012, "(-)-Epigallocatechin-3-Gallate, an AMPK Activator, Decreases Ovariectomy-Induced Bone Loss by Suppression of Bone Resorption", *Calcified tissue international*, vol. 90, no. 5, pp. 404-410.
- Lee, S.J., Kim, J.J., Moon, H.I., Ahn, J.K., Chun, S.C., Jung, W.S., Lee, O.K. & Chung, I.M. 2008, "Analysis of isoflavones and phenolic compounds in Korean soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] seeds of different seed weights", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 56, no. 8, pp. 2751-2758.
- Lee, Y., Ravazzola, M., Park, B.H., Bashmakov, Y.K., Orci, L. & Unger, R.H. 2007, "Metabolic mechanisms of failure of intraportally transplanted pancreatic beta-cells in rats: role of lipotoxicity and prevention by leptin", *Diabetes*, vol. 56, no. 9, pp. 2295-2301.
- Lefebvre, P., Chinetti, G., Fruchart, J.C. & Staels, B. 2006, "Sorting out the roles of PPAR alpha in energy metabolism and vascular homeostasis", *The Journal of clinical investigation*, vol. 116, no. 3, pp. 571-580.
- Lele, R.D. 2010, "Pro-insulin, C peptide, glucagon, adiponectin, TNF alpha, AMPK: neglected players in type 2 diabetes mellitus", *The Journal of the Association of Physicians of India*, vol. 58, pp. 30, 35-40.
- Leng, L., Jiang, Z.Q. & Ji, G.Y. 2011, "Effects of soybean isoflavone on liver lipid metabolism in nonalcoholic fatty liver rats", *Zhonghua yu fang yi xue za zhi [Chinese journal of preventive medicine]*, vol. 45, no. 4, pp. 335-339.
- Levites, Y., Amit, T., Youdim, M.B. & Mandel, S. 2002, "Involvement of protein kinase C activation and cell survival/ cell cycle genes in green tea polyphenol (-)-epigallocatechin 3-gallate neuroprotective action", *The Journal of biological chemistry*, vol. 277, no. 34, pp. 30574-30580.
- Li, C., Meng, X., Winnik, B., Lee, M.J., Lu, H., Sheng, S., Buckley, B. & Yang, C.S. 2001, "Analysis of urinary metabolites of tea catechins by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry", *Chemical research in toxicology*, vol. 14, no. 6, pp. 702-707.
- Li, C.J., Elsasser, T.H. & Kahl, S. 2009, "AKT/eNOS signaling module functions as a potential feedback loop in the growth hormone signaling pathway", *Journal of molecular signaling*, vol. 4, pp. 1.
- Li, H., Junk, P., Huwiler, A., Burkhardt, C., Wallerath, T., Pfeilschifter, J. & Forstermann, U. 2002, "Dual effect of ceramide on human endothelial cells: induction of oxidative stress and transcriptional upregulation of endothelial nitric oxide synthase", *Circulation*, vol. 106, no. 17, pp. 2250-2256.

- Li, W., Nie, S., Xie, M., Chen, Y., Li, C. & Zhang, H. 2010, "A Major Green Tea Component, (-)-Epigallocatechin-3-gallate, Ameliorates Doxorubicin-Mediated Cardiotoxicity in Cardiomyocytes of Neonatal Rats", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, .
- Liang, H. & Ward, W.F. 2006, "PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism", *Advances in Physiology Education*, vol. 30, no. 4, pp. 145-151.
- Liao, Y. & Hung, M.C. 2010, "Physiological regulation of Akt activity and stability", *American journal of translational research*, vol. 2, no. 1, pp. 19-42.
- Lila, M.A. 2007, "From beans to berries and beyond: teamwork between plant chemicals for protection of optimal human health", *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1114, pp. 372-380.
- Linossier, C., Pierre, M., Le Pecq, J.B. & Pierre, J. 1990, "Mechanisms of action in NIH-3T3 cells of genistein, an inhibitor of EGF receptor tyrosine kinase activity", *Biochemical pharmacology*, vol. 39, no. 1, pp. 187-193.
- Lindstrom, J., Ilanne-Parikka, P., Peltonen, M., Aunola, S., Eriksson, J.G., Hemio, K., Hamalainen, H., Harkonen, P., Keinanen-Kiukaanniemi, S., Laakso, M., Louheranta, A., Mannelin, M., Paturi, M., Sundvall, J., Valle, T.T., Uusitupa, M., Tuomilehto, J. & Finnish Diabetes Prevention Study Group 2006, "Sustained reduction in the incidence of type 2 diabetes by lifestyle intervention: follow-up of the Finnish Diabetes Prevention Study", *Lancet*, vol. 368, no. 9548, pp. 1673-1679.
- Liu, D., Zhen, W., Yang, Z., Carter, J.D., Si, H. & Reynolds, K.A. 2006, "Genistein acutely stimulates insulin secretion in pancreatic beta-cells through a cAMP-dependent protein kinase pathway", *Diabetes*, vol. 55, no. 4, pp. 1043-1050.
- Liu, R.H. 2003, "Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals", *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 78, no. 3 Suppl, pp. 517S-520S.
- Livingstone, C. & Collison, M. 2002, "Sex steroids and insulin resistance", *Clinical science (London, England : 1979)*, vol. 102, no. 2, pp. 151-166.
- Lobo, S., Wiczer, B.M., Smith, A.J., Hall, A.M. & Bernlohr, D.A. 2007, "Fatty acid metabolism in adipocytes: functional analysis of fatty acid transport proteins 1 and 4", *Journal of lipid research*, vol. 48, no. 3, pp. 609-620.
- Lopaschuk, G.D., Ussher, J.R., Folmes, C.D., Jaswal, J.S. & Stanley, W.C. 2010, "Myocardial fatty acid metabolism in health and disease", *Physiological Reviews*, vol. 90, no. 1, pp. 207-258.
- Lorenz, M., Wessler, S., Follmann, E., Michaelis, W., Dusterhoft, T., Baumann, G., Stangl, K. & Stangl, V. 2004, "A constituent of green tea, epigallocatechin-3-gallate, activates endothelial nitric oxide synthase by a phosphatidylinositol-3-OH-kinase-, cAMP-dependent protein kinase-, and Akt-dependent pathway and leads to endothelial-dependent vasorelaxation", *The Journal of biological chemistry*, vol. 279, no. 7, pp. 6190-6195.
- Lowell, B.B. & Shulman, G.I. 2005, "Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 307, no. 5708, pp. 384-387.
- Lu, H., Meng, X. & Yang, C.S. 2003, "Enzymology of methylation of tea catechins and inhibition of catechol-O-methyltransferase by (-)-epigallocatechin gallate", *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, vol. 31, no. 5, pp. 572-579.

- Luiken, J.J., Dyck, D.J., Han, X.X., Tandon, N.N., Arumugam, Y., Glatz, J.F. & Bonen, A. 2002, "Insulin induces the translocation of the fatty acid transporter FAT/CD36 to the plasma membrane", *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, vol. 282, no. 2, pp. E491-5.
- MacDonald, P.E. & Wheeler, M.B. 2003, "Voltage-dependent K(+) channels in pancreatic beta cells: role, regulation and potential as therapeutic targets", *Diabetologia*, vol. 46, no. 8, pp. 1046-1062.
- MacDougald, O.A. & Lane, M.D. 1995, "Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation", *Annual Review of Biochemistry*, vol. 64, pp. 345-373.
- Maddux, B.A., See, W., Lawrence, J.C., Jr, Goldfine, A.L., Goldfine, I.D. & Evans, J.L. 2001, "Protection against oxidative stress-induced insulin resistance in rat L6 muscle cells by micromolar concentrations of alpha-lipoic acid", *Diabetes*, vol. 50, no. 2, pp. 404-410.
- Maechler, P. 2003, "Novel regulation of insulin secretion: the role of mitochondria", *Current opinion in investigational drugs (London, England : 2000)*, vol. 4, no. 10, pp. 1166-1172.
- Mak, J.C. 2012, "Potential role of green tea catechins in various disease therapies: Progress and promise", *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, vol. 39, no. 3, pp. 265-273.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C. & Jimenez, L. 2004, "Polyphenols: food sources and bioavailability", *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 79, no. 5, pp. 727-747.
- Mancia, G., Bombelli, M., Corrao, G., Facchetti, R., Madotto, F., Giannattasio, C., Trevano, F.Q., Grassi, G., Zanchetti, A. & Sega, R. 2007a, "Metabolic syndrome in the Pressioni Arteriose Monitorate E Loro Associazioni (PAMELA) study: daily life blood pressure, cardiac damage, and prognosis", *Hypertension*, vol. 49, no. 1, pp. 40-47.
- Mancia, G., De Backer, G., Dominiczak, A., Cifkova, R., Fagard, R., Germano, G., Grassi, G., Heagerty, A.M., Kjeldsen, S.E., Laurent, S., Narkiewicz, K., Ruilope, L., Rynkiewicz, A., Schmieder, R.E., Boudier, H.A., Zanchetti, A., Vahanian, A., Camm, J., De Caterina, R., Dean, V., Dickstein, K., Filippatos, G., Funck-Brentano, C., Hellems, I., Kristensen, S.D., McGregor, K., Sechtem, U., Silber, S., Tendera, M., Widimsky, P., Zamorano, J.L., Erdine, S., Kiowski, W., Agabiti-Rosei, E., Ambrosioni, E., Lindholm, L.H., Viigimaa, M., Adamopoulos, S., Agabiti-Rosei, E., Ambrosioni, E., Bertomeu, V., Clement, D., Erdine, S., Farsang, C., Gaita, D., Lip, G., Mallion, J.M., Manolis, A.J., Nilsson, P.M., O'Brien, E., Ponikowski, P., Redon, J., Ruschitzka, F., Tamargo, J., van Zwieten, P., Waeber, B., Williams, B., Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension & European Society of Cardiology 2007b, "2007 Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC)", *Journal of hypertension*, vol. 25, no. 6, pp. 1105-1187.
- Mandard, S., Muller, M. & Kersten, S. 2004, "Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes", *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, vol. 61, no. 4, pp. 393-416.
- Mandel, J.L. & Pearson, M.L. 1974, "Insulin stimulates myogenesis in a rat myoblast line", *Nature*, vol. 251, no. 5476, pp. 618-620.
- Markovits, J., Linassier, C., Fosse, P., Couprie, J., Pierre, J., Jacquemin-Sablon, A., Saucier, J.M., Le Pecq, J.B. & Larsen, A.K. 1989, "Inhibitory effects of the tyrosine kinase inhibitor genistein on mammalian DNA topoisomerase II", *Cancer research*, vol. 49, no. 18, pp. 5111-5117.
- Martin, P.M., Horwitz, K.B., Ryan, D.S. & McGuire, W.L. 1978, "Phytoestrogen interaction with estrogen receptors in human breast cancer cells", *Endocrinology*, vol. 103, no. 5, pp. 1860-1867.

- Masia, R., Pena, A., Marrugat, J., Sala, J., Vila, J., Pavesi, M., Covas, M., Aubo, C. & Elosua, R. 1998, "High prevalence of cardiovascular risk factors in Gerona, Spain, a province with low myocardial infarction incidence. REGICOR Investigators", *Journal of epidemiology and community health*, vol. 52, no. 11, pp. 707-715.
- Masia, R., Sala, J., Rohlf, I., Piulats, R., Manresa, J.M., Marrugat, J. & Investigadores del estudio REGICOR 2004, "Prevalence of diabetes mellitus in the province of Girona, Spain: the REGICOR study", *Revista española de cardiología*, vol. 57, no. 3, pp. 261-264.
- Matthews, J. & Gustafsson, J.A. 2003, "Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta", *Molecular interventions*, vol. 3, no. 5, pp. 281-292.
- McGarry, J.D. & Brown, N.F. 1997, "The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis", *European journal of biochemistry / FEBS*, vol. 244, no. 1, pp. 1-14.
- McGill, H.C., Jr, McMahan, C.A., Zieske, A.W., Sloop, G.D., Walcott, J.V., Troxclair, D.A., Malcom, G.T., Tracy, R.E., Oalman, M.C. & Strong, J.P. 2000, "Associations of coronary heart disease risk factors with the intermediate lesion of atherosclerosis in youth. The Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) Research Group", *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 20, no. 8, pp. 1998-2004.
- Mecca, M.S., Moreto, F., Burini, F.H., Dalanesi, R.C., McLellan, K.C. & Burini, R.C. 2012, "Ten-week lifestyle changing program reduces several indicators for metabolic syndrome in overweight adults", *Diabetology & metabolic syndrome*, vol. 4, no. 1, pp. 1.
- Medjakovic, S., Mueller, M. & Jungbauer, A. 2010, "Potential health-modulating effects of isoflavones and metabolites via activation of PPAR and AhR", *Nutrients*, vol. 2, no. 3, pp. 241-279.
- Medzhitov, R. & Janeway, C., Jr 2000, "Innate immunity", *The New England journal of medicine*, vol. 343, no. 5, pp. 338-344.
- Meigs, J.B., Wilson, P.W., Nathan, D.M., D'Agostino RB, S., Williams, K. & Haffner, S.M. 2003, "Prevalence and characteristics of the metabolic syndrome in the San Antonio Heart and Framingham Offspring Studies", *Diabetes*, vol. 52, no. 8, pp. 2160-2167.
- Melendez-Hevia, E., Waddell, T.G. & Cascante, M. 1996, "The puzzle of the Krebs citric acid cycle: assembling the pieces of chemically feasible reactions, and opportunism in the design of metabolic pathways during evolution", *Journal of Molecular Evolution*, vol. 43, no. 3, pp. 293-303.
- Meng, X., Lee, M.J., Li, C., Sheng, S., Zhu, N., Sang, S., Ho, C.T. & Yang, C.S. 2001, "Formation and identification of 4'-O-methyl(-)-epigallocatechin in humans", *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, vol. 29, no. 6, pp. 789-793.
- Meng, X., Sang, S., Zhu, N., Lu, H., Sheng, S., Lee, M.J., Ho, C.T. & Yang, C.S. 2002, "Identification and characterization of methylated and ring-fission metabolites of tea catechins formed in humans, mice, and rats", *Chemical research in toxicology*, vol. 15, no. 8, pp. 1042-1050.
- Mercer, L.D., Kelly, B.L., Horne, M.K. & Beart, P.M. 2005, "Dietary polyphenols protect dopamine neurons from oxidative insults and apoptosis: investigations in primary rat mesencephalic cultures", *Biochemical pharmacology*, vol. 69, no. 2, pp. 339-345.
- Merritt, J.C. 2004, "Metabolic syndrome: soybean foods and serum lipids", *Journal of the National Medical Association*, vol. 96, no. 8, pp. 1032-1041.

- Messina, M., Nagata, C., y Wu AH 2006. Estimated Asian adult soy protein and isoflavone intakes. *Nutr Cancer* 55, 1-12.
- Metzger, B.E., Buchanan, T.A., Coustan, D.R., de Leiva, A., Dunger, D.B., Hadden, D.R., Hod, M., Kitzmiller, J.L., Kjos, S.L., Oats, J.N., Pettitt, D.J., Sacks, D.A. & Zouzas, C. 2007, "Summary and recommendations of the Fifth International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus", *Diabetes care*, vol. 30 Suppl 2, pp. S251-60.
- Mezei, O., Banz, W.J., Steger, R.W., Peluso, M.R., Winters, T.A. & Shay, N. 2003, "Soy isoflavones exert antidiabetic and hypolipidemic effects through the PPAR pathways in obese Zucker rats and murine RAW 264.7 cells", *The Journal of nutrition*, vol. 133, no. 5, pp. 1238-1243.
- Miele, C., Riboulet, A., Maitan, M.A., Oriente, F., Romano, C., Formisano, P., Giudicelli, J., Beguinot, F. & Van Obberghen, E. 2003, "Human glycated albumin affects glucose metabolism in L6 skeletal muscle cells by impairing insulin-induced insulin receptor substrate (IRS) signaling through a protein kinase C alpha-mediated mechanism", *The Journal of biological chemistry*, vol. 278, no. 48, pp. 47376-47387.
- Miller, R.J., Jackson, K.G., Dadd, T., Nicol, B., Dick, J.L., Mayes, A.E., Brown, A.L. & Minihane, A.M. 2012, "A preliminary investigation of the impact of catechol-O-methyltransferase genotype on the absorption and metabolism of green tea catechins", *European journal of nutrition*, vol. 51, no. 1, pp. 47-55.
- Mingrone, G., Panunzi, S., De Gaetano, A., Guidone, C., Iaiconelli, A., Leccesi, L., Nanni, G., Pomp, A., Castagneto, M., Ghirlanda, G. & Rubino, F. 2012, "Bariatric Surgery versus Conventional Medical Therapy for Type 2 Diabetes", *The New England journal of medicine*, .
- Miranda, P.J., DeFronzo, R.A., Califf, R.M. & Guyton, J.R. 2005a, "Metabolic syndrome: definition, pathophysiology, and mechanisms", *American Heart Journal*, vol. 149, no. 1, pp. 33-45.
- Miranda, P.J., DeFronzo, R.A., Califf, R.M. & Guyton, J.R. 2005b, "Metabolic syndrome: evaluation of pathological and therapeutic outcomes", *American Heart Journal*, vol. 149, no. 1, pp. 20-32.
- Misra, A., Khurana, L., Isharwal, S. & Bhardwaj, S. 2009, "South Asian diets and insulin resistance", *The British journal of nutrition*, vol. 101, no. 4, pp. 465-473.
- MITCHELL, P. 1961, "Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism", *Nature*, vol. 191, pp. 144-148.
- Miyazaki, Y., Mahankali, A., Matsuda, M., Mahankali, S., Hardies, J., Cusi, K., Mandarino, L.J. & DeFronzo, R.A. 2002, "Effect of pioglitazone on abdominal fat distribution and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients", *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, vol. 87, no. 6, pp. 2784-2791.
- Moebus, S., Hanisch, J.U., Aidselburger, P., Bramlage, P., Wasem, J. & Jockel, K.H. 2007, "Impact of 4 different definitions used for the assessment of the prevalence of the Metabolic Syndrome in primary healthcare: The German Metabolic and Cardiovascular Risk Project (GEMCAS)", *Cardiovascular diabetology*, vol. 6, pp. 22.
- Mokan, M., Galajda, P., Pridavkova, D., Tomaskova, V., Sutarik, L., Krucinska, L., Bukovska, A. & Rusnakova, G. 2008, "Prevalence of diabetes mellitus and metabolic syndrome in Slovakia", *Diabetes research and clinical practice*, vol. 81, no. 2, pp. 238-242.
- Molla, M.D., Hidalgo-Mora, J.J. & Soteras, M.G. 2011, "Phytotherapy as alternative to hormone replacement therapy", *Frontiers in bioscience (Scholar edition)*, vol. 3, pp. 191-204.

- Moore, R.J., Jackson, K.G. & Minihane, A.M. 2009, "Green tea (*Camellia sinensis*) catechins and vascular function", *The British journal of nutrition*, vol. 102, no. 12, pp. 1790-1802.
- Morales, P.A., Mitchell, B.D., Valdez, R.A., Hazuda, H.P., Stern, M.P. & Haffner, S.M. 1993, "Incidence of NIDDM and impaired glucose tolerance in hypertensive subjects. The San Antonio Heart Study", *Diabetes*, vol. 42, no. 1, pp. 154-161.
- Morel O, Jesel L, Freyssinet JM, Toti F.(2011) Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Jan;31(1):15-26.
- Morito, K., Aomori, T., Hirose, T., Kinjo, J., Hasegawa, J., Ogawa, S., Inoue, S., Muramatsu, M. & Masamune, Y. 2002, "Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta (II)", *Biological & pharmaceutical bulletin*, vol. 25, no. 1, pp. 48-52.
- Morito, K., Hirose, T., Kinjo, J., Hirakawa, T., Okawa, M., Nohara, T., Ogawa, S., Inoue, S., Muramatsu, M. & Masamune, Y. 2001, "Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta", *Biological & pharmaceutical bulletin*, vol. 24, no. 4, pp. 351-356.
- Morre, D.J., Bridge, A., Wu, L.Y. & Morre, D.M. 2000, "Preferential inhibition by (-)-epigallocatechin-3-gallate of the cell surface NADH oxidase and growth of transformed cells in culture", *Biochemical pharmacology*, vol. 60, no. 7, pp. 937-946.
- Morton, M.S., Wilcox, G., Wahlqvist, M.L. & Griffiths, K. 1994, "Determination of lignans and isoflavonoids in human female plasma following dietary supplementation", *The Journal of endocrinology*, vol. 142, no. 2, pp. 251-259.
- Mueckler, M. 1994, "Facilitative glucose transporters", *European journal of biochemistry / FEBS*, vol. 219, no. 3, pp. 713-725.
- Muoio, D.M. & Newgard, C.B. 2006, "Obesity-related derangements in metabolic regulation", *Annual Review of Biochemistry*, vol. 75, pp. 367-401.
- Muraki, K., Okuya, S. & Tanizawa, Y. 2006, "Estrogen receptor alpha regulates insulin sensitivity through IRS-1 tyrosine phosphorylation in mature 3T3-L1 adipocytes", *Endocrine journal*, vol. 53, no. 6, pp. 841-851.
- Murase, T., Misawa, K., Haramizu, S. & Hase, T. 2009, "Catechin-induced activation of the LKB1/AMP-activated protein kinase pathway", *Biochemical pharmacology*, vol. 78, no. 1, pp. 78-84.
- Murase, T., Nagasawa, A., Suzuki, J., Hase, T. & Tokimitsu, I. 2002, "Beneficial effects of tea catechins on diet-induced obesity: stimulation of lipid catabolism in the liver", *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*, vol. 26, no. 11, pp. 1459-1464.
- Murkies, A.L., Wilcox, G. & Davis, S.R. 1998, "Clinical review 92: Phytoestrogens", *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, vol. 83, no. 2, pp. 297-303.
- Murota, K., Shimizu, S., Miyamoto, S., Izumi, T., Obata, A., Kikuchi, M. & Terao, J. 2002, "Unique uptake and transport of isoflavone aglycones by human intestinal caco-2 cells: comparison of isoflavonoids and flavonoids", *The Journal of nutrition*, vol. 132, no. 7, pp. 1956-1961.
- Myong, J.P., Kim, H.R., Jung-Choi, K., Baker, D. & Choi, B. 2012, "Disparities of Metabolic Syndrome Prevalence by Age, Gender and Occupation among Korean Adult Workers", *Industrial health*, vol. 50, no. 2, pp. 115-122.

- Naasani, I., Oh-Hashi, F., Oh-Hara, T., Feng, W.Y., Johnston, J., Chan, K. & Tsuruo, T. 2003, "Blocking telomerase by dietary polyphenols is a major mechanism for limiting the growth of human cancer cells in vitro and in vivo", *Cancer research*, vol. 63, no. 4, pp. 824-830.
- Naaz, A., Yellayi, S., Zakroczymski, M.A., Bunick, D., Doerge, D.R., Lubahn, D.B., Helferich, W.G. & Cooke, P.S. 2003, "The soy isoflavone genistein decreases adipose deposition in mice", *Endocrinology*, vol. 144, no. 8, pp. 3315-3320.
- Nair, C.K., Devi, P.U., Shimanskaya, R., Kunugita, N., Murase, H., Gu, Y.H. & Kagiya, T.V. 2003, "Water soluble vitamin E (TMG) as a radioprotector", *Indian journal of experimental biology*, vol. 41, no. 12, pp. 1365-1371.
- Najm, W. & Lie, D. 2010, "Herbals used for diabetes, obesity, and metabolic syndrome", *Primary care*, vol. 37, no. 2, pp. 237-254.
- Nanjo, F., Goto, K., Seto, R., Suzuki, M., Sakai, M. & Hara, Y. 1996, "Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical", *Free radical biology & medicine*, vol. 21, no. 6, pp. 895-902.
- Naudi, A., Jove, M., Ayala, V., Cassanye, A., Serrano, J., Gonzalo, H., Boada, J., Prat, J., Portero-Otin, M. & Pamplona, R. 2012, "Cellular dysfunction in diabetes as maladaptive response to mitochondrial oxidative stress", *Experimental diabetes research*, vol. 2012, pp. 696215.
- Navarro-Peran, E., Cabezas-Herrera, J., Garcia-Canovas, F., Durrant, M.C., Thorneley, R.N. & Rodriguez-Lopez, J.N. 2005, "The antifolate activity of tea catechins", *Cancer research*, vol. 65, no. 6, pp. 2059-2064.
- Ndisang, J.F. 2010, "Role of heme oxygenase in inflammation, insulin-signalling, diabetes and obesity", *Mediators of inflammation*, vol. 2010, pp. 359732.
- Nedergaard, J., Ricquier, D. & Kozak, L.P. 2005, "Uncoupling proteins: current status and therapeutic prospects", *EMBO reports*, vol. 6, no. 10, pp. 917-921.
- Nicholls, D.G., Bernson, V.S. & Heaton, G.M. 1978, "The identification of the component in the inner membrane of brown adipose tissue mitochondria responsible for regulating energy dissipation", *Experientia. Supplementum*, vol. 32, pp. 89-93.
- Nieto-Vazquez, I., Fernandez-Veledo, S., Kramer, D.K., Vila-Bedmar, R., Garcia-Guerra, L. & Lorenzo, M. 2008, "Insulin resistance associated to obesity: the link TNF-alpha", *Archives of Physiology and Biochemistry*, vol. 114, no. 3, pp. 183-194.
- Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X.L., Yamagishi, S., Matsumura, T., Kaneda, Y., Yorek, M.A., Beebe, D., Oates, P.J., Hammes, H.P., Giardino, I. & Brownlee, M. 2000, "Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage", *Nature*, vol. 404, no. 6779, pp. 787-790.
- Nomura, S., Ichinose, T., Jinde, M., Kawashima, Y., Tachiyashiki, K. & Imaizumi, K. 2008, "Tea catechins enhance the mRNA expression of uncoupling protein 1 in rat brown adipose tissue", *The Journal of nutritional biochemistry*, vol. 19, no. 12, pp. 840-847.
- Ogbera, A.O. 2010, "Prevalence and gender distribution of the metabolic syndrome", *Diabetology & metabolic syndrome*, vol. 2, pp. 1.

- Okpechi, I.G., Pascoe, M.D., Swanepoel, C.R. & Rayner, B.L. 2007, "Microalbuminuria and the metabolic syndrome in non-diabetic black Africans", *Diabetes & vascular disease research : official journal of the International Society of Diabetes and Vascular Disease*, vol. 4, no. 4, pp. 365-367.
- Okura, A., Arakawa, H., Oka, H., Yoshinari, T. & Monden, Y. 1988, "Effect of genistein on topoisomerase activity and on the growth of [Val 12]Ha-ras-transformed NIH 3T3 cells", *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 157, no. 1, pp. 183-189.
- Olefsky, J.M. & Glass, C.K. 2010, "Macrophages, inflammation, and insulin resistance", *Annual Review of Physiology*, vol. 72, pp. 219-246.
- Orgaard, A. & Jensen, L. 2008, "The effects of soy isoflavones on obesity", *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, vol. 233, no. 9, pp. 1066-1080.
- Orozco, L.J., Buchleitner, A.M., Gimenez-Perez, G., Roque I Figuls, M., Richter, B. & Mauricio, D. 2008, "Exercise or exercise and diet for preventing type 2 diabetes mellitus", *Cochrane database of systematic reviews (Online)*, vol. (3), no. 3, pp. CD003054.
- Osawa, H., Robey, R.B., Printz, R.L. & Granner, D.K. 1996a, "Identification and characterization of basal and cyclic AMP response elements in the promoter of the rat hexokinase II gene", *The Journal of biological chemistry*, vol. 271, no. 29, pp. 17296-17303.
- Osawa, H., Sutherland, C., Robey, R.B., Printz, R.L. & Granner, D.K. 1996b, "Analysis of the signaling pathway involved in the regulation of hexokinase II gene transcription by insulin", *The Journal of biological chemistry*, vol. 271, no. 28, pp. 16690-16694.
- Otsuka, R., Imai, T., Kato, Y., Ando, F. & Shimokata, H. 2010, "Relationship between number of metabolic syndrome components and dietary factors in middle-aged and elderly Japanese subjects", *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension*, vol. 33, no. 6, pp. 548-554.
- Ozawa E. Regulation of phosphorylase kinase by low concentrations of Ca ions upon muscle contraction: the connection between metabolism and muscle contraction and the connection between muscle physiology and Ca-dependent signal transduction. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2011;87(8):486-508.
- Pages, G., Guerin, S., Grall, D., Bonino, F., Smith, A., Anjuere, F., Auburger, P. & Pouyssegur, J. 1999, "Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 286, no. 5443, pp. 1374-1377.
- Patel, R.P. & Barnes, S. 2010, "Isoflavones and PPAR Signaling: A Critical Target in Cardiovascular, Metastatic, and Metabolic Disease", *PPAR research*, vol. 2010, pp. 153252.
- Peckett, A.J., Wright, D.C. & Riddell, M.C. 2011, "The effects of glucocorticoids on adipose tissue lipid metabolism", *Metabolism: clinical and experimental*, vol. 60, no. 11, pp. 1500-1510.
- Pessin, J.E. & Saltiel, A.R. 2000, "Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance", *The Journal of clinical investigation*, vol. 106, no. 2, pp. 165-169.
- Peters, J.M., Hennuyer, N., Staels, B., Fruchart, J.C., Fievet, C., Gonzalez, F.J. & Auwerx, J. 1997, "Alterations in lipoprotein metabolism in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-deficient mice", *The Journal of biological chemistry*, vol. 272, no. 43, pp. 27307-27312.
- Pompella, A., Visvikis, A., Paolicchi, A., De Tata, V. & Casini, A.F. 2003, "The changing faces of glutathione, a cellular protagonist", *Biochemical pharmacology*, vol. 66, no. 8, pp. 1499-1503.

- Pocock G, Richards CD (2005) Fisiología humana. La base de la medicina, Masson 2ª edición.
- Potenza, M.A., Marasciulo, F.L., Chieppa, D.M., Brigiani, G.S., Formoso, G., Quon, M.J. & Montagnani, M. 2005, "Insulin resistance in spontaneously hypertensive rats is associated with endothelial dysfunction characterized by imbalance between NO and ET-1 production", *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, vol. 289, no. 2, pp. H813-22.
- Potenza, M.A., Marasciulo, F.L., Tarquinio, M., Tiravanti, E., Colantuono, G., Federici, A., Kim, J.A., Quon, M.J. & Montagnani, M. 2007, "EGCG, a green tea polyphenol, improves endothelial function and insulin sensitivity, reduces blood pressure, and protects against myocardial I/R injury in SHR", *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, vol. 292, no. 5, pp. E1378-87.
- Pouyssegur, J., Volmat, V. & Lenormand, P. 2002, "Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling", *Biochemical pharmacology*, vol. 64, no. 5-6, pp. 755-763.
- Puigserver, P., Rhee, J., Donovan, J., Walkey, C.J., Yoon, J.C., Oriente, F., Kitamura, Y., Altomonte, J., Dong, H., Accili, D. & Spiegelman, B.M. 2003, "Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction", *Nature*, vol. 423, no. 6939, pp. 550-555.
- Puljak, L., Parameswara, V., Dolovcak, S., Waldrop, S.L., Emmett, D., Esser, V., Fitz, J.G. & Kilic, G. 2008, "Evidence for AMPK-dependent regulation of exocytosis of lipoproteins in a model liver cell line", *Experimental cell research*, vol. 314, no. 10, pp. 2100-2109.
- Qiao, Q. & DECODE Study Group 2006, "Comparison of different definitions of the metabolic syndrome in relation to cardiovascular mortality in European men and women", *Diabetologia*, vol. 49, no. 12, pp. 2837-2846.
- Qin, B., Polansky, M.M., Harry, D. & Anderson, R.A. 2010, "Green tea polyphenols improve cardiac muscle mRNA and protein levels of signal pathways related to insulin and lipid metabolism and inflammation in insulin-resistant rats", *Molecular nutrition & food research*, vol. 54 Suppl 1, pp. S14-23.
- Quitibs A, Hall GE (2006) Tratado de fisiología médica. VW Seconders 11ª Edición.
- Raederstorff, D.G., Schlachter, M.F., Elste, V. & Weber, P. 2003, "Effect of EGCG on lipid absorption and plasma lipid levels in rats", *The Journal of nutritional biochemistry*, vol. 14, no. 6, pp. 326-332.
- Ramachandran, A., Snehalatha, C., Satyavani, K., Sivasankari, S. & Vijay, V. 2003, "Metabolic syndrome in urban Asian Indian adults--a population study using modified ATP III criteria", *Diabetes research and clinical practice*, vol. 60, no. 3, pp. 199-204.
- Ramadan, G., El-Beih, N.M. & Abd El-Ghffar, E.A. 2009, "Modulatory effects of black v. green tea aqueous extract on hyperglycaemia, hyperlipidaemia and liver dysfunction in diabetic and obese rat models", *The British journal of nutrition*, vol. 102, no. 11, pp. 1611-1619.
- Rashid, A., Liu, C., Sanli, T., Tsiani, E., Singh, G., Bristow, R.G., Dayes, I., Lukka, H., Wright, J. & Tsakiridis, T. 2011, "Resveratrol enhances prostate cancer cell response to ionizing radiation. Modulation of the AMPK, Akt and mTOR pathways", *Radiation oncology (London, England)*, vol. 6, pp. 144.
- Ravelli, G.P., Stein, Z.A. & Susser, M.W. 1976, "Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy", *The New England journal of medicine*, vol. 295, no. 7, pp. 349-353.
- Richler, C. & Yaffe, D. 1970, "The in vitro cultivation and differentiation capacities of myogenic cell lines", *Developmental biology*, vol. 23, no. 1, pp. 1-22.

- Richon, V.M., Lyle, R.E. & McGehee, R.E., Jr 1997, "Regulation and expression of retinoblastoma proteins p107 and p130 during 3T3-L1 adipocyte differentiation", *The Journal of biological chemistry*, vol. 272, no. 15, pp. 10117-10124.
- Ridker, P.M., Buring, J.E., Cook, N.R. & Rifai, N. 2003, "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*, vol. 107, no. 3, pp. 391-397.
- Rimbach, G., Boesch-Saadatmandi, C., Frank, J., Fuchs, D., Wenzel, U., Daniel, H., Hall, W.L. & Weinberg, P.D. 2008, "Dietary isoflavones in the prevention of cardiovascular disease--a molecular perspective", *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, vol. 46, no. 4, pp. 1308-1319.
- Rodriguez Artalejo, F., Lopez Garcia, E., Gutierrez-Fisac, J.L., Banegas Banegas, J.R., Lafuente Urdinguio, P.J. & Dominguez Rojas, V. 2002, "Changes in the prevalence of overweight and obesity and their risk factors in Spain, 1987-1997", *Preventive medicine*, vol. 34, no. 1, pp. 72-81.
- Roepstorff, C., Halberg, N., Hillig, T., Saha, A.K., Ruderman, N.B., Wojtaszewski, J.F., Richter, E.A. & Kiens, B. 2005, "Malonyl-CoA and carnitine in regulation of fat oxidation in human skeletal muscle during exercise", *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, vol. 288, no. 1, pp. E133-42.
- Rogue, A., Renaud, M.P., Claude, N., Guillouzo, A. & Spire, C. 2011, "Comparative gene expression profiles induced by PPARgamma and PPARalpha/gamma agonists in rat hepatocytes", *Toxicology and applied pharmacology*, vol. 254, no. 1, pp. 18-31.
- Ronis, M.J., Chen, Y., Badeaux, J. & Badger, T.M. 2009, "Dietary soy protein isolate attenuates metabolic syndrome in rats via effects on PPAR, LXR, and SREBP signaling", *The Journal of nutrition*, vol. 139, no. 8, pp. 1431-1438.
- Rubino, F., Forgione, A., Cummings, D.E., Vix, M., Gnuli, D., Mingrone, G., Castagneto, M. & Marescaux, J. 2006, "The mechanism of diabetes control after gastrointestinal bypass surgery reveals a role of the proximal small intestine in the pathophysiology of type 2 diabetes", *Annals of Surgery*, vol. 244, no. 5, pp. 741-749.
- Rubio MA 2011, *Tratamiento farmacológico de la obesidad*, seminario edn, fundación Lilly, 20 simposio científico: obesity today.
- Rudich, A., Tirosh, A., Potashnik, R., Hemi, R., Kanety, H. & Bashan, N. 1998, "Prolonged oxidative stress impairs insulin-induced GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes", *Diabetes*, vol. 47, no. 10, pp. 1562-1569.
- Russell, R.R., 3rd, Bergeron, R., Shulman, G.I. & Young, L.H. 1999, "Translocation of myocardial GLUT-4 and increased glucose uptake through activation of AMPK by AICAR", *The American Journal of Physiology*, vol. 277, no. 2 Pt 2, pp. H643-9.
- Rutter, M.K., Meigs, J.B., Sullivan, L.M., D'Agostino RB, S. & Wilson, P.W. 2004, "C-reactive protein, the metabolic syndrome, and prediction of cardiovascular events in the Framingham Offspring Study", *Circulation*, vol. 110, no. 4, pp. 380-385.
- Ryden, M. & Arner, P. 2007, "Tumour necrosis factor-alpha in human adipose tissue -- from signalling mechanisms to clinical implications", *Journal of internal medicine*, vol. 262, no. 4, pp. 431-438.

- Saad, M.J., Araki, E., Miralpeix, M., Rothenberg, P.L., White, M.F. & Kahn, C.R. 1992, "Regulation of insulin receptor substrate-1 in liver and muscle of animal models of insulin resistance", *The Journal of clinical investigation*, vol. 90, no. 5, pp. 1839-1849.
- Salazar, M.R., Carbajal, H.A., Aizpurua, M., Riondet, B., Rodrigo, H.F., Rechifort, V., Quaini, S.M. & Echeverria, R.F. 2005, "Decrease of blood pressure by community-based strategies", *Medicina*, vol. 65, no. 6, pp. 507-512.
- Salinari, S., Bertuzzi, A., Asnaghi, S., Guidone, C., Manco, M. & Mingrone, G. 2009, "First-phase insulin secretion restoration and differential response to glucose load depending on the route of administration in type 2 diabetic subjects after bariatric surgery", *Diabetes care*, vol. 32, no. 3, pp. 375-380.
- Sandhofer, A., Iglseider, B., Paulweber, B., Ebenbichler, C.F. & Patsch, J.R. 2007, "Comparison of different definitions of the metabolic syndrome", *European journal of clinical investigation*, vol. 37, no. 2, pp. 109-116.
- Sano, H., Kane, S., Sano, E., Miinea, C.P., Asara, J.M., Lane, W.S., Garner, C.W. & Lienhard, G.E. 2003, "Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation", *The Journal of biological chemistry*, vol. 278, no. 17, pp. 14599-14602.
- Santos, A.C., Severo, M. & Barros, H. 2010, "Incidence and risk factors for the metabolic syndrome in an urban South European population", *Preventive medicine*, vol. 50, no. 3, pp. 99-105.
- Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M. & Sabatini, D.M. 2005, "Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 307, no. 5712, pp. 1098-1101.
- Schonthal, A.H. 2011, "Adverse effects of concentrated green tea extracts", *Molecular nutrition & food research*, vol. 55, no. 6, pp. 874-885.
- Schrauwen, P. & Hesselink, M. 2002, "UCP2 and UCP3 in muscle controlling body metabolism", *The Journal of experimental biology*, vol. 205, no. Pt 15, pp. 2275-2285.
- Selma, M.V., Espin, J.C. & Tomas-Barberan, F.A. 2009, "Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 57, no. 15, pp. 6485-6501.
- Sen, P., Mukherjee, S., Ray, D. & Raha, S. 2003, "Involvement of the Akt/PKB signaling pathway with disease processes", *Molecular and cellular biochemistry*, vol. 253, no. 1-2, pp. 241-246.
- Serisier, S., Leray, V., Poudroux, W., Magot, T., Ouguerram, K. & Nguyen, P. 2008, "Effects of green tea on insulin sensitivity, lipid profile and expression of PPARalpha and PPARgamma and their target genes in obese dogs", *The British journal of nutrition*, vol. 99, no. 6, pp. 1208-1216.
- Setchell, K.D. 1998, "Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones", *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 68, no. 6 Suppl, pp. 1333S-1346S.
- Setchell, K.D., Brown, N.M., Desai, P.B., Zimmer-Nechimias, L., Wolfe, B., Jakate, A.S., Creutzinger, V. & Heubi, J.E. 2003, "Bioavailability, disposition, and dose-response effects of soy isoflavones when consumed by healthy women at physiologically typical dietary intakes", *The Journal of nutrition*, vol. 133, no. 4, pp. 1027-1035.

- Sfeir, Z., Ibrahim, A., Amri, E., Grimaldi, P. & Abumrad, N. 1997, "Regulation of FAT/CD36 gene expression: further evidence in support of a role of the protein in fatty acid binding/transport", *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*, vol. 57, no. 1, pp. 17-21.
- Shao, D. & Lazar, M.A. 1997, "Peroxisome proliferator activated receptor gamma, CCAAT/enhancer-binding protein alpha, and cell cycle status regulate the commitment to adipocyte differentiation", *The Journal of biological chemistry*, vol. 272, no. 34, pp. 21473-21478.
- Shaw, J.E., Sicree, R.A. & Zimmet, P.Z. 2010, "Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030", *Diabetes research and clinical practice*, vol. 87, no. 1, pp. 4-14.
- Shaw, R.J., Kosmatka, M., Bardeesy, N., Hurley, R.L., Witters, L.A., DePinho, R.A. & Cantley, L.C. 2004, "The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, no. 10, pp. 3329-3335.
- Shi, Y. & Burn, P. 2004, "Lipid metabolic enzymes: emerging drug targets for the treatment of obesity", *Nature reviews. Drug discovery*, vol. 3, no. 8, pp. 695-710.
- Shin, E.S., Cho, S.Y., Lee, E.H., Lee, S.J., Chang, I.S. & Lee, T.R. 2006, "Positive regulation of hepatic carnitine palmitoyl transferase 1A (CPT1A) activities by soy isoflavones and L-carnitine", *European journal of nutrition*, vol. 45, no. 3, pp. 159-164.
- Shukla, A., Brandsch, C., Bettzieche, A., Hirche, F., Stangl, G.I. & Eder, K. 2007, "Isoflavone-poor soy protein alters the lipid metabolism of rats by SREBP-mediated down-regulation of hepatic genes", *The Journal of nutritional biochemistry*, vol. 18, no. 5, pp. 313-321.
- Simmen, F.A., Mercado, C.P., Zavacki, A.M., Huang, S.A., Greenway, A.D., Kang, P., Bowman, M.T. & Prior, R.L. 2010, "Soy protein diet alters expression of hepatic genes regulating fatty acid and thyroid hormone metabolism in the male rat", *The Journal of nutritional biochemistry*, vol. 21, no. 11, pp. 1106-1113.
- Singh, B.N., Shankar, S. & Srivastava, R.K. 2011, "Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications", *Biochemical pharmacology*, vol. 82, no. 12, pp. 1807-1821.
- Sjostrom, L., Lindroos, A.K., Peltonen, M., Torgerson, J., Bouchard, C., Carlsson, B., Dahlgren, S., Larsson, B., Narbro, K., Sjostrom, C.D., Sullivan, M., Wedel, H. & Swedish Obese Subjects Study Scientific Group 2004, "Lifestyle, diabetes, and cardiovascular risk factors 10 years after bariatric surgery", *The New England journal of medicine*, vol. 351, no. 26, pp. 2683-2693.
- Sjostrom, L., Peltonen, M., Jacobson, P., Sjostrom, C.D., Karason, K., Wedel, H., Ahlin, S., Anveden, A., Bengtsson, C., Bergmark, G., Bouchard, C., Carlsson, B., Dahlgren, S., Karlsson, J., Lindroos, A.K., Lonroth, H., Narbro, K., Naslund, I., Olbers, T., Svensson, P.A. & Carlsson, L.M. 2012, "Bariatric surgery and long-term cardiovascular events", *JAMA : the journal of the American Medical Association*, vol. 307, no. 1, pp. 56-65.
- Smith, E. & Morowitz, H.J. 2004, "Universality in intermediary metabolism", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, no. 36, pp. 13168-13173.
- Song, X.M., Fiedler, M., Galuska, D., Ryder, J.W., Fernstrom, M., Chibalin, A.V., Wallberg-Henriksson, H. & Zierath, J.R. 2002, "5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside treatment improves glucose homeostasis in insulin-resistant diabetic (ob/ob) mice", *Diabetologia*, vol. 45, no. 1, pp. 56-65.

- Sorenson, R.L., Brelje, T.C. & Roth, C. 1994, "Effect of tyrosine kinase inhibitors on islets of Langerhans: evidence for tyrosine kinases in the regulation of insulin secretion", *Endocrinology*, vol. 134, no. 4, pp. 1975-1978.
- Staels, B., Dallongeville, J., Auwerx, J., Schoonjans, K., Leitersdorf, E. & Fruchart, J.C. 1998, "Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism", *Circulation*, vol. 98, no. 19, pp. 2088-2093.
- Stahl, A., Evans, J.G., Pattel, S., Hirsch, D. & Lodish, H.F. 2002, "Insulin causes fatty acid transport protein translocation and enhanced fatty acid uptake in adipocytes", *Developmental cell*, vol. 2, no. 4, pp. 477-488.
- Suganami, T., Nishida, J. & Ogawa, Y. 2005, "A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha", *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 25, no. 10, pp. 2062-2068.
- Suganami, T., Tanimoto-Koyama, K., Nishida, J., Itoh, M., Yuan, X., Mizuarai, S., Kotani, H., Yamaoka, S., Miyake, K., Aoe, S., Kamei, Y. & Ogawa, Y. 2007, "Role of the Toll-like receptor 4/NF-kappaB pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages", *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 27, no. 1, pp. 84-91.
- Suh, K.S., Chon, S., Oh, S., Kim, S.W., Kim, J.W., Kim, Y.S. & Woo, J.T. 2010, "Prooxidative effects of green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate on the HIT-T15 pancreatic beta cell line", *Cell biology and toxicology*, vol. 26, no. 3, pp. 189-199.
- Swaroop, J.J., Rajarajeswari, D. & Naidu, J.N. 2012, "Association of TNF-alpha with insulin resistance in type 2 diabetes mellitus", *The Indian journal of medical research*, vol. 135, no. 1, pp. 127-130.
- Tachibana, H. 2009, "Green tea polyphenol receptor and the signaling pathway", *Seikagaku. The Journal of Japanese Biochemical Society*, vol. 81, no. 4, pp. 290-294.
- Tachibana, H. 2008, "Green tea polyphenol EGCG signaling pathway through the 67-kDa laminin receptor", *Nihon yakurigaku zasshi. Folia pharmacologica Japonica*, vol. 132, no. 3, pp. 145-149.
- Takahashi, Y., Odbayar, T.O. & Ide, T. 2009, "A comparative analysis of genistein and daidzein in affecting lipid metabolism in rat liver", *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, vol. 44, no. 3, pp. 223-230.
- Taniguchi, C.M., Emanuelli, B. & Kahn, C.R. 2006, "Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action", *Nature reviews. Molecular cell biology*, vol. 7, no. 2, pp. 85-96.
- Taylor, E.B. & Goodyear, L.J. 2007, "Targeting skeletal muscle AMP-activated protein kinase to treat type 2 diabetes", *Current diabetes reports*, vol. 7, no. 6, pp. 399-401.
- Taylor, H., Liu, J., Wilson, G., Golden, S.H., Crook, E., Brunson, C.D., Steffes, M., Johnson, W.D. & Sung, J.H. 2008, "Distinct component profiles and high risk among African Americans with metabolic syndrome: the Jackson Heart Study", *Diabetes care*, vol. 31, no. 6, pp. 1248-1253.
- Thirunavukkarasu, M., Penumathsa, S.V., Koneru, S., Juhasz, B., Zhan, L., Otani, H., Bagchi, D., Das, D.K. & Maulik, N. 2007, "Resveratrol alleviates cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetes: Role of nitric oxide, thioredoxin, and heme oxygenase", *Free radical biology & medicine*, vol. 43, no. 5, pp. 720-729.

- Tijburg, L.B., Wiseman, S.A., Meijer, G.W. & Weststrate, J.A. 1997, "Effects of green tea, black tea and dietary lipophilic antioxidants on LDL oxidizability and atherosclerosis in hypercholesterolaemic rabbits", *Atherosclerosis*, vol. 135, no. 1, pp. 37-47.
- Tokimitsu, I. 2004, "Effects of tea catechins on lipid metabolism and body fat accumulation", *BioFactors (Oxford, England)*, vol. 22, no. 1-4, pp. 141-143.
- Tomas Abadal, L., Varas Lorenzo, C., Perez, I., Puig, T. & Balaguer Vintro, I. 2001, "Risk factors and coronary morbimortality in a Mediterranean industrial cohort over 28 years of follow-up. The Manresa Study", *Revista espanola de cardiologia*, vol. 54, no. 10, pp. 1146-1154.
- Tomlinson, D.R., Willars, G.B. & Carrington, A.L. 1992, "Aldose reductase inhibitors and diabetic complications", *Pharmacology & therapeutics*, vol. 54, no. 2, pp. 151-194.
- Torre-Villalvazo, I., Tovar, A.R., Ramos-Barragan, V.E., Cerbon-Cervantes, M.A. & Torres, N. 2008, "Soy protein ameliorates metabolic abnormalities in liver and adipose tissue of rats fed a high fat diet", *The Journal of nutrition*, vol. 138, no. 3, pp. 462-468.
- Tran, A., Gelaye, B., Girma, B., Lemma, S., Berhane, Y., Bekele, T., Khali, A. & Williams, M.A. 2011, "Prevalence of Metabolic Syndrome among Working Adults in Ethiopia", *International journal of hypertension*, vol. 2011, pp. 193719.
- Tran, H., Brunet, A., Griffith, E.C. & Greenberg, M.E. 2003, "The many forks in FOXO's road", *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*, vol. 2003, no. 172, pp. RE5.
- Tsai, T.Y., Cheng, J.F. & Lai, Y.M. 2011, "Prevalence of metabolic syndrome and related factors in Taiwanese high-tech industry workers", *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*, vol. 66, no. 9, pp. 1531-1535.
- Tschopp, O., Yang, Z.Z., Brodbeck, D., Dummler, B.A., Hemmings-Mieszczak, M., Watanabe, T., Michaelis, T., Frahm, J. & Hemmings, B.A. 2005, "Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis", *Development (Cambridge, England)*, vol. 132, no. 13, pp. 2943-2954.
- Tuomilehto, J., Lindstrom, J., Eriksson, J.G., Valle, T.T., Hamalainen, H., Ilanne-Parikka, P., Keinanen-Kiukaanniemi, S., Laakso, M., Louheranta, A., Rastas, M., Salminen, V., Uusitupa, M. & Finnish Diabetes Prevention Study Group 2001, "Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance", *The New England journal of medicine*, vol. 344, no. 18, pp. 1343-1350.
- Ullrich, A. & Schlessinger, J. 1990a, "Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity", *Cell*, vol. 61, no. 2, pp. 203-212.
- Ullrich, A. & Schlessinger, J. 1990b, "Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity", *Cell*, vol. 61, no. 2, pp. 203-212.
- Unger, R.H. & Orci, L. 2001, "Diseases of liporegulation: new perspective on obesity and related disorders", *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 15, no. 2, pp. 312-321.
- Unger, T., Paulis, L. & Sica, D.A. 2011, "Therapeutic perspectives in hypertension: novel means for renin-angiotensin-aldosterone system modulation and emerging device-based approaches", *European heart journal*, vol. 32, no. 22, pp. 2739-2747.

- Valcic, S., Muders, A., Jacobsen, N.E., Liebler, D.C. & Timmermann, B.N. 1999, "Antioxidant chemistry of green tea catechins. Identification of products of the reaction of (-)-epigallocatechin gallate with peroxy radicals", *Chemical research in toxicology*, vol. 12, no. 4, pp. 382-386.
- van Dam, R.M. & Hu, F.B. 2005, "Coffee consumption and risk of type 2 diabetes: a systematic review", *JAMA : the journal of the American Medical Association*, vol. 294, no. 1, pp. 97-104.
- Van de Laar, F.A., Lucassen, P.L., Akkermans, R.P., Van de Lisdonk, E.H. & De Grauw, W.J. 2006, "Alpha-glucosidase inhibitors for people with impaired glucose tolerance or impaired fasting blood glucose", *Cochrane database of systematic reviews (Online)*, vol. (4), no. 4, pp. CD005061.
- Vanhaesebroeck, B. & Alessi, D.R. 2000, "The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB", *The Biochemical journal*, vol. 346 Pt 3, pp. 561-576.
- Verspohl, E.J., Tollkuhn, B. & Kloss, H. 1995, "Role of tyrosine kinase in insulin release in an insulin secreting cell line (INS-1)", *Cellular signalling*, vol. 7, no. 5, pp. 505-512.
- Virkamaki, A., Ueki, K. & Kahn, C.R. 1999, "Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance", *The Journal of clinical investigation*, vol. 103, no. 7, pp. 931-943.
- Vivien Chou 2012, , . Available: <http://www.shen-nong.com/eng/front/index.html> [2012, 12 marzo].
- Wallerath, T., Deckert, G., Ternes, T., Anderson, H., Li, H., Witte, K. & Forstermann, U. 2002, "Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase", *Circulation*, vol. 106, no. 13, pp. 1652-1658.
- Waltner-Law, M.E., Wang, X.L., Law, B.K., Hall, R.K., Nawano, M. & Granner, D.K. 2002, "Epigallocatechin gallate, a constituent of green tea, represses hepatic glucose production", *The Journal of biological chemistry*, vol. 277, no. 38, pp. 34933-34940.
- Wang, C.N., O'Brien, L. & Brindley, D.N. 1998, "Effects of cell-permeable ceramides and tumor necrosis factor-alpha on insulin signaling and glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes", *Diabetes*, vol. 47, no. 1, pp. 24-31.
- Wang, J., Barbry, P., Maiyar, A.C., Rozansky, D.J., Bhargava, A., Leong, M., Firestone, G.L. & Pearce, D. 2001, "SGK integrates insulin and mineralocorticoid regulation of epithelial sodium transport", *American journal of physiology. Renal physiology*, vol. 280, no. 2, pp. F303-13.
- Wang, T.T., Sathyamoorthy, N. & Phang, J.M. 1996, "Molecular effects of genistein on estrogen receptor mediated pathways", *Carcinogenesis*, vol. 17, no. 2, pp. 271-275.
- Wang, X.L., Zhang, L., Youker, K., Zhang, M.X., Wang, J., LeMaire, S.A., Coselli, J.S. & Shen, Y.H. 2006, "Free fatty acids inhibit insulin signaling-stimulated endothelial nitric oxide synthase activation through upregulating PTEN or inhibiting Akt kinase", *Diabetes*, vol. 55, no. 8, pp. 2301-2310.
- Watanabe, S., Yamaguchi, M., Sobue, T., Takahashi, T., Miura, T., Arai, Y., Mazur, W., Wahala, K. & Adlercreutz, H. 1998, "Pharmacokinetics of soybean isoflavones in plasma, urine and feces of men after ingestion of 60 g baked soybean powder (kinako)", *The Journal of nutrition*, vol. 128, no. 10, pp. 1710-1715.
- Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L. & Ferrante, A.W., Jr 2003, "Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue", *The Journal of clinical investigation*, vol. 112, no. 12, pp. 1796-1808.

- Wellbrock, C., Karasarides, M. & Marais, R. 2004, "The RAF proteins take centre stage", *Nature reviews.Molecular cell biology*, vol. 5, no. 11, pp. 875-885.
- Wells, R.G., Pajor, A.M., Kanai, Y., Turk, E., Wright, E.M. & Hediger, M.A. 1992, "Cloning of a human kidney cDNA with similarity to the sodium-glucose cotransporter", *The American Journal of Physiology*, vol. 263, no. 3 Pt 2, pp. F459-65.
- Weyer, C., Foley, J.E., Bogardus, C., Tataranni, P.A. & Pratley, R.E. 2000, "Enlarged subcutaneous abdominal adipocyte size, but not obesity itself, predicts type II diabetes independent of insulin resistance", *Diabetologia*, vol. 43, no. 12, pp. 1498-1506.
- Wikipedia contributors , *Wikipedia:Portada* [Homepage of Wikipedia, The Free Encyclopedia], [Online] [2012, .
- Wolfram, S. 2007, "Effects of green tea and EGCG on cardiovascular and metabolic health", *Journal of the American College of Nutrition*, vol. 26, no. 4, pp. 373S-388S.
- Wolfram, S., Raederstorff, D., Preller, M., Wang, Y., Teixeira, S.R., Riegger, C. & Weber, P. 2006, "Epigallocatechin gallate supplementation alleviates diabetes in rodents", *The Journal of nutrition*, vol. 136, no. 10, pp. 2512-2518.
- Wolfram, S., Raederstorff, D., Wang, Y., Teixeira, S.R., Elste, V. & Weber, P. 2005, "TEAVIGO (epigallocatechin gallate) supplementation prevents obesity in rodents by reducing adipose tissue mass", *Annals of Nutrition & Metabolism*, vol. 49, no. 1, pp. 54-63.
- Wu, A.H., Tseng, C.C., Van Den Berg, D. & Yu, M.C. 2003, "Tea intake, COMT genotype, and breast cancer in Asian-American women", *Cancer research*, vol. 63, no. 21, pp. 7526-7529.
- Wu, J., Oka, J., Higuchi, M., Tabata, I., Toda, T., Fujioka, M., Fuku, N., Teramoto, T., Okuhira, T., Ueno, T., Uchiyama, S., Urata, K., Yamada, K. & Ishimi, Y. 2006a, "Cooperative effects of isoflavones and exercise on bone and lipid metabolism in postmenopausal Japanese women: a randomized placebo-controlled trial", *Metabolism: clinical and experimental*, vol. 55, no. 4, pp. 423-433.
- Wu, Q., Ortegon, A.M., Tsang, B., Doege, H., Feingold, K.R. & Stahl, A. 2006b, "FATP1 is an insulin-sensitive fatty acid transporter involved in diet-induced obesity", *Molecular and cellular biology*, vol. 26, no. 9, pp. 3455-3467.
- Xiao, C.W., Mei, J., Huang, W., Wood, C., L'abbe, M.R., Gilani, G.S., Cooke, G.M. & Curran, I.H. 2007, "Dietary soy protein isolate modifies hepatic retinoic acid receptor-beta proteins and inhibits their DNA binding activity in rats", *The Journal of nutrition*, vol. 137, no. 1, pp. 1-6.
- Xiao, C.W., Wood, C. & Gilani, G.S. 2006, "Nuclear receptors: potential biomarkers for assessing physiological functions of soy proteins and phytoestrogens", *Journal of AOAC International*, vol. 89, no. 4, pp. 1207-1214.
- Xu, B. & Chang, S.K. 2008, "Antioxidant capacity of seed coat, dehulled bean, and whole black soybeans in relation to their distributions of total phenolics, phenolic acids, anthocyanins, and isoflavones", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 56, no. 18, pp. 8365-8373.
- Xu, H., Barnes, G.T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C.J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J.S., Tartaglia, L.A. & Chen, H. 2003, "Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance", *The Journal of clinical investigation*, vol. 112, no. 12, pp. 1821-1830.
- Xu, X., Wang, H.J., Murphy, P.A., Cook, L. & Hendrich, S. 1994, "Daidzein is a more bioavailable soymilk isoflavone than is genistein in adult women", *The Journal of nutrition*, vol. 124, no. 6, pp. 825-832.

- Xu, X., Wang, H.J., Murphy, P.A. & Hendrich, S. 2000, "Neither background diet nor type of soy food affects short-term isoflavone bioavailability in women", *The Journal of nutrition*, vol. 130, no. 4, pp. 798-801.
- Yaffe, D. 1968, "Retention of differentiation potentialities during prolonged cultivation of myogenic cells", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 61, no. 2, pp. 477-483.
- Yamaguchi, Y., Flier, J.S., Yokota, A., Benecke, H., Backer, J.M. & Moller, D.E. 1991, "Functional properties of two naturally occurring isoforms of the human insulin receptor in Chinese hamster ovary cells", *Endocrinology*, vol. 129, no. 4, pp. 2058-2066.
- Yamashita, T., Sasahara, T., Pomeroy, S.E., Collier, G. & Nestel, P.J. 1998, "Arterial compliance, blood pressure, plasma leptin, and plasma lipids in women are improved with weight reduction equally with a meat-based diet and a plant-based diet", *Metabolism: clinical and experimental*, vol. 47, no. 11, pp. 1308-1314.
- Yang, C.S., Chen, L., Lee, M.J., Balentine, D., Kuo, M.C. & Schantz, S.P. 1998, "Blood and urine levels of tea catechins after ingestion of different amounts of green tea by human volunteers", *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, vol. 7, no. 4, pp. 351-354.
- Yang, C.S., Sang, S., Lambert, J.D., Hou, Z., Ju, J. & Lu, G. 2006, "Possible mechanisms of the cancer-preventive activities of green tea", *Molecular nutrition & food research*, vol. 50, no. 2, pp. 170-175.
- Yang, C.S. & Wang, H. 2011, "Mechanistic issues concerning cancer prevention by tea catechins", *Molecular nutrition & food research*, vol. 55, no. 6, pp. 819-831.
- Yang, T.T. & Koo, M.W. 2000, "Chinese green tea lowers cholesterol level through an increase in fecal lipid excretion", *Life Sciences*, vol. 66, no. 5, pp. 411-423.
- Yang, W., Reynolds, K., Gu, D., Chen, J. & He, J. 2007, "A comparison of two proposed definitions for metabolic syndrome in the Chinese adult population", *The American Journal of the Medical Sciences*, vol. 334, no. 3, pp. 184-189.
- Yang, Y., Nie, W., Yuan, J., Zhang, B., Wang, Z., Wu, Z. & Guo, Y. 2010, "Genistein activates endothelial nitric oxide synthase in broiler pulmonary arterial endothelial cells by an Akt-dependent mechanism", *Experimental & molecular medicine*, vol. 42, no. 11, pp. 768-776.
- Zabetian, A., Hadaegh, F. & Azizi, F. 2007, "Prevalence of metabolic syndrome in Iranian adult population, concordance between the IDF with the ATPIII and the WHO definitions", *Diabetes research and clinical practice*, vol. 77, no. 2, pp. 251-257.
- Zaninovich, A.A. 2005, "Role of uncoupling proteins UCP1, UCP2 and UCP3 in energy balance, type 2 diabetes and obesity. Synergism with the thyroid", *Medicina*, vol. 65, no. 2, pp. 163-169.
- Zeng, G., Nystrom, F.H., Ravichandran, L.V., Cong, L.N., Kirby, M., Mostowski, H. & Quon, M.J. 2000, "Roles for insulin receptor, PI3-kinase, and Akt in insulin-signaling pathways related to production of nitric oxide in human vascular endothelial cells", *Circulation*, vol. 101, no. 13, pp. 1539-1545.
- Zeyda, M. & Stulnig, T.M. 2009, "Obesity, inflammation, and insulin resistance--a mini-review", *Gerontology*, vol. 55, no. 4, pp. 379-386.

- Zhang, Y., Shen, C., Ai, D., Xie, X. & Zhu, Y. 2011, "Upregulation of Scavenger Receptor BI by Hepatic Nuclear Factor 4alpha through a Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma-Dependent Mechanism in Liver", *PPAR research*, vol. 2011, pp. 164925.
- Zhang, Z.F., Li, Q., Liang, J., Dai, X.Q., Ding, Y., Wang, J.B. & Li, Y. 2010, "Epigallocatechin-3-O-gallate (EGCG) protects the insulin sensitivity in rat L6 muscle cells exposed to dexamethasone condition", *Phytomedicine : International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, vol. 17, no. 1, pp. 14-18.
- Zheng, J. & Ramirez, V.D. 2000, "Inhibition of mitochondrial proton FOF1-ATPase/ATP synthase by polyphenolic phytochemicals", *British journal of pharmacology*, vol. 130, no. 5, pp. 1115-1123.
- Zick, Y. 2005, "Ser/Thr phosphorylation of IRS proteins: a molecular basis for insulin resistance", *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*, vol. 2005, no. 268, pp. pe4.
- Zimmet, P., M M Alberti, K.G. & Serrano Rios, M. 2005, "A new international diabetes federation worldwide definition of the metabolic syndrome: the rationale and the results", *Revista espanola de cardiologia*, vol. 58, no. 12, pp. 1371-1376.
- Zimmet, P., Magliano, D., Matsuzawa, Y., Alberti, G. & Shaw, J. 2005, "The metabolic syndrome: a global public health problem and a new definition", *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, vol. 12, no. 6, pp. 295-300.
- Zou, C., Wang, Y. & Shen, Z. 2005, "2-NBDG as a fluorescent indicator for direct glucose uptake measurement", *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, vol. 64, no. 3, pp. 207-215.
- Zunino, S. 2009, "Type 2 diabetes and glycemic response to grapes or grape products", *The Journal of nutrition*, vol. 139, no. 9, pp. 1794S-800S.