



Universidad de Concepción
Facultad de Farmacia
Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología

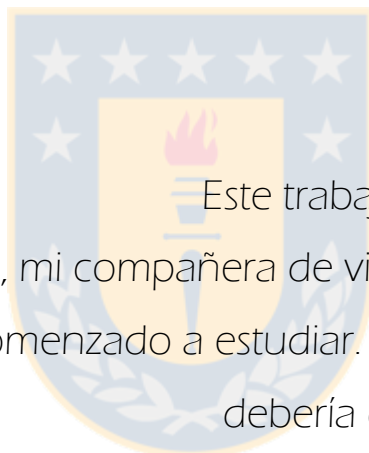
Tesis para optar al grado de
Magister en Bioquímica Clínica en Inmunología

**Evaluación *in vivo* de la administración de la cepa
Lactobacillus salivarius (LPLM-O1)
sobre parámetros metabólicos, inflamatorios y
morfométricos en un modelo murino de obesidad
inducido por dieta**

JOAQUÍN ARIEL ROJAS FRITZ

Profesor tutor: Dr. Daniel Duran Sandoval
Dpto. de Bioquímica Clínica e Inmunología, Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción

Agosto de 2016



Este trabajo se lo dedico de todo corazón a **Patita**, mi compañera de vida, que sin su apoyo ni siquiera hubiese comenzado a estudiar. El diploma que recibiré debería decir Joaquín y Patricia.

Espero ser siempre digno de su amor.

A mis hijos **Benjamín** y **Francisca**, sin ellos, no hubiese tenido la fortaleza de avanzar. Además, quiero pedirles perdón por todos esos momentos que no estuve ahí, y me comprometo a retribuir con creces todo ese tiempo que no me dediqué a ellos como se merecen.

Los amo con todo mí ser.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi eterna gratitud por siempre a todos aquellos que de una u otra forma colaboraron para que esta aventura llegara a buen puerto y que con sus conocimientos, amistad y paciencia me entregaron las herramientas para lograrlo.

A mí querido Profesor Daniel Duran, quien, primero que todo me dio la oportunidad de ingresar al programa de magister, luego me enseñó lo hermoso y a la vez complejo que es el trabajo con animales de experimentación y por sobre todo me enseñó que se necesita trabajar con cariño y respeto hacia los animales. Sin darse cuenta, me mostró el camino que quiero seguir en mi vida profesional de aquí en adelante. Gracias por todo querido amigo Daniel.

Quiero agradecer a todos los profesores del departamento, que tuvieron la paciencia de enseñarme y aguantarme en sus clases, y por exigirme de la misma forma que mis compañeros. Siempre tendré los mejores recuerdos de mis profesores. Profesora Margarita, fue siempre la palabra justa en el momento justo, esas largas conversaciones respecto a la vida, me conmovieron siempre. Profesora Paula, que me hizo llorar estudiando, sin su exigencia, no hubiese avanzado. Profesora Liliana, siempre una sonrisa y un saludo amable y honesto. Profesores Claudia, Felipe, Claudio, Natalia, muchas gracias por sus conocimientos.

A mi padre, porque donde esté, siempre le da el impulso a mi alma para seguir, gracias a él y mi tío Juan, soy quien soy, los extraño muchísimo.

A mi madre, que lo único que deseo es retribuirle de alguna forma todo el sacrificio que ha realizado por mí.

Al Dr. Armando Islas, mí querido profesor de pregrado, gracias a él, soy el profesional que soy, me enseñó la humildad y el trabajo. Aunque él no lo crea, cada palabra que conversamos se transforma en una lección por aprender.

A ti Maxito, que a tu corta edad fuiste un ejemplo de fortaleza y nobleza difícil de seguir.

Gracias a todos mis amigos que me dieron fuerzas en los momentos difíciles y no me abandonaron en esta travesía.



INDICE GENERAL

INDICE GENERAL	5
INDICE DE TABLAS	9
INDICE DE FIGURAS	10
RESUMEN	12
SUMMARY	13
I. MARCO TEORICO	14
1. Definición y diagnóstico de la obesidad	16
2. Obesidad a nivel global	17
3. Obesidad en Chile	19
4. Etiología y fisiopatología de la obesidad	21
4.1 Factores genéticos	22
4.2 Cambios en los patrones de alimentación y actividad física	24
4.3 Indicadores morfométricos de la obesidad en humanos	26
4.4 Tejido adiposo	29
4.5 Glicemia basal	34
4.6 Insulina y Resistencia a la Insulina	36
4.6.1 Insulina	36
4.6.2 Resistencia a la insulina	40
4.7 Leptina	42

4.8	Colesterol total	47
4.9	Triglicéridos	49
5	Rol de las citoquinas en la obesidad	52
5.1	Interleuquina 6	55
5.2	Factor de necrosis tumoral alfa	56
5.3	Interleuquina 10	58
6	Modelos animales de obesidad	59
6.1	Modelos genéticos	62
6.1.1	Mutaciones espontáneas con pérdida de funcionalidad de un único gen	62
6.1.2	Mutaciones con pérdida de la funcionalidad de un único gen, generadas de forma artificial	64
6.1.3	Modificaciones genéticas	65
6.1.4	Modelos poligénicos	71
6.2	Modelos inducidos por dieta rica en grasas	74
6.3	Formulación de dieta alta en grasas	76
6.4	El ratón C57BL/6J alimentado con dieta alta en grasas (Diet induced obesity mouse: DIO mouse)	76
6.5	Modelo de ratón C57BL/6 de Obesidad inducida por dieta con alimentos formulados por Research Diet Inc.	79
7	Dieta y composición de la microbiota intestinal	81
8	La microbiota intestinal y su impacto en el desarrollo de la obesidad	83

9	Definición de Probióticos	87
10	Cepa probiótica <i>Lactobacillus salivarius</i> LPLM-O1	94
II.	HIPOTESIS	95
III.	OBJETIVOS	96
3.1	Objetivo general	96
3.2	Objetivos específicos	96
IV.	MATERIALES Y MÉTODO	97
1.	Animales y tratamiento	97
2.	Parámetros bioquímicos	98
3.	Test de tolerancia a la glucosa y test de respuesta a insulina	101
4.	Obtención de muestras y eutanasia	103
5.	Determinaciones morfométricas	103
6.	Análisis estadístico	104
V.	RESULTADOS	106
1.	Estandarización de un modelo murino de obesidad inducido por dieta rica en grasas (HFD)	106
2.	Medición del efecto de la administración oral de LPLM-O1 sobre la ganancia de peso inducida por dieta rica en grasas	110
3.	Cuantificación del efecto de la administración oral de LPLM-O1 sobre parámetros bioquímicos clínicos e inflamatorios en el modelo murino de obesidad inducido por dieta	116

3.1	Parámetros bioquímicos	116
3.2	Leptina y citoquinas	118
3.3	Tejidos	120
4.	Evaluación del efecto de la administración oral de LPLM-O1 sobre la tolerancia a la glucosa y respuesta a la insulina en modelo DIO	121
4.1	Test de respuesta a la insulina intraperitoneal (TRIIP)	121
4.2	Test de Tolerancia a la Glucosa Intraperitoneal (TTGIP)	122
4.3	Test de Tolerancia a la Glucosa oral (TTGO)	123
VI.	DISCUSIÓN	125
VII.	CONCLUSIÓN	140
VIII.	BIBLIOGRAFÍA	141



INDICE DE TABLAS

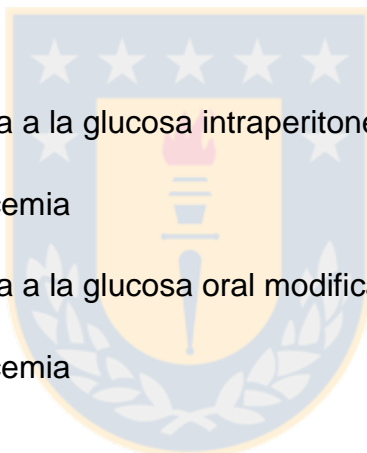
Tabla 1. Cambios de peso y bioquímica sanguínea en hembras C57BL/6 después 16 semanas de tratamiento	109
Tabla 2: Consumo promedio de pellet o gelatina en ratones C57BL/6.	114
Tabla 3: Parámetros bioquímicos en ratones C57BL/6 por grupo al sacrificio.	117
Tabla 4: Leptina y citoquinas en ratones C57BL/6 por grupo al sacrificio	119
Tabla 5: Peso de tejidos en ratones C57BL/6 por grupo al sacrificio.	120



INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Prevalencia de obesidad en mayores de 20 años en los años 1980 y 2008	17
Figura 2. Diez años de tendencia (2000-2009) del IMC en países seleccionados de América según Organización mundial de la Salud.	19
Figura 3. Distribución del tejido adiposo en ratones	30
Figura 4. Dibujo representativo de la morfología del adipocito blanco y pardo	31
Figura 5. Secreción de insulina en células beta pancreático	37
Figura 6. Vías de señalización de la insulina	38
Figura 7. Señalización de la insulina y resistencia a la insulina	41
Figura 8. Relación entre la expansión del tejido adiposo y el incremento del estado proinflamatorio	54
Figura 9. Factores que influyen la composición de la microbiota intestinal humana, con especial énfasis en la dieta	82
Figura 10. Modelo murino de obesidad inducida por dieta rica en grasas	98
Figura 11. Modelo de evaluación de LPLM-O1 sobre la ganancia de peso en modelo de obesidad inducido por dieta rica en grasas	99
Figura 12. Esquema del protocolo de TTGIP, TTGO y TRIIP	102
Figura 13. Estandarización de modelo murino de obesidad inducida por dieta, estudio preliminar	107

Figura 14. Perfil de consumo de alimento de los ratones	108
Figura 15. Variación de peso de ratones (machos y hembras) alimentados con dieta baja en grasas (LFD) y alta en grasas (HFD)	111
Figura 16. Test de tolerancia a la glucosa	112
Figura 17. Consumo de alimento en hembras	113
Figura 18. Evolución de la masa en gramos durante las semanas de desarrollo del modelo de obesidad	115
Figura 19. Curva de Glicemia basal post administración de dieta diferenciada	122
Figura 20. Test de tolerancia a la glucosa intraperitoneal expresado en la curva de glicemia	123
Figura 21. Test de tolerancia a la glucosa oral modificado expresado en la curva de glicemia	124



Resumen

La obesidad es considerada una pandemia. En general no solo corresponde a un desequilibrio entre el ingreso/egreso de energía, sino que también se encuentra influenciada por factores genéticos, fisiológicos, metabólicos y factores socio-culturales.

Actualmente se ha informado que la microbiota que coloniza el intestino humano puede desempeñar un papel importante en el desarrollo de la obesidad. Esta afirmación se basa en varios estudios que muestran diferencias en la microbiota intestinal entre los individuos delgados y obesos. Debido a que está ampliamente aceptado que la microbiota intestinal es esencial para una vida sana, tratamientos terapéuticos basados en la modulación de la microbiota intestinal han despertado un interés considerable.

Recientemente, la cepa de *Lactobacillus salivarius* LPLM-O1 proveniente de leche materna humana. Esta cepa ha mostrado diversas propiedades probióticas, por lo que es interesante para propósitos medicinales. Sin embargo, sus beneficios sobre la obesidad no se han estudiado todavía.

El objetivo de este estudio fue evaluar *in vivo* el efecto metabólico de la administración de *L. salivarius* LPLM-O1 en un modelo murino de obesidad inducida por dieta alta en grasas. Aunque su efecto sobre la tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina es discreto, la suplementación de la dieta con la cepa LPLM-O1 reduce la ganancia de peso total y la masa de tejido adiposo de ratones obesos, mejora de marcadores inflamatorios y reduce los niveles circulantes de glucosa e insulina, en comparación con ratones delgados. En conclusión, el consumo de LPLM-O1 mejora marcadores de obesidad en un modelo murino de la obesidad inducida por la dieta. Estos resultados apoyan el potencial de *L. salivarius* LPLM-O1 como tratamiento probiótico en la obesidad.

Palabras claves: dieta alta en grasas, probiótico, aumento de peso.

Abstract

Since several decades, the obesity is considered a pandemic. Overall, obesity not only corresponds to an intake/output energy imbalance, but also is influenced by genetic, physiological, metabolic, social and cultural factors.

It is currently reported that the microbiota that colonizes the human gut may play an important role in the development of obesity. This statement is based on several studies showing differences in gut microbiota between lean and obese individuals. Because it is widely accepted that intestinal microbiota is essential for a healthy life, therapeutic treatments based on modulation of the gut microbiota have garnered considerable interest.

The strain *Lactobacillus salivarius* LPLM-O1 has been recently isolated from human breast milk. This strain has shown diverse probiotic properties, making it interesting for medicinal purposes. However, the benefits on obesity have not been studied yet.

The aim of this study was to evaluate *in vivo* the metabolic effect of administering *L. salivarius* LPLM-O1 in a murine model of high fat diet-induced obesity. Although the effect on glucose tolerance and insulin sensitivity is marginal, diet supplementation with LPLM-O1 strain reduces the total weight gain ratio in obese mice. This effect is linked to an improvement of inflammatory markers, as well as to reduced circulating glucose and insulin levels, when compared to lean mice. Additionally, LPLM-O1 supplementation reduces adipose tissue mass in obese mice. In conclusion, diet supplementation with the *L. salivarius* LPLM-O1 strain improves obesity markers in a murine model of diet-induced obesity. These results support the potential use of *L. salivarius* LPLM-O1 as a probiotic treatment in obesity.

Keyword: probiotic, high fat diet, weight gain.

I. MARCO TEÓRICO

Actualmente la obesidad es considerada una pandemia. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el 2005 había aproximadamente 400 millones de adultos obesos, estimándose para el año 2015 alrededor de 2,300 millones de personas con sobrepeso y más de 700 millones con obesidad (World Health Organization. 2011. Obesity and overweight: World Health Organization. Disponible en <http://www.who.int>).

En términos generales la obesidad corresponde a un desequilibrio del balance energético, con un gran consumo de energía y poco gasto de ésta, pero que además se encuentra influenciada por factores genéticos, fisiológicos, metabólicos, sociales y culturales (Yazdi et al., 2015). Fisiológicamente, éste es un desorden metabólico complejo que perturba el metabolismo de todo el cuerpo en el intento de contrarrestar el exceso de energía. En la mayoría de los países desarrollados y aquellos en vías de serlo, el porcentaje de población obesa casi se ha duplicado en los últimos 20 años y de forma alarmante en la población infantil. La obesidad constituye además un grave problema de salud pública debido a que está acompañada por el desarrollo de patologías crónicas asociadas, como son la resistencia a la insulina, diabetes, hipertensión, enfermedades cardiovasculares, hígado graso y dislipidemias entre otras (Doo et al., 2015).

Se ha señalado recientemente que la microbiota que coloniza el intestino humano puede jugar un papel importante en el desarrollo de la obesidad y de otras enfermedades metabólicas e inmunológicas del hospedador. Dicha afirmación se basa en avanzados estudios metagenómicos que han determinado que existen diferencias de microbiota intestinal entre individuos delgados y obesos. Las

diferencias observadas se asocian a la presencia de una población microbiana con mayor capacidad para extraer energía de la dieta y/o que favorece la aparición de un estado de inflamación crónico de bajo grado en individuos obesos. Recientemente, la obesidad se ha correlacionado con una proporción alterada de dos grupos bacterianos predominantes, *Bacteroidetes* y *Firmicutes* tanto en roedores (Sanz et al., 2010) como en humanos (Amores et al., 2004).

Debido a que es ampliamente aceptado que la microbiota intestinal es indispensable para el desarrollo de una vida saludable, el desarrollo de la terapéutica basada en la modulación de la microbiota intestinal ha adquirido un impulso considerable. Existen algunos agentes como los antibióticos, probióticos, prebióticos y simbióticos que tienen la capacidad de alterar la composición de la microbiota intestinal. Sin embargo, un nuevo término, farmabióticos, involucra cualquier forma de explotación terapéutica de la flora comensal, incluyendo el uso de bacterias probióticas vivas, derivados probióticos y metabolitos biológicamente activos, prebióticos, simbióticos o bacterias comensales modificados genéticamente (Wu et al., 2015).

Recientemente, ha sido aislada desde leche materna humana sana una cepa de *Lactobacillus salivarius* denominada LPLM-O1 (Jara et al., 2011). Dicha cepa ha mostrado propiedades probióticas y otras que la hacen interesante con fines industriales. Dadas sus propiedades biológicas y su potencial comercial, es interesante evaluar *in vivo* el efecto que tendría la cepa LPLM-O1 en el desarrollo de la obesidad asociada a una dieta rica en grasas (Ramirez de Arellano, 2012).

1. Definición y diagnóstico de la obesidad

La obesidad se define como una enfermedad crónica multifactorial caracterizada por un aumento de la masa grasa, y por lo tanto del peso corporal, como consecuencia de un balance energético positivo mantenido en el tiempo. Aunque no todo incremento de peso corporal es debido a un aumento del tejido adiposo, en la práctica cotidiana el concepto de obesidad se relaciona con el peso corporal. La obesidad corresponde a un aumento de la grasa corporal en proporción al área del paciente. El diagnóstico se establece con la medición del Índice de Masa Corporal (IMC): peso en kilogramos dividido por altura en metros al cuadrado). Un IMC entre 25 y 29,9 kg/m² determina el diagnóstico de sobrepeso, mientras que un valor mayor o igual a 30 kg/m² se considera como obesidad (Nyholm et al., 2007).

Sin embargo, y como una forma de hacer partícipe a la población general en su control de peso, se ha establecido la medición de la circunferencia de cintura como una forma sencilla de evaluar la obesidad en un paciente. Esta medición se basa en el entendido que la circunferencia de cintura da cuenta del depósito de grasa visceral la cual, según diversos estudios, es la fracción grasa con mayor asociación al desarrollo de patologías concomitantes a la obesidad. Así, de acuerdo a los criterios del Panel III de Tratamiento de Adultos (ATP III) del Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol de los EEUU, establece como valor de referencia un diámetro de cintura de 102 cm en hombres y 88 cm en mujeres (Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) 2002. Expert Panel on: Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult treatment Panel III) Reporte final). Sin embargo, estos parámetros han sido

adaptados a la población chilena de acuerdo a los valores obtenidos en la Encuesta Nacional de Salud 2010 y que corresponden a 88 cm y 83 cm en hombres y mujeres, respectivamente (Ministerio de Salud, 2010).

2. Obesidad a nivel global

Desde 1980, la prevalencia mundial de la obesidad, estandarizada por edad, casi se ha duplicado pasando de 6,4% en 1980 a 12,0% en 2008, con la mitad de éste aumento producido entre los años 2000 y 2008 (Figura 1). Estadísticas globales revelan que aproximadamente 1.460 millones personas tenían un IMC ≥ 25 y 508 millones personas eran obesos en 2008. Durante ese mismo período, el número de adultos con sobrepeso y obesidad en los países en desarrollo se triplicó de 250 millones en 1980 a 904 millones de personas en el 2008. Utilizando

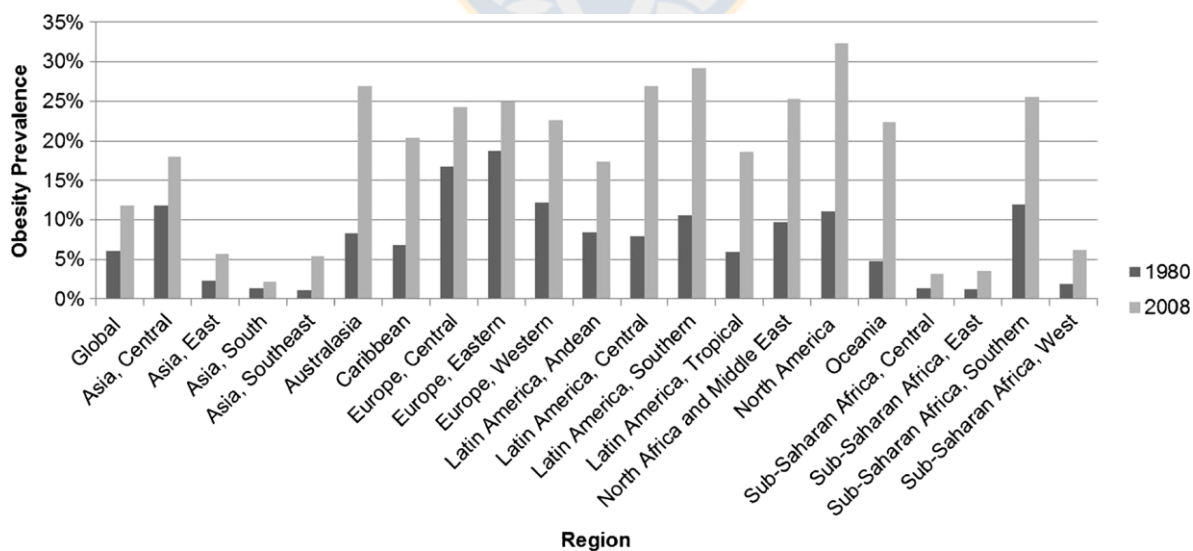


Figura 1. Prevalencia de obesidad en mayores de 20 años en los años 1980 y 2008. (Imes y Burke, 2014).

datos de 105 países, Kanter y Caballero informaron de una mayor prevalencia de obesidad en el sexo femenino en comparación con la obesidad masculina. El Medio Oriente y África del Norte tuvo mayores diferencias de sobrepeso femenino y la obesidad. Sin embargo, entre los países desarrollados, hubo una mayor prevalencia de varones con sobrepeso en comparación con las mujeres con sobrepeso (Amores et al., 2004).

Además, la obesidad está asociada a un incremento de la incidencia de numerosas patologías como la apnea obstructiva del sueño, enfermedades cardiovasculares y diabetes mellitus tipo 2; junto a numerosas otras comorbilidades como reflujo gastrointestinal, pancreatitis, síndrome de ovario poliquístico, algunos tipos de cáncer, depresión, discriminación social y laboral y reducción de la calidad de vida (Yatsuya et al., 2014). Este autor estima que la proporción de adultos con sobrepeso en el año 2013 fue de 36% en hombres y 37% en mujeres. Debido a que la obesidad trae consigo la presencia de otras enfermedades como hipertensión, enfermedades cardiovasculares, dislipidemias y diabetes, se asume que la prevalencia de estas enfermedades aumenta de forma conjunta.

Efectivamente, no cabe discusión que la tendencia mundial de la obesidad va en aumento, aun cuando existen variaciones significativas en relación a las diferentes regiones del planeta y a sus condiciones socio-económicas que pueden generar diferencias en el aumento del índice de masa corporal entre hombres y mujeres (Yatsuya et al., 2014; Figura 2).

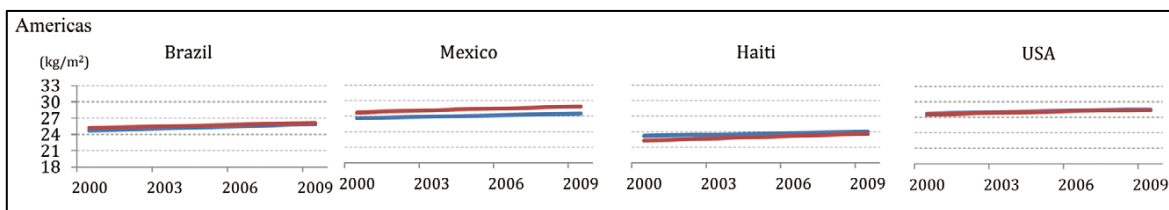


Figura 2. Diez años de tendencia (2000-2009) del IMC en países seleccionados de América según Organización mundial de la Salud. Línea azul, hombres; línea roja mujeres. Modificado de Yatsuya et al., 2014.

Cada año fallecen 2,8 millones de personas adultas debido al sobrepeso y la obesidad siendo éste el quinto factor principal de riesgo de defunción en el mundo y la segunda causa de mortalidad prematura evitable después del tabaco (Moreno, 2013).

3. Obesidad en Chile

La obesidad es una patología transversal afectando a todos los países, culturas y continentes. Nuestro país no escapa a los alcances de esta pandemia. Actualmente, Chile es uno de los países que presenta una mayor tasa de sobrepeso y obesidad del continente, con importante incremento en los últimos años (Amigo, 2003). La obesidad afecta al 7,4% de los menores de 6 años y es del orden de un 25% en adultos y adultos mayores. Se estima que en nuestro país, al año 2007, existían 3,4 millones de personas obesas, y desde entonces la cifra ha manifestado un continuo aumento (Abello y Caro, 2007). En el 2009, el 39.3% de la población adulta en Chile presentaba sobrepeso y el 25,1% padecía de obesidad. En edades pediátricas al igual que la tendencia en países desarrollados, la obesidad infantil ha aumentado en forma significativa y progresiva. Según una encuesta del SIMCE

2012 indica que un 44% de los niños presenta sobrepeso u obesidad en Chile (Agencia de Calidad de la Educación, 2012), ocupando en sexto lugar con mayores índices de obesidad infantil dentro de los países de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) (Espinoza-Silva y Aguilar-Farías, 2014).

La obesidad infantil y juvenil es una enfermedad crónica porque se perpetua en el tiempo y suele acompañarse de trastornos metabólicos como la hipercolesterolemia y resistencia a la insulina, que determinan a futuro un mayor riesgo de desarrollar Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2), hipertensión arterial y arteriosclerosis, así como muerte prematura por enfermedades cardiovasculares isquémicas y algunos tipos de cáncer (Burrows, 2007). Estudios en adultos han demostrado que cambios en el estilo de vida que llevan a pérdida de peso mejoran la resistencia a la insulina y previenen la diabetes (Tuomilehto et al., 2001). Esta contribución de la modificación en los estilos de vida no ha sido suficientemente estudiada en niños y adolescentes. Sin embargo, se sabe que los hábitos familiares muy arraigados son difíciles de reemplazar por otros más saludables, si no se involucra a la familia en el tratamiento del sobrepeso (Domínguez-Vásquez et al., 2008).

Según Farías y colaboradores (2011) el riesgo de desarrollar obesidad aumenta con un estilo de vida occidentalizado el cual implica el consumo de comida rica en carbohidratos y grasas en conjunto con un sedentarismo marcado, conductas que se están arraigando fuertemente en la sociedad chilena.

4. Etiología y fisiopatología de la obesidad

Debido a la gran relevancia como problema de salud a nivel mundial, resulta imperioso conocer los principales factores ambientales y socioculturales asociados al desarrollo de obesidad. De igual forma, se hace necesario evaluar los desórdenes orgánicos originados a partir de la alteración de los mecanismos fisiológicos que controlan el equilibrio energético en nuestro organismo y que, en definitiva, son responsables del desarrollo de la obesidad. Todo esto con el fin de comprender los mecanismos involucrados en la regulación del balance energético que permiten la instauración de esta patología (Boguszewski et al., 2010; González, 2013).

La comprensión actual de la genética y la biología molecular nos permite considerar la etiopatogenia de la obesidad como un fenómeno bastante complejo. En este sentido, la teoría de un aumento sostenido en el consumo de calorías, asociado con la deficiencia en el gasto de energía es excesivamente simplista, ya que la obesidad tiene un origen muy heterogéneo e involucra una gran variedad de factores genéticos y nutricionales que se relacionan con su desarrollo (Lumeng, 2011).

Investigaciones realizadas en los últimos años han revolucionado la comprensión de los mecanismos fisiológicos y moleculares que regulan el peso del organismo. Así, el descubrimiento de la leptina, su receptor, el receptor de melanocortina, así como el hallazgo de la acción de algunos mediadores hormonales implicados en el mantenimiento del peso corporal, ha contribuido a una mejor comprensión de los procesos fisiológicos implicados en el desarrollo de la obesidad (Boguszewski et al., 2010). También, datos experimentales y clínicos sugieren que el tejido adiposo de individuos obesos presenta un estado inflamatorio

crónico persistente de bajo grado que provoca efectos sistémicos adversos. (Shoelson, 2007; Lumeng, 2011).

4.1 Factores genéticos

La obesidad se debe a una constante y compleja interacción entre genes predisponentes y los estímulos ambientales. Muchas investigaciones sugieren que el desarrollo de la obesidad puede tener su origen en las primeras etapas de la vida, es decir, durante el período fetal. De acuerdo con esto, un mecanismo de programación se activará durante el período fetal debido a diversos factores como los nutricionales, hormonales, físicos y psicológicos que actuarían en ciertos períodos críticos de la vida para modificar algunos mecanismos fisiológicos.

La presencia en el mismo núcleo familiar de uno o varios miembros con obesidad severa, ha sugerido la probable implicancia de los factores genéticos en la ocurrencia de esta condición desde una temprana edad. Por lo tanto, se ha demostrado un aumento siete veces mayor riesgo de sufrir obesidad extrema (IMC > 45) cuando uno de los padres es obeso (Doo M. y Kim Y., 2015).

Múltiples estudios de las familias, y los gemelos adoptados sugieren que los factores genéticos representaron el 45 a 75% entre las variaciones individuales en el IMC (Sharma A. y Padwal R., 2010). En un estudio de gemelos suecos, las correlaciones para el IMC fueron 0,70 para los hombres y 0,66 para las mujeres entre los gemelos idénticos criados por separado (Stunkard A. et al., 1986). En Corea, la heredabilidad del IMC fue de 82% para los hombres y 87% para las mujeres en los gemelos adolescentes (Hur Y., 2007) y la heredabilidad de la masa grasa corporal fue de 45% con un fuerte componente familiar (Cho E. et al., 2001).

En cuanto el patrón de distribución de grasa corporal, la heredabilidad estimada oscila entre 28% a 61% para la relación cintura/cadera, y del 29% al 82% para la circunferencia abdominal (Fernández R., 2013).

De acuerdo con la séptima revisión del mapa de la obesidad humana (Pérusse et al., 2005), utilizando datos recogidos hasta el año 2005, sumado a estudios realizados por Ichahara y Yamada en el 2008 (Ichahara S et al., 2008), se han reportado 47 casos de obesidad monogénica, 24 casos de cambios mendelianos y 115 diferentes *loci* susceptibles de estar implicados en la obesidad poligénica. En este sentido, el mapa de la obesidad sugiere que, excepto en el cromosoma Y, todos los cromosomas tienen genes con una implicancia potencial en la aparición y desarrollo de la obesidad. Hoy en día, basada en los resultados de los 222 estudios realizados sobre los genes y la obesidad, hay evidencia científica suficiente disponible para identificar 71 genes como posibles inductores de la ocurrencia de obesidad. Si también son consideradas regiones cromosómicas, este número aumenta a más de 200 genes. Quince de estos genes están estrechamente asociado con volumen de grasa corporal. Uno de los genes descubiertos que posee implicancia potencial en el desarrollo de la obesidad a una edad temprana es el gen FTO (Cecil J. et al., 2008). Este gen se considera que induce el aumento de peso progresivo en sujetos en los que es sobreexpresado. Su expresión es generalmente mayor en las áreas hipotalámicas involucradas en los procesos de alimentación. También se ha observado que en el caso de privación aguda de alimentos, la expresión de este gen se modifica, lo que sugiere su potencial interrelación en el nivel de apetito y la sensación de saciedad. Por lo tanto, los datos de un estudio realizado en niños demostró que existe una estrecha relación entre la sensación de

saciedad reportado por los niños y el grado de la expresión génica. Así, los niños que poseen dos alelos de riesgo mostraron una respuesta a la saciedad significativamente menor (Cecil J. et al., 2008).

Por otra parte, las mutaciones en algunos genes humanos responsable de la aparición de los efectos pleiotrópicos asociado con condiciones obesidad mórbida como una manifestación clínica se han conocido desde la década de los 80. Uno de estas mutaciones es conocida como el síndrome de Prader Willi, que es un trastorno autosómico dominante. El setenta por ciento de los pacientes con este síndrome presentan anomalías en numerosos genes localizados entorno al cromosoma 15 del padre. Clínicamente, este síndrome se caracteriza en niños por la aparición de obesidad, hipotonía muscular, retardo mental, hipogonadismo, criptorquidia y baja altura asociada a manos y pies pequeños. En algunos casos, este síndrome es frecuentemente asociado a la presencia de DM2, cetogénesis e hiperglicemia. Este síndrome representa unos de los más prevalentes ejemplos de obesidad dismórfica en humanos (Ichahara S. y Yamada, 2008; Doo M. y Kim Y., 2015).

4.2 Cambios en los patrones de alimentación y actividad física

En el mundo occidental, el advenimiento de la biotecnología de los alimentos tiene garantizado el consumo de cualquier tipo de alimento durante todo el año. Esto, combinado con un acceso casi ilimitado a la alimentación de una gran parte de la población, ha dado lugar a una serie de cambios en la dieta habitual de los individuos. Por lo tanto, se ha producido un aumento en el consumo de alimentos de origen animal y las bebidas carbonatadas, que proporcionar 20 a un 30 % de la

ingesta total de energía diaria. Cavadini et al. (2000), señaló que la sobrealimentación de los niños, niñas y adolescentes por estos productos como jugos de frutas es un elemento central que explica el exceso de acumulación de grasa corporal. González-Jiménez en el 2010, sugiere que las calorías totales, composición de los alimentos, palatabilidad, y la variedad, el tamaño y el número de comidas diarias también son factores estrechamente relacionados con la obesidad.

La obesidad puede ser el resultado de un mayor consumo de grasas en la dieta y los alimentos de calóricos ricos en azúcares (Amato R., 2010; Hinney et al., 2010; Reedy J. y Krebs-Smith, 2010). Por otro lado, algunos estudios han demostrado que las dietas o alimentos que controlan el apetito (tales como verduras, frutas y granos enteros) fueron inversamente relacionados con la prevalencia de la obesidad (Deram y Villares, 2009; Giske et al., 2011). Esto es probablemente debido a la densidad de energía diluida en la dieta, la absorción incompleta, y un aumento de saciedad a través de vaciado gástrico retardado del alimento consumido (Doo y Kim, 2015). Además, los patrones de dieta que alteran la regulación de la ingesta de energía alimentaria, tales como: saltarse una comida, el consumo de “snacks”, comer fuera de casa, también fueron asociados con la obesidad (Giske et al., 2011). Sin embargo, el consumo de dietas bajas en energía mostró ser insostenibles en el mantenimiento de la pérdida de peso a largo plazo en individuos obesos (Summerbell y Glasziou, 2008). El rol del consumo de frutas y hortalizas en el peso corporal, como un indicador de la obesidad, no es claro (Alinia et al., 2009). Curiosamente, el efecto de la composición o tipo de dieta sobre la obesidad tuvo resultados disímiles entre los individuos. Por ejemplo, algunos individuos eran hiper-sensibles a las dietas benéficas (como las dietas o alimentos

con que regulan y controlan apetito y las dietas de bajo consumo de grasa) y mantenían pesos corporales saludables. Otros grupos eran más propensos para aumentar de peso con las dietas similares (Deram y Villares, 2009).

La evidencia científica muestra que la escasa actividad física (AF) y los hábitos sedentarios en la adolescencia, tienden a perpetuarse en la edad adulta. Por ello, puede caracterizarse la adolescencia como el período en que se puede establecer un estilo de vida sedentario y poco saludable. Ver la televisión, jugar video juegos, estar en el computador por espacios prolongados de tiempo ha sido señalado como una de las causas importantes de desarrollo de obesidad (Guerra-Cabrera, 2009) y enfermedad cardiovascular en niños y adolescentes. (Nelson, 2009)

4.3 Indicadores morfométricos de obesidad en humanos

Sabemos que diversos factores favorecen un balance positivo de energía que conlleva un aumento de masa grasa, por ende de peso corporal, que se mantiene en el tiempo. (Bray y Bouchard, 2008; Prieto-Hontoria et al., 2011). Es este incremento excesivo de peso a expensas de grasa corporal lo que caracteriza a la obesidad. Sin embargo, un exceso de peso no necesariamente indica obesidad, ya que éste puede deberse a diversas causas como masa muscular elevada, embarazo, o relacionarse con algunas patologías como la insuficiencia cardiaca en las que se retiene gran cantidad de líquido (Barbany y Foz, 2002).

En este sentido, el concepto de obesidad ha sufrido diversas interpretaciones en los últimos años. En la actualidad también se define la obesidad como el resultado de un desequilibrio entre la ingesta de la energía y el gasto energético

mantenido en el tiempo, ocasionando tanto un incremento del número de adipocitos como en su volumen y posiblemente también con modificaciones funcionales en su metabolismo. (Moreno, 2013)

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define como obesidad cuando el índice de masa corporal (IMC) es igual o superior a 30 kg/m². Dicho índice es utilizado por la mayoría de los estudios epidemiológicos, y está recomendado por diversas sociedades médicas y organizaciones de salud internacionales para su uso clínico, dada su reproducibilidad y fácil utilización (Moreno, 2013).

Un reciente estudio de investigadores de la Clínica Universidad de Navarra muestra que la evaluación única del IMC como índice de clasificación de la población en sujetos obesos o con sobrepeso frente a la normalidad puede llevar a error. Así, dicho estudio mostró que el 29% de las personas que según el IMC son normo peso, ofrecen realmente un porcentaje de grasa corporal propio de una persona obesa y que un 80% de las personas que según el mismo índice, presentan sobrepeso, realmente son obesas. Para llegar a dichas conclusiones se utilizó la pletismografía por desplazamiento de aire, que se realiza mediante el equipo llamado BOP-POD (Moreno, 2013).

Otros criterios para la clasificación de la obesidad son los siguientes:

I. **Criterio celular:** según el número y tamaño de los adipocitos (Moreno et al., 2002):

- **Hiperplásica:** Si se debe a un aumento del número de células. Este tipo de obesidad suele aparecer en épocas de crecimiento, considerándose responsable de la obesidad infantil y del adolescente.

- Hipertrófica: Si lo que se produce es un aumento del tamaño celular, en particular de los adipocitos, siendo este tipo de obesidad el principal responsable de la obesidad en el adulto.

II. **Criterio anatómico**: según la cantidad así como la localización predominante de los depósitos grasos. De esta forma se pueden distinguir al menos tres tipos diferenciados de obesidad (Bouchard et al. ,1998).

- Obesidad difusa o de clase I: caracterizada por el exceso de grasa corporal total sin que se produzca una concentración específica de tejido adiposo en alguna región corporal.

- Obesidad central o de clase II: también denominada obesidad “androide” por considerarse típica de varones y caracterizada por el exceso de grasa subcutánea en la región abdominal (tipo manzana) y en el tronco. Es una obesidad fundamentalmente hipertrófica, la grasa es visceral y altamente sensible a la lipólisis inducida por catecolaminas. Esta obesidad suele asociarse a intolerancia a la glucosa, hipertrigliceridemia, diabetes mellitus tipo 2, hipertensión y enfermedad arterial coronaria.

- Obesidad glúteo-femoral o de clase III: también denominada obesidad “ginoide”, típica de mujeres, se caracteriza porque la grasa se localiza preferentemente en la región glúteo femoral (tipo pera). Es una obesidad hiperplásica y poco sensible a la lipólisis. Suele asociarse a litiasis biliar, tromboflebitis e hiperinsulinemia.

4.4 Tejido adiposo

Dada la creciente prevalencia de obesidad en el mundo, el tejido adiposo ha sido objeto de mucho interés en la investigación; así, con el objetivo de combatir las graves complicaciones de la obesidad de manera efectiva el estudio del metabolismo y funcionalidad del tejido adiposo se ha tomado en cuenta como diana en la resolución de ésta epidemia.

En roedores, así como en el resto de los mamíferos, el tejido adiposo se encuentra distribuido en distintas localizaciones en el organismo (Figura 3). Éstos depósitos se encuentran principalmente a nivel subcutáneo, mediastínico, mesentérica, perigonadal, perirrenal y retroperitoneal (Smorlesi et al., 2012).

El tejido adiposo fue considerado durante muchos años un tejido inerte sin excesivo interés metabólico, que almacenaba grasa de modo pasivo, proporcionando aislamiento contra la pérdida de calor y funcionando como soporte mecánico en ciertas regiones del cuerpo, protegiendo y manteniendo en su lugar los órganos internos así como a otras estructuras más externas del cuerpo (Gomez-Ambrosi et al., 2001; Prieto-Hontoria et al., 2011).

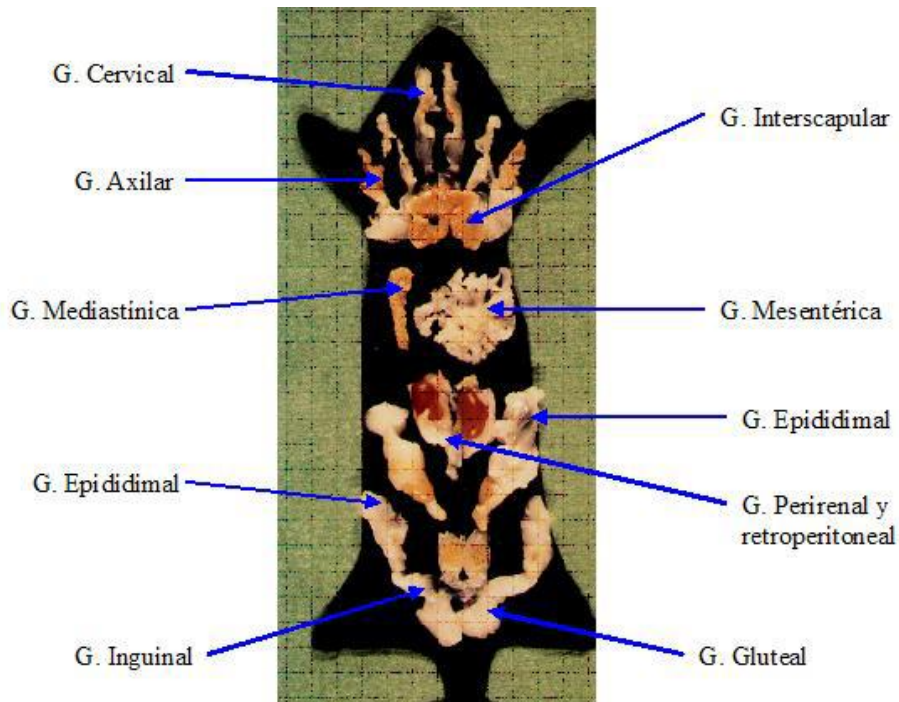


Figura 3. Distribución del tejido adiposo en ratones. (Moreno, 2013)

Afortunadamente en la actualidad el interés por el tejido adiposo ha aumentado considerablemente, superando el concepto clásico y básico de éste tejido, considerándolo más que una mera célula reservorio.

Se distinguen dos grandes tipos de tejido adiposo, el tejido adiposo blanco y el tejido adiposo pardo o marrón. Ambos tienen capacidad de metabolizar y almacenar lípidos, sin embargo sus funciones, morfología y distribución son muy distintas.

Adipocitos blancos y pardos tienen una morfología diferente y funciones opuestas, pero estudios anatómicos han demostrado que ambos tipos están contenidos en forma conjunta en varios lugares. Pequeños depósitos se encuentran ubicados en el espacio subcutáneo (depósitos subcutáneos) o muy cercano y rodeando los órganos del tronco (depósitos viscerales). Distintas barreras

anatómicas delimitan los depósitos grasos. Así, los tejidos adiposos subcutáneos son delimitados por una capsula de tejido conectivo mientras que los depósitos viscerales están delimitados por láminas peritoneales. La excepción corresponde al depósito mediastínico que rodea el corazón y la aorta que es continuo junto al tejido adiposo subcutáneo que rodea las arterias carótida y subclavia. Cada depósito adiposo se asocia a pedúnculos neuro-vasculares como lo hacen otros órganos (Smorlesi et al., 2012).

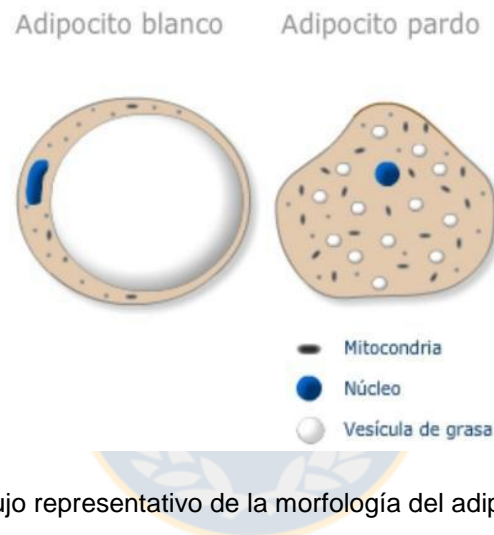


Figura 4. Dibujo representativo de la morfología del adipocito blanco y pardo.

El tejido adiposo blanco (TAB) es el órgano específico que almacena la energía sobrante en forma de grasa, siendo capaz de proveer energía en forma de ácidos grasos y glicerol en periodos de balance energético negativo. Es el tejido adiposo mayoritario. Está extensamente distribuido por todo el cuerpo y es el principal lugar de reserva energética (Fantuzzi, 2005). El TAB contiene varios tipos celulares como son: adipocitos, pre adipocitos, fibroblastos, células endoteliales de los vasos sanguíneos y macrófagos (Clement et al., 2004).

Los adipocitos blancos almacenan los triglicéridos (TG) en una única gran gota lipídica que ocupa prácticamente la totalidad de su citoplasma. En situaciones que requieren gasto de energía, los TG son rápidamente hidrolizados por lipasas en un proceso denominado lipólisis y los ácidos grasos obtenidos son transportados por la sangre hacia otros tejidos donde serán oxidados en las mitocondrias como fuente de energía (Guilherme et al., 2008).

Una concentración excesivamente alta de ácidos grasos libres en el plasma tiene consecuencias muy adversas para la salud. Por este motivo, el papel regulador del TAB es esencial para la coordinación del metabolismo de los lípidos y la glucosa y la salud del organismo (González-Pérez, 2009)

Normalmente el TAB corresponde entre el 10 al 20% del peso corporal en los hombres y del 20 al 30% en las mujeres, lo que garantiza la reserva energética para dos meses. No obstante, el contenido del TAB es altamente variable a lo largo de la vida del individuo en función de múltiples factores, siendo TAB el único órgano con un potencial ilimitado de crecimiento a cualquier edad del individuo. El crecimiento del TAB puede ser de tipo hipertrófico y reversible, por aumento de la cantidad de TG almacenados en los adipocitos, o hiperplásico e irreversible, por aumento del número de adipocitos. En las personas adultas, prácticamente todo el tejido adiposo es blanco, por tanto, al hablar de tejido adiposo se está haciendo referencia al TAB.

La formación del tejido adiposo blanco se inicia antes del nacimiento, sin embargo esto puede variar entre especies. La mayor expansión del mismo tiene lugar rápidamente después del nacimiento, pero su desarrollo es un proceso continuo a lo largo de la vida. Es bien conocida la capacidad de generar nuevas células grasas en respuesta a dietas con alto contenido de carbohidratos y grasa.

Sin embargo, la nueva adquisición de éstas células grasas parece ser un proceso irreversible (Jacobi D. y Stanya K., 2012).

Teniendo en cuenta la localización de los depósitos de tejido adiposo y las características funcionales de los adipocitos que los integran, el TAB se sub divide, a grandes rasgos, en subcutáneo y visceral.

- Subcutáneo: comprende grasa ubicada entre la dermis y los músculos.
- Visceral: está integrado por todo el tejido adiposo intraperitoneal.

Hace más de 60 años se observó que la adiposidad visceral se correlaciona con el desarrollo de desórdenes metabólicos graves como el síndrome metabólico. Al respecto, los obesos presentan una actividad secretora del tejido adiposo alterada que puede afectar al funcionamiento de distintos sistemas (Bray et al., 2002). De hecho, se ha demostrado que los niveles de citoquinas pro inflamatorias están aumentados en pacientes con mayor adiposidad visceral.

Hoy se sabe que la principal diferencia entre el tejido adiposo subcutáneo y el visceral radica en la secreción de adipocinas, las cuales tienen una implicación en la regulación fisiológica del almacenaje de grasa, adipogénesis, metabolismo energético, ingesta de alimentos y desordenes metabólicos (González-Pérez, 2009, Moreno-Aliaga et al., 2010). Esto explica por qué el aumento del tejido adiposo visceral y no de subcutáneo, se asocia mayoritariamente con estos desórdenes metabólicos (Jacobi D. y Stanya K., 2012).

Independiente de su clasificación, los desórdenes clínicos asociados con la obesidad se generan como consecuencia directa o secundaria al aumento de la masa grasa total en el individuo.

4.5 Glicemia

La glucosa es el sustrato metabólico clave para la producción de energía tisular. Los niveles normales de glucosa en sangre, o glicemia, se mantienen en un estrecho rango gracias a factores que controlan la producción y la utilización de ésta. Las hormonas clave que regulan la homeostasis de la glucosa incluyen la insulina, glucagón, adrenalina, noradrenalina, cortisol y hormona del crecimiento (Güemes, et al., 2015).

La concentración de glucosa en sangre se encuentra en función de la tasa de entrada de glucosa a la circulación equilibrada por la tasa de eliminación de glucosa. La glucosa circulante deriva de tres fuentes: la absorción intestinal durante la alimentación, la glucogenolisis y la gluconeogénesis (Güemes, et al., 2015).

El principal determinante de la rapidez con la que la glucosa aparece en la circulación durante la alimentación es la velocidad del vaciado gástrico. Otras fuentes de glucosa circulante son derivadas principalmente de los procesos hepáticos: la glucogenolisis, que corresponde a la metabolización del glucógeno, forma en la cual se almacena la glucosa en el hígado y en menor proporción en músculos; y la gluconeogénesis, que forma glucosa principalmente a partir de ácidos de lactato y aminoácidos durante el estado de ayuno. Glucogenolisis y la gluconeogénesis están bajo el control del glucagón, una hormona producida en el páncreas. Durante las primeras 8-12 horas de ayuno, glucogenolisis es el principal mecanismo que permite la disponibilidad de glucosa circulante. El glucagón facilita este proceso y, por lo tanto, promueve la aparición de glucosa en la circulación.

Durante los períodos de ayuno prolongados, la glucosa es producida vía gluconeogénesis (Nilsson et al., 2012).

Las hormonas gluco-reguladoras incluyen insulina, glucagón, amilina, GLP-1, péptido insulínico dependiente de la glucosa (GIP), epinefrina, cortisol y hormona de crecimiento. De éstos, la insulina y amilina junto al glucagón son producidas por las células pancreáticas. GLP-1 y GIP son producidas por las células L del intestino. Estas hormonas gluco-reguladoras permiten mantener las concentraciones circulantes de glucosa en un intervalo relativamente estrecho.

En el modelo bi-hormonal de la homeostasis de la glucosa, la insulina es la hormona reguladora clave en la disminución de la glucosa circulante y el glucagón un importante regulador de la aparición en circulación de la glucosa (Nathan, 2015).

Después de alcanzar un pico después del consumo de comidas, la glucosa en sangre disminuye lentamente durante las siguientes horas, volviendo a los niveles de ayuno. En estas condiciones la glucosa se dirige al músculo esquelético y tejido adiposo impulsada principalmente por insulina. Al mismo tiempo, la producción endógena de glucosa se suprime por 1) la acción directa de insulina, a través de la vena porta, en el hígado, y 2) el efecto paracrino de la insulina dentro del páncreas, lo que resulta en la supresión del glucagón (Nilsson et al., 2012).

La glicemia es un parámetro de rutina usado para la evaluación de diversas patologías, entre ellas la diabetes mellitus. Los métodos enzimáticos utilizados para su cuantificación no han cambiado de forma importante en los últimos años, sumándose los sistemas portátiles de medición de glucosa basados en métodos de

química seca (glucómetro portátil), dos técnicas esenciales para la evaluación continua de pacientes, sobre todo diabéticos (Nathan, 2015). La glicemia basal (o en ayuno) en humanos está establecida en el rango 70 – 99 mg/dL.

4.6 Insulina y Resistencia a la Insulina

4.6.1 Insulina

La insulina es una hormona producida por las células beta pancreáticas que es clave para la regulación de la homeostasis de la glucosa. Así, es la responsable de mantener la normoglicemia (cantidad normal de glucosa en sangre) mediante un equilibrio entre su acción en los tejidos y su secreción desde el páncreas (Bowe J. et al., 2014). La insulina disminuye las concentraciones de glucosa en sangre y la actividad gluconeogénica y la lisis de glucógeno en el hígado. También favorece la síntesis de triglicéridos en el hígado y en el tejido adiposo.

La secreción de insulina se estimula por la presencia de glucosa en sangre que es captada por el receptor Glut2 del páncreas (Lacy P. et al., 1975; Rorsman y Renstrom, 2003) y, tras varios procesos, se oxida en el ciclo de Krebs, produciendo ATP. Esto desencadena el cierre de los canales de K⁺ sensibles a ATP, induciendo una despolarización de la membrana de las células beta

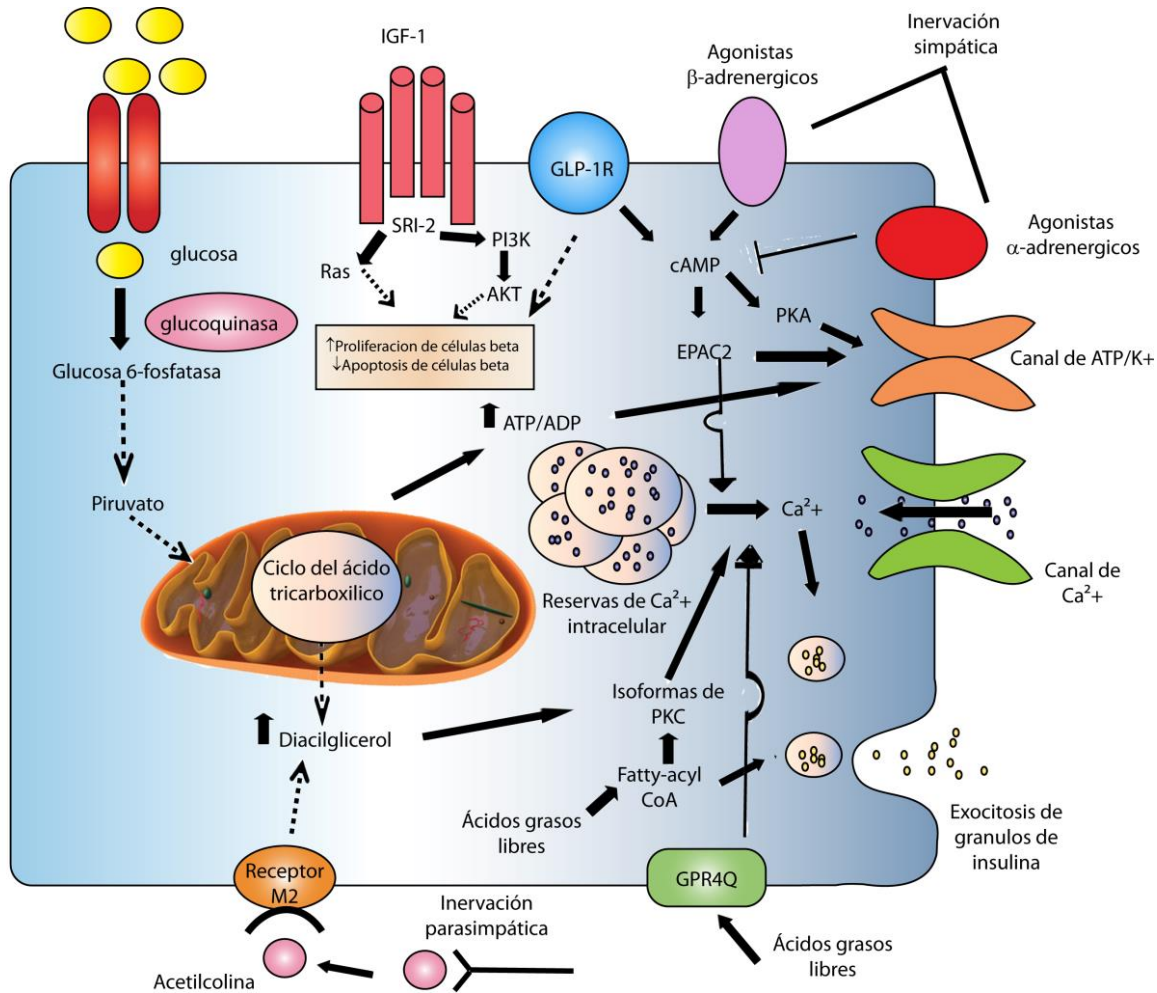


Figura 5: Secreción de insulina en células beta pancreáticas. La secreción de insulina es producida por estímulo de glucosa, el cual induce a un aumento en la relación ATP/ADP. Este cambio produce el cierre de canales de K⁺ + ATP, la despolarización de la membrana plasmática, el aumento de las concentraciones de calcio citoplasmáticas y la exocitosis de los gránulos que contienen insulina. Si se incrementa la demanda de insulina, el metabolismo de la glucosa en las células beta puede ser mejorada por el aumento de actividad de la enzima glucoquinasa y por la reposición de los productos intermedios del ciclo del ácido tricarboxílico. A su vez los aumentos en los niveles de citrato inducido por glucosa, conducen a un aumento de cantidades de malonil CoA, que a través de la inhibición de la carnitina palmitoil transferasa 1 (CPT-1) conducen a un aumento de los niveles de Acil CoA, de diacilglicerol (DAG) y de la señalización a través de la proteína quinasa C (PKC) . Los ácidos grasos también participan de la liberación de insulina a través de los receptores acoplados a proteínas G , GPR40 o a través del metabolismo de Fatty-acil CoA y la estimulación de la exocitosis de insulina. También se ha descrito que GLP - 1 potencia la liberación de insulina estimulada por glucosa a través de su receptor acoplado a proteínas -G por medio de mecanismos que incluyen la estimulación de la proteína quinasa A (PKA) y el factor de intercambio de nucleótidos de guanina EPAC2. Del mismo modo, la liberación de acetilcolina desde las terminaciones nerviosas parasimpáticas activa el receptor muscarínico M2 , estimulando la liberación de insulina dependiente de DAG y PKC. A su vez, la masa de células beta puede ser regulada positivamente por el receptor IGF-1, en el que el SRI-2 se fosforila y activa una cascada de moléculas, incluyendo PI3K , AKT y Ras , lo que resulta en una mejor supervivencia de las células beta. Por último, receptor GLP-1 (GLP-1R) puede incrementar de manera similar la supervivencia de las células beta e inhibir la apoptosis de las mismas a través de varias vías, incluyendo la transactivación del receptor del factor de crecimiento epidérmico y la vía del SRI-2.

pancreáticas que permite la entrada de Ca^{2+} a la célula y la posterior fusión de los gránulos de insulina acumulados en el citoplasma a la membrana plasmática, logrando finalmente su liberación a circulación (Rorsman y Renstrom, 2003). (Figura 5).

La insulina, tras la unión a su receptor en los distintos tejidos, induce una serie de eventos que lleva a la translocación del transportador de glucosa GLUT4 a la membrana (Figuras 5 y 6).

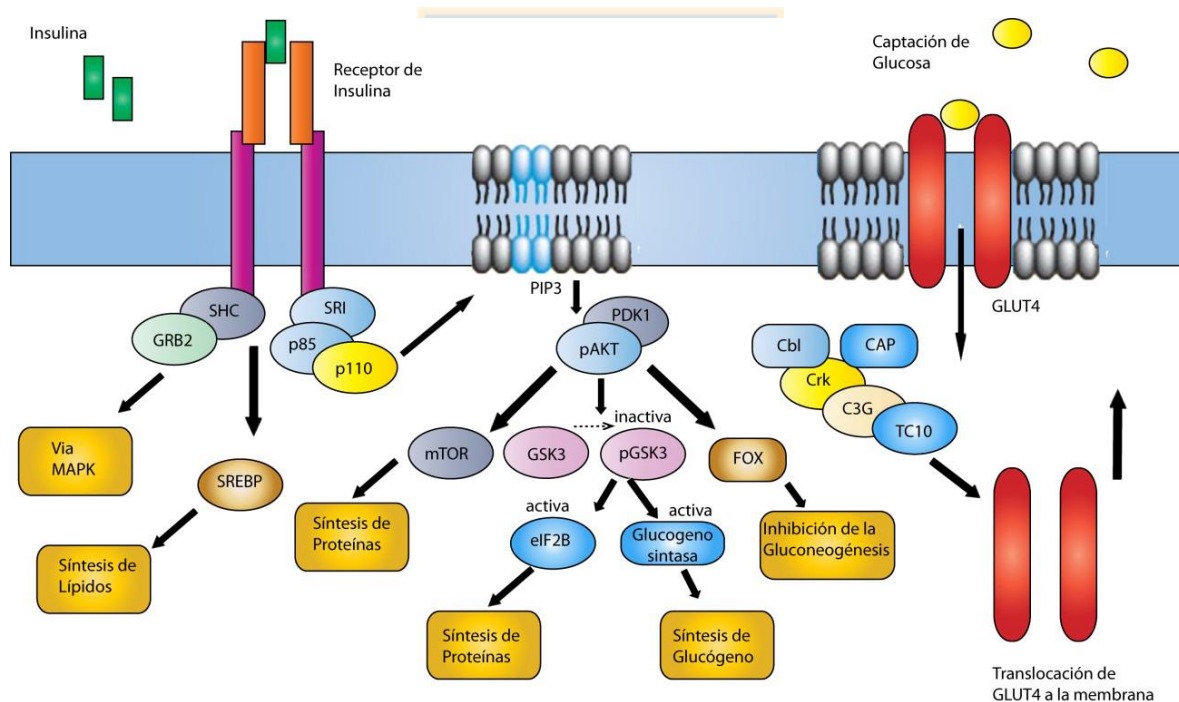


Figura 6. Vías de señalización de la insulina. La activación del receptor de insulina induce al aumento de la transcripción de SREBP y a la fosforilación de miembros de la familia del SRI, SHC y Cbl. Tras la fosforilación de tirosinas, estas proteínas interactúan con moléculas de señalización a través de sus dominios SH2, lo que resulta en la activación de una variedad de vías de señalización, incluyendo a la PI3K, las MAPK y la activación del complejo Cbl/CAP. Estas vías actúan de forma coordinada para regular el metabolismo de la glucosa, lípidos y proteínas.

El receptor de insulina (RI) es un heterotetrámero unido a membrana que posee dos subunidades alfa y dos subunidades beta. La unión de la insulina a las subunidades alfa permite un cambio conformacional que activa la autofosforilación del receptor y la fosforilación de otras proteínas como los sustratos de receptores de insulina (SRI), SHC y Cbl. Estas, tras la fosforilación de sus tirosinas, actúan como sitios de unión a proteínas con dominios SH2, como la PI3K, Grb-2 y SHP-2, produciendo un amplio número de respuestas que van desde la translocación de Glut4 a la membrana a la síntesis de proteínas, lípidos y glucógeno, así como la regulación de la expresión de genes (White M., 1997; Chang L. et al., 2004; Mouio D. y Newgard C., 2008). Por un lado, la fosforilación de SRI y SHC induce la unión de Grb2 a los motivos fosforilados logrando así su activación. Grb2 activa al factor intercambiador de guanina RAS que está en la membrana plasmática activando ésta, a su vez, a una enzima serina/treonina quinasa que termina en la activación de la cascada de Raf/MEK/ERK (White M., 1997).

Por otro lado, el SRI también recluta a la membrana a PI3K, la cual cataliza la conversión de fosfatidilinositol(4,5)P2 (PIP2) a fosfatidilinositol(3,4,5)P3 (PIP3). El aumento de PIP3 en la membrana celular resulta en el reclutamiento de proteínas con dominio PH, como AKT o PDK1, a dicha membrana (Mouio D. y Newgard C., 2008; Pessin J. y Saltiel A., 2000). AKT es fosforilada por PDK1 en su residuo treonina 308 y por mTORC2 en el residuo serina 473. Una vez fosforilada, AKT se activa y fosforila a la proteína glicógeno sintasa-3 inactivándola y a AS160 RAB-GTPasa que interacciona con RAB10 y permite la translocación de Glut4 a la membrana (Mouio D. y Newgard C., 2008; Pessin J. y Saltiel A., 2000). La

finalización de esta señalización está a cargo de la proteína tirosina-fosfatasa IB (PTP1B), PTEN y SHIP2, las cuales inactivan los productos lipídicos de PI3K (Chang L. et al., 2004).

4.6.2 Resistencia a la insulina

La resistencia a la insulina se define como una condición caracterizada por una menor actividad biológica de esta hormona. Esta menor actividad se expresa en sus diferentes acciones metabólicas, siendo la más evidente el desajuste en el metabolismo de la glucosa que se manifiesta en órganos y tejidos como el hígado, tejido adiposo y muscular así como también en el endotelio (James D. y Piper R., 1994).

En un estado de resistencia a la insulina, las vías de señalización no responden apropiadamente. Por ejemplo, los efectos de la fosforilización de IRS son ahora opuestos por la acción de de-fosforilación de los residuos de tirosina por proteínas tirosina fosfatasas y por la fosforilación en residuos serina y treonina del IRS, lo que reduce su habilidad para actuar como sustrato del receptor de insulina, impidiendo así la señalización posterior. Entre los estímulos que promueven la fosforilación de serina-treoninas en SRI1 y SRI2 están: los ácidos grasos libres, el diacilglicerol, la glucosa y las cerámidas (James D. y Piper R., 1994), los cuales inducen la fosforilación de SRI1 y SRI2 por diversas proteínas como, mTORC1-S6K1, IKK, ROCK1, PI3K-AKT, ERK1/2 y las estrés quinasas JNK y p38 (Danielsson et al., 2009; Archuleta et al., 2009).

En cuanto a las proteínas fosfatasas implicadas en la defosforilación de la tirosina del receptor de insulina y que permiten la regulación negativa de la señalización de insulina, se encuentran la tirosina fosfatasa PTP1B, la tirosina fosfatasa transmembrana LAR, la proteína tirosina fosfatasa con dominio SH2 que contiene PTPasa-2 (SHP-2) y la fosfatasa relacionada con antígeno leucocitario (LRP) (Archuleta et al., 2009).

La cantidad de SRI y RI también puede ser regulada por degradación en la que participan las proteínas de la familia SOCS a través de la vía de ubiquitina-proteasoma (Lu X., et al., 2013). (Figura 7)

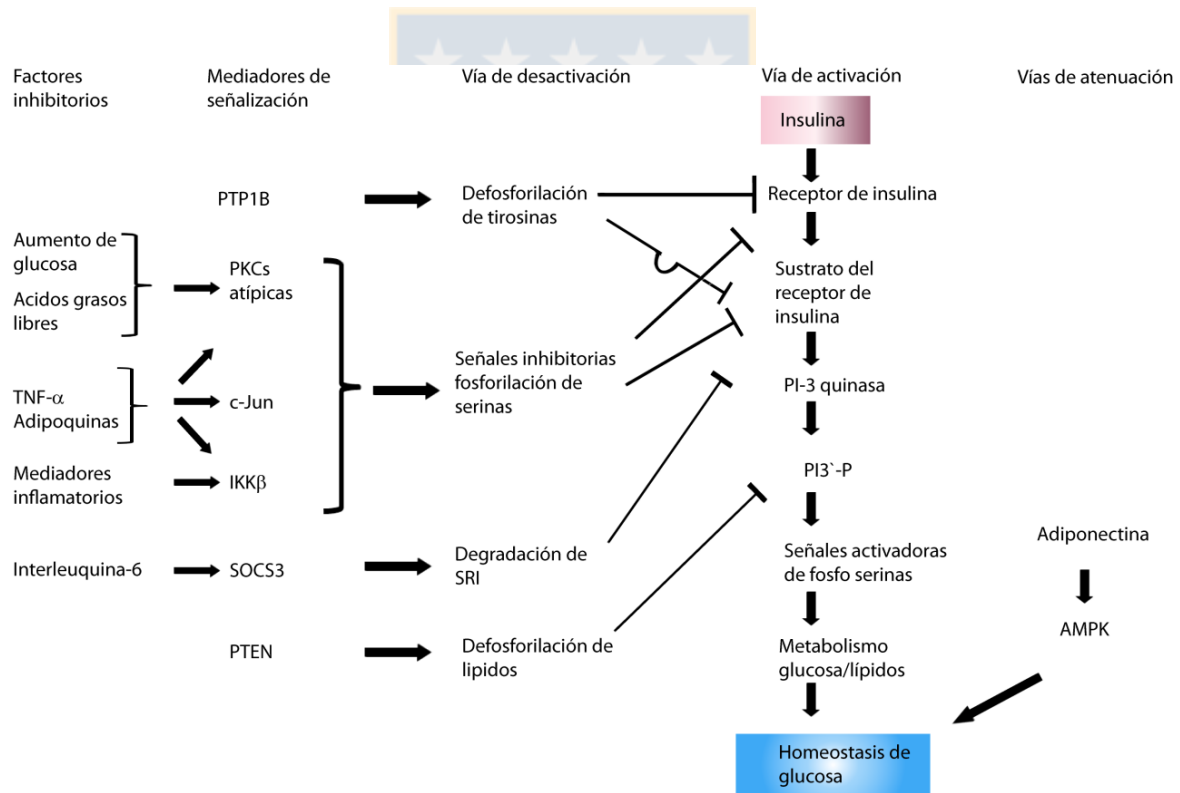


Figura 7. Señalización de la insulina y resistencia a la insulina. La insulina al unirse a su receptor es seguida por una cascada de eventos intracelulares, representado como las vías de activación. La modulación negativa de la acción de la insulina puede producir la resistencia a la insulina, esta modulación puede ser en parte por factores de transcripción, que participan en las vías de desactivación (tirosinas fosfatasas, serina quinatas, fosfatasas y lípidos) o a las acciones inhibitorias sobre la señalización de insulina (las vías de activación). A su vez, la adiponectina tiene una función en el metabolismo de la glucosa al mejorar de una forma distinta la señalización de insulina. Adaptado de Stumvoll et al. (2005).

La obesidad juega un papel importante en la insulino resistencia. Considerando a la obesidad como un proceso pro inflamatorio, que provoca cantidades importantes de radicales libres que desencadenaran el incremento del estrés oxidativo, lo que trae como consecuencia la interrupción de las señales de la traducción de la insulina, teniendo como consecuencia la resistencia a la insulina. Esta relación no solo sugiere una relación con el grado de obesidad, si no que se establece una relación de acuerdo de la distribución del tejido adiposo. La mayor relación entre ambos se hace con el tejido adiposo visceral (TAV) ubicado en el interior del tórax, abdomen y pelvis. El TAV aumentado, posee un mayor riesgo de padecer alguna enfermedad metabólica, y este tejido daría inicio a la IR debido al elevado flujo de ácidos grasos libres (AGL) tanto en el sistema portal como en la circulación general tiene efectos sobre la captación de glucosa a nivel celular y en el metabolismo glucídico intracelular. Las grasas viscerales tienen características metabólicas que las hacen más lipolíticas y más resistentes a efectos antilipolíticos de la insulina. Esto produce que el hígado reciba una mayor cantidad de AGL provenientes del TAV, por otro lado el mayor flujo AGL al hígado estimula síntesis de triglicéridos, con un aumento en la secreción de lipoproteínas de muy baja densidad. También, se conoce que la grasa interfiere con la unión de la insulina con su receptor hepático (Verdugo M., 2013).

4.7 Leptina

En el año 1994 la revista *Nature* publica el artículo “Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue”, debido al grupo liderado por J. Friedman de la Rockefeller University (Zhang Y. et al., 1995). En esta publicación

se describe el gen *ob* en el ratón, la proteína que codifica la leptina, y el gen homólogo en el ser humano. El ratón *ob/ob* con el gen *ob* mutado y carente de leptina padece obesidad, hiperfagia, dislipemia, hiperinsulinemia y diabetes. Esta situación es reversible mediante la administración de leptina a estos animales. Las esperanzas de que este importante descubrimiento fuera útil en el tratamiento de la obesidad humana se desvanecieron pronto al descubrirse que los pacientes obesos cursan con hiperleptinemia. El descubrimiento de la leptina produjo una extraordinaria avalancha de publicaciones, una auténtica “leptinomanía”, que permitió avanzar no sólo en el conocimiento de los efectos reguladores de la leptina sobre el apetito en el ser humano, sino también en el conocimiento de su función de señal de déficit nutricional y del nivel suficiente de reservas energéticas para poner en marcha la activación del eje hipotálamo-hipófisis-gonadas en la pubertad. El descubrimiento del grupo de Friedman estimuló de forma importante la investigación en biología molecular y en genética en relación a la obesidad, lo que ha permitido aumentar nuestros conocimientos sobre la genética de la obesidad, la regulación del peso corporal y las funciones hormonales de la célula adiposa (Sadaf Farooqi I. y O’Rahilly S., 2009).

La leptina es una hormona secretada fundamentalmente en el tejido adiposo blanco y que circula en plasma en una concentración proporcional a la grasa corporal. La leptina atraviesa la barrera hematoencefálica, e interactúa con su receptor específico en el núcleo arcuato del hipotálamo, actuando como una señal indicadora de las reservas energéticas. El núcleo arcuato presenta dos tipos de poblaciones neuronales con altos niveles de expresión del receptor de leptina: las

neuronas POMC/CART, que conducen señales anorexigénicas a través de los derivados de la proopiomelanocortina (POMC), y las neuronas AGRP/NPY, que conducen señales estimuladoras de la ingesta a través del neuropéptido Y (NPY) y la proteína relacionada con Agouti (AGRP). En situaciones de niveles reducidos o inexistentes de leptina (por ejemplo, en situaciones de ayuno prolongado o en la deficiencia genética de leptina), se favorece la expresión de AGRP/NPY, lo que impulsa a una mayor ingesta de alimentos. En situaciones de exceso de leptina, se promueve la expresión de POMC, que se escinde postraduccionalmente en péptidos llamados melanocortinas (entre ellas, α -MSH y β -MSH) que actuarían como ligandos endógenos del receptor 4 de melanocortina (MC4R). Por el contrario, AGRP actuaría como un agonista inverso en este receptor, promoviendo la ingesta de alimentos (Sadaf Farooqi I. y O'Rahilly S., 2009).

Los niveles plasmáticos de leptina guardan una relación directa con la masa de tejido adiposo y el IMC. En individuos delgados sanos, la mayor parte de la leptina que circula en el plasma lo hace unida a proteínas, siendo ésta la forma más propicia para ser captada por los tejidos y desempeñar su función. Se calcula que los niveles séricos normales de leptina en personas con normopeso oscilan en el rango de 1-15 ng/ml, siendo en hombres: $8.9 \text{ ng/ml} \pm 4.8$ y en mujeres: $17.1 \text{ ng/ml} \pm 10.5$. En individuos con $\text{IMC} > 30$ se pueden encontrar valores de 30 ng/ml o superiores.

Inicialmente se creía que las acciones de la leptina eran exclusivamente centrales, pero el descubrimiento sus receptores con sus distintas isoformas (Ob-Ra, Ob-Rb, Ob-Rc, Ob-Rd, Ob-Re y Ob-Rf) en prácticamente todos los tejidos del

organismo, determinó que se le atribuyeran numerosas funciones fisiológicas (Verdugo M., 2013).

La ausencia o el mal funcionamiento de este receptor es lo que provoca el fenotipo de obesidad que presentan algunos modelos animales, incluidos los ratones *db/db* o su similar las ratas Zucker *fa/fa*. La mutación en el gen de la diabetes en el ratón *db/db* da lugar a obesidad y diabetes. Un receptor de la leptina se expresa de forma importante en el hipotálamo, y es anormal en el ratón *db/db* (C57 BL/Ks). La proteína mutante está perdida en la región citoplasmática y es defectuosa en la transducción de la señal. Esto sugiere que los efectos de la leptina sobre el descenso de peso se deben a una señal que se transduce a nivel de su receptor en el hipotálamo (Verdugo M., 2013).

Los principales efectos que se le pueden atribuir a la leptina son:

- Control del balance energético del organismo.
- La modulación del sistema inmunitario.
- El control de la reproducción y el desarrollo sexual.

En este sentido, la leptina, al ser secretada por el tejido adiposo en cantidades proporcionales a la masa del mismo, actúa como un indicador del estado de la reserva energética del organismo completo. En consecuencia, en caso de reserva abundante de energía (elevado IMC), los niveles de leptina se encuentran aumentados (Insganaitis E. y Lustig R., 2005). Este control se lleva a cabo tanto a nivel periférico como central. En el primer caso, la regulación se realiza mediante la activación de diferentes rutas, destacando la activación de la enzima 5'-AMPK. Se ha observado que la leptina es capaz de activar de forma directa e independiente

de AMP, en parte mediante estimulación simpática, la subunidad $\alpha 2$ de la AMPK en tejidos periféricos, lo que conlleva un aumento del gasto energético mediante la activación de la oxidación de glucosa y de AGL (Insganaitis E. y Lustig R., 2005).

En la regulación central de la homeostasis energética, la leptina actúa transmitiendo información acerca de la reserva energética desde el resto del organismo hasta el hipotálamo, ejerciendo la modulación del apetito. En una situación de acumulación de tejido adiposo se produce un aumento de la concentración de leptina, aportando al hipotálamo el mensaje de “abundancia” que se traduce en una reducción del apetito y un aumento de la actividad catalítica en los tejidos efectores. Por el contrario, en el caso que se produzca una reducción del nivel de leptina motivada por un ayuno de 12 horas o más, o por una pérdida de masa grasa, la señal interpretada por el hipotálamo es de escasez, lo que conduce a un aumento del apetito y a la disminución del gasto energético (Insganaitis E. y Lustig R., 2005).

Los pacientes obesos suelen presentar una leptinemia muy elevada, acompañada de un incremento de la relación leptina libre/leptina unida a proteínas que, paradójicamente, no conduce a la pérdida de peso ni ejerce control alguno sobre la ingesta o el gasto energético. Esta alteración característica de la obesidad se conoce como resistencia a la leptina. De hecho, en la obesidad los mecanismos de control del apetito que ejercen la insulina y la leptina resultan ineficaces. El sistema nervioso central se resiste a su efecto pese a que los niveles de ambas hormonas se encuentran muy elevados, lo que resulta en una percepción equivocada de escasez energética (Insganaitis E. y Lustig R., 2005). Esta resistencia se debe a la conjunción de varios mecanismos:

- A nivel central se produce una reducción del transporte de las hormonas a través de la barrera hemato-encefálica y una disminución de la señalización intracelular. Lo primero se justifica porque los transportadores de la barrera son saturables y en situación de obesidad, dados los elevados niveles de leptina e insulina, no son capaces de introducir cantidades suficientes para llevar al hipotálamo la información real de la situación energética y obtener un efecto (Morrison C., 2008).

4.8 Colesterol total

El colesterol en el organismo proviene de 3 diferentes fuentes: la síntesis endógena, la bilis y su recirculación enterohepática y una fracción aportada por la dieta. Una vez en el lumen, el colesterol es solubilizado junto con los triglicéridos (TG) y fosfolípidos en forma de micelas mixtas, gracias a los ácidos biliares. La absorción intestinal de colesterol ocurre gracias a la acción de proteínas que ingresan el colesterol al enterocito (NPC1L1, ABCG5 y G8, ACAT2 y ABCA1). Una vez que el colesterol es captado por el enterocito es mayoritariamente esterificado con ácidos grasos para formar ésteres de colesterol, en una reacción catalizada por la enzima ACAT2 (Temel R. et al., 2003). Posteriormente, dichos ésteres serán empaquetados en quilomicrones y secretados hacia la linfa, y seguirán la circulación portal hasta llegar al hígado. Además, la proteína ABCA1, que también se expresa también en enterocitos, es capaz de transportar colesterol desde el interior celular hacia las apolipoproteínas en contacto con la superficie celular. De esta forma, las

células intestinales pueden actuar como células periféricas capaces de participar en la formación de lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Temel R. et al., 2003).

La síntesis endógena de colesterol, es otra forma de aporte de colesterol y su proporción respecto de otras vías de abastecimiento depende de la composición de la dieta y de la especie animal. Así, en humanos, aproximadamente la mitad del colesterol proviene de la absorción intestinal y la otra mitad de la síntesis endógena (39), mientras que en ratones alcanza hasta el 70%.

La mayoría de los tejidos tiene la capacidad de sintetizar colesterol de *novo*, pero el principal órgano implicado en su síntesis es el hígado. El colesterol se sintetiza a partir de acetil CoA siguiendo la ruta del mevalonato. Ésta comienza con la formación de 3-hidroxi3-metilglutaril CoA (HMG CoA) a partir de acetil CoA y acetoacetil CoA. HMG CoA es posteriormente reducido a mevalonato. Este paso resulta irreversible en las vías de síntesis y está regulado por la enzima HMG CoA reductasa. Los niveles de ARNm de esta enzima se utilizan frecuentemente como indicador de la síntesis de colesterol, y esta proteína supone además la diana de las estatinas, fármacos inhibidores de la HMG CoA reductasa que constituyen la primera línea de tratamiento de la hipercolesterolemia. Luego el mevalonato se convierte a isopentenil pirofosfato, la condensación a escualeno y la ciclación final de este último a lanosterol. El lanosterol es el precursor final de colesterol (Temel R. et al., 2003).

El hígado es el órgano central encargado de la homeostasis del colesterol y supone el lugar de intersección de sus diversas rutas metabólicas. Además de la síntesis de *novo* de colesterol, el hígado es capaz de captar colesterol procedente

de quilomicrones residuales (QMr), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) y LDL por endocitosis a través del receptor de LDL (LDLR) y de la proteína relacionada con el receptor (LRP) (Herz J. y Strickland D., 2001) así como de las partículas HDL a través del receptor *scavenger* SR-B1. Una vez dentro del hepatocito, el colesterol puede convertirse en sales biliares, lo que constituye el destino final de la mayor parte del colesterol del organismo. En los humanos, unos 500 mg son transformados en sales biliares cada día. Este proceso implica la actuación de 17 enzimas diferentes, y pueden seguir dos rutas diferentes: una principal, llamada clásica o neutra, y una secundaria, denominada alternativa o ácida. La vía clásica representa aproximadamente el 75% del total de la síntesis en ratones y hasta el 90% en los humanos (Russel D., 2003).

4.9 Triglicéridos

Antes de ser absorbidos, los TG procedentes de la dieta son hidrolizados en dos grandes pasos. Por un lado, la acción mecánica de la boca y el estómago rompe los grandes agregados originales, que después serán solubilizados en micelas junto con los ácido biliares. Al mismo tiempo, los TG son digeridos por toda una serie de lipasas provenientes fundamentalmente del páncreas, descomponiéndolos en monoacilglicéridos (MAG) y ácidos grasos (Pan X. y Hussain M., 2012). Cuando las concentraciones de estos dos productos son altas, ambos pueden difundir a través de la membrana de los enterocitos. Sin embargo, también pueden ser transportadas en contra de la gradiente con la ayuda de determinadas proteínas (Su X., Abumrad N., 2009; Pan X. y Hussain M., 2012). Una vez en el interior del enterocito, los ácidos

grasos libres y los monoglicéridos se reesterifican para formar de nuevo TG, fundamentalmente, por la acción de las enzimas MGAT y DGAT (mono y diacilglicerol aciltransferasa, respectivamente) en lo que se conoce como la vía de síntesis del monoacilglicerol. Los triglicéridos serán luego conducidos hacia el retículo endoplásmico, donde tendrá lugar su empaquetamiento en quilomicrones maduros (Qm). Los Qm se sintetizan preferentemente en el intestino delgado durante el periodo postprandial. Son partículas muy ricas en TG (80-95% de la composición total). El ensamblaje de los Qm comienza en el retículo endoplásmico mediante la unión entre la proteína apoB48 y los lípidos que le cede la denominada proteína microsomal transportadora de triglicéridos (MTP). A medida que la apoB48 va uniéndose a más lípidos se va separando de la membrana del retículo endoplásmico, conformando lo que se denomina una “partícula primordial”, que contiene lípidos neutros en su núcleo y que posteriormente irá aumentando de tamaño mediante la adición de nuevos lípidos por parte de la MTP o por la fusión directa de vesículas lipídicas preformadas. Una de las proteínas más importantes en este proceso es la apoAIV, que contribuye a la estabilización de su superficie y que se ha mostrado como un marcador de la absorción intestinal de TG. Tras pasar al aparato de Golgi, estos *prequilomicrones* reciben nuevos lípidos, así como la unión de apoA1, con lo que se convierten en Qm nacientes, que se almacenan en vesículas y acabarán pasando a la circulación linfática tras su fusión con la membrana basolateral del enterocito. Una vez que alcancen el torrente sanguíneo adquirirán, entre otras, apoCII y apoE, completando su maduración (Su X., Abumrad N., 2009).

La síntesis de TG puede darse a través de dos vías fundamentales: una es la vía del monoacilglicerol, descrita anteriormente, y la otra es la vía del glicerol fosfato, que sería propiamente una síntesis de novo, y que tiene lugar fundamentalmente a nivel del hígado y, en menor medida, en el tejido adiposo. En este caso los ácidos grasos pueden sintetizarse a partir de glucosa (acetil CoA), gracias fundamentalmente al rol de las enzimas FAS (fatty acid synthase) y ACC (acetyl-CoA carboxylase). Luego los TG son empaquetados en partículas VLDL gracias a la enzima MTP, que transfiere lípidos procedentes del citosol o del retículo endoplásmico a partículas apoB nacientes (Pan X. y Hussain M., 2012). El catabolismo periférico tiene lugar mediante la hidrólisis de los TG presentes en el core de las partículas ricas en TG (TRLPs), constituidas principalmente por los Qms y las partículas de VLDL secretadas por el hígado. Esta hidrólisis depende principalmente de la enzima lipoproteína lipasa (LPL), la cual es sintetizada por el tejido adiposo y el músculo, que mediante transcitosis, pasa a la parte luminal de la membrana, donde la visión clásica sostenía que se unía a los proteoglicanos de la pared endotelial. Una vez anclada, la LPL puede interactuar con las TRLPs, hidrolizando sus TG y dando lugar a partículas residuales tanto de quilomicrones como de partículas VLDL. La actividad LPL está regulada por la acción de diferentes apoproteínas que pueden intervenir su funcionamiento, donde destaca la apoCII, que inhibe su acción. Las partículas residuales serán entonces retiradas de la circulación por el hígado, a nivel del espacio de Disse, y en dicho proceso parecen jugar un papel relevante el LDLr, la LRP o incluso la apoE. En los últimos años, esta visión clásica se ha visto matizada por nuevos estudios que han añadido nuevos actores a esta visión, entre ellos destaca el papel de la proteína GPIHBP1,

sintetizada por las células endoteliales, la cual se une directamente a la LPL en el espacio luminal y es fundamental para que ésta pueda llevar a cabo su hidrólisis (Pan X. y Hussain M., 2012).

5. Rol de las citoquinas en la obesidad

Tradicionalmente, los adipocitos se han considerado depósitos de energía que almacenaban los triglicéridos durante la alimentación y liberaban ácidos grasos durante el ayuno, para proporcionar energía a los tejidos. La clonación y descripción del gen de la leptina (Zhang Y., 1995) supuso el mayor impulso en el estudio del tejido adiposo como parte activa y reguladora del metabolismo. Sin embargo, durante la última década se han identificado diferentes proteínas secretadas por los adipocitos, que se conocen con el nombre de adipoquinas y que actúan sobre otros tejidos, como el músculo, el páncreas, el hígado y el sistema nervioso central. Estos factores secretados por el tejido adiposo tienen un papel central en el control de la homeostasis ya que intervienen en la regulación de procesos fisiológicos tales como la ingesta de alimento, el balance energético, la acción de la insulina, el metabolismo lipídico y glucídico, la angiogénesis, el remodelado vascular, la presión sanguínea y la coagulación. La función del tejido adiposo como un órgano endocrino tiene importantes implicaciones para comprender las relaciones fisiopatológicas entre el exceso de grasa corporal y los estados patológicos como la resistencia a la insulina y la diabetes tipo 2 (Kahn B., 2000; Wajchenberg B. 2000).

En individuos obesos hay una producción excesiva de ASP (proteína estimuladora de la acilación), TNF α (factor alfa de necrosis tumoral), IL-6

(interleuquina-6) y resistina, los cuales disminuyen la acción de la insulina en hígado y músculo esquelético. A nivel vascular, el angiotensinógeno y PAI-1 (inhibidor 1 del activador del plasminógeno) favorecen la hipertensión. En cambio, la adiponectina protege de la formación de ateromas. La leptina, sensibiliza a la insulina y regula el balance energético disminuyendo la ingesta. En individuos obesos, la leptina esta incrementada pero presentan resistencia a esta hormona. La adiponectina estimula la sensibilidad a insulina a nivel periférico y esta disminuida en la obesidad (Fukuhara A., 2005).

La lista de adipoquinas descritas ha ido creciendo en los últimos años. Algunas de las adipoquinas, tales como el angiotensinógeno y el PAI-1 están implicadas en la homeóstasis vascular. Otras adipoquinas como la adiposina, la ASP, el TNF- α , la IL-6 y la resistina están asociados con la aparición y mantenimiento de la resistencia a insulina. Por el contrario, adipoquinas como la leptina y la adiponectina están asociadas a una mayor sensibilidad a insulina. Recientemente ha sido descrita la visfatina, una hormona secretada en el tejido adiposo que es capaz de unirse al receptor de la insulina y estimular la señalización de esta vía. (Fukuhara A., 2005).

La fisiopatología de la generación de señales por el tejido adiposo tiene una importancia capital en el impacto deletéreo que un exceso de grasa puede ejercer sobre el organismo humano. El tejido adiposo y sus adipocitoquinas mediarían muchos de los cambios metabólicos provocados en el síndrome metabólico del ser humano (Kahn B., 2000). Además, la obesidad tiene una correlación positiva con la resistencia a la insulina y el aumento de concentración de marcadores inflamatorios

vasculares. Unas concentraciones elevadas de varias citoquinas proinflamatorias, como las IL-6, IL-18, TNF- α , resistina, así como de Proteína C

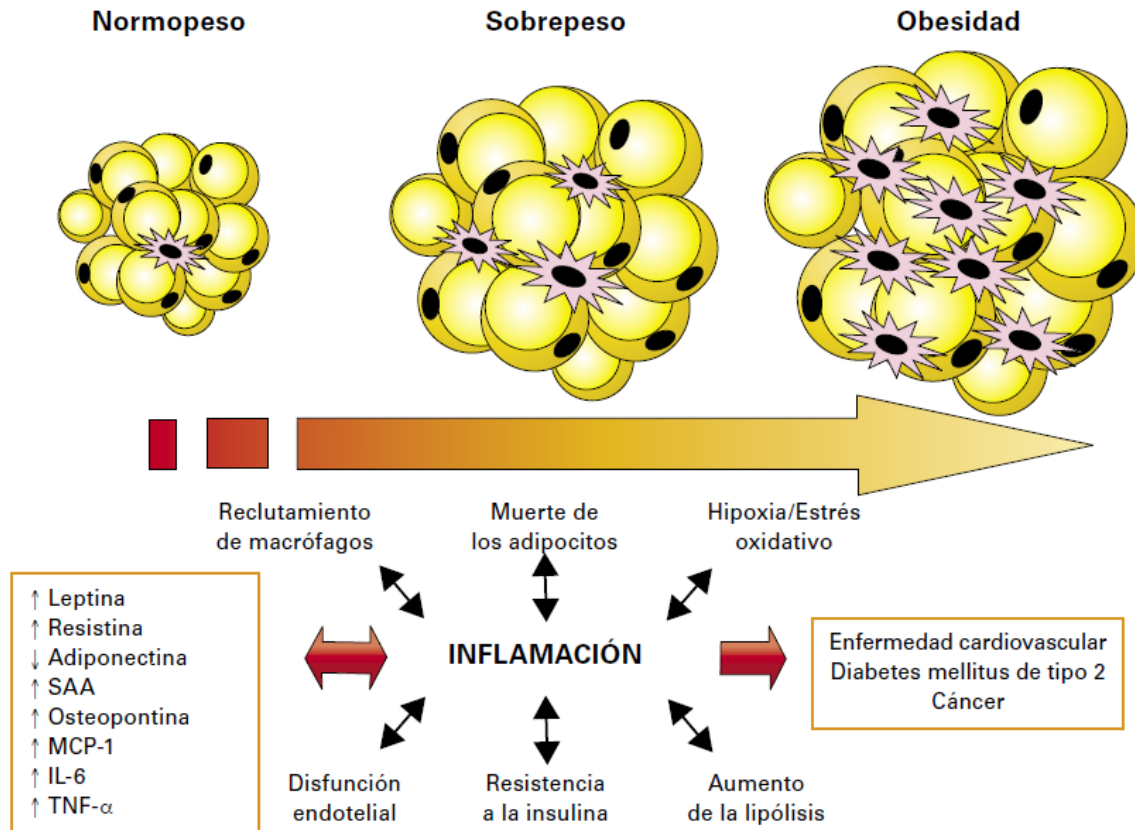


Figura 8. Relación entre la expansión del tejido adiposo y el incremento del estado proinflamatorio. IL-6 (interleucina 6); MCP-1 (proteína quimioatrayente de monocitos-1); SAA (amiloide sérico A); TNF- α (factor de necrosis tumoral α) (García M., 2013).

reactiva (PCR) se han asociado con indicadores de aumento de masa grasa: peso, índice de masa corporal (IMC) y con factores de riesgo cardiovascular, sugiriendo que el tejido adiposo contribuye a la producción de estas citoquinas. También se ha propuesto que el tejido adiposo como modulador de sustancias antiinflamatorias, como la adiponectina (Esposito K., et al., 2003) (Figura 8).

La elevación de las citoquinas proinflamatorias que tiene lugar en la obesidad origina un aumento de la lipólisis y una disminución de la capacidad del tejido adiposo para acumular triglicéridos. Esto se traduce en un aumento de los ácidos grasos libres circulantes y su depósito en forma de triglicéridos en el músculo, lo que agrava el estado proinflamatorio y contribuye significativamente al aumento de la resistencia a la insulina (Guilherme A., et al., 2008).

El aumento en la acumulación de macrófagos en el tejido adiposo desempeña un papel determinante en el incremento de mediadores de inflamación que, con el mayor grado de estrés oxidativo, hipoxia, lipólisis y resistencia a la insulina, junto a la alteración en el perfil secretor de adipocinas, tendrá como posible consecuencia la aparición de enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus de tipo 2 y cáncer, entre otras patologías. De todos los productos que el tejido adiposo es capaz de producir, a continuación vamos a describir los productos pro-inflamatorios más relevantes en el papel de la obesidad relacionado con la inflamación: el TNF- α e IL-6 (Guilherme A., et al., 2008).

5.1 Interleuquina 6 (IL-6)

La IL-6 es una citoquina multifuncional, intermediaria en procesos inflamatorios y de estrés, producida por diferentes tipos celulares. Entre éstos se encuentran los adipocitos, de los que procede la tercera parte de su concentración. La síntesis a partir de la grasa visceral, es tres veces superior respecto a la subcutánea y existe una correlación entre los niveles plasmáticos y la masa corporal además de una asociación significativa con el IMC y otros parámetros de adiposidad. La obesidad se asocia con un aumento plasmático de las concentraciones de IL-6 que puede

contribuir a inflamación sistémica y resistencia a la insulina; sin embargo los ratones carentes de IL-6 desarrollan obesidad a edades avanzadas. Hay autores que han publicado que niveles elevados de la IL-6 podrían ser predictores del desarrollo de una diabetes mellitus o de infarto de miocardio (Pradhan A., 2001). Parece que aumenta la concentración de ácidos grasos libres por aumento de la secreción hepática de triglicéridos, mecanismo por el cual podría ser coadyuvante de la resistencia a la insulina. Asimismo, se ha encontrado que disminuye la síntesis de adiponectina, contribuyendo así a incrementar más la insulinoresistencia (Vozarova B., 2001).

5.2 Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α)

El TNF- α es una citoquina producida principalmente por monocitos, linfocitos, tejido adiposo y músculo. La relación que existe entre las citoquinas proinflamatorias y la acción de la insulina en obesidad y diabetes tipo 2 fue reconocida por primera vez al observar la elevada producción de TNF- α en el tejido adiposo de individuos obesos (Hotamisligil S. et al., 1995). El TNF- α es una proteína de 17 kDa secretada como trímero de 51 kDa que toma su nombre de su identificación inicial como factor proapoptótico en células tumorales. La evidencia directa de la participación de esta citoquina en la resistencia a la insulina se obtuvo al observar que la infusión aguda de TNF- α inhibía la disponibilidad de glucosa estimulada por la insulina tanto en roedores obesos (Hotamisligil S., et al., 1995) como en humanos sanos (Plomgaard P., 2005).

Estudios *in vivo* han demostrado que el tejido adiposo de roedores obesos con resistencia a la insulina (Hotamisligil S., et al., 1995) y de humanos obesos produce

significativamente mayor cantidad de TNF- α y la neutralización de éste en roedores con resistencia a la insulina produce un aumento de la captación de glucosa en respuesta a la insulina. Los sujetos obesos al perder peso presentan una disminución de los niveles de TNF- α . (Plomgaard P., 2005)

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

El TNF- α es capaz a su vez de activar rutas lipolíticas en el tejido adiposo, provocando una liberación masiva de AGL al torrente circulatorio. Este hecho contribuye a generar resistencia a la insulina así como a la retroalimentación de la producción de esta citoquina, que también puede desencadenar resistencia a la insulina de forma directa, por su capacidad para fosforilar un resto de serina del IRS mediante la activación de JNK e I κ B/NF κ B , inhibiendo la cascada de señalización de la insulina. Además, el TNF- α causa alteraciones metabólicas en tejidos afectados por la resistencia a la insulina como hígado y músculo esquelético (Cai D., 2005).

5.3 Interleucina 10 (IL-10)

Corresponde a una citoquina antiinflamatoria relacionada con los mecanismos de supresión de las células T reguladoras (Treg), además es una potente citoquina inmunorreguladora secretada por una gran cantidad de células inmunes, incluyendo monocitos, células dendríticas (DC), células B, células T activadas y por supuesto las Treg. La IL-10 disminuye la expresión de moléculas coestimuladoras en las DC, lo que induce un estado tolerogénico en ellas y suprime los linfocitos T efectores (Guzmán-Flores, 2013). Tiene la capacidad de inhibir la producción de TNF- α , IL-1 β e IL-6, en diversos tipos celulares, además de automodularse. También inhibe la generación de especies reactivas del oxígeno (intermediarios) y aumenta la liberación de los receptores RsTNF, que pueden antagonizar los efectos del TNF- α (Batista J. et al., 2009).

Durante el proceso de inflamación crónica provocado por la obesidad, en el tejido adiposo se desarrolla una polarización de los macrófagos residentes en él desde M2 (macrófagos productores de IL-10) a M1, que son productores de citoquinas proinflamatorias como TNF- α e IL-6, proceso que es revertido cuando se provoca el adelgazamiento del individuo (Guzmán-Flores, 2013). Uno de los métodos que la IL-10 regula la respuesta inflamatoria es mediante la inhibición de la NADPH oxidasa, y por lo tanto, el estrés oxidativo resultante de la enzima. Esto se ha asociado con problemas de activación y de señalización aberrante del sustrato del receptor de la insulina. Además, la vía de señalización de la insulina puede ser alterada por niveles anormales de IL-6 y TNF- α . Sin embargo, IL-10 puede restituir

la señalización normal de la insulina mediante la inhibición de la NADPH oxidasa o antagonizando las acciones de IL-6 y TNF- α (Krithika S., 2016).

6. Modelos animales de obesidad

A medida que la prevalencia de la obesidad está aumentando junto con sus consecuencias socio-económicas y de salud, la búsqueda para encontrar nuevos tratamientos o una cura también está aumentando. Los tratamientos farmacéuticos contra la obesidad y alimentos que la previene se han probado y se sigue haciendo, pero realmente son pocos los productos que alcanzan a comercializarse debido a que es necesario comprobar su efectividad en el tiempo, contraindicaciones e interacciones farmacológicas, por lo cual el proceso de producción se hace altamente costoso y lento. Debido a esto, es muy importante que los modelos usados, ya sea *in vitro* o *in vivo*, sean buenos sustitutos de la obesidad humana (Nilsson C., 2012).

Los modelos animales han contribuido de manera fundamental al desarrollo histórico de la comprensión de los procesos básicos que regulan nuestro equilibrio energético. Se han empleado cinco tipos diferentes de modelos animales en el estudio de las bases fisiológicas y genéticas de la obesidad. El primer modelo refleja mutaciones monogénicas que han aparecido de forma espontánea en colonias de roedores, y consecuentemente se han caracterizado. El segundo consiste en aumentar el índice de mutaciones aleatorias de forma artificial, tratando a los roedores con mutágenos o exponiéndolos a radiación. El tercer modelo son ratones

y ratas en los que un gen específico ha sido alterado o sobre expresado deliberadamente. Estas alteraciones manipuladas genéticamente pueden generarse por todo el cuerpo y durante toda la vida (manipulaciones transgénicas globales) o restringirse a un periodo de tiempo y a un determinado tejido o tipo celular. En estos casos, hay dos tipos de situaciones que permiten nuevos descubrimientos: cuando se tiene como objetivo un gen específico que se piensa que tiene una función en la regulación del equilibrio energético, y cuando se altera un gen con un propósito diferente, pero la consecuencia es un inesperado fenotipo obeso o delgado. Un cuarto grupo de modelos animales abarca experimentos donde se ha utilizado la cría selectiva para obtener cepas de roedores que difieren en su grado de acumulación grasa.

Por último, se han hecho estudios de otras especies que incluyen primates no humanos y perros. Junto con los estudios de las bases genéticas y fisiológicas de la obesidad, los estudios de modelos animales nos han informado sobre los aspectos ambientales de esta condición. Los estudios en este contexto incluyen el análisis de las respuestas de los animales a dietas altas en grasas o altas en grasas y en azúcares (dieta de cafetería u occidentalizadas), investigaciones sobre los efectos de la restricción dietética en la masa corporal y la pérdida de peso, y por último, estudios sobre el impacto de fármacos potenciales sobre algunos componentes del equilibrio energético. A pesar de la existencia de todos estos trabajos, aún quedan muchas lagunas en el conocimiento sobre la regulación de la composición corporal y el almacenamiento de energía, y una necesidad constante de desarrollar fármacos para tratar la obesidad. Por consiguiente, la reducción del uso de modelos animales, aunque éticamente deseable, no será viable a corto o a

medio plazo, e incluso se estima un aumento de la actividad investigadora que implica la utilización de modelos animales, ya que la pandemia de obesidad continúa y se expande geográficamente.

Está plenamente aceptado que la obesidad proviene de un desequilibrio prolongado entre el nivel de consumo y el gasto de energía, almacenándose el excedente que resulta en forma de lípidos corporales, principalmente en forma de tejido adiposo. Comprender los factores que regulan tanto el consumo como el gasto de energía es por tanto un paso importante en el desarrollo de tratamientos para la obesidad, ya sean modificaciones ambientales y/o de estilo de vida o fármacos. Nuestros conocimientos sobre la regulación del consumo de alimento y el comportamiento en la elección de alimento y la base fisiológica de las diferencias en el gasto de energía, se debe en gran parte a los estudios realizados en animales. En los últimos 15 años se han hecho importantes progresos en esta área, en particular desde el descubrimiento de la leptina, hormona citoquina, derivada de los adipocitos (Zhang *et al.* 1995) y su receptor (Tartaglia *et al.* 1995, Lee *et al.* 1996), ambos descubiertos mediante la caracterización del defecto genético en ratones mutantes (ratones *ob/ob* y *db/db*) que apareció espontáneamente en los Laboratorios Jackson en los años 40 y 50. El descubrimiento de la leptina desencadenó una explosión de actividad en el campo de la regulación de energía (Zhang *et al.* 1995) siendo este descubrimiento, en su totalidad, resultado del trabajo con animales.

Sin embargo, la importancia crítica de utilizar modelos animales para entender las regulaciones del consumo de energía y el equilibrio energético es de varias décadas anteriores al descubrimiento de la leptina. Algunos ejemplos clave son el

descubrimiento de la insulina, hormona reguladora pancreática, a principios del siglo pasado, que fue en gran parte el resultado del trabajo con perros; señales de saciedad provenientes del intestino como el péptido YY (PYY) y la colecistoquinina (CCK), ambos descubiertos mucho antes que la leptina mediante el trabajo con animales. Además, los modelos animales han contribuido no solo a nuestro conocimiento de las bases fisiológicas y genéticas de la obesidad, sino que han sido pieza clave en estudios sobre los efectos ambientales, tales como la epigenética, respuestas a dietas altas en grasas y bajas en calorías, y la identificación y desarrollo de varios agentes farmacéuticos para el tratamiento de la obesidad. (Speakman J., et al., 2008).

A continuación se detallarán los principales modelos de obesidad en roedores que han sido utilizadas con éxito en gran cantidad de experimentos.

6.1. Modelos genéticos

6.1.1 Mutaciones espontáneas con pérdida de la funcionalidad en un único gen

Los ratones *ob/ob* (Zhang et al., 1994) y *db/db* y la rata Zucker obesa (*fa/fa*) son casos clásicos de las mutaciones espontáneas de pérdida de función en un único gen que generan obesidad masiva. Al caracterizar las bases genéticas de las mutaciones se reveló que el defecto en los ratones *ob/ob* se debe a la supresión de un único par de bases, y al producto génico se le dio el nombre de leptina (Zhang et al., 1995). Las mutaciones de *db/db* y ratas *fa/fa* resultaron ser mutaciones en el receptor de leptina.

En la actualidad, se conocen al menos 10 defectos por pérdida de función en un único gen que causen obesidad masiva y hayan sido completamente caracterizados genéticamente. En todos los casos en los que se han descubierto estos defectos, estos provienen inicialmente de mutaciones espontáneas en grandes centros de producción. Los mutantes de un único gen son normalmente detectados por expertos observadores, y confirmados más tarde, cuando exhiben su alteración genética. El desarrollo de técnicas de secuenciación de alto rendimiento y la conclusión de los genomas del ratón y la rata en los primeros años del nuevo milenio han ayudado a que el tiempo entre el descubrimiento de un nuevo mutante y su caracterización se reduzca considerablemente, y a que progresivamente se vaya acortando aún más.

Sin embargo, hay una aleatoriedad inherente en el descubrimiento de defectos en un único gen, lo que significa que los genes con ningún o mínimo efecto en el heterocigoto tienen una menor posibilidad de ser descubiertos. Además, la detección de únicamente los principales defectos genéticos implica que casi por definición estos defectos afectarán únicamente a una mínima proporción de la población, como fue el caso del ratón *ob/ob* y el gen leptina. Aunque este descubrimiento supuso un gran avance, los cribados genéticos en la población humana han mostrado que un ínfimo número de individuos tienen mutaciones por pérdida de función en este gen (Farooqi & O'Rahilly, 2005). Esto también sucede con todos los demás genes que se han descubierto como defectos espontáneos en un único gen y caracterizados genética y funcionalmente (Rankinen et al., 2006). El auténtico progreso que aporta el estudio de estos genes es que permite avanzar en nuestros conocimientos sobre el funcionamiento del sistema de regulación

energética. De hecho, muchos de estos genes alterados que pertenecen a este grupo de mutaciones únicas espontáneas, parecen estar involucrados en un patrón común que incluye la leptina y la insulina como moléculas señalizadoras. Para aumentar nuestro conocimiento de este patrón han sido cruciales los estudios de caracterización de estos defectos espontáneos “por pérdida de función en un único gen”.

6.1.2 Mutaciones con pérdida de función en un único gen, generadas de forma artificial.

La arbitrariedad con la que mutaciones espontáneas resultan en pérdidas de función importantes en genes críticos ha llevado a intentos de acelerar el proceso mediante el aumento artificial de los niveles de mutación. Esto se consigue tratando a los animales con sustancias químicas mutagénicas o exponiéndolos a radiación (Gailus-Durner et al., 2005). Ya que estas mutagénesis no son totalmente dirigidas, los resultados son alteraciones arbitrarias distribuidas por todo el genoma que se transmiten a la descendencia. Los animales generados en estos experimentos no sólo muestran o ilustran la regulación de energía, sino muchos otros aspectos de las funciones animales. Un programa de trabajo con mutagénesis en Alemania ha dado como resultado la identificación de un ratón con alteraciones en el receptor de la hormona de crecimiento (SMA-1). Estos animales tienen alguna relevancia en el estudio de la obesidad, ya que su fenotipo implica un cuerpo pequeño debido a la limitación del crecimiento, junto con un aumento importante en la cantidad de tejido adiposo.

El principal problema de esta técnica es que, aunque es relativamente fácil inducir mutaciones artificiales y aleatorias en animales, actualmente es bastante costoso fenotipar a la descendencia resultante de estos animales a una escala razonable. Dado que el genoma del ratón se compone de alrededor de 25.000-30.000 genes, y dado que una mutación concreta puede producir solamente un efecto de pérdida de función en el 3-5% de los casos (el resto de mutaciones produce efectos benignos en el tercer codón o modificaciones que no alteran la secuencia de aminoácidos, o si la alteran no son funcionales), descubrir el efecto de pérdida de función en un gen concreto requeriría la fenotipificación de más de medio millón de individuos. Medir solamente una vez el peso corporal de este número de animales resultaría prohibitivo. Por lo tanto, estos estudios han aportado un mínimo progreso a los conocimientos sobre la regulación de energía, un fenotipo mucho más complejo de caracterizar que el peso corporal (Gailus-Durner et al., 2005).

6.1.3 Modificaciones genéticas

Se ha creado un gran número de modelos transgénicos y *knock out* (KO) con fenotipos obesos y delgados desde la caracterización de los primeros genes de la obesidad. La actualización en 2005 del mapa genético de la obesidad humana citaba 248 genes que, cuando son mutados o expresados como transgenes en el ratón, resultan en fenotipos que afectan al peso corporal y a la cantidad de tejido adiposo (Rankinen et al., 2006). La capacidad de introducir o eliminar genes en la línea germinal de los animales ha facilitado el desarrollo de complejos modelos genéticos de enfermedad, así como el estudio *in vivo* de las funciones génicas. Las

investigaciones sobre la obesidad han sido un reto debido a su compleja etiología en lo que se refiere a los factores genéticos, metabólicos, de comportamiento y ambientales. La investigación utilizando modelos animales, genéticamente modificados, de obesidad y delgadez ha llevado a una importante expansión de nuestro conocimiento sobre los mecanismos fisiológicos y moleculares que afectan al equilibrio energético. Esto es útil para la identificación de dianas potenciales para el desarrollo de terapias frente a la obesidad humana.

Con las tecnologías tradicionales de transgénesis, desarrolladas entre finales de los años 80 y los años 90, había poco control sobre cuántas copias de genes, y dónde, eran introducidas en el genoma. Sin embargo, ahora existe una gran abundancia de sofisticadas técnicas para actuar sobre el gen, lo que permite a los investigadores manipular el genoma de forma que es posible efectuar prácticamente cualquier cambio en él. Además, avanzadas técnicas permiten controlar alteraciones del genoma que sólo actúan en un momento concreto, o que tienen constructos que se expresan sólo en tejidos específicos (Davey y MacLean, 2006).

La sobreexpresión de los genes diana fue la primera técnica que se utilizó de forma amplia. La secuencia de codificación completa del gen es clonada corriente abajo desde un promotor que puede proporcionar expresión global o específica de un tejido, resultando en una descendencia transgénica que sobre expresa el gen diana. Aunque es una técnica bastante sencilla y barata, el nivel de expresión de genes y proteínas no siempre tiene un efecto fisiológico. Los modelos globales murinos *KO* son más predecibles y más reproducibles que los de sobreexpresión. Aquí, el fenotipo es creado a partir de la eliminación total del gen diana en todos los tejidos, y estos ratones *KO* pueden utilizarse para la identificación de muchos

factores implicados en el desarrollo. De estos modelos *KO* resultan a menudo acciones imprevistas de los genes diana que, aunque a veces son perjudiciales, resultando por ejemplo en malformaciones embrionarias, pueden en muchos casos permitir descubrimientos inesperados sobre las funciones de dichos genes.

Un ejemplo de un descubrimiento inesperado desarrollado a partir de un *KO* transgénico es el ratón *axl*, desarrollado originalmente para determinar si el receptor tirosina quinasa *axl*, tenía algún papel en la leucemia. Como se esperaba, este ratón no exhibía ningún tumor hematopoyético, pero casualmente, las características fenotípicas exhibidas estaban asociadas con diabetes mellitus no dependiente de insulina. El ratón *axl* presenta hiperglucemia e hiperinsulinemia, severa resistencia a la insulina y obesidad progresiva, pero no polifagia (Davey y MacLean, 2006). Posteriores análisis de estos animales *axl* revelaron elevaciones sistémicas del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), que también ha demostrado ser elevado tanto en modelos animales de obesidad, como en humanos (Yamakawa et al. 1995), lo que sugiere que la expresión de *axl* afecta a la modulación endógena de la producción de TNF α , que a su vez contribuye de forma indirecta al desarrollo de la obesidad.

Además de los modelos *KO* globales y sobre un tejido específico, la modificación genética también comprende modelos "*knock-in*", que reemplazan el gen endógeno por una mutación. Los ratones *knock-in* tienen la capacidad de jugar un papel más específico y pueden usarse para determinar los efectos de cambios leves en la estructura o función de las proteínas. Se han utilizado como modelo para enfermedades humanas o para determinar la significancia funcional de patrones de señalización de un receptor particular. Por ejemplo, los ratones *s/s* creados por

Bates et al. en el 2005 se desarrollaron para investigar el papel de las señales de leptina individuales mediante la introducción de una mutación *knock-in* que alteraba el patrón de señalización intracelular dominante a través del que se creía que la leptina tenía su principal función (el patrón STAT3). La ausencia de la forma larga del receptor de leptina (*ObRb*), como en el caso de los ratones *db/db*, da lugar a obesidad y diabetes. Se halló que los ratones *s/s* presentaban similitudes con los *db/db*, al mostrar un desarrollo temprano de la obesidad, caracterizado por polifagia y niveles elevados de leptina e insulina, lo que sugiere resistencia a la leptina. Sin embargo, la restricción calórica normalizaba el control glucémico en los ratones *s/s*, que mostraban una mejora en la resistencia a la insulina y la intolerancia a la glucosa. En consecuencia, los ratones transgénicos *s/s* han contribuido a un estudio más profundo de la obesidad y la diabetes (Bates et al., 2005).

Un problema clave con los ratones *KO* es la posibilidad de que el gen provoque la muerte prematura del embrión, imposibilitando el estudio de sus efectos en adultos. Un problema menos obvio es que una manipulación genética que tenga efecto durante toda la vida puede forzar a los animales a hacer cambios compensatorios a lo largo de su desarrollo. Por lo tanto, el que normalmente es un gen clave en el proceso de la regulación energética puede en apariencia tener muy poca importancia cuando ha sido eliminado porque un mecanismo compensatorio se ha hecho cargo de sus funciones. Uno de estos casos es el gen del neuropéptido Y (NPY). Cuando se introduce de forma directa en el cerebro, este neuropéptido es uno de los estimuladores más potentes del comportamiento alimentario. Además, cuando los animales son privados de comida, los niveles naturales de NPY aumentan, mientras que en los animales saciados disminuyen (Lin et al., 2004). Sin

embargo, cuando se eliminó el NPY, los ratones resultantes no mostraban un fenotipo anómalo obvio. El sistema *Cre/loxP* es una herramienta para los *KO* histo-específicos y tiempo específicos de genes objetivo, que permite la investigación de dichos genes. Este sistema se compone de dos líneas transgénicas separadas, una que expresa Cre recombinasa (*Cre*) y otra en la que las secuencias de reconocimiento de Cre recombinasa (*loxP*) están estratégicamente posicionadas a cada lado del gen objetivo. Cuando *Cre* se expresa en ratones que albergan un gen diana que contiene *loxP*, se elimina el gen deseado. Dependiendo de la especificidad del tejido y el tiempo de expresión de la recombinasa, estas modificaciones pueden verse restringidas a ciertos tipos celulares o estadios del desarrollo (Blüher et al. 2002)

Algunos ejemplos del uso del sistema *Cre/loxP* incluyen su uso para crear ratones con trastornos histoespecíficos en el receptor de la insulina: en el tejido muscular (MIRKO), en las células β (BIRKO), en el tejido hepático (LIRKO) y en el tejido adiposo (FIRKO) (Blüher et al. 2002). El ratón FIRKO presenta una baja masa adiposa, pérdida de la relación normal entre la leptina plasmática y el peso corporal y aparece protegido contra la obesidad relacionada con la edad y la inducida por lesión hipotalámica. Resulta interesante que, manteniendo niveles normales de ingesta alimenticia, estos ratones también demuestran tener muchas características similares a los ratones sometidos a restricciones calóricas, incluyendo una vida más larga que la de las líneas salvajes.

Los estudios sobre animales genéticamente modificados no sólo han aumentado nuestros conocimientos sobre la regulación de la ingesta de alimento y el equilibrio energético, sino que también han tenido un papel clave en el aumento

de nuestros conocimientos sobre la relación entre la obesidad y enfermedades como la diabetes y el síndrome metabólico.

Por ejemplo, la rata con obesidad de comienzo tardío (llamada LOB, late-onset obesity rat) fue descubierta como resultado de manipulaciones transgénicas que en origen se habían creado para investigar la expresión de la hormona de crecimiento en el sistema vasopresina (Wells S., et al., 2003). Al compararlo con mutaciones espontáneas más clásicas, se encontraron varias diferencias en este modelo transgénico. Primero, la mutación era autosómica dominante, desarrollando obesidad de forma tardía, al contrario que la mayoría de las mutaciones, que son recesivas con obesidad de aparición temprana. En prácticamente todos los modelos, la obesidad es manifiesta en todos los depósitos de grasa, mientras que los machos de rata LOB, la grasa se acumula de forma selectiva en depósitos viscerales, pero no periféricos, como a veces ocurre en los humanos. Además, al contrario que muchos otros modelos que presentan polifagia, la obesidad se manifestaba a pesar del consumo normal de una dieta baja en grasas, que curiosamente podía iniciarse en ratas LOB jóvenes administrando una dieta elevada en grasas. De nuevo en contraste con la mayoría de los modelos que muestran resistencia a la insulina, las ratas LOB mantenían la sensibilidad a la insulina a pesar de presentar una obesidad visceral masiva, lo que proporciona un valioso modelo para la investigación de enfermedades relacionadas con la obesidad (Wells S., et al., 2003)

Varios estudios han sugerido que aunque la obesidad predispone a varias enfermedades, no es la masa adiposa total sino la grasa abdominal excesiva el mejor indicador de las consecuencias metabólicas adversas, tales como la

resistencia a la insulina, la intolerancia a la glucosa y la dislipidemia, asociada con el síndrome metabólico X. Para examinar esta relación más a fondo, se han estudiado modificaciones genéticas de las dos formas del 11 β -hidroxiesteroide dehidrogenasa (11 β -HSD). En contraste con el 11 β -HSD tipo 2, que inactiva los glucocorticoides, el 11 β -HSD tipo 1 regenera esta acción. Los ratones que sobreexpresaban 11 β -HSD-1 (Masuzaki et al. 2003, Masuzaki y Flier, 2003) mostraban síntomas del síndrome metabólico similares a los observados en humanos, por ejemplo obesidad visceral, resistencia a la leptina e insulina, dislipidemia e hipertensión, mientras que los ratones sin ninguna mutación en el gen 11 β -HSD-1 mostraban un fenotipo resistente a la diabetes y resistencia a la acumulación de grasa visceral y a la insulina (Masuzaki y Flier, 2003).

6.1.4 Modelos poligénicos

Es obvio que en la mayoría de las circunstancias la obesidad y sus precursores energéticos relacionados son normalmente rasgos multifactoriales o poligénicos, que resultan de la acción combinada de muchos genes e interacciones ambientales. En los humanos, las mutaciones monogénicas son de limitada importancia cuando consideramos el aumento de la epidemia de obesidad, ya que sólo son aplicables a unos pocos casos en la población obesa. A la vista de estas evidencias, varios programas de investigación se han centrado en localizar la base poligénica de la obesidad, y muchos de ellos han empleado modelos animales. A pesar de que a menudo el fenotipo de un animal se mide fácilmente, la identificación de los genes que se encuentran bajo un rasgo puede ser un trabajo laborioso. Sin embargo, comparado con estudios con humanos, el empleo de modelos animales es muchas

veces más rápido, ya que las técnicas mejoradas y algunos métodos más agresivos (como por ejemplo la disección corporal completa) permiten una descripción precisa del fenotipo. Además, se ha mejorado la capacidad de detectar loci de carácter cuantitativo (QTL) utilizando modelos animales, gracias al mayor tamaño de las familias y la estructura genealógica más controlada y formalizada. Aunque se han utilizado varios modelos animales, tales como ratas, el ratón es la especie de modelo genético más común, y recientes avances para determinar su mapa genético han incrementado aún más su uso. Normalmente, el mapa molecular se compone de más de 6500 marcadores micro satélites basados en la reacción en cadena de la polimerasa (Dietrich et al. 1996). Dado que el ratón presenta una gran homología con otras especies de mamíferos, su uso para la localización de loci genéticos es valiosísimo.

A la hora de localizar regiones del genoma responsables de fenotipos de obesidad poligénica, el mapeo de QTL es una valiosa herramienta que rastrea el genoma de un organismo para buscar asociaciones estadísticas entre información fenotípica y los marcadores. Los QTL mapeados pueden ser el resultado de genes individuales o de un número de loci relacionados. Hasta la fecha, se han localizado más de 200 QTL de la obesidad en el ratón, aunque muchos de ellos están en la misma región cromosómica y podrían, por lo tanto, representar el mismo o los mismos genes (Snyder et al. 2004). Los QTL son detectados normalmente en entrecruzamientos de individuos pertenecientes a la generación F2, que se consiguen con más éxito mediante el uso de dos poblaciones basales de animales que muestren grandes diferencias significativas en el rasgo en cuestión (Speakman J., et al., 2008).

Muchos rasgos relacionados con la obesidad son altamente hereditarios y por lo tanto la selección de los dos genotipos extremos (elevado y bajo) dentro de una línea lleva a características divergentes. Las líneas divergentes son posteriormente cruzadas para producir una población F1 y después cruzada entre hermanos para producir una población F2 endogámica, que típicamente exhibe una amplia variación fenotípica entre individuos. La información genotípica y fenotípica de marcadores moleculares se utiliza para determinar asociaciones estadísticas entre el fenotipo y áreas del genoma, localizando QTL. Una ventaja clave de esta técnica es que no requiere ningún conocimiento previo sobre la naturaleza biológica del rasgo sometido a examen (Fisler y Warden 1997).

Los rasgos relacionados con la obesidad que se han seleccionado de forma divergente a lo largo de muchas generaciones incluyen la masa corporal, composición corporal, nivel de ingesta, pérdida de calor y actividad espontánea (Swallow et al. 2001). Una lista detallada de aquellos en los que ha tenido lugar el mapeo de QTL está disponible en Brockmann y Bevova (2002). La mayoría de los QTL tienen sólo un pequeño efecto, sin embargo, otros contribuyen de manera más significativa. Por ejemplo, *Fob2* explica el 19,5% de variabilidad en las líneas de ratón seleccionadas por el porcentaje de grasa corporal.

En algunos casos se requiere intervención ambiental, al exponer a los ratones a una dieta elevada en grasas, para revelar propensión o resistencia a la obesidad en líneas seleccionadas o cepas endogámicas. Por ejemplo, las líneas seleccionadas por Sharp et al. (1984) para consumo elevado y bajo de alimento, muestran resistencia a la obesidad cuando se les administra una dieta elevada en grasa mediante la reducción de la ingesta de alimento para mantener el mismo

consumo de energía que cuando se les administraba una dieta baja en grasa (Hambly et al. 2005). Por el contrario, existen cepas endogámicas de ratones que presentan una elevada tendencia a la obesidad, por ejemplo, C57BL/6J (Johnston et al. 2006). Mediante el cruzamiento de variedades que son propensas y resistentes a la obesidad, pueden localizarse QTL que caracterizan obesidad inducida por la dieta y que están estrechamente unidos a la condición humana.

Aunque el uso de las técnicas de mapeo QTL a menudo localiza nuevos genes candidatos para rasgos de la obesidad que se convierten en objetivos para los estudios genéticos con humanos, las investigaciones están lejos de concluir. Deben utilizarse todavía muchas nuevas líneas seleccionadas y variedades endogámicas de ratón, y explorarse su posible asociación con la obesidad inducida por la dieta (Johnston et al. 2006).

6.2 Modelos de obesidad inducidos por dieta rica en grasas

Muchas ideas sobre factores metabólicos, hormonales y neurológicos que intervienen en el control de la homeostasis energética tienen sido obtenida de ratones de cepas puras, transgénicos y *knock-out*. Sin embargo, un gran porcentaje de la obesidad humana y de diabetes tipo 2 sigue un modo poligénico de herencia. Por consiguiente, modelos de obesidad y diabetes inducida por dieta y han sido desarrollado para investigar las enfermedades y para probar la eficacia de compuestos terapéuticos para prevenir o revertir la obesidad, resistencia a la insulina o diabetes (Van Heek M., et al., 1997).

Las investigaciones que llevan a cabo estudios de alimentación en roedores tienen que tener en cuenta varias condiciones importantes ya que la ingesta de

alimento o el gasto de energía se ven influidos por una variedad de factores: la elección y lo constante de las condiciones ambientales como la temperatura, la duración del ciclo luz/oscuridad, el número de animales por jaula o el sistema alimentación utilizado para las jaulas son de suma importancia. También, cualquier manipulación experimental influirá en la actividad física y el comportamiento de alimentación. Por lo tanto, el control sobre éstas y otras condiciones ambientales son importantes para minimizar la variabilidad los datos.

Otro factor que debe ser considerado es la edad de la animales en el que se llevó a cabo un estudio. Es más eficaz de iniciar la alimentación alta en grasas a una edad temprana, pero también es importante tener en cuenta que el balance de energía difiere en un animal joven en comparación con los animales más viejos. Por ejemplo, las ratas en la edad puberal ganan rápidamente masa magra y muestran diferentes características metabólicas en comparación con ratas de edad avanzada, que puede a su vez estar perdiendo masa magra y obteniendo de la masa grasa (Van Heek M., et al., 1997).

Otra variable importante es la duración de la dieta productora de obesidad, que entre más largo es el período de alimentación, mayor es el incremento de la ganancia de peso corporal y, presumiblemente, la grasa corporal.

Otros factores importantes son la palatabilidad y textura de la dieta de elección.

Especialmente en ratas y ratones, las dietas hidratadas ya sea como geles o en solución promueven una mayor ganancia de peso corporal, en comparación con dietas secas, en polvo o granulados. Además, no hay considerable evidencia de que las dietas de sabor dulce que contiene sacarosa, fructosa o sacarina promuevan la hiperfagia y la obesidad en ratas y ratones (Van Heek M., et al., 1997).

6.3 Formulación de dietas altas en grasas

La composición de una dieta de alta energía es de suma importancia para la inducción de un fenotipo de enfermedad específico.

Diversas dietas “altas en energía” con mayor contenido calórico, se han utilizado para inducir la obesidad y enfermedades relacionadas en roedores y otros animales.

Por lo general, la fuente de grasas y/o los hidratos de carbono, se enriquecen o modifican, el colesterol contenido se puede aumentar o se pueden agregar concentrados lácteos. Es ventajoso utilizar una dieta estándar purificada como base para una dieta alta en energía en lugar de las dietas comerciales estándares, las cuales se fabrican con altos contenidos de vegetales y puede contener fitoestrógenos. Estos pueden ejercer actividades estrogénicas o anti-estrogénicos y por lo tanto afectar a la progresión de la enfermedad metabólica. En dietas purificadas, cada nutriente es representado por un ingrediente y por lo tanto se puede variar individualmente mientras que todos los otros ingredientes permanecen sin cambios. Dietas personalizadas son ofrecidas por varios proveedores con su formulación estandarizada. Es importante cambiar sólo un componente de la dieta a la vez y mantener el resto de la dieta idéntica a la dieta de control sin modificar, para permitir comparaciones entre grupos experimentales (Roel A., et al., 2015).

6.4 El ratón C57BL/6J alimentado con dieta alta en grasas (*Diet Induced Obesity mouse: DIO mouse*)

El estándar de oro para un modelo de obesidad inducido por dieta es el ratón macho C57BL/6J. El ratón C57BL/6J desarrolla un fenotipo obeso solo cuando se le permite acceso *ad libitum* a una dieta alta en grasas, mientras que en una dieta baja en grasas, C57BL/6J permanece normal. Cuando se compara ratones C57BL/6J con otras cepas tales como el ratón A/J o el C57BL/KsJ, éstos son relativamente resistentes al efecto de alimentarlos con una dieta alta en grasas. La obesidad en ratones C57BL/6J es el resultado de hipertrofia e hiperplasia del adipocito. La grasa acumulada en los C57BL/6J es depositada selectivamente en el mesenterio. C57BL/6J exhibe un mayor aumento de peso por unidad de energía ingerida (tasa de eficiencia alimentación) y, la capacidad de la energía ingerida para ser metabolizada (eficiencia metabólica) es menor en ratones C57BL /6J alimentados con una dieta alta en grasas en comparación con los ratones control. El aumento de peso observado en ratones C57BL/6J puede por lo tanto, no ser plenamente explicada por el aumento de la ingesta de energía, sino que también es causada por una tasa metabólica reducida (Tanya Y., 2007).

Además de las características típicas de obesidad desarrolladas en el ratón C57BL/6J bajo una dieta alta en grasas, éstos desarrollan gradualmente resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, hiperglucemia leve a moderada, dislipidemia, hipo-adiponectinemia, resistencia a la leptina/hiperleptinemia e hipertensión.

En cuanto a la adiposidad central, el curso progresivo de desarrollo de la diabetes, así como la interacción de componentes nutricionales y variables genéticas de ratones C57BL/6J es estrechamente paralela a la progresión de las formas comunes de la enfermedad en humanos (Tanya Y., 2007).

Típicamente, machos C57BL/6J son alimentados con una dieta alta en grasas que contiene 40-60% de las calorías derivadas de la grasa (dieta control 5-10% de grasa), durante 8-16 semanas. El fenotipo diabético en ratón el C57BL/6J es evidente después de un mes de comer una dieta rica en grasas: la glucosa plasmática basal e insulina se elevan y pruebas de tolerancia a la glucosa muestran disminución en la eliminación de la glucosa desde la sangre y alteración de la secreción de insulina. A las 16 semanas, ratones C57BL/6J desarrollan una masa grasa que aumenta en un 93% (Sörhede W., et al., 2004).

Se ha demostrado en numerosos estudios que el modelo de ratón DIO C57BL/6J es adecuado para experimentar nuevas intervenciones terapéuticas. Diversos fármacos antidiabéticos, tales como las tiazolidinedionas (TZD), inhibidores DPP-IV, así como las drogas anti-obesidad tales como antagonistas del receptor CB1 ejercen la eficacia *in vivo* en el ratón DIO (Sörhede W., et al., 2004).

Al comparar diferentes especies de modelos de obesidad como lo son la rata y el ratón, el ratón DIO presenta la desventaja de su tamaño más pequeño que las ratas que conduce a limitaciones experimentales. La inducción de la obesidad y la resistencia a la insulina se produce más rápido en el ratón C57BL/6J, que también desarrolla la hiperglucemia a una grado más pronunciada en comparación con la rata. Por lo tanto, el ratón DIO C57BL/6J es un modelo robusto que puede ser usado para estudios mecanísticos y como una herramienta para el nuevos sustancias terapéuticas. En cuanto a las pruebas de drogas de rutina, varios aspectos deben ser considerados, tales como la estandarización del modelo, duración y costo-eficacia, el beneficio clínico esperado, y por último pero no menos importante la aceptación del modelo por la comunidad científica. En este sentido, el ratón DIO es

ciertamente el más estandarizado, más rápido y mejor modelo aceptado en este sentido (Surwit M., et al., 1995).

A medida que el desarrollo de la obesidad y la diabetes tipo 2 están progresando a un porcentaje cada vez mayor en las poblaciones de las sociedades occidentales y los países en desarrollo, hay una gran necesidad de modelos relevantes de la diabetes tipo 2, síndrome metabólico y obesidad. A pesar de tener un modelo animal que imita todas las condiciones humanas, éste no es realista; los modelos de obesidad inducidos por dieta descritos anteriormente son herramientas importantes para la investigación, la interacción entre la influencia del cambio del ambiente y los antecedentes genéticos, los cuales son invaluable para futuras investigaciones para orientar y poner a prueba las intervenciones terapéuticas en ensayos preclínicos (Surwit M., et al., 1995).

6.5 Modelo de ratón C57BL/6 de Obesidad inducida por dieta con alimentos formulados por Research Diet Inc.

En 1995 se desarrollaron dietas altas en grasas con el fin de crear un modelo de obesidad inducido por dieta alta en grasas en modelos de ratón. Fue así como West et al. (1992) y Surwit et al., (1995) necesitaban crear una dieta con un alto contenido en grasas (45% de grasas), la cuales provenían de manteca de cerdo, desarrollando un pellet sólido que permitía evaluar estudios de ingesta de alimentos. Fue así como Research Diet Inc. presentó varias formula preliminares para su estudio y se estableció la dieta D12451 como la dieta estándar alta en grasas (HFD de su nombre en inglés *High Fat Diet*) y su control D12450 como la dieta control (10% grasas) (LFD de su nombre en inglés *Low Fat Diet*).

La publicación del descubrimiento de la leptina por Zhang y Friedman et al. (1995) creó el interés mundial en este nuevo péptido como una herramienta para la investigación y el descubrimiento terapéutico para la obesidad y sus trastornos relacionados. La dieta D12451 HFD, no sólo genera el fenotipo hipótesis en su primer estudio, sino también ayudó a los investigadores a descubrir, investigar y describir el fenómeno de la resistencia a la leptina. Los resultados de este estudio inicial y la descripción de la utilización de estas dos dietas, se presentan en el documento de Van Heek et al. (1997), "Ratones obesos dieta inducidos desarrollan resistencia periférica a la Leptina, pero no una resistencia central".

Según revisiones bibliográficas hechas por Diet Research Inc., más de 1.000.000 de kilos de estas dietas se ha enviado a cientos de investigadores, que trabajan en 766 instituciones independientes en 58 países (Australia, Bélgica, Canadá, Chile, China, Colombia, República Checa, Dinamarca, Finlandia, Francia, Alemania, Hungría, India, Irlanda, Israel, Italia, Japón, México, Países Bajos, Nueva Zelanda, Noruega, Polonia, Portugal, Escocia, Singapur, Corea del Sur, España, Suecia, Suiza, Turquía, Reino Unido y Estados Unidos, y más), lo que significa que estas dietas se han convertido en el estándar para la investigación en el campo de la obesidad, la diabetes y el síndrome metabólico. Mediante el uso de estas dietas estándares, los investigadores tienen una amplia gama de datos de referencia a partir de una base de datos de publicaciones de investigación usando estas dietas que se expande permanentemente.

7 Dieta y composición de la microbiota intestinal

La microbiota intestinal humana está influenciada por diversos factores, siendo la dieta un factor muy importante (Figura 9). Los componentes de los alimentos que son indigeribles para las enzimas humanas (por ejemplo la fibra), proporcionan sustrato para el metabolismo microbiano intestinal. Como las bacterias están especializadas en la fermentación de diferentes sustratos, las dietas más complejas pueden proporcionar una amplia gama de promotores del crecimiento y factores inhibidores del crecimiento para diferentes filos de bacterias (Graf D., et al., 2015). Además, los productos finales de metabolismo bacteriano, especialmente las vitaminas y los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), son vitales para la salud humana. Como la mayoría de estos productos de metabolismo bacteriano intestinal tiene efectos promotores de la salud, se intenta identificar patrones dietéticos que aumenten la diversidad bacteriana y promover el crecimiento de bacterias beneficiosas (Flint H., et al., 2012).

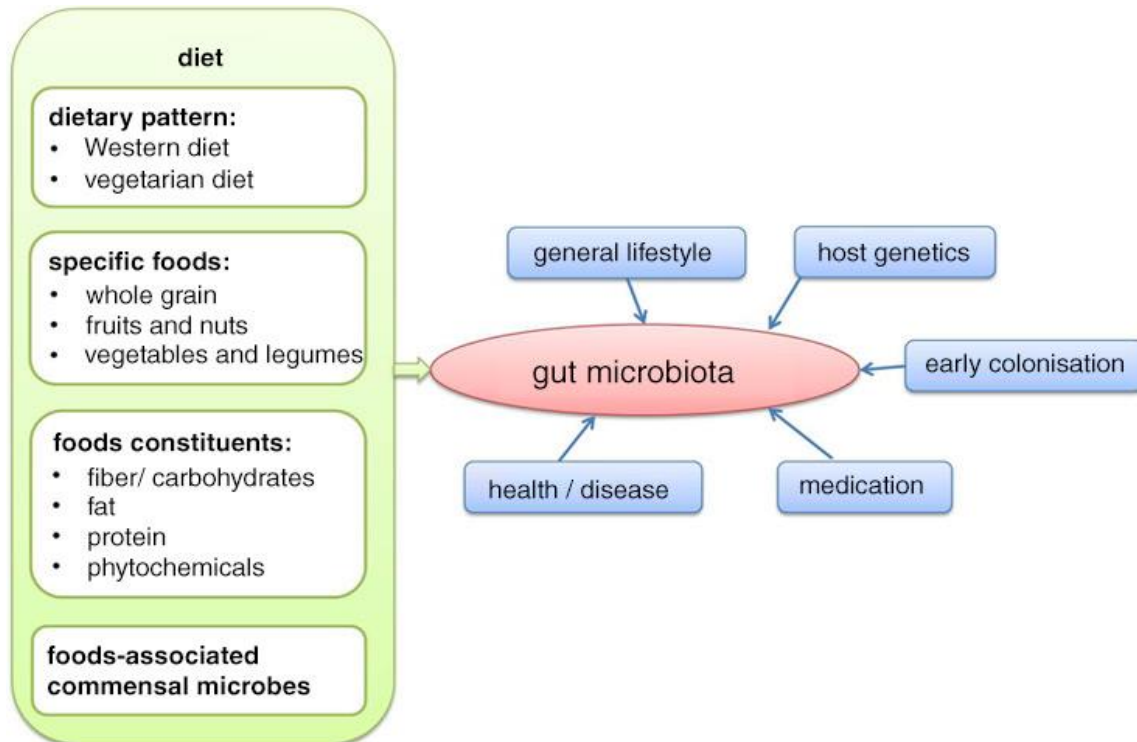


Figura 9. Factores que influyen la composición de la microbiota intestinal humana, con especial énfasis en la dieta. (Draf D., et al., 2015)

La dieta “occidental” de las personas que viven en los países occidentales, también llamada comida rápida, es por lo general más bien baja en fibra y proporciona una alta cantidad de grasa y carbohidratos refinados en comparación con la dieta de las personas que viven en zonas rurales. Varios estudios compararon la microbiota intestinal de los estadounidenses o europeos con los de africanos o sudamericanos (De Filippo C. et al., 2010; Yatsunenکو T. et al., 2012; Schnorr S. et al., 2014). Las diferencias en la composición de la microbiota intestinal ya estaban presente entre bebés de 6 meses de edad en los de Malawi en comparación con bebés finlandeses de la misma edad (Schnorr S. et al., 2014). Esto está de acuerdo con los resultados de Yatsunenکو et al. (2012), que determinaron la composición de la microbiota intestinal de voluntarios de 0 a 70 años de edad de Venezuela, Malawi

y Estados Unidos, informando que, independientemente de la edad, la composición de la microbiota intestinal se encuentra agrupada de acuerdo al país. Las muestras de Malawi y Venezuela eran bastante similares, en comparación con las muestras de los Estados Unidos.

8 La microbiota intestinal y su impacto en el desarrollo de la obesidad

En la actualidad existe cierta controversia en cuanto a si la microbiota que coloniza el intestino humano está involucrada o no en el desarrollo de la obesidad. La microbiota intestinal se sabe que desempeña funciones bioquímicas esenciales tales como la obtención de energía a través de la dieta y la síntesis de vitaminas y otros componentes absorbibles (Tehrani A. et al., 2012). Sin embargo, los desequilibrios en el composición de la microbiota intestinal se han asociado con la aparición de resistencia a la insulina y aumento del peso corporal (Cani, 2008).

Existen numerosos mecanismos propuestos para la regulación de la obesidad por parte de la microbiota intestinal, entendiéndose que existen muchos otros que aún no han sido del todo entendidos. En este sentido, la microbiota intestinal participa de forma activa en la absorción de nutrientes, en el mantenimiento de la función de barrera de la pared intestinal y el control de la saciedad a través de la participación en la regulación de la secreción de diversas hormonas. Todos estos factores participan en una mayor o menor proporción en la regulación de la lipogénesis y por ende en el desarrollo de la obesidad (Bonakdar, 2012).

La biomasa microbiana intestinal incluye aproximadamente 10^{14} bacterias que residen normalmente en el tracto gastrointestinal, alcanzando un número de células

microbianas que excede en gran medida el número de células humanas. El genoma colectivo de estos microorganismos (la microbiota) contiene millones de genes en comparación con aproximadamente 20.000 a 25.000 genes del genoma humano (Graf D. et al., 2015). Esta "fábrica" microbiana contribuye a una amplia gama de funciones bioquímicas y metabólicas que el cuerpo humano no podría realizar de otro modo (Neish, 2009). A pesar de que los cambios inducidos por la dieta en la microbiota intestinal se producen en un corto período de tiempo (3-4 días después de un cambio de dieta), estos cambios son fácilmente reversibles.

La idea de la presencia de una población microbiana intestinal obesogénica emergió cuando Ley et al., en el año 2005 descubrieron que el fenotipo de la obesidad puede ser transmitido a través del trasplante de microbiota intestinal en ratones (Hannelore D. et al., 2014), los cuales confirmaron estas observaciones en individuos obesos humanos (Ley R. et al., 2006). No obstante, la naturaleza exacta del cambio de filos en la microbiota intestinal asociado a obesidad aún es controvertida (Duncan S. et al., 2007; Schwartz A. et al., 2010). Sin embargo, varios estudios han mostrado asociaciones entre diversidad bacteriana y el IMC, la adiposidad, la dislipidemia y la resistencia a la insulina (Burcelin R. et al., 2012; Nicholson J. et al., 2012). La dieta es uno de los diversos factores a los que responde la microbiota intestinal (Power S. et al., 2013). En los animales, una dieta alta en grasas (HFD) se traduce en el aumento de los phylos Bacteroidetes y Firmicutes (Serino M. et al., 2012; Mujico J. et al., 2013).

La evidencia reciente sugiere que la microbiota intestinal afecta a la adquisición de nutrientes, almacenamiento de energía, y a una gran cantidad de vías metabólicas del huésped (Nicholson, 2012). Hallazgos recientes plantean la

posibilidad de que la microbiota intestinal tenga un papel importante en la regulación del peso y en este sentido puede ser en parte responsable del desarrollo de la obesidad. En los últimos años, la capacidad de obtener una imagen completa de las comunidades microbianas del intestino, ha mejorado por la introducción de técnicas moleculares independientes de los cultivos microbiológicos, basadas en la secuenciación del gen ribosómico ARNr 16S. Jumpertz *et al.* en el 2011 realizó un estudio de balance energético en pacientes hospitalizados, 12 sujetos delgados y 9 obesos, que consumieron 2 dietas calóricas distintas durante breves períodos de tiempo (Jumpertz, 2011). Estos investigadores al mismo tiempo monitorearon la microbiota intestinal mediante la realización de estudios de piro-secuenciación de genes de ARNr 16S bacterianos presentes en las heces y midiendo las calorías ingeridas y eliminadas por las heces mediante bomba calorimétrica. Este estudio mostró que la carga de nutrientes alterada (es decir, calorías altas vs. calorías bajas) indujo cambios rápidos en la composición bacteriana de la flora intestinal humana, y estos cambios se correlacionaron con la pérdida de energía en las heces de personas delgadas. Proporciones elevadas de Firmicutes y las correspondientes reducciones en los Bacteroidetes se asociaron con un aumento de almacenamiento energético de aproximadamente 150 kcal. Estos datos apuntan a una fuerte relación entre la composición de la microbiota intestinal y la absorción de nutrientes en humanos; dichos estudios deben ser confirmados con mayor número de pacientes.

La microbiota intestinal es muy importante en el mantenimiento de la función tanto gastrointestinal como inmunológica, además de ser crucial para la digestión de nutrientes, lo cual ha sido confirmado por estudios en ratones libres de gérmenes (Tilg H., 2011). Las funciones metabólicas importantes de la microbiota intestinal

incluyen catabolismo de las toxinas y agentes carcinógenos, síntesis de los micronutrientes, fermentación de sustancias alimenticias no digeribles y absorción de electrolitos y minerales. Además, la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) por parte de la microbiota intestinal afecta el crecimiento y la diferenciación de los enterocitos y colonocitos. Las diferencias en las actividades metabólicas de la microbiota intestinal pueden contribuir a variaciones en la extracción de calorías ingeridas de sustancias alimenticias, almacenamiento de calorías en el tejido adiposo, y la disponibilidad de energía para la proliferación microbiana. Tales diferencias en la microbiota intestinal son también responsables de la variación de la capacidad de un individuo para obtener energía, explicando los aspectos de la obesidad. Las diferencias en la composición microbiana intestinal y su eficiencia metabólica pueden ser responsables de la predisposición de un individuo a los trastornos metabólicos como la obesidad y la diabetes (Kallus S., 2011).

Las bacterias comienzan la colonización del intestino estéril del lactante en las primeras horas después del nacimiento, pasando por una sucesión bacteriana hasta una microbiota adulta consolidada que se establece después del destete. En los niños de seis meses de edad, se han identificado grupos dominantes de la microbiota fecal tales como: Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Verrucomicrobia y menor abundancia de Proteobacteria y bacterias aeróbicas Gram negativas (Favier et al., 2002; Palmer C. et al., 2007). La microbiota fecal de los individuos adultos es única y altamente estable en el tiempo y su composición en parte está determinada por la genética del individuo (Zoetendal E. et al., 2001).

Distintos estudios han revelado que existe una relación entre microbiota intestinal y el metabolismo en el ser humano. Actualmente se ha demostrado que

los microorganismos intestinales pueden modificar el metabolismo del huésped a través de distintas vías de señalización en el intestino, con efectos sobre la inflamación, resistencia a la insulina y depósito de grasa (Ley, 2010). La obesidad se ha asociado a aumento en la abundancia relativa de Firmicutes y reducciones proporcionales en la abundancia de Bacteroidetes, en la composición de la microbiota intestinal de ratones genéticamente obesos. Además, de una mayor proporción de Archaea (Ley R. et al., 2005).

Actualmente, el tratamiento y prevención de la obesidad incluye el uso de fármacos, intervenciones quirúrgicas y control dietario, los cuales, aún en conjunto no logran contrarrestar adecuadamente el aumento de peso de los pacientes. Es por eso que se ha puesto énfasis en el control de la microbiota intestinal, ya que al parecer, muchos de los diferentes factores que participan en el desarrollo de la obesidad confluyen en una modificación de ésta (Kang Y., 2013).

Así, es claro que la discusión respecto al rol de la microbiota intestinal sobre el control de peso corporal y su potencialidad como blanco terapéutico en el manejo de la obesidad es aún un tema de debate. Sin embargo, el estudio de cepas probióticas humanas autóctonas, en particular de *Lactobacillus salivarius* LPLM-O1, sobre la regulación del peso corporal, contribuiría al debate y ayudaría a la mejor comprensión de las propiedades probióticas de esta cepa bacteriana.

9 Definición de probióticos

Existen numerosas definiciones de probióticos y se han ido actualizando desde el Primer Consenso de Probióticos el año 2001 en Argentina y la más usada actualmente es “microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades

adecuadas confieren un efecto beneficioso a la salud del hospedero (Guarner F. Consensus statements from the Workshop "Probiotics and Health: Scientific Evidence", 2010).

Es importante saber que los probióticos deben cumplir ciertas características para ser denominados como tal, como por ejemplo:

- ✓ deben estar correctamente identificados debido a que los efectos saludables demostrados para una cepa microbiana específica no son extrapolables o atribuibles a otras cepas de la misma especie,

- ✓ carecer de factores de virulencia
- ✓ no tener la capacidad de producir metabolitos indeseables,
- ✓ mostrar tolerancia a las condiciones del entorno donde ejercen el beneficio, y

- ✓ que se verifique su funcionalidad probiótica en ensayos de intervención en modelos animales y humanos (Guarner F., 2010).

La evidencia existente indica que estas bacterias confieren beneficios en el manejo o la prevención de algunas enfermedades del tubo digestivo, de enfermedades con base inmunitaria y algunas alteraciones metabólicas (Marteau, 2002). El origen de las bacterias probióticas es principalmente la microbiota del colon, la vagina o la leche materna de los seres humanos, así como del medio ambiente, y muchas de sus propiedades derivan de haber coexistido con el *Homo sapiens* por cientos de miles de años en un comensalismo que fue estimulado por su inocuidad (Wilson M., 2005).

En un estudio de Collado et al., 2009 efectuado en muestras de leche de 50 madres se detectó mediante PCR cuantitativa en tiempo real, (qRT-PCR) la presencia de diversos géneros o conjuntos (clusters) de bacterias que incluían predominantemente *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, y *Lactobacillus* además de *Enterococcus* y *Clostridium* XIXa-XIVb, y con frecuencias más bajas de *Bacteroides* y *Clostridium* cluster IV sólo en dos muestras. Los recuentos totales de microorganismos expresados como logaritmo decimal de los equivalentes de genoma por mililitro fueron $6,03 \pm 0,75$ (aproximadamente un millón de microorganismos por mL) (Collado M. et al., 2009). La composición de esta microbiota varía dependiendo de la etapa y duración de la lactancia; por otra parte, la microbiota del calostro es diferente de aquella presente en la etapa de lactancia madura o de los meses finales del proceso. La microbiota de la leche materna depende también del estado nutricional de la madre y es menos diversa en las mujeres obesas (Cabrera-Rubio R. et al., 2012).

En la leche materna han sido detectadas cepas de probióticos exógenos que han sido administrados por vía oral a la madre, como por ejemplo *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 (Abrahamsson T. et al., 2009). De las especies de *Bifidobacterium* aisladas de la leche materna algunas tienen características de probióticos al ser evaluadas respecto de su capacidad de resistir los efectos del ácido clorhídrico y la bilis, de su capacidad de inhibir el crecimiento de patógenos y de adherirse a líneas celulares derivadas de los enterocitos y a la mucina intestinal de lactantes; además no se detectan en su citoplasma factores de virulencia transmisibles (plasmidios). Arboleya et al. (2011) identificaron en la leche humana *Bifidobacterium longum*, *B. lactis*, *B. animalis* y *B. catenulatum*, entre otros, con

recuentos del orden de 10^4 UFC por mL; también fueron identificadas frecuentemente algunas especies de bacterias Gram positivas con recuentos que fueron similares o incluso algo superiores a los de algunas de las especies de bacterias antes nombradas (Zivkovic, 2007). Si se tiene en cuenta que una nodriza le suministra a su hijo diariamente un volumen aproximado de 1000 ml de leche, quiere decir que en el intestino de éste último se siembran cada día 10^7 microorganismos que pertenecen a distintas superfamilias, géneros, especies y cepas; queda por saber si este proceso sigue verdaderamente un plan preestablecido y, de ser así, qué factores rigen su progreso y cuáles son sus blancos y receptores en el tubo digestivo del lactante.

Recientemente Grönlund et al. (2011) observó que al mes y a los 6 meses después del parto, tanto la similitud como la diversidad de las poblaciones de bifidobacterias fecales estaba aumentada en las parejas madre-hijo, en especial para *Bifidobacterium bifidum*, cuando las madres habían recibido por vía oral combinaciones distintivas del perfil de probióticos, siendo que estos agentes habían tenido poco efecto sobre las otras poblaciones de bifidobacterias del hijo (Grönlund M. et al., 2011).

Un aspecto que recientemente ha recibido atención es el origen de las bacterias detectadas en la leche materna. Donnet-Hughes et al., demostró en ratas que durante la lactancia se produce la migración de células dendríticas que contienen bacterias de origen colónico desde las placas de Peyer a los nódulos linfáticos mesentéricos, desde donde migrarían a la glándula mamaria a través de la circulación sanguínea y los vasos linfáticos. Este mismo grupo de investigadores demostró que en la circulación sanguínea de mujeres embarazadas transitan

monocitos cuyo citoplasma contiene bacterias vivas sin inducir síntomas de bacteremia; además, en las células acinares de la glándula mamaria se detectaron bacterias o su material genético. Este fenómeno sería característico del embarazo y la lactancia y estimularía el *imprinting* inmune de la glándula mamaria (Donnet-Hughes A. et al., 2010).

Se ha postulado que las bacterias de origen colónico podrían formar biopelículas en los galactóforos, desde los que se vaciarían al flujo de leche materna durante el amamantamiento. Se desconoce cuál sería la evolución de todo este sistema con el destete, cuando se produce la involución de acinos y galactóforos.

La colonización del intestino del recién nacido parece seguir una secuencia que ha sido estudiada en detalle, aunque muchos de sus determinantes no han sido elucidados. En las primeras 24 a 72 horas después del parto el lumen del colon contiene una cierta cantidad de oxígeno y es colonizado por enterobacterias Gram-negativas provenientes de la microbiota fecal materna. Estas bacterias consumen el oxígeno y generan un ambiente anaerobio favorable para el desarrollo de los anaerobios que pasan a constituir la microbiota dominante de los niños alimentados en forma exclusiva con leche materna, con predominio de los lactobacilos y bifidobacterias y recuentos bajos de Bacteroides y enterobacteriáceas. Cuando el niño es destetado, su microbiota residente comienza a parecerse a la de los adultos, con aumentos del número y variedad de sus especies bacterianas y cepas y entre el primero y el segundo años de vida llega a una composición estable (Turnbaugh P. et al., 2009). Sin embargo, pese a la diversidad detectable en la composición de la microbiota de los diversos individuos, a nivel metagenómico existe un núcleo común de especies cuya composición es más o menos constante, que tiene

capacidades que le permiten realizar y regular funciones metabólicas importantes (Vael C. y Desager K., 2009).

Se ha postulado que la colonización inicial del intestino del recién nacido por bacterias fecales de origen materno y por aquellas provenientes de su leche materna cumple la misión de instruir al sistema inmune del lactante, desviando su patrón de reacción inmunitaria desde el perfil Th₂, (propio de la etapa intrauterina y que genera propensión a manifestaciones alérgicas) hacia el perfil Th₁, más maduro, que se asocia con la manifestación de tolerancia inmune y genera respuestas de tipo inflamatorio normal si es necesario. Además, bacterias de la microbiota intestinal potencian la calidad de la función de barrera de la mucosa intestinal así como la producción de mucina por las células caliciformes, estimula la síntesis de péptidos con actividad antimicrobiana por las células de Paneth y el desarrollo del tejido linfático asociado con el tubo digestivo, GALT (por sus iniciales en inglés, *Gut-Associated Lymphoid Tissue*) (Wilson M., 2005).

Un aspecto que también ha merecido atención recientemente es la posible relación entre la microbiota colónica y la obesidad. La obesidad está asociada con cambios de la microbiota residente, con disminuciones de los miembros del filum *Bacteroidetes* y aumento del filum *Firmicutes* (Ley R. et al., 2006). Se ha postulado que esta microbiota tendría una mayor capacidad de extraer energía de las fracciones no digeribles de los nutrientes que llegan al colon (Turnbaugh P. et al., 2006). Cuando los obesos pierden peso, la relación entre los dos filos se normaliza, con aumento de los *Bacteroidetes* y descenso de los *Firmicutes* (Ley R. et al., 2006), lo que guarda relación con la magnitud de la pérdida de peso y no con la composición de la dieta. Cambios semejantes de la proporción entre *Firmicutes* y

Bacteroidetes han sido observados en la flora del colon de obesos en Chile, quienes también presentaban hallazgos de laboratorio de la existencia de un proceso inflamatorio de baja intensidad evidenciado por el aumento de la proteína C-reactiva circulante (Brignardello J. et al., 2010). Sin embargo, no se conoce con precisión si esta asociación es un fenómeno que tiene una relación causal o es parte de un proceso respecto de cuyo significado la información de que se dispone es escasa y aislada.

Es importante mencionar que a partir del nacimiento en el tubo digestivo del recién nacido se va estableciendo una microbiota bacteriana intestinal que va evolucionando con el tiempo hasta alcanzar su madurez, es decir, una composición de sus filos, géneros, especies y cepas similar a la de los adultos. Esta microbiota es modulada por diversos factores que modifican su composición: la microbiota colónica y vaginal maternas, el medio ambiente de la sala de parto, las bacterias de la leche materna, las bacterias de los alimentos no lácteos después del destete y los contactos con otros seres humanos. Diversos fármacos (como los antibióticos), alimentos y nutrientes (como el hierro, el zinc y los nucleótidos), moléculas indigeribles y fermentables (prebióticos, mucinas) y por último bacterias agregadas a alimentos o administradas en preparaciones farmacéuticas (los probióticos) pueden modular en algún momento u otro la composición de dicha microbiota y ejercer diversos efectos favorables para quien los consume.

Entre los microorganismos comúnmente empleados como probióticos se encuentran las bacterias ácido lácticas, que se agrupan en una gran cantidad de géneros que incluyen un considerable número de especies. Las cepas utilizadas generalmente pertenecen a especies de los géneros *Lactobacillus*, *Enterococcus* y

Bifidobacterium. Una característica de los microorganismos considerados probióticos es que son bacterias aisladas desde el tracto gastrointestinal u glándula mamaria desde individuos saludables y son nuevamente introducidas al organismo a través de un vehículo alimenticio (Amores, 2004).

10 Cepa probiótica *Lactobacillus salivarius* LPLM-O1

Con el objetivo de caracterizar poblaciones bacterianas con propiedades probióticas, varias cepas de lactobacilos fueron aisladas desde leche materna de mujeres chilenas sanas (Jara S. et al., 2011). De ese estudio la cepa probiótica LPLM-O1, denominada así por ser un lactobacilo probiótico de leche materna, presenta numerosas características probióticas dentro de las que presenta una marcada inhibición de patógenos nosocomiales, alta hidrofobicidad, rápido crecimiento en medios de cultivo comerciales; resistencia a procesos biotecnológicos como alta resistencia al secado, fácil inclusión en matrices o formulaciones y una alta resistencia a almacenamientos prolongados sin pérdidas significativas de su viabilidad y propiedades probióticas. La cepa probiótica LPLM-O1 corresponde a un *Lactobacillus salivarius* según secuenciación 16s de ARN ribosomal.

II. HIPÓTESIS

La suplementación dietaria con la cepa probiótica LPLM-O1 aislada de leche materna humana mejora los cambios metabólicos y morfométricos asociados a incremento de peso en un modelo de obesidad murina inducida por dieta.



III. OBJETIVOS

1. Objetivo general

Evaluar *in vivo* el efecto de la suplementación dietaria con una bacteria probiótica (LPLM-O1) aislada de leche materna humana sobre los parámetros metabólicos y morfométricos de un modelo de obesidad murina inducida por dieta.

2. Objetivos específicos

1. Estandarizar un modelo murino de obesidad inducido por dieta.
2. Medir el efecto de la administración oral de LPLM-O1 sobre la ganancia de peso inducida por dieta rica en grasas.
3. Cuantificar el efecto de la administración oral de LPLM-O1 sobre parámetros bioquímicos clínicos e inflamatorios en el modelo murino de obesidad inducido por dieta.
4. Valorar el efecto de la administración oral de LPLM-O1 sobre la tolerancia a la glucosa y la respuesta a insulina en modelo murino de obesidad inducido por dieta.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales y tratamiento.

50 hembras y 32 machos de la cepa murina C57BL/6 de 10-12 semanas de edad (ISP, Santiago) fueron mantenidos en el vivero de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción bajo ciclos luz/oscuridad de 12 horas y temperatura ambiente de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$. Se mantuvo 4-6 animales por caja con ambiente enriquecido (conos de cartón y papel tissue para anidaje). Los animales fueron alimentados *ad libitum* con dieta murina D12450H (10% grasa; Low fat diet: LFD. Open Source Diets; Research Diets, Inc. New Brunswick, NJ USA) en pellet. La reposición de agua se realizó cada 2 días y los cambios de viruta 1 vez por semana.

Tras un periodo de aclimatación de 2-3 semanas, los animales fueron randomizados según parámetros de peso, glicemia y trigliceridemia. Fueron divididos en 2 grupos (15 – 25 individuos por grupo según sexo) y alimentados con dieta LFD o D12451 (45% grasa; High fat diet: HFD. Open Source Diets; Research Diets, Inc. New Brunswick, NJ USA) en pellet, según protocolo, y libre acceso al agua.

Tras evidenciar un incremento significativo en peso entre el grupo LFD y HFD (~30%), cada grupo según dieta y sexo fue aleatorizado según peso y glicemia basal en dos subgrupos (n= 10-12 c/u), uno de los cuales fue tratado con placebo (gelatina de arándano) y otro con placebo suplementado con 1×10^9 UFC/g de *Lactobacillus salivarius* cepa LPLM-O1. Se evaluó el consumo de alimento diariamente y el peso de animales semanalmente (Figura 10).

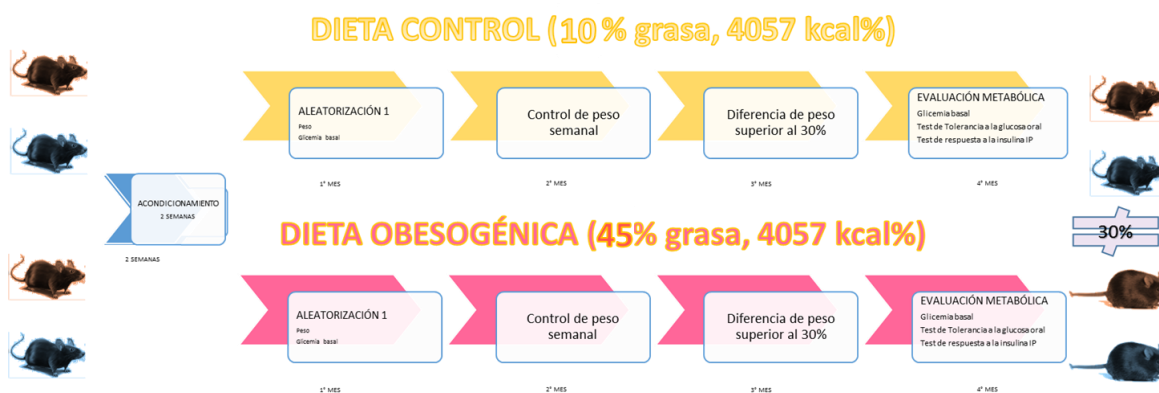


Figura 10. Modelo murino de obesidad inducida por dieta rica en grasas.

La gelatina de arándanos fue desarrollada en el Laboratorio de Procesos Biológicos de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad de Concepción. La concentración de 1×10^9 UFC/g *L. salivarius* LPLM-O1 fue determinada según estudios previos y corresponde a una concentración que permite la detección del probiótico vivo en las fecas de los animales que lo consumieron.

2. Parámetros bioquímicos

Las diferentes evaluaciones bioquímicas y metabólicas realizadas durante el protocolo se ciñeron al esquema presentado en la Figura 11. Las tomas de muestra de sangre para randomización se realizaron tras ayuno de 8 horas con libre acceso al agua dentro del ciclo de oscuridad. Se obtuvo una muestra sanguínea (~ 400uL) desde ratones adormecidos en campana de isoflurano



Figura 11. Modelo de evaluación de LPLM-O1 sobre la ganancia de peso en modelo de obesidad inducido por dieta rica en grasas.

(Forane ®, Baxter) vía punción retro-orbital con capilares del micro-hematocrito heparinizados. Los animales fueron adormecidos individualmente. Se realizó paralelamente la toma de peso y evaluación de glicemia (tiras Accu-check® Performa, Roche; sistema de automedición de glucosa en sangre OneTouch Ultra2, Johnson & Johnson Medical). Las muestras de sangre se mantuvieron en hielo hasta su procesamiento. Alícuotas de suero/plasma fueron obtenidas tras centrifugar las muestras de sangre a 6000 rpm por 10 minutos a 4°C.

La determinación de parámetros bioquímicos se adaptó a sistema de medición fotométrica en microplacas. Brevemente, para la determinación de glucosa, colesterol total y triglicéridos 2uL de suero fueron depositados en microplacas de 96 pocillos (Pro-bind™ Flat bottom polystyrene assay plates, 96 well, flat bottom, Falcon®; Beckton Dickinson. NJ USA) y mezclados con 200uL de reactivo (Glucosa-LS (GOD-PAP); Colesterol Total-LS (CHOD-PAP); Triglicéridos-LS (GPO-PAP); Valtek Diagnostics), respectivamente. Tras incubación de 10min a temperatura

ambiente se midió la absorbancia a 490nm (Synergy 2, Biotek). El cálculo de concentraciones para cada muestra se determinó usando el factor de conversión obtenido por la razón entre la concentración del analito y la absorbancia respectiva de suero calibrador (Valtrol C, Valtek Diagnostics). La cuantificación de glutámico-oxalacético (GOT) y glutámico-pirúvico (GPT) transaminasas, se realizó por ensayos cinéticos usando microplacas UV-transparentes (Costar UV plate, 96 well flat bottom; Corning Inc. NY USA). Trabajando sobre hielo, 20uL de suero fueron mezclados con 200uL de reactivo de trabajo de la enzima correspondiente compuesto por una proporción 5:1 v/v de reactivo 1: reactivo 2 (GOT-LS (IFCC) y GPT-LS (IFCC); Valtek Diagnostics). Luego, la placa fue medida a 340nm a 30°C cada 40 segundos durante 6 minutos. El cálculo de actividad enzimática para cada muestra se determinó multiplicando el factor de conversión, obtenido por la razón entre la actividad enzimática nominal respectiva y el promedio del cambio de absorbancia cada 40 segundos en el suero calibrador (Valtrol C, Valtek Diagnostics), con el promedio del cambio de absorbancia cada 40 segundos de cada muestra. No fueron consideradas los cambios de absorbancia entre 0 y 80 segundos, considerada la fase lag de la reacción.

El control de calidad de los ensayos se realizó midiendo paralelamente muestras de sueros controles valorados (Valtrol N, Valtrol P; Valtek Diagnostics). La medición fue aceptada si los valores del analito respectivo en los sueros control se encontraba dentro del rango de tolerancia.

La cuantificación de insulina (Rat/mouse Insulin ELISA Kit, Millipore), leptina (R&D Sysytems, Minneapolis, MN), interleuquina 6, TNF-alpha (Mouse IL-6, mouse

TNFalpha, Ready Set Go!, Bioscience) e interleuquina 10 (Mouse IL-10 ELISA Ready- SET- Go!® (2nd generation)) se realizó según protocolo del fabricante. El Índice HOMA-IR fue calculado usando la fórmula $[\text{glucosa (mg/dL)} \times \text{insulina (uUI/mL)}] / 405$ (Akagiri et al, 2008).

3. Test de tolerancia a la glucosa y test de respuesta a insulina.

Para realizar el Test de Tolerancia a la Glucosa (TTG) se procedió como describe Cariou et al el 2006. Brevemente, a ratones en ayuno de 8 horas con libre acceso al agua se les cuantificó glicemia basal (tiras Accu-chek® Performa, Roche; sistema de automedición de glucosa en sangre OneTouch Ultra2, Johnson & Johnson Medical). Seguido, fueron inyectados intraperitonealmente con un bolo de 1g/kg de solución de glucosa (Glucosa (Dextrosa) 30% APIROFLEX, Fresenius Kabi) y la glicemia evaluada a los 15, 30, 60, 90 y 120 min post inyección. En adelante este protocolo corresponderá al Test de Tolerancia a la Glucosa Intraperitoneal (TTGIP). Alternativamente se realizó un TTG oral (TTGO). Para ello, los ratones fueron sometidos a ayuno de 8 horas con libre acceso al agua durante 4 horas seguido de un periodo de restricción acuosa durante las 4 horas finales de este periodo. Tras medición de glicemia basal, se administró una dosis oral de 50% glucosa (1g/kg) directamente en la cavidad oral mediante un gotario, seguido de la evaluación de glicemia a los 15, 30, 60, 90 y 120 min. El área bajo la curva (AUC) de glicemia v/s tiempo se calculó usando el método de suma de polinomios. Para el Test de Respuesta a Insulina (TRIIP) se procedió como sigue. Brevemente, a

ratones en ayuno de 8 horas con libre acceso al agua se les cuantificó glicemia basal (tiras Accu-chek® Performa, Roche; sistema de automedición de glucosa en sangre OneTouch Ultra2, Johnson & Johnson Medical). Seguido, fueron inyectados intraperitonealmente con 0,4 UI insulina/kg (Actrapid 100 UI/mL; Novo-Nordisk) y la glicemia evaluada a los 15, 30, 60, 90 y 120 min post inyección.

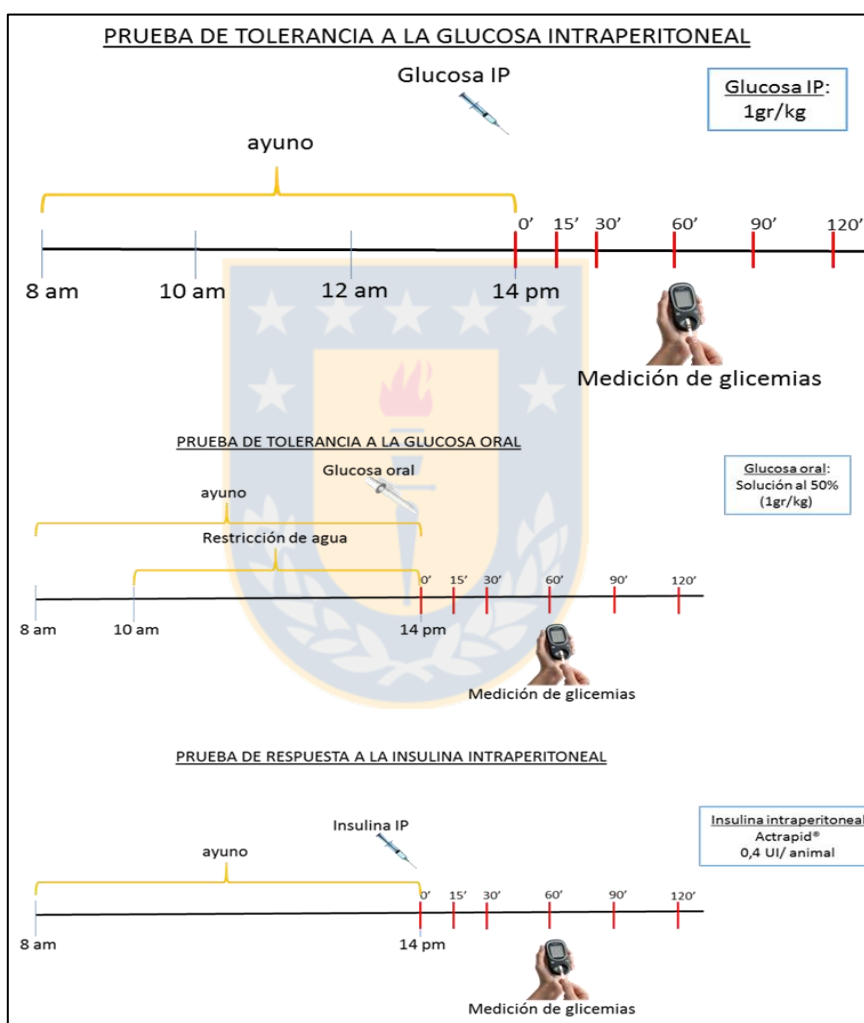


Figura 12. Esquema del protocolo de test de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (TTGIP), Test de tolerancia a la glucosa oral (TTGO) y test de respuesta a la insulina intraperitoneal (TRIIP).

4. Obtención de muestras y eutanasia

El procedimiento de eutanasia comenzó provocando un estado de anestesia en los animales usando una campana de isofluorano (Forane ®, Baxter), la cual permite una gran saturación del gas en el espacio donde se dispuso el animal. Luego de confirmar visualmente la inconciencia, el animal fue colocado de cúbito dorsal para su exanguinación por punción cardíaca. La muerte fue confirmada por dislocación cervical y finalmente el animal fue dispuesto para su disección y extracción de tejidos.

La sangre obtenida por punción cardíaca en jeringa heparinizada, fue conservada sobre hielo para luego ser centrifugada a 6000 rpm por 10 minutos a 4°C. El plasma obtenido se congeló a -80°C para análisis posteriores.

La disección de tejidos se realizó en un rango de 30 min/ratón. Se disectaron muestras de tejido graso visceral, corazón y aorta dorsal las cuales fueron dispuestas en 4% formaldehído tamponado para su posterior análisis histopatológico. Además se congeló en nitrógeno líquido muestras de tejido adiposo visceral y subcutáneo, páncreas, cerebro, hígado, músculo y tejido adiposo pardo para su posterior análisis.

5. Determinaciones morfométricas

Las determinaciones morfométricas fueron medidas al momento del sacrificio. Así, la longitud de los animales se midió con una regla desde la punta de la nariz hasta el ano. Las demás mediciones corresponden a: peso total de los animales,

peso del tejido adiposo subcutáneo y peso del tejido adiposo visceral, que se obtuvieron a través de una pesa digital.

Para el cálculo de índice de masa corporal (IMC) se dividió el peso de cada animal (g) al final del estudio por el cuadrado del largo ano-nasal (cm).

6. Análisis estadístico

Se realizó el experimento utilizando 80 animales en total (40 machos y 40 hembras). Este número se determinó en base al tiempo, espacio y capacidad de manejo de los animales del bioterio del Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología de la Facultad de Farmacia. Los datos obtenidos fueron analizados mediante test ANOVA para dos factores fijos, uno de los cuales fue el tipo de dieta (LFD o HFD), siendo el otro factor la suplementación o no del *Lactobacillus salivarius* LPLM-O1 en cada tipo de dieta. Para el análisis de muestras univariadas se utilizó el test de Kruskal-Wallis para la comparación entre los distintos grupos de dietas dentro de un mismo sexo y la Prueba de Mann-Whitney para la comparación de estos pares. Los análisis estadísticos se consideraron significativos con un $p < 0,05$.

Para los test de tolerancia a la glucosa oral e intraperitoneal (TTGO y TTGIP), test de respuesta a la insulina intraperitoneal (TRIIP) y las curvas de peso se usó el modelo lineal general para medidas repetidas, por tratarse de varias mediciones en distintos tiempos en un mismo animal o grupo de animales. En el caso del TTGO y TTGIP se realizó un test de ANOVA para medidas repetidas. Luego, utilizando las

áreas bajo la curva (AUC, por sus siglas en inglés) se realizó la comparación entre grupos de dieta y la adición o no de *Lactobacillus salivarius* LPLM-O1 con el test de Kruskal-Wallis y la comparación de pares con la prueba de Mann-Whitney.

Los datos obtenidos se analizaron con el programa GraphPad Prism version 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com).



V. RESULTADOS

1. Estandarización de un modelo murino de obesidad inducido por dieta rica en grasas (HFD).

Con el fin de establecer un modelo de obesidad inducido por dieta, se realizó un ensayo preliminar. Para ello, 16 ratones hembras de 10 a 12 semanas de edad fueron aleatorizados como se describe en “Métodos” y divididos en 2 grupos de 8 animales cada uno estadísticamente similares. Luego, un grupo inició alimentación *ad libitum* con dieta baja en grasa (LFD, 10% grasa) y el otro con dieta alta en grasa (HFD, 45% grasa), además de libre acceso a agua y en condiciones ambientales similares. Se evaluó la evolución del peso durante 90 días. Como se observa en la figura 13, el grupo bajo dieta HFD tuvo un incremento importante de peso comparado al grupo LFD que se hace significativo ya a los 60 días de tratamiento (Figura 13A). En efecto, la razón de ganancia en peso diario del grupo HFD es significativamente mayor al observado en el grupo LFD (0,14 +/- 0,08 g/día vs 0,03 +/- 0,03 g/día, respectivamente. $p < 0,01$. Figura 13B), lo que se evidencia visualmente (Figura 13B, interior)

Para evaluar el efecto de la dieta HFD sobre el metabolismo de la glucosa, se realizó un IP-TTG tras 8 semanas de tratamiento. En primer lugar, se observa que la glicemia basal es significativamente mayor en el grupo HFD comparado al grupo LFD (140,3 +/- 5,2 mg/dL vs 122,6 +/- 4,9 mgd/dL, respectivamente. $p < 0,05$. Figura 13C). Tras el bolo de glucosa, se observó que el pico de glicemia en ratones bajo dieta HFD es significativamente mayor que el observado en ratones bajo dieta LFD.

Así, el área bajo la curva (AUC) del grupo AUC es significativamente mayor al observado para el grupo LFD (27387 +/- 983 v/s 17543 +/- 598, $p < 0,001$. Figura 13C interior). Estos resultados sugieren que la dieta HFD produce intolerancia a la glucosa.

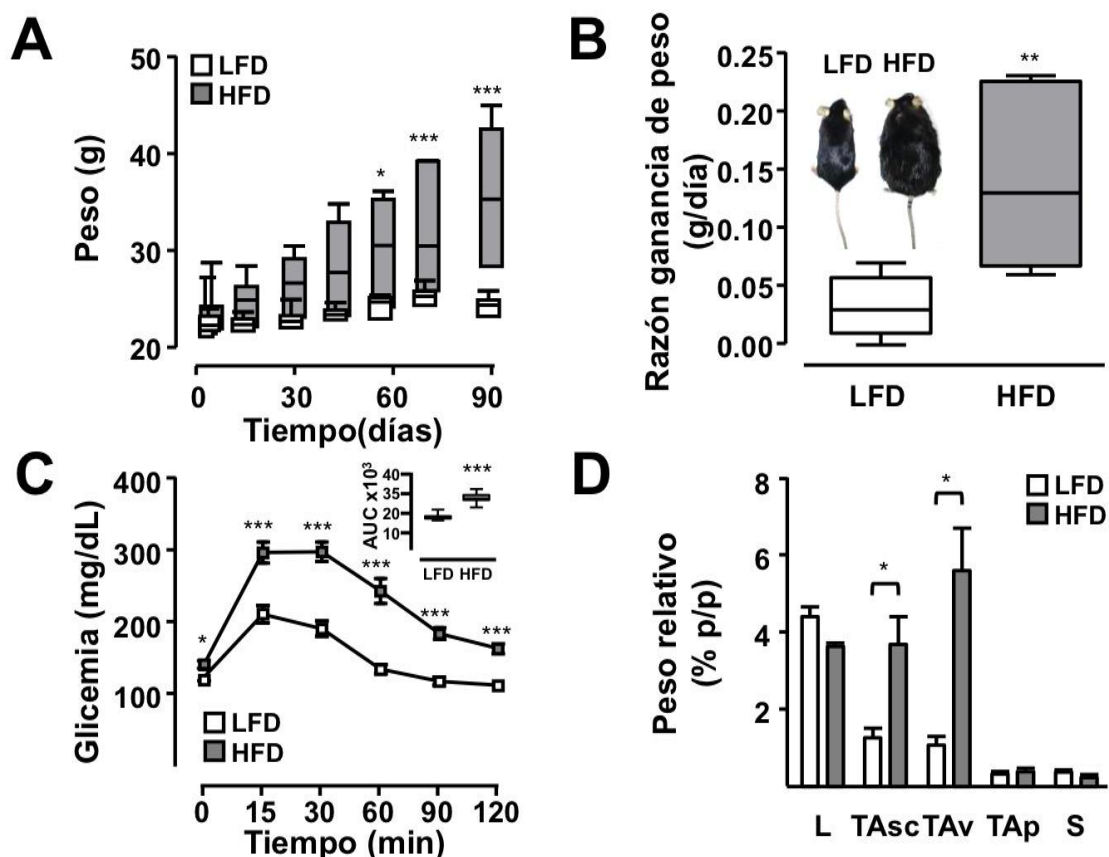


Figura 13. Estandarización de modelo murino de obesidad inducida por dieta, estudio preliminar. A) Gráfico de caja que muestra la evolución de peso de grupo alimentado con dieta rica en grasa (HFD. $n=8$) respecto al grupo alimentado con dieta baja en grasa (LFD. $n=8$). Cada columna representa la distribución de datos, indicando mediana, cuartil 1 y cuartil 3, valor máximo y valor mínimo para dicho grupo. **B)** Gráfico de caja para la velocidad promedio individual diaria de ganancia en peso de cada animal durante 90 días de dieta diferenciada, tanto para el grupo LFD como HFD. La figura interna muestra una fotografía de animales representativos de cada grupo al final del estudio. **C)** Test de tolerancia a la glucosa. Se muestra las curvas de glicemia (promedio +/- error estándar) obtenidas para el grupo LFD y HFD luego de la administración intraperitoneal de 1g/kg p.v. de glucosa tras ayuno de 6 h. El gráfico de caja interno representa la distribución por grupo de las áreas bajo la curva (area under curve; AUC) por tipo de dieta. **D)** Peso relativo de órganos respecto al peso total del animal al final del tratamiento. H: hígado, Tasc: tejido adiposo subcutáneo, Tav: tejido adiposo visceral, Tap: tejido adiposo pardo, B: Bazo. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,0001$

Se analizó qué órganos o tejidos fueron alterados por la dieta HFD. Como se observa en la Figura 13D hubo un incremento significativo de la masa relativa de tejido adiposo subcutáneo y visceral en ratones bajo dieta HFD comparado a aquellos bajo dieta LFD. Esto no fue observado en otros órganos como hígado, tejido adiposo pardo o bazo. De esta manera se establece que el incremento de peso observado en ratones bajo dieta HFD es a expensas de un incremento del tejido adiposo.

Respecto al consumo de alimento por parte de los animales sometidos al estudio, es interesante observar que no hubo diferencia entre grupos alimentados con dieta LFD o HFD durante el periodo analizado (Figura 14). De igual manera, no hubo signos de diarrea ni alteraciones de hidratación. Esto sugiere que el aumento de peso de estos animales se debe exclusivamente al alto contenido de grasas contenida en la dieta HFD.

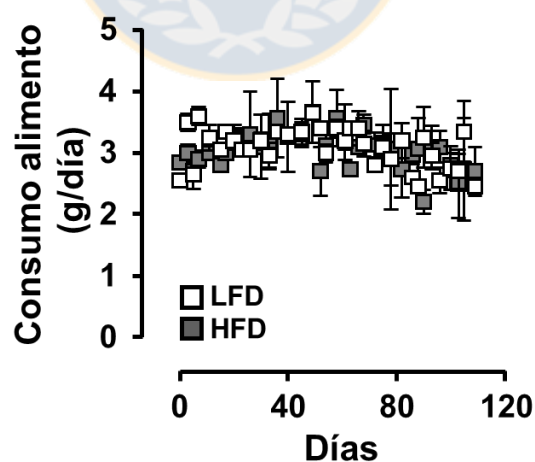


Figura 14. Perfil de consumo de alimento de los ratones. Consumo promedio diario de alimento durante el ensayo. Se observa que el perfil del consumo de alimento es similar entre el grupo LFD (n=8) y el grupo HFD (n=8) durante el periodo de estudio.

Tabla 1. Cambios de peso y bioquímica sanguínea en hembras C57BL/6 después de 16 semanas (t = 16sem) bajo dieta LFD o HFD, comparado con valores basales (t = 0sem).

Dieta Etapa (n)	LFD t = 0 sem (n = 8)	LFD t = 16 sem (n = 4)	HFD t = 0 sem (n = 8)	HFD t = 16 sem (n = 3)	
Peso (g)	22.1 ± 1.0	24,7 ± 1,5 **	22.9 ± 1.8	41,7 ± 6,6 *	&&
Glicemia (mg/dL)	196.4 ± 28.5	141,3 ± 25,5 **	195.0 ± 29.7	165,7 ± 13,6 ^{ns}	ns
Col tot (mg/dL)	98.9 ± 6.3	81,4 ± 7,2 **	94.9 ± 7.9	99,9 ± 28,9 ^{ns}	ns
TG (mg/dL)	57.2 ± 4.1	47,7 ± 10,0 ^{ns}	52.5 ± 4.3	62,0 ± 27,4 ^{ns}	ns
GOT (UI/L)	86.6 ± 31.4	158,2 ± 31,5 *	77.0 ± 16.0	205,9 ± 47,8 *	&&
GPT (UI/L)	39.0 ± 8.5	60,6 ± 20,7 ^{ns}	40.3 ± 10.8	95,0 ± 5,3 *	ns

Comparación de valores a 16 semanas respecto a su basal 0 semanas.

(*) = p < 0,05; (**) = p < 0,01; (***) = p < 0,001; (^{ns}) = p > 0.05

Comparación de valores a 16 semanas entre grupo HFD vs LFD.

(&&) = p < 0,01; (^{ns}) = p > 0.05

Para completar el análisis de nuestro estudio preliminar de modelo de obesidad, se analizó la bioquímica sanguínea de los ratones tras 16 semanas de tratamiento (Tabla 1). Para el grupo LFD, se observa un incremento discreto pero significativo de peso tras 16 semanas de tratamiento. Sin embargo, se observa una disminución significativa de la glicemia y colesterolemia, lo que puede estar dado por la estabilización de estos parámetros después de 16 semanas bajo dieta LFD, comparado a los valores inducidos por la dieta comercial usada en los centros de crianza previo al tratamiento, cuya composición no es conocida. Igualmente hay una elevación de los valores de transaminasa que es solo significativa para GOT. En el caso de la dieta HFD, se observa igualmente un incremento significativo del peso tras 16 semanas respecto al basal (p<0,05) y respecto al grupo LFD (p< 0,01).

Así también, se observa un incremento significativo de los valores de transaminasas respecto al basal ($p < 0,05$) y respecto al grupo alimentado con LFD, en particular GOT ($p < 0,01$). Esto último podría asociarse a acumulación de lípidos en el hígado.

En resumen, el uso de una dieta HFD en ratones de la cepa C57BL/6 por periodos superiores a 6 semanas, permite un incremento significativo de peso respecto a un grupo similar bajo dieta isocalórica LFD. Este incremento de peso se asocia a intolerancia a la glucosa, hiperglicemia basal, discreta modificación del perfil lipídico y elevación de marcadores inflamatorios hepáticos, sumado a un incremento significativo de la masa de tejido adiposo comparado a otros órganos. De esta manera se establece que el protocolo propuesto para la estandarización de un modelo de obesidad murina inducida por dieta es correcto.

2. Medición del efecto de la administración oral de la cepa LPLM-O1 sobre la ganancia de peso inducida por dieta rica en grasas.

Habiendo estandarizado nuestro modelo DIO, se procedió con la siguiente etapa de nuestro proyecto. Así, 80 ratones de la cepa C57Bl/6 (40 machos y 40 hembras) de 10 a 12 semanas de edad, fueron recibidos y aclimatados de acuerdo a protocolo. Posterior a ello, los animales, separados en machos y hembras, fueron muestreados y aleatorizados como se describe en “Métodos” y divididos en dos grupos (20 animales cada uno) para cada sexo, recibiendo un grupo la dieta LFD como control y el otro la dieta HFD. Se distribuyeron 5 animales por jaula, obteniendo así, 4 jaulas de animales por sexo y por tratamiento. Realizando el

control de peso semanalmente, se observó un mayor incremento de peso del grupo HFD respecto al grupo LFD desde la segunda semana de dieta, resultando en una diferencia significativa en el aumento de peso del grupo LFD respecto al grupo HFD en ambos sexos (Figura 15). Sin embargo, los grupos de hembras se comportaron de manera más estable y homogénea respecto a la ganancia de peso en el tiempo, comparado a los machos quienes mostraron mayor dispersión de los valores. Pese a esto, tras 90 días de tratamiento se obtuvo animales machos y hembras obesos (grupo HFD), basado en un incremento en peso superior al 30% respecto de a sus controles (LFD) en ambos sexos.

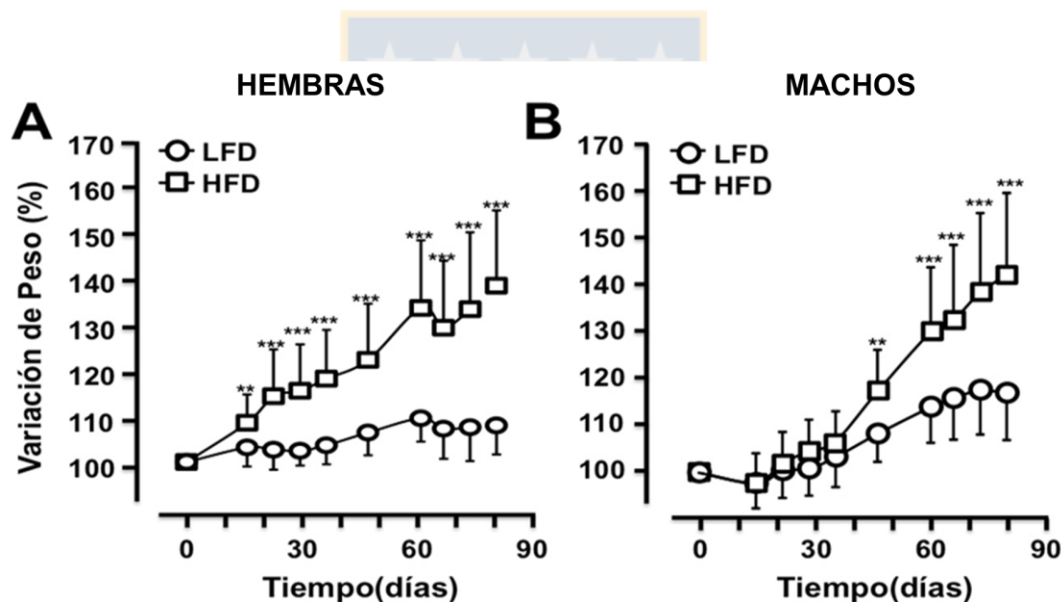


Figura 15. Variación de peso de ratones (hembras y machos) alimentados con dieta baja en grasas (LFD) y alta en grasas (HFD), expresada en porcentaje respecto al peso inicial. (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Con el fin de establecer si este incremento en peso se asoció a una alteración del metabolismo de glucosa, se realizó un IP-TTG. Como se observa en la figura 16, las curvas de glicemia fueron significativamente mayores para aquellos grupos alimentados con dieta HFD, comparados a los grupos bajo dieta LFD. Es interesante

notar que la glicemia basal de los machos bajo dieta HFD es mayor que la observada en hembras. De igual forma, el pico de glicemia en machos post bolo de glucosa fue mayor que el observado en hembras. Siendo estos resultados similares a los observados en el ensayo de estandarización del modelo DIO, podemos indicar que los ratones bajo dieta HFD son obesos e intolerantes a la glucosa. Dadas estas condiciones, procedimos a la siguiente etapa.

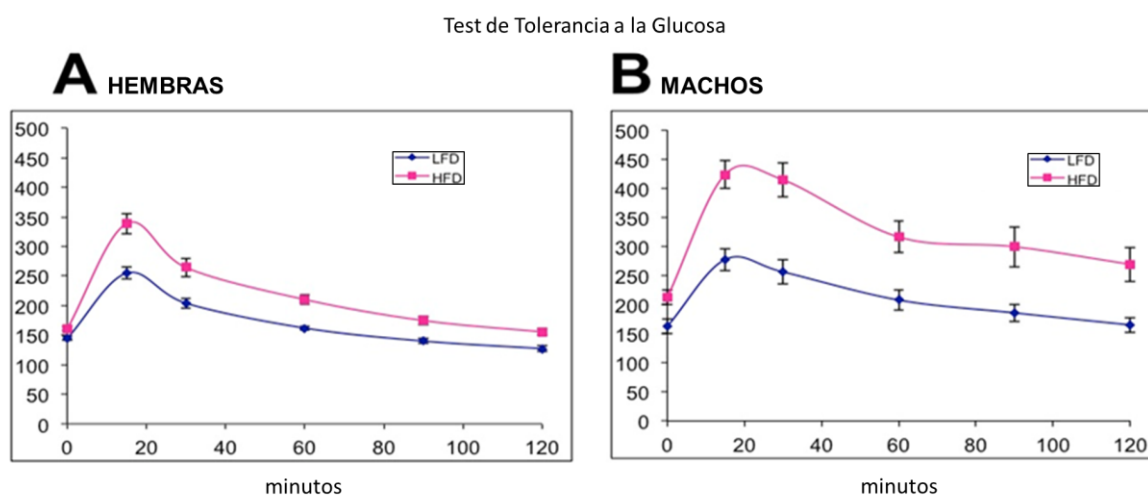


Figura 16. Test de tolerancia a la glucosa. Se muestra las curvas de glicemia (promedio +/- error estándar) obtenidas para el grupo LFD y HFD en A) hembras y B) Machos, luego de la administración intraperitoneal de 1g/kg p.v. de glucosa tras ayuno de 6 h.

Establecido el estado obeso, machos y hembras fueron randomizados separadamente según dieta utilizando parámetros descritos previamente, dividiéndolos en 2 subgrupos. Los subgrupos fueron designados aleatoriamente para recibir placebo (Pla; jalea de arándano) o cepa *Lactobacillus salivarius* LPLM-O1 (Lac; jalea de arándano suplementada con 1×10^9 UFC/g *Lactobacillus salivarius* LPLM-O1).

Tras el inicio de la suplementación de las respectivas dietas LFD o HFD con placebo o cepa LPLM-O1 (Pla y Lac, respectivamente), uno de los primeros aspectos a evaluar fue si los animales modificaban la cantidad de alimento ingerido a lo largo del estudio. Para ello se evaluó diariamente la cantidad de *pellet* (LFD o HFD, según grupo) y gelatina ingerida. Para esta última se consideró la taza de deshidratación, la que fue estimada en 1.1% por hora.

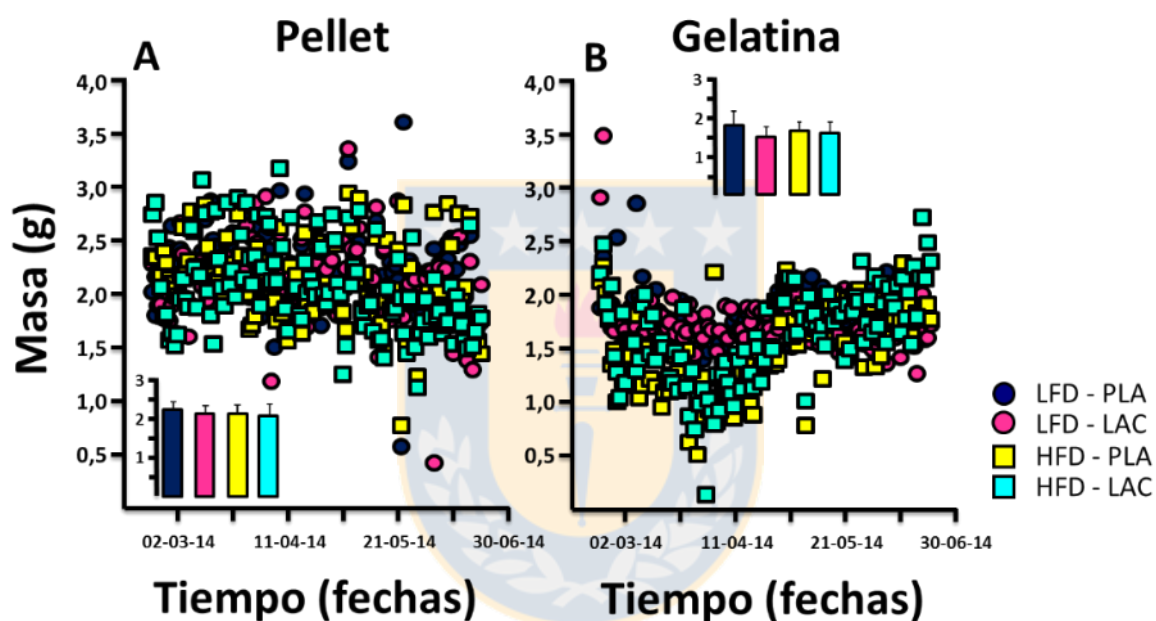


Figura 17. Consumo de alimento en hembras. A) perfil del consumo de alimento (pellet) en gramos al día, de los diferentes grupos en estudio B) perfil del consumo de gelatina de arándano en gramos al día, de los diferentes grupos en estudio. LFD= dieta LFD; HDF= dieta HFD; PLA = placebo; LAC = jalea suplementada con LPLM-O1

Si bien a lo largo del estudio hubo una variación importante del consumo diario de pellet y gelatina (Figura 17), no hubo mayor diferencia entre grupos por sexo (Tabla 2). Al respecto, datos no publicados en nuestro grupo establecen que el consumo diario de pellet en ratones C57BL/6 es $\sim 2,5\text{g/día}$, lo que se condice con los resultados observados en el presente ensayo. Sin embargo, un dato interesante es que el consumo de gelatina en machos duplica al observado en hembras. Esto

podría estar relacionado a la mayor disponibilidad de gelatina en machos al haber una misma cantidad para un grupo menor de animales por caja.

Tabla 2: Consumo promedio de pellet o gelatina en ratones C57BL/6. Durante todo el estudio se cuantificó diariamente la cantidad de alimento consumido promedio por cada grupo de animales.

Dieta – Tratamiento (n)	Pellet (g/día)	Gelatina (g/día)
Hembras		
LFD – Pla (n = 11)	2.2 ± 0.2	1.8 ± 0.3
LFD – Lac (n = 12)	2.1 ± 0.2	1.5 ± 0.2
HFD – Pla (n = 10)	2.1 ± 0.2	1.7 ± 0.2
HFD – Lac (n = 10)	2.1 ± 0.3	1.6 ± 0.2
Machos		
LFD – Pla (n = 6)	2.7 ± 0.3	3.6 ± 0.3
LFD – Lac (n = 7)	3.1 ± 0.4	3.8 ± 0.8
HFD – Pla (n = 6)	2.4 ± 0.4	3.5 ± 0.7
HFD – Lac (n = 7)	2.7 ± 0.2	3.0 ± 0.6

No existiendo mayores diferencias de consumo de alimento o suplemento entre grupos por sexo, se analizó la evolución del peso en machos y hembras según tratamiento (Figura 18). Como era esperable, los grupos alimentados con dieta HFD y placebo (HFD-PLA) mantuvieron una curva de ganancia en peso mayor que su control (LFD-PLA), que fue significativa en el caso de las hembras (Figura 18A-C). Sin embargo, al suplementar la dieta HFD con la cepa LPLM-O1 (HFD-LAC) se observa que la ganancia de peso fue menor comparado a su placebo para ambos sexos, pero significativo en hembras (Figura 18A-C). El efecto de menor ganancia de peso con el suplemento de la cepa LPLM-O1 también se observó, pero en menor cuantía, en machos y hembras bajo dieta LFD,

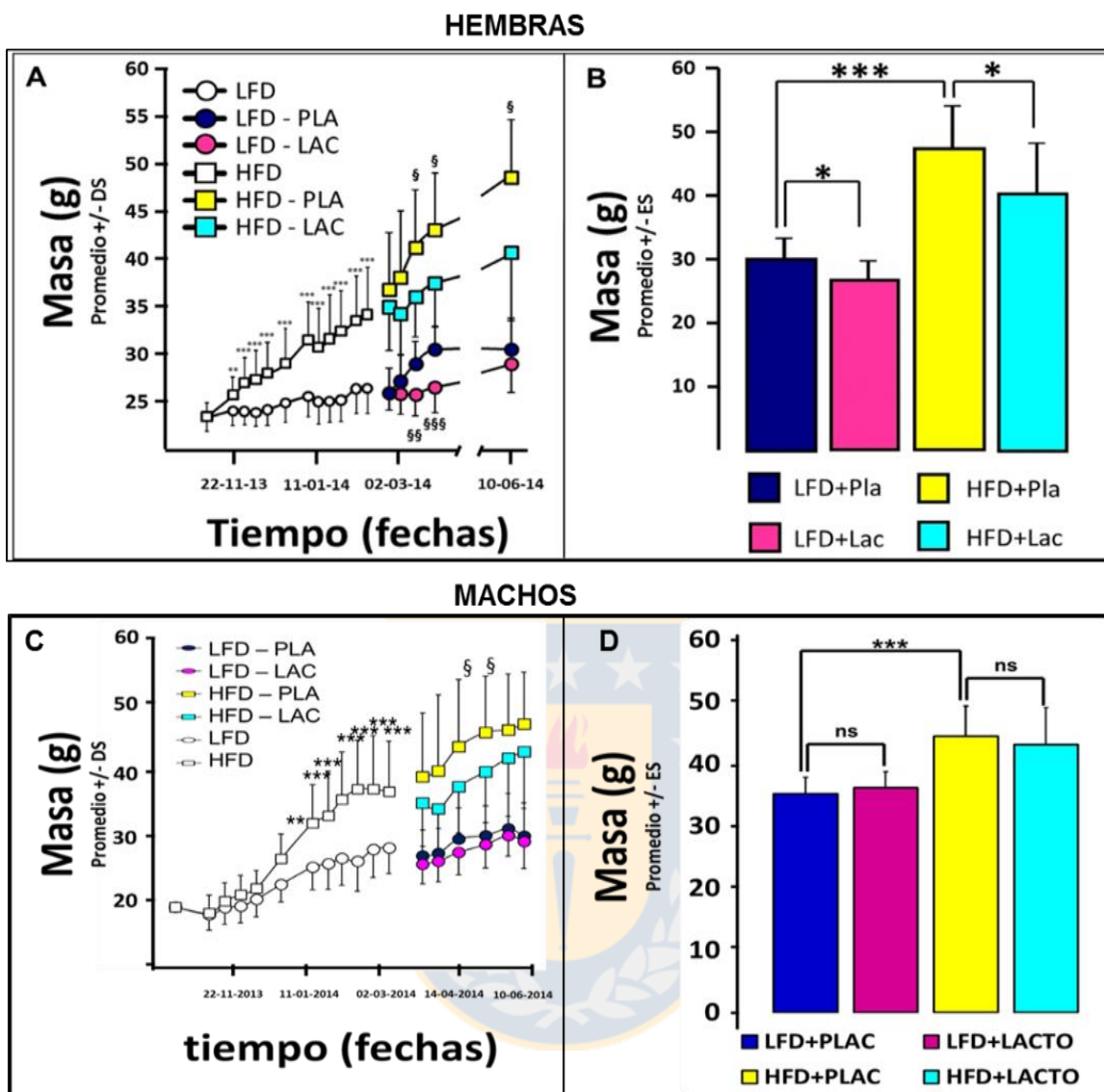


Figura 18 Evolución de la masa en gramos durante las semanas de desarrollo del modelo de obesidad (puntos blancos) y luego, durante el tratamiento LFD y HFD con suplemento del probiótico LPLM-O1 y sin él (puntos de color), para **A)** hembras y **C)** machos respectivamente (*/ \S $p < 0,05$; **/ $\S\S$ $p < 0,01$; ***/ $\S\S\S$ $p < 0,001$). **B y D:** gráfico muestra los promedios finales (\pm error estándar, ES) de las masas en gramos al momento del sacrificio de los animales, para hembras y machos respectivamente.

pero significativo solo en hembras. Tras sacrificio, los valores de peso de cada grupo evidencian que la suplementación dietaria con la cepa LPLM-O1 disminuye la ganancia de peso (Figura 18B-D). Si bien este efecto es discreto en machos, en

hembras se observó un efecto significativo que es evidente tanto para dieta HDF y LFD.

Con estos resultados podemos concluir que la suplementación dietaria por un periodo de 16 semanas con cepa LPLM-O1 reduce la ganancia de peso bajo un régimen alto en grasas, particularmente en ratones C57BL/6 hembras.

3. Cuantificación del efecto de la administración oral de LPLM-O1 sobre parámetros bioquímicos clínicos y citoquinas en el modelo DIO.

3.1. Parámetros bioquímicos

Se analizaron diversos parámetros bioquímicos en las muestras de plasma aisladas tras el sacrificio de los animales, para evaluar el fenotipo obeso y el efecto que la suplementación dietaria con la cepa LPLM-O1 tendría en ellos.

Si bien se observaron algunas diferencias estadísticamente significativas solo entre parámetros de los grupos LFD y HFD con placebo – indicando un efecto significativo de la dieta –, es interesante comentar sobre algunos de los resultados obtenidos. En particular se observa que los animales alimentados con dieta HFD presentan a una elevación muy discreta de la glicemia basal comparada con aquellos alimentados con dieta LFD, sobre todo en hembras. Sin embargo, se evidencia una marcada elevación de la insulinemia basal con la consecuente elevación del índice HOMA-IR. Ello indica que los animales bajo dieta HFD son resistentes a la insulina. Ahora bien, la suplementación dietaria con cepa LPLM-O1 disminuye la concentración de insulina basal en los ratones obesos, lo que se asocia

a una disminución del índice HOMA-IR. Si bien esta disminución no es significativa, la tendencia observada sobre esos parámetros en hembras y machos obesos sugiere fuertemente que la cepa LPLM-O1 disminuye la resistencia a la insulina en estos animales.

Tabla 3: Parámetros bioquímicos en ratones C57BL/6 por grupo al sacrificio. Resultados se muestran en promedio \pm error estándar.

Dieta Tratamiento	Glucosa (mg/dL)	Insulina (uUI/mL)	HOMA IR	Col tot (mg/dL)	TG (mg/dL)	GOT (U/L)	GPT (U/L)
Hembras							
LFD - Pla	125.3 \pm 6.2	10.9 \pm 2.3	3.3 \pm 0.7	86.4 \pm 6.3	73.9 \pm 5.4	117.2 \pm 14.1	37.8 \pm 9.0
LFD - Lac	109.1 \pm 6.2	14.3 \pm 4.3	4.0 \pm 1.2	75.5 \pm 4.9	61.3 \pm 4.0	103.5 \pm 9.1	29.6 \pm 3.3
HFD - Pla	129.1 \pm 6.2	34.1 \pm 5.6	10.8 \pm 1.9	119.2 \pm 5.5	62.7 \pm 4.0	165.7 \pm 5.6	82.2 \pm 8.8
HFD - Lac	109.4 \pm 8.1	22.1 \pm 5.4	6.6 \pm 2.0	100.4 \pm 3.1	59.9 \pm 6.1	166.2 \pm 14.3	81.0 \pm 12.4
Machos							
LFD - Pla	128.0 \pm 13.0	20.8 \pm 9.5	7.8 \pm 3.6	125.2 \pm 10.9	115.6 \pm 8.6	93.0 \pm 23.9	36.7 \pm 9.8
LFD - Lac	126.1 \pm 7.1	32.3 \pm 10.4	10.6 \pm 4.0	127.0 \pm 18.7	100.2 \pm 13.7	107.5 \pm 16.6	40.7 \pm 8.0
HFD - Pla	153.0 \pm 15.4	59.8 \pm 14.0	23.2 \pm 7.5	158.5 \pm 15.1	79.8 \pm 5.7	110.4 \pm 15.5	67.7 \pm 2.6
HFD - Lac	148.6 \pm 16.8	38.3 \pm 7.2	15.1 \pm 4.1	154.1 \pm 15.2	85.2 \pm 7.5	125.2 \pm 16.2	65.9 \pm 7.8

Col tot: colesterolemia total ; TG: trigliceridemia.

Valores **en negro** indican diferencia estadística $p < 0.05$ entre LFD-Pla vs HFD-Pla

Respecto al colesterol total, existe una marcada tendencia al aumento en los grupos bajo dieta HFD, significativa ($p < 0,05$) solo en hembras. Sin embargo, la suplementación dietaria con *Lactobacillus salivarius* LPLM-O1 en ambos grupos, no tiene un efecto evidente. Sobre los valores de triglicéridos, no se observó un efecto evidente de la dieta, salvo en machos, sin mayor modificación inducida por la cepa LPLM-O1. Así, *Lactobacillus salivarius* LPLM-O1 tiene un efecto marginal sobre parámetros lipídicos en ratones.

Se puede también analizar sobre estos resultados que la elevación significativa de las transaminasas GOT y GPT en los animales obesos se asociaría a un proceso inflamatorio hepático, probablemente hígado graso. Sin embargo, el tratamiento con cepa LPLM-O1 no tiene mayor efecto sobre estos parámetros.

En resumen, la suplementación dietaria con la cepa LPLM-O1 tiene un efecto marginal sobre lípidos en sangre y parámetros inflamatorios hepáticos. Sin embargo, se observa una disminución de parámetros glucídicos que, aunque no significativos, sugieren una mejora de la resistencia a la insulina inducida por la dieta alta en grasa.

3.2. Leptina y citoquinas

Al cuantificar leptina, como indica la Tabla 4, es claro que existe un aumento de la concentración sanguínea de leptina en los individuos que consumen dietas HFD comparado con sus controles LFD, significativo en el caso de las hembras. Sin embargo, la suplementación con la cepa *Lactobacillus salivarius* LPLM-O1 disminuye la concentración de esta hormona, efecto significativo en el caso de hembras bajo dieta HFD. Esto se condice con los resultados de la disminución de peso observada en este grupo.

Tabla 4: Leptina y citoquinas en ratones C57BL/6 por grupo al sacrificio. Resultados se muestran en promedio \pm error estándar.

Dieta Tratamiento	Leptina (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	TNFalfa (pg/mL)	IL-10 (&) (pg/mL)
Hembras				
LFD - Pla	477.0 \pm 50.3	73.4 \pm 43.4	136.2 \pm 119.5	4970
LFD - Lac	368.6 \pm 30.3	63.7 \pm 3.1	57.2 \pm 5.8	1520
HFD - Pla	996.9 \pm 73.6	162.5 \pm 49.2	114.3 \pm 91.4	0
HFD - Lac	696.6 \pm 98.3 *	86.2 \pm 24.5	150.0 \pm 7.1	3620
Machos				
LFD - Pla	335.4 \pm 69.8	43.9 \pm 10.6	141.5 \pm 212.9	6670
LFD - Lac	330.0 \pm 58.1	48.9 \pm 20.6	67.9 \pm 52.2	1720
HFD - Pla	576.3 \pm 81.0	219.2 \pm 52.0	166.5 \pm 37.9	0
HFD - Lac	498.4 \pm 65.7	115.3 \pm 13.6	180.0 \pm 98.6	5770

(&) Valores de IL-10 representan la media de 2 determinaciones
 Valores **en negro** indican diferencia estadística $p < 0.05$ entre LFD-Pla vs HFD-Pla
 (*) $p < 0,05$ Lac vs Pla

También se cuantificó IL-6. Esta citoquina proinflamatoria se eleva en aquellos grupos alimentados con la dieta HFD, comparado a LFD y es discretamente disminuida bajo suplementación con la cepa LPLM-O1. Este perfil proinflamatorio inducido por la dieta HFD no se observa al cuantificar TNFalfa ni IL-10. Sin embargo, la cuantificación de estas citoquinas fue compleja debido a limitaciones técnicas.

Sin embargo, los datos anteriores se correlacionan con un incremento de la masa adiposa bajo dieta HFD que propiciaría un perfil proinflamatorio, fenómeno que sería parcialmente mejorado por la suplementación dietaria con la cepa LPLM-O1.

3.3. Tejidos

Con el fin de profundizar respecto al efecto discreto de la suplementación con cepa LPLM-O1 sobre el peso en ratones HFD, se comparó el peso de diferentes tejidos post-mortem (Tabla 5). Para machos y hembras, el consumo de la dieta HFD produce un incremento de la masa de tejido adiposo blanco (subcutáneo, periovárico y epididimal, respectivamente), particularmente significativo en hembras. Sin embargo, la suplementación dietaria con la cepa LPLM-O1 produce una discreta disminución de la masa de tejido adiposo en los animales obesos HFD comparado al placebo, que es significativa para el tejido adiposo periovárico en hembras. Este efecto, aunque menor, se observa también en el tejido adiposo epididimal en machos.

Tabla 5: Peso de tejidos en ratones C57BL/6 por grupo al sacrificio. Resultados se muestran en promedio \pm desviación estándar.

Dieta Tratamiento	TA subc (g)	TA pov (g)	TA epi (g)	TA pardo (g)	Hígado (g)
Hembras					
LFD - Pla	0.8 \pm 0.3	1.2 \pm 0.5		0.1 \pm 0.0	1.1 \pm 0.2
LFD - Lac	0.5 \pm 0.2	0.9 \pm 0.3		0.2 \pm 0.1	1.0 \pm 0.2
HFD - Pla	2.8 \pm 0.6	3.6 \pm 1.3		0.2 \pm 0.0	1.3 \pm 0.2
HFD - Lac	2.0 \pm 0.9	2.3 \pm 1.2 *		0.2 \pm 0.1	1.3 \pm 0.2
Machos					
LFD - Pla	0.7 \pm 0.3		0.9 \pm 0.4	0.2 \pm 0.0	1.3 \pm 0.1
LFD - Lac	0.7 \pm 0.4		0.9 \pm 0.5	0.2 \pm 0.1	1.4 \pm 0.3
HFD - Pla	1.2 \pm 0.5		1.3 \pm 0.6	0.3 \pm 0.1	1.8 \pm 0.4
HFD - Lac	1.1 \pm 0.7		1.0 \pm 0.3	0.2 \pm 0.1	1.7 \pm 0.4

TA subc: tejido adiposo subcutáneo; TA pov: tejido adiposo periovárico; TA epi: tejido adiposo epididimal; TA pardo: tejido adiposo pardo.

Valores **en negro** indican diferencia estadística $p < 0.05$ entre LFD-Pla vs HFD-Pla

(*) $p < 0,05$ Lac vs Pla

Es interesante también observar que el peso del hígado bajo HFD incrementa respecto a LFD, lo que podría relacionarse a hígado graso. Sin embargo, el efecto de la cepa LPLM-O1 sobre este parámetro no es significativo.

En resumen, la administración oral de LPLM-O1 como suplemento de una dieta rica en grasa disminuye la resistencia a la insulina en animales obesos, asociado a una discreta disminución del perfil proinflamatorio asociado a obesidad. De igual forma tendría un efecto importante disminuyendo la masa de tejido adiposo blanco.

4. Evaluación del efecto de la administración oral de LPLM-O1 sobre la tolerancia a la glucosa y respuesta a la insulina en modelo DIO.

Luego de tres meses de dieta diferenciada (LFD y HFD) con y sin adición de *Lactobacillus salivarius* LPLM-O1, los animales fueron evaluados por test de respuesta a la insulina intraperitoneal (TRIIP), test de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (TTGIP) y test de tolerancia a la glucosa oral (TTGO) modificado. Estas evaluaciones fueron hechas con intervalos mínimos de 10 días entre una y otra.

4.1. Test de respuesta a la Insulina Intraperitoneal (TRIIP)

En relación a esta prueba, no se observaron diferencias entre las curvas de glicemia según dieta (LFD v/s HFD) post administración de insulina intraperitoneal (Figura 19). De igual forma, tampoco se observó un efecto del consumo de *Lactobacillus salivarius* LPLM-O1 sobre la curva de glicemia. Llama la atención que

el nivel de dispersión de los datos es alto, lo que disminuye significativamente la sensibilidad de esta técnica.

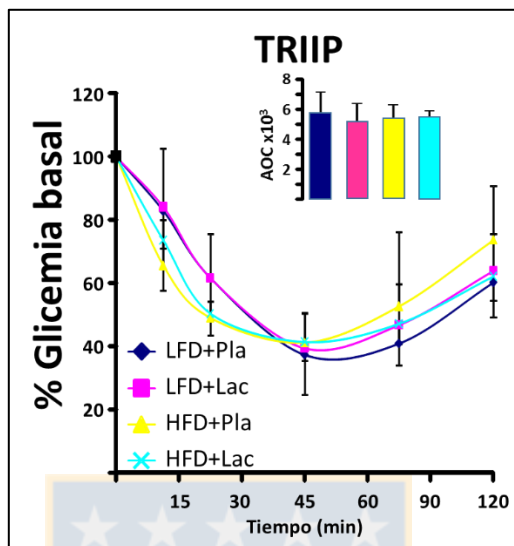


Figura 19. Curva de Glicemia basal post administración de dieta diferenciada durante 12 semanas, en machos y hembras, expresada en porcentaje de variación respecto a la glicemia basal durante los tiempos 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos; junto al gráfico de las áreas bajo las curvas (AOC) respectivo, no existiendo diferencia significativa entre los diferentes grupos de estudio, LFD+plac, LFD+Lacto, HFD+plac, HFD+Lacto ($p > 0.05$).

4.2. Test de Tolerancia a la Glucosa Intraperitoneal (TTGIP)

En esta prueba, sí se obtuvo diferencias en las curvas, principalmente a nivel de tipos de dieta, ya que las curvas de glicemia en los grupos HFD son marcadamente más altas durante todos los tiempos de medición y con una diferencia significativa ($p < 0,05$) a los 15, 30 y 45 minutos. Sin embargo, no se aprecia diferencia entre los grupos de igual dieta con o sin *Lactobacillus salivarius* LPLM-O1. (Figura 20)

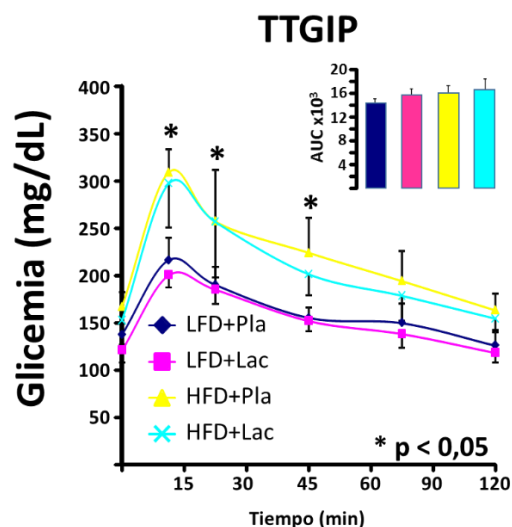


Figura 20. Test de tolerancia a la glucosa intraperitoneal expresado en la curva de glicemia (mg/dL) durante los tiempos 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos después de la administración de glucosa intraperitoneal; junto al gráfico de área bajo la curva (AUC), de los diferentes grupos de estudio, LFD+plac, LFD+Lacto, HFD+plac, HFD+Lacto (*, $p < 0.05$).

4.3. Test de Tolerancia a la Glucosa oral (TTGO)

Este test se realizó con el fin de ver la respuesta fisiológica del organismo al consumo oral de glucosa, ya que el test habitual es a través de la administración intraperitoneal, pero la absorción de glucosa por esta vía no es la forma natural del ingreso de carbohidratos, de tal manera que podrían estar afectando diversos factores que participan durante la ingesta oral de glucosa. Como indica la figura 21, en este test sólo existe diferencia significativa de los resultados al minuto 45 entre dietas HFD y LFD sin adición de *Lactobacillus salivarius* LPLM-O1 (*, $p > 0.05$).

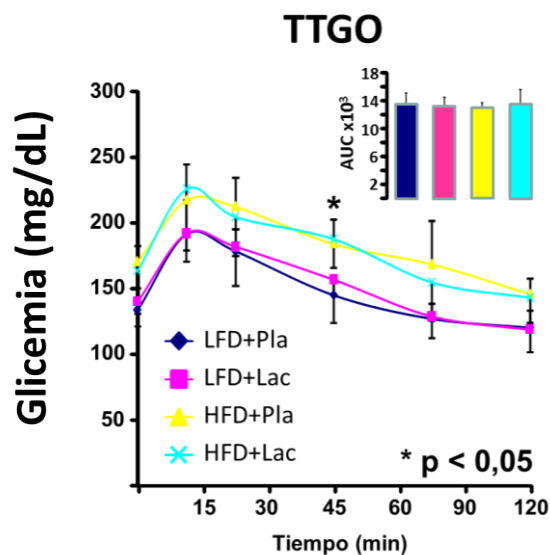


Figura 21. Test de tolerancia a la glucosa oral modificado expresado en la curva de glicemia (mg/dL) durante los tiempos 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos después de la administración de glucosa oral; junto al gráfico de área bajo la curva (AUC), de los diferentes grupos de estudio, LFD+plac, LFD+Lacto, HFD+plac, HFD+Lacto (*, $p > 0.05$).

Con estos resultados podemos concluir que la dieta HFD altera el metabolismo de la glucosa produciendo intolerancia. Sin embargo, la suplementación con la cepa LPLM-O1 no tiene efecto sobre este ensayo, al menos durante el periodo de tiempo que duró en tratamiento.

VI. DISCUSIÓN

La obesidad y los problemas relacionados con la salud están aumentando rápidamente en todo el mundo. Los hábitos alimentarios y estilos de vida están asociados con enfermedades relacionadas con la obesidad (Novotny et al, 2014).

Raoult D. (2010) sugirió que, a pesar de todo, existiría algún tipo de relación entre la microbiota de los seres humanos y la obesidad. En el año 2010, en un modelo experimental en ratas con obesidad inducida por una dieta con alto contenido de grasa se demostró que *Bifidobacterium breve* B-3 ejercía efectos antiobesidad e inducía disminuciones de la acumulación de la grasa corporal total, a nivel de las almohadillas de grasa epididimaria y que induciría mejorías de los perfiles de lípidos en el plasma sanguíneo. Además, en estos animales los genes que regulan la sensibilidad a la insulina se encontraban activados (Kondo S. et al., 2010).

Los tratamientos tradicionales basados en las dietas hipocalóricas y el aumento de la actividad física han tenido cierto éxito en el control de la obesidad. Sin embargo, por lo general estas estrategias dan lugar a reducciones de peso limitadas y temporales. En este contexto, la identificación de nuevos factores implicados en la regulación del balance energético es fundamental a fin de desarrollar estrategias de intervención más eficientes para controlar la obesidad y las enfermedades asociadas. Se ha propuesto el uso de estrategias dietéticas destinadas a modular la composición de la microbiota como medio para controlar los trastornos metabólicos de forma más eficaz. Estas incluyen la administración de oligosacáridos prebióticos, que estimulan el crecimiento y/o la actividad metabólica

de las bacterias beneficiosas, y de cepas bacterianas probióticas, en forma de alimentos funcionales y suplementos.

Actualmente, las personas, pese a consumir dietas con grandes cantidades de lípidos y carbohidratos, tienden a elegir alimentos o suplementos dietéticos que pueden ejercer un efecto beneficioso para la salud. En este contexto, hay muchos estudios que han demostrado los efectos de los probióticos en la obesidad y las enfermedades metabólicas, teniendo en cuenta el peso corporal, los niveles de lípidos y metabolismo hepático (Aggarwal et al, 2013; Poutahidis et al, 2013; Zarrati et al, 2013). La evidencia inicial de la relación entre la obesidad y la composición microbiana intestinal se informó hace 30 años, cuando la pérdida de peso inducida quirúrgicamente por cirugía de *bypass* gástrico y la ganancia de peso a través de lesiones del núcleo hipotalámico ventromedial se encontraron asociadas con cambios en la ecología microbiana intestinal. Estos primeros estudios utilizaron métodos de cultivos microbiológicos que detectan una baja cantidad de los microorganismos alojados en el intestino. De esta manera, se han emprendido muchos estudios dirigidos a la modulación la composición de la microbiota intestinal con el fin de controlar estos trastornos con una base metabólica, tales como la obesidad. Sato et al. en el 2008 demostraron que la administración de la leche fermentada con *Lactobacillus gasseri* disminuyó el tamaño de los adipocitos en el tejido adiposo mesentérico y también redujo los niveles séricos de leptina. Esto demostró el potencial efecto regulador de tales bacterias sobre el crecimiento del tejido adiposo y, por lo tanto, sobre la obesidad. En otro estudio realizado por Ma X. et al. en el 2008 usando ratones alimentados con una dieta rica en grasas, la administración de *Lactobacillus* , *Bifidobacterium* , y *Streptococcus* en la dieta

mejoró la esteatosis y la resistencia a la insulina inducida en estos ratones por el exceso de grasa en la dieta. Los estudios de este tipo están mejorando nuestra comprensión de la relación potencial entre metabolismo y ciertos componentes de la microbiota. Sin embargo, se necesitan más estudios para responder a todas las preguntas y determinar los factores implicados en el desarrollo de la obesidad y sus enfermedades metabólicas asociadas.

En modelos animales, la relación de los géneros bacterianos intestinales más destacados, *Bacteroidetes* y *Firmicutes*, se alteran en respuesta a cambios en la dieta (Sonnenburg, 2010). Estudios realizados en ratones han demostrado la relación entre el equilibrio energético, la dieta, y la composición de la microbiota intestinal. El trasplante de la microbiota intestinal de los donantes obesos resultó en aumento de la adiposidad en los individuos receptores en comparación con una transferencia similar desde donantes delgados (Nicholson J. et al., 2012).

Diferentes experimentos previos realizados con otras cepas de *Lactobacillus* sp. han mostrado efectos anti-obesogénicos. En este sentido, y dadas las propiedades biológicas y potencial industrial de la cepa LPLM-O1, se hace interesante evaluar su efecto sobre el desarrollo de obesidad, lo que podría ser un aporte en el tratamiento y principalmente prevención de la obesidad en nuestra sociedad (Turnbaugh P. et al., 2008; Guarner F. et al., 2010; Kang J. et al., 2010; Sanders M. et al., 2011; Zimmet P. et al., 2011; Jung S. et al., 2013; Mujico J. et al., 2013; Petschow B. et al., 2013).

El presente estudio se llevó a cabo con el fin de analizar el efecto de la suplementación con probióticos una dieta alta en grasas que induce obesidad en ratones, utilizando un modelo animal de DIO (diet-induced obesity) en ratones

machos y hembras C57BL/6J que recibieron una dieta alta en grasas (#D12451, Open Source Diets) y su control bajo en grasas (#D12450B), las cuales tuvieron un grupo control sin la adición de *Lactobacillus salivarius* LPLM-O1 y otro grupo donde sí se agregó el probiótico proveniente de leche materna humana. El probiótico fue administrado a una concentración de 1×10^9 UFC/gr de jalea de arándano como vehículo de administración, debido a que existe la idea de administrarlo de esta manera en estudios clínicos posteriores en niños en etapa escolar.

La mayor parte de la bibliografía (Yun et al, 2009; Kang et al, 2010; Takemura et al, 2010; Arora, et al, 2012; Kang et al, 2013, Mujico et al, 2013 ; Park et al, 2013), además de las empresas que distribuyen animales de laboratorio como The Jackson[®] Laboratory (<https://www.jax.org/jax-mice-and-services/strain-data-sheet-pages/body-weight-hart-000664>) describen las curvas de crecimiento de ratones C57BL/6 y de otras cepas, en función de la edad y ganancia en peso, no en talla. Por ello, se podría inferir que la ganancia de peso de nuestros animales se debió a un aumento de su talla. Sin embargo, la información disponible coincide que las curvas de ganancia en peso de ratones C57BL/6 bajo dietas estándar se estabilizan desde las 12 a 15 semanas de edad. Igualmente, pese a la variación de datos publicados, el peso de hembras y machos C57BL/6 entre las 15 y 20 semanas de edad es aproximadamente 20-25 gramos. Bajo esta perspectiva, nuestras animales inician el tratamiento dietario a la edad de 15 semanas, el cual se extendió hasta las 31 semanas de edad. Si bien no podemos establecer una variación de talla (debido a que no medimos los animales al inicio del estudio), el incremento significativo de peso sobre el 70% observado en el grupo HFD respecto al LFD, no es debido a un

sobrecrecimiento inducido por dieta, sino más bien asociado a un incremento del volumen abdominal de los ratones, lo que se evidenció visualmente al momento de la disección *postmortem*, donde queda en evidencia que el incremento en peso de los animales sometidos a dieta HFD es debido principalmente a un aumento de la masa adiposa, tanto subcutánea como visceral, sin un mayor aumento de volumen de otros tejidos evaluados como lo describe Kang et al el 2010. Además, entendiendo que la obesidad corresponde a un aumento de masa corporal superior al 25% del peso normal de la población estudiada y junto a los antecedentes anteriores nos permiten confirmar que el protocolo establecido en el presente estudio tiene como resultado la obtención de un modelo de obesidad inducido por dieta.

Además, en concordancia con Cani et al (2006), para complementar el fenotipo obeso provocado por una dieta rica en grasas, se asocian al aumento de peso, alteraciones clínicas como intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina principalmente. Junto con esto, las glicemias basales mayores encontradas en el grupo HFD respecto al LFD, se deben principalmente a la resistencia a la insulina provocada por el aumento del tejido adiposo (evaluada de forma indirecta a través del HOMA IR).

Este incremento de la glicemia basal concuerda con lo descrito por Peterson et al (2014) en donde describe que la obesidad genera alteraciones metabólicas a todo nivel, incluyendo el metabolismo glucídico y su homeostasis (intolerancia a la glucosa o resistencia a la insulina).

En relación a la variación de los resultados entre machos y hembras es importante decir que el “Gold estándar” del modelo de obesidad reconocido internacionalmente es el de los machos C57BL/6 (Reuter, 2007) y su uso así lo confirma (Yun et al, 2009; Kang et al, 2010; Takemura et al, 2010; Velagapudi et al, 2010; Naito et al, 2011; Arora, et al, 2012; Kang et al, 2013, Mujico et al, 2013 ; Park et al, 2013, Van del Heijden et al, 2015) aun cuando numerosas publicaciones realizan sus experimentos con hembras de las misma cepa (Surwit et al, 1995; Winzell et al, 2004; Takemura et al, 2010). La utilización de hembras en los estudios de evaluación metabólica y endocrina siempre ha tenido buena aceptación, básicamente debido a que las hembras no poseen conductas de naturaleza territorial y de jerarquización que poseen los machos, lo que hace que dentro de un mismo grupo de animales, que se encuentran en una misma jaula, con las mismas condiciones ambientales, se obtengan grandes diferencias en los resultados debido al estrés de los machos más sumisos, provocado por el hostigamiento generado por el macho alfa del grupo, el cual le impide comer, dormir y desenvolverse socialmente de manera adecuada a los animales más débiles. Estas conductas, no se expresan de manera tan marcada en las hembras, pero sí tienden a desarrollar otro tipo de conductas sociales como por ejemplo, realizan rutinariamente un acicalamiento (barbering) a sus pares, el cual puede llegar a ser excesivo, conducta que habitualmente tiene una connotación social entre los ratones de la cepa C57BL/6, pero que sin embargo, actualmente se está asociando a altos índices de estrés oxidativo que afecta a las neuronas gatillando conductas compulsivas como ésta (Vieira, 2014).

En relación a lo anteriormente descrito, al teorizar sobre los factores que inciden en los resultados de los análisis cuando se compara machos con hembras, donde sí existen diferencias entre estos grupos, provocadas por la gran dispersión de datos provocados debido a la variación de los resultados dentro del grupo de los machos. De esta forma se explican, por ejemplo, las diferencias de las curvas de variaciones de peso (Figura 18) donde se encuentran diferencias de ganancias de peso en hembras, estadísticamente significativas desde la segunda semana de dietas diferenciadas, en contraste con los machos, donde ésta diferencia sólo se hace significativa desde la sexta a séptima semana de experimentación.

Esta compleja relación social entre los machos provocó además un manejo de los grupos de tal manera que muchas se tuvo que separar en dos un grupo de experimentación con el fin de minimizar conductas agresivas que en un par de ocasiones puntuales provocó la muerte de uno de los ratones, lo que no sólo generó pesar por lo ocurrido, sino que además provocó adecuar el diseño experimental a la cantidad menor de animales resultantes.

Otra causa que fundamenta la gran dispersión de los resultados, como por ejemplo los de ganancia de peso obtenidos dentro de los grupos sometidos a dieta HFD, es posible explicarla debido al modelo murino utilizado, que corresponde a una cepa “exocriada” (fondo genético amplio similar al de una población humana) de C57BL/6, en la cual tenemos animales que son más respondedores a una dieta alta en grasas y otros animales no lo son tanto. De forma contraria, una cepa murina “endocriada” corresponde a aquella en que sus generaciones presentan el mismo fondo genético de los padres (sobre 97% de homocigosis), lo que provoca similares

respuestas a estímulos ambientales en todos los animales. A pesar de estas variaciones en las respuestas, el resultado de esta variación presenta una distribución estadística normal (valores no publicados) lo que sugiere que esta dispersión es parte del diseño experimental y no producto del sesgo. Y si bien, no es siempre un dato publicado, las variaciones de ganancia en peso observadas en los modelos de obesidad inducida por dieta (Takemura et al, 2010; An et al, 2011; Kang et al, 2013; Novotny et al, 2014) dan cuenta de una alta dispersión, lo que no interfiere mayormente en la demostración de que la dieta alta en grasas provoca un mayor aumento de peso respecto a una dieta baja en grasas.

Después de obtener el modelo de obesidad asociado a un consumo de dieta rica en grasas, se evaluó el efecto de la administración en la dieta del *Lactobacillus salivarius* LPLM-O1 en ambos grupos dietarios (LFD y HFD), observando que la adición del *Lactobacillus* provoca una menor ganancia de peso en ambos grupos sin afectar el consumo de pellet ni la gelatina en los grupos en el cual se administraba, de la misma manera a lo observado en estudios realizados con anterioridad usando otros *Lactobacillus* (Takemura et al, 2010; An et al, 2011; Kang et al, 2013). Así, el efecto del *Lactobacillus* afecta directamente a la reducción de la ganancia de peso diaria lo que redundará finalmente en la cantidad de masa de grasa abdominal y visceral de los animales (Kang et al, 2013).

Junto a la obesidad se asocian diversas patologías que provocan un deterioro progresivo del estado de salud de quienes la padecen, entre ellas tenemos las dislipidemias, el hígado graso, resistencia a la insulina, que provocan igual o más daño al organismo que la obesidad en sí, es por ello que es de nuestro interés en el

estudio evaluar la aparición y progresión de estas alteraciones. En este sentido, respecto a la evaluación de los parámetros bioquímicos que podrían evidenciar una dislipidemia revisamos los resultados del colesterol total y los triglicéridos, en ellos, sólo existe diferencia cuando comparamos el efecto dieta del experimento ($p < 0,05$), lo cual indica que la dieta HFD provoca un aumento en estos parámetros. Sin embargo, no ocurre la disminución que se esperaba del colesterol y los triglicéridos cuando al administrar el *Lactobacillus salivarius* LPLM-O1, ya que existen varios reportes científicos que avalan que algunas cepas de *Bifidobacterium sp.* y *Lactobacillus sp.* presentan, tanto efectos hipocolesterolémicos como hipotrigliceridémicos en humanos y en modelos experimentales murinos (Lee et al, 2006; An et al, 2011; Takemura et al, 2010; Yin et al, 2010). En estos estudios, los mecanismos propuestos involucrados son la inhibición de las enzimas que sintetizan el colesterol, las bacterias favorecen la eliminación de colesterol por las heces, las bacteria inhiben la absorción de colesterol de novo. Además, las bacterias interfieren con el reciclaje de sales biliares (producto metabólico del colesterol) y facilitan su eliminación, lo que aumenta la demanda de sales biliares a partir del colesterol consumiendo éste desde la circulación. (An et al, 2011)

En relación a la actividad de la enzima transaminasa GPT sólo se aprecia una diferencia significativa ($p < 0, 05$) entre los grupos LFD+ plac y HFD+plac (efecto dieta), lo cual indica que la dieta HFD genera un aumento de GPT, que sería producto de un cuadro de inflamación de los hepatocitos asociado a un eventual proceso de hígado graso (Lee et al, 2014). Respecto a la actividad de la GOT, no

se observó variaciones significativas, lo que descartaría una necrosis de hepatocitos.

En la obesidad el acumulo de grasa induce una gran expansión en el tejido adiposo blanco que demanda una serie de cambios estructurales en los adipocitos y en la matriz extracelular, siendo la inflamación una consecuencia de la respuesta a tal demanda, debido a lo mismo es que se dice que la obesidad implica un proceso de inflamación crónica en el organismo que la padece. Por tal motivo es que hemos querido evaluar el estado inflamatorio a través de la medición de diversas citoquinas pro-inflamatorias (IL-6 y TNF- α) y citoquinas moduladoras de la inflamación (IL-10). En relación a la concentración plasmática de IL-6 es importante destacar que la dieta HFD, provoca una menor secreción de IL-6 respecto a la dieta LFD (sólo en hembras). Sin tener claro la causa de esta disminución y analizando los componentes de las dietas, donde la principal diferencia de las formulaciones tienen relación a la cantidad de grasa de cerdo (manteca de cerdo) casi 10 veces mayor y Maltodextrina, 3.5 veces más en la dieta HFD respecto a la LFD, es probable que alguno de estos componentes tenga un efecto antiinflamatorio; sin encontrar en la bibliografía antecedentes que indiquen que algunos de éstos componentes tenga efecto en la disminución de la secreción plasmática de IL-6. En machos no hubo diferencias en los resultados obtenidos. IL-6 a menudo es secretada por los macrófagos M1 como parte de la respuesta inflamatoria normal contra injurias e infección (Krithika S., 2016). En el síndrome metabólico, la disfunción de los adipocitos es frecuente y se asocia con un aumento de la población de macrófagos M1 dentro del tejido adiposo. Esto puede resultar en el aumento de la secreción de

otras citoquinas proinflamatorias a partir del tejido adiposo, las cuales pueden actuar a través de diferentes vías de señalización celular, incluyendo mTOR y PKC para inducir resistencia a la insulina. Además, IL-6 puede causar la activación aberrante del receptor de insulina, lo que resulta en cascadas de señalización anormales, acción anormal de la insulina y anormal metabolismo de la glucosa (Krithika S., 2016).

Los resultados de Factor de Necrosis Tumoral alfa plasmático (TNF- α) como otro indicador proinflamatorio, fueron muy similares entre machos y hembras, obteniendo casi el mismo patrón de valores para los diferentes grupos de estudio, sin presentar diferencia estadística entre ellos ($p > 0.05$), lo cual puede ser producto a que la escasa cantidad de plasma obtenido provocó que utilizáramos un pool de sueros de cada jaula de cada grupo de experimentación.

Los resultados obtenidos respecto a IL-6 y TNF- α , no aportan datos relevantes al evaluar entre los grupos de experimentación, sin embargo, queda claro que el *Lactobacillus salivarius* LPLM-O1 no provoca una mejora del estado inflamatorio que podría existir en los animales obesos alimentados con la dieta HFD, como lo hacen otras especies probióticas (Novotny et al, 2015).

La obesidad provoca un estado proinflamatorio que puede influir negativamente sobre la sensibilidad a la insulina por parte de los tejidos, además, la producción de hormonas por parte del tejido adiposo puede verse alterada y originar la secreción de adipocinas que causen resistencia a la insulina. De esta manera, y en relación a la medición de insulina, la cual aumento sus niveles

sanguíneos en los animales que consumieron dieta rica en grasas, respecto a su control bajo en grasas se debe principalmente al aumento de la cantidad de grasa infiltrada en los diferentes tejidos (Hotamisligil et al, 1995). Es importante destacar que esta resistencia a la insulina ocurre en ausencia de hiperglicemia basal en ayuno (Kahn y Flier, 2000) por lo cual estos animales no son diabéticos. Respecto a los resultados de la leptina, primero que todo es evidente que existe una importante y significativa diferencia entre los animales que consumen una dieta LFD y HFD (efecto dieta) probablemente asociado a su mayor cantidad de tejido adiposo que presentan los animales que consumieron dieta HFD. De la misma forma, la disminución de la concentración plasmática de leptina que ocurre en los animales que consumieron dieta más el probiótico en relación a los que no consumieron el *Lactobacillus salivarius* LPLM-O1 se puede deber a la menor cantidad de tejido adiposo acumulado en su cuerpo (Kang et al, 2013). En individuos sanos, la leptina es capaz de aumentar la sensibilidad a la insulina y ejercer sus acciones beneficiosas en el metabolismo lipídico mediante la activación de la AMPK en tejidos periféricos. Pero en individuos obesos, al igual que sucede en el hipotálamo, estos efectos se pierden y aparece la resistencia a la leptina, por la anulación de la activación de PI3K (fosfatidil inositol 3-kinasa) por el mismo mecanismo. Además, este obstáculo en la señalización en tejidos periféricos provoca también resistencia a la insulina, que a su vez se verá agravada por la resistencia a la leptina. Por tanto en el punto de cruce entre las cascadas de señalización de insulina y leptina encontramos una posible explicación a la aparición de la resistencia a ambas hormonas. Se ha llegado a hipotetizar que, en el síndrome metabólico, la resistencia

a la insulina podría ser secundaria a la resistencia a la leptina, e incluso podría tratarse de un mecanismo compensatorio (Morrison C., 2008).

Respecto a la glicemia basal los valores se mantienen de acuerdo a otras investigaciones y no experimentan variaciones entre los grupos de estudio ($p > 0,05$), sin embargo, se aprecia una tendencia hacia la disminución de estos parámetros, de manera similar a lo encontrado al probar otros probióticos (Ma et al, 2008; Yin et al, 2010; Wu et al, 2015).

Intolerancia a la glucosa sin insulinoresistencia: en nuestro estudio observamos que la dieta HFD induce intolerancia a la glucosa (TTGIP, TTGO) (Kowalski y Bruce, 2014) comparado con la dieta LFD. En efecto, los niveles de glicemia alcanzados en ratones bajo HFD tras una inyección intraperitoneal de glucosa duplican los valores observados a la misma dosis relativa en ratones LFD. En estas circunstancias es principalmente, el tejido muscular el responsable de la disminución de la glicemia. Por tanto, la intolerancia a la glucosa observada en animales bajo HFD puede estar sobrevalorada. Por ello, es posible que el resultado de TTGIP indique una intolerancia a la glucosa sobredimensionada y que, por ello, estos resultados no se condigan a los resultados en el TRIIP. No obstante, y como lo indican los resultados del subgrupo de mayor ganancia en peso, solo la intolerancia a la glucosa de los animales más obesos se relacionaría a una menor respuesta a la insulina, lo cual podría ser evaluado de forma indirecta a través del HOMA IR.

Pese a lo anterior, el hecho que los animales bajo HFD muestren una glicemia basal más elevada sugiere que su control glicémico está alterado y que es esperable sean intolerantes a la glucosa, tal y como ocurre en el humano (Kahn y Flier, 2000).

Otro de los aspectos que se relacionan con el desarrollo de obesidad es la insulino resistencia (Kowalski y Bruce, 2014). El gold standard es el Clamp euglicémico – hiperinsulinémico (Pacini et al, 2013). Sin embargo, su implementación es compleja. Alternativamente se utilizan modelos más sencillos que de aproximación como el índice HOMA IR o el índice QUICKY (Villafán-Bernal et al, 2011) que, sin embargo, demandan una toma de muestra extra, lo cual implica modificar el diseño experimental y otro factor de angustia y estrés para el animal en estudio.

En el presente estudio se utilizó el test de respuesta a insulina intraperitoneal (TRIIP) (Pacini et al, 2013) el que es ampliamente usado, fácil de implementar y de bajo estrés para el animal. De nuestros resultados podemos observar que la respuesta a insulina no se afecta por la dieta. Sin embargo, llama la atención que aquellos ratones que tuvieron una mayor velocidad de incremento en peso tuvieron menor respuesta a la insulina en la prueba. Esto sugiere que una ganancia en peso rápida establece un cuadro de insulinoresistencia temprano.

Si bien estos resultados son acordes a lo esperado, es también importante indicar que el uso del peso total y no de la masa magra de cada animal para ajustar la dosis de glucosa e insulina a inyectar puede provocar un error por exceso. Es claro que los animales mientras más obesos sean, mayor cantidad de tejido adiposo

relativo tendrán. Sin embargo, el tejido adiposo es comparativamente, un tejido con baja tasa de metabolización de glucosa, particularmente en una situación de ayuno (Kowalski y Bruce, 2014).

Esta variaciones poco significativas en todos los aspectos asociados a la obesidad como alteraciones de transaminasas (GOT y GPT), colesterol y triglicéridos, Test de tolerancia a la insulina y glicemia basal en dieta LFD junto a indicadores inflamatorios como IL-6 y TNF-alpha, es muy probable que se encuentren influenciados por los efectos benéficos de los arándanos respecto a las patologías asociadas a la obesidad, lo cual, probablemente debe estar generando interferencia en muchos de los resultados obtenidos (De Furia et al, 2009), además de que es posible de que el *Lactobacillus salivarius* LPLM-O1 no tenga un efecto relevante sobre estos parámetros.

De esta manera sería interesante plantear un diseño experimental que no incluya el uso de un alimento antioxidante como lo es el arándano, sino más bien, el uso de un vehículo neutro en sus efectos fisiológicos.

VII. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo mostraron que el *Lactobacillus salivarius* LPLM-O1 al ser administrado como un suplemento asociado a una dieta rica en grasas es beneficioso en los animales estudiados. Sería importante conocer los mecanismos por los cuales estos efectos se producen con el fin de generar observaciones con fundamentos fisiológicos y bioquímicos que permitan avalar un estudio clínico en humanos. Sin embargo, los datos obtenidos dan resultados promisorios, otorgando efectos anti-obesogénicos al *Lactobacillus salivarius* LPLM-O1 que pueden ser utilizados dentro de una terapia múltiple al momento de abordar la obesidad, principalmente en personas que consumen dietas altas en grasas.



VIII. BIBLIOGRAFÍA

Abello M. Nancy y Caro P. Claudio. Estrategia global contra la obesidad (ego-chile): Una oportunidad para el desarrollo de transectorialidad a favor de la calidad de vida". Programa de Diplomado en Salud Pública y Salud Familiar. UACH, 2007.

Abrahamsson T.R., Sinkiewicz G., Jakobsson T., Fredrikson M., Björkstén B. Probiotic lactobacilli in breast milk and infant stool in relation to oral intake during the first year of life. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2009; 49: 349-54.

Agencia de Calidad de la Educación, Gobierno de Chile, 2012. SIMCE 2012, Resultados para Docentes y Directivos.

Akagiri, S., et al., A Mouse Model of Metabolic Syndrome; Increase in Visceral Adipose Tissue Precedes the Development of Fatty Liver and Insulin Resistance in High-Fat Diet-Fed Male KK/Ta Mice. *J Clin Biochem Nutr*, 2008. 42(2): p. 150-7.

Alesia Walker, Christoph Böhm, Mareike Wenning, Michael Wagner, Michael Blaut, Alinia S., Hels O., Tetens I. The potential association between fruit intake and body weight—a review. *Obes Rev*, 2009; 10: 639-647.

Amato R., Pinelli M., D'Andrea D., Miele G., Nicodemi M., Raiconi G., Coccozza S. 0. A novel approach to simulate gene-environment interactions in complex diseases. *BMC Bioinformatics*, 2010, 11: 8-17.

Amigo H., Bustos P., Arteaga A., Acosta A.M., Rona RJ. Risk factors of cardiovascular disease among young adults. *Rev Med Chil*. 2003 Sep; 131(9):973-80.

Amores R., A. Calvo, J. Maestre y Martínez-Hernández. *Rev. Esp. Quimioterap*, 2004; 17(2): 131 -139.

Arboleya S., Ruas-Madiedo P., Margolles A., Solís G., Salminen S., Reyes-Gavilán C.G., Gueimonde M. Characterization and in vitro properties of potentially probiotic Bifidobacterium isolated from breast-milk. *Int J Food Microbiol*, 2011; 149: 28-36.

Archuleta, T.L., et al., Oxidant stress-induced loss of IRS-1 and IRS-2 proteins in rat skeletal muscle: role of p38 MAPK. *Free Radic Biol Med*, 2009. 47(10): p. 1486-93.

Arora Tulika, Jelena Anastasovska , Glen Gibson , Kieran Tuohy , Raj Kumar Sharma , Jimmy Bell and Gary Frost. Effect of Lactobacillus acidophilus NCDC 13 supplementation on the progression of obesity in diet-induced obese mice. *British Journal of Nutrition* (2012), 108, 1382–1389

Barbany M, Foz M. Obesity: concept, classification and diagnosis. *An Sist Sanit Navar*, 2002; 25 Suppl 1:7-16.

Bates S.H., Kulkarni R.N., Seifert M., Myers M.G. Jr. Roles for leptin receptor/STAT3-dependent and -independent signals in the regulation of glucose homeostasis. *Cell Metab*. 2005; 1(3):169-78.

Batista Júnior Miguel Luiz, Renato Delascio Lopes, Marília Cerqueira Leite Seelaender y Antonio Carlos Lopes. Anti-inflammatory Effect of Physical Training in Heart Failure: Role of TNF- α and IL-10. *Arq Bras Cardiol* 2009; 93(6): 643-651.

Blüher M., Michael M.D., Peroni OD., Ueki K., Carter N., Kahn B.B., Kahn C.R. Adipose tissue selective insulin receptor knockout protects against obesity and obesity-related glucose intolerance. *Dev Cell*. 2002 Jul; 3(1):25-38.

Boguszewski CL, Paz-Filho G, Velloso LA. Neuroendocrine body weight regulation: integration between fat tissue, gastrointestinal tract, and the brain. *Endokrynol Pol.* 2010; 61: 194-206.

Bonakdar A., Tehrani, B. G. Nezami, A. Gewirtz and S. Srinivasan. Obesity and its associated disease: a role for microbiota?. *Neurogastroenterol Motil* (2012) 24, 305–311.

Bouchard C., L, Rice, T. Rao, D. C. "The genetics of human obesity." New York: Marcel Dekker. Inc. 1998.

Bowe James E., Franklin Zara J., Hauge-Evans Astrid C., King Aileen J., Persaud Shanta J. y Peter M Jones. METABOLIC PHENOTYPING GUIDELINES: Assessing glucose homeostasis in rodent models. *Journal of Endocrinology* (2014) 222, G13–G25.

Bray G.A., Bouchard C. *Handbook of obesity: etiology and pathophysiology.* : New York; Basel : Dekker, cop. 2004; 2nd ed; 2004.

Bray G.A., Lovejoy J.C., Smith S.R., De Lany J.P., Lefevre M., Hwang D., et al. The influence of different fats and fatty acids on obesity, insulin resistance and inflammation. *J Nutr*, 2002 09; 132 (9): 2488-2491.

Brignardello J., Morales P., Diaz E., Romero J., Brunser O., Gotteland M. Pilot study: alterations of intestinal microbiota in obese humans are not associated with colonic inflammation or disturbances of barrier function. *Aliment Pharmacol Ther.* 2010; 32: 1307-14.

Brockmann G.A., Bevova M.R. Using mouse models to dissect the genetics of obesity. *Trends in Genetics*, 2002, 18, p. 367–76.

Burcelin R. Regulation of metabolism: a cross talk between gut microbiota and its human host. *Physiology (Bethesda)*. 2012; 27: 300–7.

Burrows L. y Miller R. Chronic kidney disease and cardiovascular disease: pathophysiologic links. *Nephrol Nurs J*. 2007; 34 (1): 55-63.

Cabrera-Rubio R., Collado M.C., Laitinen K., Salminen S., Isolauri E., Mira A. The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *Am J Clin Nutr*, 2012; 96: 544 - 51

Cai Dongsheng , Yuan Minsheng , Daniel F Frantz, Peter A Melendez, Lone Hansen, Cani P.D., Bibiloni R., Knauf C., Waget A., Neyrinck A.M., Delzenne N.M., et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*. 2008; 57:1470-81.

Cariou, B., et al., The farnesoid X receptor modulates adiposity and peripheral insulin sensitivity in mice. *J Biol Chem*, 2006. 281(16): p. 11039-49).

Cavadini C, Siega-Riz A.M., Popkin B.M. US adolescent food intake trends from 1965 to 1996. *Arch Dis Child*, 2000; 83: 18-24.

Cecil Joanne E., Tavendale Roger, Watt Peter, Marion M. Hetherington y Colin N.A. Palmer. An Obesity-Associated FTO Gene Variant and Increased Energy Intake in Children. *N Engl J Med* 2008; 359: 2558-66.

Chang, L., S.H. Chiang, and A.R. Saltiel, Insulin signaling and the regulation of glucose transport. *Mol Med*, 2004. 10(7-12): p. 65-71.

Cho E.Y., Park H.Y., Jee S.H., Jang Y.S., Bae S.J., Lee J.H., Jang Y.S. Korean familial resemblance in fat mass and fat free mass: cardiovascular genome study. *Korean J Lipidol* (2001), 11: 537-547.

Clement K., Viguerie N., Poitou C., Carette C., Pelloux V., Curat C.A., et al. Weight loss regulates inflammation-related genes in white adipose tissue of obese subjects. *FASEB JOURNAL* 2004; 18 (14):1657-1669.

Collado M.C., Delgado S., Maldonado A., Rodríguez J.M. Assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women by quantitative real-time PCR. *Lett Appl Microbiol*. 2009; 48: 523-28.

Danielsson, A., et al., Short-term overeating induces insulin resistance in fat cells in lean human subjects. *Mol Med*, 2009. 15(7-8): p. 228-34.

Davey R.A., MacLean H.E. Current and future approaches using genetically modified mice in endocrine research. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006; 291(3):E429-38.

De Filippo C., Cavalieri D., Di Paola M., Ramazzotti M., Poullet J.B., Massart S., et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010; 107: 14691-6.

Deram S., Villares S.M. Genetic variants influencing effectiveness of weight loss strategies. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 2009; 53: 129-138.

Dietrich W.F., Miller J., Steen R., Merchant M.A., Damron-Boles D., Husain Z., Dredge R., Daly M.J., Ingalls K.A., O'Connor T.J. A comprehensive genetic map of the mouse genome. *Nature*. 1996, 14; 380(6570) p. 149-52.

Domínguez-Vásquez P., Olivares S., Santos JL. Influencia familiar sobre la conducta alimentaria y su relación con la obesidad infantil. Departamento de Nutrición, Diabetes y Metabolismo. Facultad de Medicina. Pontificia Universidad Católica de Chile. Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA). Universidad de Chile. 2008.

Donnet-Hughes A., Perez P.F., Doré J., Leclerc M., Levenez F., Benyacoub J., Serrant P., Segura-Roggero I., Schiffrin E.J. Potential role of the intestinal microbiota of the mother in neonatal immune education. *Proc Nutr Soc*, 2010; 69(3):407-15.

Doo Miae and Kim Yangha. Obesity: Interactions of Genome and Nutrients. *Prev. Nutr. Food Sci.* 2015; 20: (1):1-7

Duncan S.H., Louis P., Flint H.J. Cultivable bacterial diversity from the human colon. *Lett Appl Microbiol.* 2007; 44: 343–50.

Espinoza-Silva Miguel y Aguilar-Farías Nicolás. Estado nutricional y capacidad física en escolares de 4 a 7 años en un establecimiento escolar público de Chile, 2014. *Nutr Hosp.* 2015; 32(1):69-74.

Esposito Katherine, Pontillo Alessandro, Di Palo Carmen, Giulliano Giovanni, Masella Mariangella, Marfella Raffaele, Giugliano Dario. Effect of weight loss and lifestyle changes on vascular inflammatory markers in obese women. A randomized trial. *JAMA*, 2003, 289 (14); p. 1799 -1804.

Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115 (5):911-919.

Farías N. María Magdalena, Silva B. Catalina, Rozowski N. Jaime. Microbiota intestinal: rol en obesidad. *Rev Chil Nutr*, 2011, Vol. 38, N°2, 228-233.

Favier Christine, Elaine E. Vaughan, Willem M. De Vos, and Antoon D. L. Akkermans. Molecular Monitoring of Succession of Bacterial Communities in Human Neonates. *Applied and environmental microbiology*, 2002, p. 219–226

Feigelman S. Crecimiento, desarrollo y conducta. En: Kliegman RM, Behrman RE, Jenson HB, Stanton BF, editores. *Nelson Tratado de Pediatría*. 18ª ed. Ámsterdam: Elsevier 2009. p. 33-74.

Fernández-Borja M, Bellido D, Vilella E, Olivecrona G, Vilaró S. Lipoprotein lipase-mediated uptake of lipoprotein in human fibroblasts: evidence for an LDL receptor-independent internalization pathway. *J Lipid Res*. 1996; 37(3):464-81.

Fernández Palomares Rosa. Modulación de la microbiota intestinal: efecto de los prebióticos y probióticos en la prevención y tratamiento del Síndrome metabólico. Trabajo de Grado, Doctorado en Ciencias. Universitat Oberta de Catalunya, 2013, España.

Ferrante A. W. Jr. Obesity-induced inflammation: a metabolic dialogue in the language of inflammation. *J Intern Med* 2007; 262: p. 408–414.

Fisler J.S., Warden C.H. Mapping of mouse obesity genes: a generic approach to a complex trait. *Journal of Nutrition*, 1997, 127, 1909S–16S.

Flint H.J., Scott K.P., Louis P., Duncan S.H. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2012; 9: 577- 89.

Fukuhara Atsunori, Morihiko Matsuda, Masako Nishizawa, Katsumori Segawa, Masaki Tanaka, Kae Kishimoto, Yasushi Matsuki, Mirei Murakami, Tomoko Ichisaka, Hiroko Murakami, Eijiro Watanabe, Toshiyuki Takagi, Megumi Akiyoshi, Tsuguteru Ohtsubo, Shinji Kihara, Shizuya Yamashita, Makoto Makishima, Tohru Funahashi, Shinya Yamanaka, Ryuji Hiramatsu, Yuji Matsuzawa, Ichihiro Shimomura. Visfatin: A Protein Secreted by Visceral Fat That Mimics the Effects of Insulin. *Science*, 2005, (307) p. 426-30.

Gailus-Durner V, Fuchs H, Becker L, Bolle I, Brielmeier M, Calzada-Wack J, Elvert R, Ehrhardt N, Dalke C, Franz TJ, Grundner-Culemann E, Hammelbacher S, Hölter SM, Hölzlwimmer G, Horsch M, Javaheri A, Kalaydjiev SV, Klempt M, Kling E, Kunder S, Lengger C, Lisse T, Mijalski T, Naton B, Pedersen V, Prehn C, Przemeck G, Racz I, Reinhard C, Reitmeir P, Schneider I, Schrewe A, Steinkamp R, Zybill C, Adamski J, Beckers J, Behrendt H, Favor J, Graw J, Heldmaier G, Höfler H, Ivandic B, Katus H, Kirchhof P, Klingenspor M, Klopstock T, Lengeling A, Müller W, Ohl F, Ollert M, Quintanilla-Martinez L, Schmidt J, Schulz H, Wolf E, Wurst W, Zimmer A, Busch DH, de Angelis MH. Introducing the German Mouse Clinic: open access platform for standardized phenotyping. *Nat Methods.* 2005 Jun; 2(6):403-4.

García Molina, Olga María. Efecto de flavonoides sobre un modelo de obesidad en ratones db/db. Trabajo de tesis doctoral, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia, 2013.

Giskes K., van Lenthe F., Avendano-Pabon M., Brug J. A systematic review of environmental factors and obesogenic dietary intakes among adults: are we getting closer to understanding obesogenic environments? *Obes Rev*, 2011; 12: e95-e106.

Gomez-Ambrosi J., Muruzabal F.J., Burrell M.A. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2001; 280 (6):e827-e847.

González Jiménez E. Obesidad: Análisis etiopatogénico y fisiopatológico. *Endocrinol Nutr.* 2013; **60**:17-24.

Gonzalez-Periz A, Horrillo R, Ferre N, Gronert K, Dong B, Moran-Salvador E, et al. Obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis are alleviated by omega-3 fatty acids: a role for resolvins and protectins. *FASEB JOURNAL* 2009; 23(6):1946-1957.

Graf D., Di Cagno R., Fåk F., Flint H.J., Nyman M., Saarela M., Watzl B. Contribution of diet to the composition of the human gut microbiota. *Microb Ecol Health Dis.* 2015, (4); 26: 26164

Grönlund M.M., Grześkowiak L., Isolauri E., Salminen S. Influence of mother's intestinal microbiota on gut colonization in the infant. *Gut Microbes* 2011; 2: 227-33.

Grundy Scott M., Diane Becker, Luther T. Clark, Richard S. Cooper, Margo A. Denke, D., James Howard, Donald B. Hunninghake, D. Roger Illingworth, Russell V. Luepker, M.D., Patrick McBride, James M. McKenney, Pharm.D., Richard C. Pasternak, Neil J. Stone, .D., Linda Van Horn. 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) Final Report. *Circulation.* 2002; 106: 3143-3421.

Guarner F., Requena T., Marcos A. Consensus statements from the Workshop "Probiotics and Health: Scientific evidence". *Nutr Hosp.* 2010; 25(5): 700-4.

Güemes María, Rahman A. Sofia, Khalid Hussain. What is a normal blood glucose?. Arch Dis Child, 2015; 0:1–6.

Guerra-Cabrera CE, Vila-Díaz J, Apolinaire-Pennini JJ, Cabrera-Romero AC, Santana-Carballosa I, Almaguer-Sabina PM. Factores de riesgo asociados a sobrepeso y obesidad en adolescentes. Revista Electrónica de las Ciencias Médicas en Cienfuegos. Medisur. 2009; 7(2).

Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008; 05; 9(5):367-377.

Guilherme Adilson, Joseph V. Virbasius, Vishwajeet Puri and Michael P. Czech Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. Nature Reviews. Molecular Cell Biology, 2008, 9; p. 367- 77.

Guzmán-Flores Juan Manuel y Portales-Pérez Diana Patricia. Mecanismos de supresión de las células T reguladoras (Treg). Gaceta Médica de México. 2013; 149: 630- 8.

Hambly C., Adams A., Fustin J.M., Rance K.A., Bungler L., Speakman J.R. Mice with low metabolic rates are not susceptible to weight gain when fed a high fat diet. Obesity Research, 2005; 13, 556-567.

Hannelore Daniel, Amin Moghaddas Gholami, David Berry, Charles Desmarchelier, Hannes Hahne, Gunnar Loh, Stanislas Mondot, Patricia Lepage, Michael Rothballer, Herz J. y Strickland D. LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. J Clin Invest, 2001.108(6) p. 779-84.

Hinney A., Vogel C.I., Hebebrand J. From monogenic to polygenic obesity: recent advances. *Eur Child Adolesc Psychiatry*, 2010; 19: 297-310.

Hotamisligil S. Gokhan, Arner Peter, Caro F. Jose, Richard L. Atkinson and Bruce M. Spiegelman. Increased Adipose Tissue Expression of Tumor Necrosis Factor- α in Human Obesity and Insulin Resistance. *J Clin Invest*, 1995, 95; p. 2409-15.

Hur Y.M. 2007. Sex difference in heritability of BMI in South Korean adolescent twins. *Obesity (Silver Spring)*, 2007, 15: 2908-2911.

Ichihara S y Yamada Y. Genetic factors for human obesity. *Cell. Mol. Life Sci.* 2008, 65: 1086 – 1098.

Imes Christopher y Burke Lora E. The Obesity Epidemic: The USA as a Cautionary Tale for the Rest of the World. *Curr Epidemiol Rep* (2014) 1:82–88

Isganaitis Elvira y Lustig Robert H. Elvira Isganaitis, Robert H. Lustig. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25:2451-2462.

Jacobi D., Stanya K.J., Lee C.H..Adipose tissue signaling by nuclear receptors in metabolic complications of obesity. *Adipocyte* 2012;1 (1):4.

James, D.E. and R.C. Piper, Insulin resistance, diabetes, and the insulin-regulated trafficking of GLUT-4. *J Cell Biol*, 1994. 126(5): p. 1123-6.

Jara Solange, Sánchez Magaly, Vera Rodrigo, Cofré Jaime, Castro Erica. The inhibitory activity of *Lactobacillus* spp. isolated from breast milk on gastrointestinal pathogenic bacteria of nosocomial origin. *Anaerobe*, 2011, 17: p. 474-477

Johnston S.L., Grune T., Bell L.M., et al. Having it all: historical energy intakes do not generate the anticipated trade-offs in fecundity. *Proceedings in Biological Science*, 2006; 273, p. 1369–74.

Jongsoon Lee and Steven E Shoelson. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- β and NF- κ B. *Nat Med*. 2005; 11(2): 183–190.

Jumpertz R, Le DS, Turnbaugh PJ, Trinidad C, Bogardus C, Gordon JI, Krakoff J. Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans. *Am J Clin Nutr* 2011; 94: 58-65.

Jung Seung-Pil, Keun-Mi Lee, Ji-Hee Kang, Sung-Il Yun, Han-Oh Park, Yong Moon, Jong-Yeon Kim. Effect of *Lactobacillus gasseri* BNR17 on Overweight and Obese Adults: A Randomized, Double-Blind Clinical Trial. *Korean J Fam Med*, 2013; (34):80-89

Kahn Bárbara B. y Jeffrey S. Flier. Obesity and insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 2000; 106(4) p. 473- 481.

Kallus S.J., Brandt L.J. The intestinal microbiota and obesity. *J Clin Gastroenterol* 2011; 46: 16 -24.

Kang Ji-Hee, Yun Sung-Il, and Han-Oh Park. Effects of *Lactobacillus gasseri* BNR17 on Body Weight and Adipose Tissue Mass in Diet-Induced Overweight Rats. *The Journal of Microbiology*, 2010, (48); 5: p. 712-714

Kang Y.S. Obesity associated hypertension: new insights into mechanism. *Electrolyte Blood Press*. 2013; 11(2): 46-52

Kondo S., Xiao J.Z., Satoh T., Odamaki T., Takahashi S., Sugahara H., Yaeshima T., Iwatsuki K., Kamei A., Abe K. Antiobesity effects of *Bifidobacterium breve* strain B-3 supplementation in a mouse model with high-fat diet-induced obesity. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2010; 74: 1656-61.

Krithika Srikanthan, Feyh Andrew, Haresh Visweshwar, Joseph I. Shapiro, and Komal Sodhi. Systematic Review of Metabolic Syndrome Biomarkers: A Panel for Early Detection, Management, and Risk Stratification in the West Virginian Population. *Int. J. Med. Sci.* 2016, 13; p. 25- 37.

Lacy, P.E., Endocrine secretory mechanisms. A review. *Am J Pathol*, 1975; 79(1): p. 170-88.

Lee G.H., Proenca R., Montez J.M., Carroll K.M., Darvishzadeh J.G., Lee J.I., Friedman J.M. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature*. 1996, 15; 379 (6566):632-5.

Ley R.E., Turnbaugh P.J., Klein S., Gordon J.I. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 2006; 444: 1022-23.

Ley, Ruth E. Obesity and the human microbiome. *Current Opinion in Gastroenterology*. 2010, (26)1, p. 5–11.

Lin S., Boey D., Herzog H. NPY and Y receptors: lessons from transgenic and knockout models. *Neuropeptides*. 2004; 38(4): p. 189-200.

Lu, X.M., R. Tompkins, and A. Fischman, Burn injury-induced IRS-1 degradation in mouse skeletal muscle. *Int J Burns Trauma*, 2013. 3(1): p. 37-48.

Lumeng C.N., Saltiel A.R. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J Clin Invest*, 2011, 121: 2111–2117

Ma X, Hua J, Li Z. Probiotics improve high fat diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance by increasing hepatic NKT cells. *J Hepatol.* 2008; 49:821-30.

Masuzaki H. y Flier J.S. Tissue-specific glucocorticoid reactivating enzyme, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 beta-HSD1)--a promising drug target for the treatment of metabolic syndrome. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord.* 2003; 3(4) p. 255-62.

Masuzaki H., Yamamoto H., Kenyon C.J., Elmquist J.K., Morton N.M., Paterson J.M., Shinyama H., Sharp M.G., Fleming S., Mullins J.J., Seckl J.R., Flier J.S. Transgenic amplification of glucocorticoid action in adipose tissue causes high blood pressure in mice. *J Clin Invest.* 2003; 112(1) p. 83-90.

Ministerio de Salud de Chile. Encuesta Nacional de Salud ENS, Chile 2009-2010.

Moreno C. Andrea (2013), Efecto de diversos mediadores lipídicos bioactivos derivados de los ácidos grasos omega-3 sobre el peso y la composición corporal en un modelo murino de obesidad. Trabajo de grado, Master Europeo en Alimentación Nutrición y Metabolismo. Facultad de Farmacia, Universidad de Navarra, España.

Moreno-Aliaga M, Martinez J.A. El tejido adiposo: órgano de almacenamiento y órgano secretor. Gobierno de Navarra, Departamento de Salud; 2002.

Morrison D. Christopher. Leptin resistance and the response to positive energy balance. *Physiol Behav.* 2008 August 6; 94(5): 660–663.

Mujico J.R., Baccan G.C., Gheorghe A., Diaz L.E., Marcos A. Changes in gut microbiota due to supplemented fatty acids in diet-induced obese mice. *Br J Nutr.* 2013; 110: 711–20.

Muoio, D.M. and C.B. Newgard, Mechanisms of disease: molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. 9(3): p. 193-205.

Naito E., Y. Yoshida, K. Makino, Y. Kounoshi, S. Kunihiro, R. Takahashi, T. Matsuzaki, K. Miyazaki and F. Ishikawa. Beneficial effect of oral administration of *Lactobacillus casei* strain Shirota on insulin resistance in diet-induced obesity mice. *Journal of Applied Microbiology*, 2011, 110, 650–657.

Nathan David M. Diabetes: Advances in Diagnosis and Treatment. *JAMA*. 2015; 314(10):1052-1062.

Neish A.S. Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology* 2009; 136: 65- 80.

Nicholson J.K., Holmes E., Kinross J., Burcelin R., Gibson G., Jia W., et al. Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science*. 2012; 336: 1262–7.

Nicholson JK, Holmes E, Kinross J, Burcelin R, Gibson G, Jia W, Pettersson S. Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science* 2012; 336: 1262-7.

Nilsson Cecilia, Raun Kirsten, Yan Fei-Fei, Larsen Marianne O., Tang-Christensen Mads. Laboratory animals as surrogate models of human obesity. *Acta Pharmacologica Sinica* (2012) 33: 173–181

Nyholm Maria, Gullberg Bo, Merlo Juan, Lundqvist-Persson Cristina, Lennart Råstam and Lindblad Ulf. The Validity of Obesity Based on Self-reported Weight and Height: Implications for Population Studies. *OBESITY*, 2007;15: 197- 208.

Palmer C., Bik E.M., DiGiulio DB., Relman D.A., Brown P.O. Development of the Human Infant Intestinal Microbiota. *PLoS Biol.* 2007, 5(7): e177.

Pan X., y Hussain M. Gut triglyceride production. *Biochim Biophys Acta.* 2012; 1821 (5):727-35.

Park J.E., S. H. Oh and Y.S. Cha. *Lactobacillus plantarum* LG42 isolated from gajami sik-hae decreases body and fat pad weights in diet-induced obese mice. *Journal of Applied Microbiology*, 2013, 1-12.

Pérusse Louis, Rankinen Tuomo, Zuberi Aamir, Chagnon Yvon C., Weisnagel S. John, Argyropoulos George, Walts Brandon, Snyder Eric E. y Bouchard Claude. The Human Obesity Gene Map: The 2004 Update. *OBESITY RESEARCH*, 2005, 13(3): 381-490.

Pessin, J.E. and A.R. Saltiel, Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest*, 2000. 106(2): p. 165-9.

Petschow Bryon, Jöel Doré, Patricia Hibberd, Timothy Dinan, Gregor Reid, Martin Blaser, Patrice D. Cani, Fred H. Degnan, Jane Foster, Glenn Gibson, John Hutton, Philippe Schmitt-Kopplin, Bernhard Kuster, Dirk Haller and Thomas Clavel. High-fat diet alters gut microbiota physiology in mice. *The ISME Journal*, 2014, 8, 295–308.

Peterson C. T., V. Sharma, L. Elmén and S. N. Peterson. Immune homeostasis, dysbiosis and therapeutic modulation of the gut microbiota. *British Society for Immunology, Clinical and Experimental Immunology*, 2014, 179: 363-377.

Plomgaard Peter, Bouzakri Karim, Krogh-Madsen Rikke, Bettina Mittendorfer, Juleen R. Zierath y Bente K. Pedersen. Tumor Necrosis Factor- α Induces Skeletal

Muscle Insulin Resistance in Healthy Human Subjects via Inhibition of Akt Substrate 160 Phosphorylation. *Diabetes*, 2005, (54) p. 2939-45.

Power S.E., O'Toole P.W., Stanton C., Ross R.P., Fitzgerald G.F. Intestinal microbiota, diet and health. *Br J Nutr*. 2013; 1–16.

Pradhan A.D., Manson J.E., Rifai N., Buring J.E., Ridker P.M. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA*. 2001, 18; 286 (3):327-34.

Prieto- Hontoria P.L., Patricia Pérez-Matute, Marta Fernández-Galilea, Bustos M., Alfredo Martínez J., María J. Moreno-Aliaga. Review: Role of obesity-associated dysfunctional adipose tissue in cancer: A molecular nutrition approach. *BBA – Bioenergetics*, 2011; 1807: 664-678.

Ramírez de Arellano A., M. Sánchez, R. Vera, S. Jara, M. González and E. Castro. Effect of orally-administered *Lactobacillus plantarum* LPLM-O1 strain in an immunosuppressed mouse model of urinary tract infection. *Beneficial Microbes*, 2012; 3(1): 51-59

Rankinen T., Zuberi A., Chagnon Y.C., Weisnagel S.J., Argyropoulos G., Walts B., et al. The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity*. 2006; 14:529-644.

Raoult D. Probiotics and obesity: a link? *Nat Rev Microbiol*, 2009; 7: 616.

Reedy J., Krebs-Smith S.M. Dietary sources of energy, solid fats, and added sugars among children and adolescent in the United States. *J Am Diet Assoc*, 2010; 110: 1477-1484.

Roel A. van der Heijden, Fareeba Sheedfar, Martine C. Morrison, Pascal P.H. Hommelberg, Danny Kor, Niels J. Kloosterhuis, Nanda Gruben, Sameh A. Youssef, Alain de Bruin, Marten H., Hofker, Robert Kleemann, Debby P.Y. Koonen y Peter Heeringa. High-fat diet induced obesity primes inflammation in adipose tissue prior to liver in C57BL/6j mice. *AGING*, 2015, 7(4), p. 256-67.

Rorsman, P. and E. Renstrom, Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia*, 2003. 46(8): p. 1029-45.

Russel D., The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu Rev Biochem*, 2003. 72: p.

Sadaf Farooqi I. y O'Rahilly Stephen. Leptin: a pivotal regulator of human energy homeostasis. *Am J Clin Nutr* 2009; 89 (suppl):980S–4S.

Sanders Mary Ellen, James T. Heimbach, Bruno Pot, Daniel Tancredi, Irene Lenoir-Wijnkoop, Anu Lähteenmäki-Uutela, Miguel Gueimonde y Silvia Bañares. Health claims substantiation for probiotic and prebiotic products. *Gut Microbes*, 2011, 2:3, 127-133

Sanz Yolanda, Santacruz Arlette and Gauffin Paola. *Proceedings of the Nutrition Society* (2010), 69, 434–441

Sato M., Uzu K., Yoshida T., Hamad E.M., Kawakami H., Matsuyama H., et al. Effects of milk fermented by *Lactobacillus gasseri* SBT2055 on adipocyte size in rats. *Br J Nutr*. 2008; 99:1013-7.

Schnorr S.L., Candela M., Rampelli S., Centanni M., Consolandi C., Basaglia G., et al. Gut microbiome of the Hadza huntergatherers. *Nat Commun*. 2014; 5: 3654.

Schwartz A., Taras D., Schafer K., Beijer S., Bos N.A., Donus C., et al. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity (Silver Spring)*. 2010; 18: 190–5.

Serino M., Luche E., Gres S., Baylac A., Berge M., Cenac C., et al. Metabolic adaptation to a high-fat diet is associated with a change in the gut microbiota. *Gut*. 2012; 61: 543–53.

Sharma A. M., Padwal R. 2010. Obesity is a sign—over-eating is a symptom: an aetiological framework for the assessment and management of obesity. *Obes Rev* 11: 362-370.

Sharp G., Hill W.G., Robertson A. Effects of selection on growth, body composition and food intake in mice. *Genetical Research*, 1984; 43, p. 75–92.

Shoelson SE, Herrero L, Naaz A (2007) Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology* 132: 2169–2180.

Smorlesi A., Frontini A., Giordano A. y Cinti S. The adipose organ: white-brown adipocyte plasticity and metabolic inflammation. *Obesity Reviews*. International Association for the Study of Obesity, 2012; 13 (Suppl. 2), 83–96.

Snyder E.E., Walts B., Pérusse L., Chagnon Y.C., Weisnagel S.J., Rankinen T., Bouchard C. The human obesity gene map: the 2003 update. *Obes Res*, 2004; 12(3) p. 369-439.

Sonnenburg E.D., Zheng H., Joglekar P., Higginbottom S.K., Firbank S.J., Bolam D.N., Sonnenburg J.L. Specificity of polysaccharide use in intestinal bacteroides species determines diet-induced microbiota alterations. *Cell* 2010; 141:1241-52.

Sörhede Winzell Maria y Bo Ahrén. The High-Fat Diet–Fed Mouse. A Model for Studying Mechanisms and Treatment of Impaired Glucose Tolerance and Type 2 Diabetes. *Diabetes*, 2004, 53(3), p. s215-s219.

Speakman John, Hambly Catherine, Mitchell Sharon y Elżbieta Król. Contribución de los modelos animales al estudio de la obesidad. *Laboratory Animals*, 2008, 42, p. 413-32.

Stumvoll, M., B.J. Goldstein, and T.W. van Haeften, Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet*, 2005. 365(9467): p. 1333-46.

Stunkard AJ, Foch TT, Hrubec Z. A twin study of human obesity. *JAMA*, 1986, 256: 51-54.

Su X., Abumrad N. A. Cellular fatty acid uptake: a pathway under construction. *Trends Endocrinol Metab*. 2009; 20 (2):72-7.

Summerbell C.D., Cameron C., Glasziou P.P. WITHDRAWN: Advice on low-fat diets for obesity. *Cochrane Database Syst Rev*, 2008; 16: CD003640.

Surwit, M.N. Feinglos, J. Rodin, A. Sutherland, A.E. Petro, E.C. Opara, C.M. Kuhn and M. Rebuff-Scrive. Differential Effects of Fat and Sucrose on the Development of Obesity and Diabetes in C57BL/6J and A/J Mice R.S. *Metabolism*, 1995, 44(5): p. 645-651.

Swallow J.G., Koteja P., Carter P.A., Garland T. Jr. Food consumption and body composition in mice selected for high wheel-running activity. *Journal of Comparative Physiology B* 171, 2001, p. 651–9.

Tanja Y. Reuter. Diet-induced models for obesity and type 2 diabetes. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 2007, 4(1), p. 3-8.

Tartaglia L.A., Dembski M., Weng X., Deng N., Culpepper J., Devos R., Richards G.J., Campfield L.A., Clark F.T., Deeds J., Muir C., Sanker S., Moriarty A., Moore K.J., Smutko J.S., Mays G.G., Wool E.A., Monroe C.A., Tepper R.I. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*. 1995, 29; 83(7):1263-71

Takemura Naoki, Takuma Okubo and Kei Sonoyama. *Lactobacillus plantarum* strain No. 14 reduces adipocyte size in mice fed high-fat diet. *Experimental Biology and Medicine* 2010; 235: 849–856.

Tehrani A.B., Nezami B.G., Gewirtz A., Srinivasan S. Obesity and its associated disease: a role for microbiota? *Neurogastroenterol Motil.* 2012, 24 (4); p. 305-11.

Temel R., et al., Compared with Acyl-CoA:cholesterol O-acyltransferase (ACAT) 1 and lecithin:cholesterol acyltransferase, ACAT2 displays the greatest capacity to differentiate cholesterol from sitosterol. *J Biol Chem*, 2003. 278(48):p. 47594-601.

Tilg H., Kaser A. Gut microbiome, obesity, and metabolic dysfunction. *J Clin Invest* 2011; 121: 2126-32.

Todd R. Klaenhammer, Ruth Ley, Max Nieuwdorp, Bruno Pot, David Relman, Andrew Serazin y Mary Ellen Sanders. Probiotics, prebiotics, and the host microbiome: the science of translation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2013, p. 1–17

Tuomilehto J, Del Prato S. Mealtime glucose regulation in type 2 diabetes. *Int J Clin Pract.* 2001; 55(6):380-3.

Turnbaugh P.J., Hamady M., Yatsunenko T., Cantarel B.L., Duncan A., Ley R.E., Sogin M.L., Jones W.J., Roe B.A., Affourtit J.P., Egholm M., Henrissat B., Heath A.C., Knight R., Gordon J.I. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 2009; 457: 480-4.

Turnbaugh P.J., Ley R.E., Mahowald M.A., Magrini V., Mardis E.R., Gordon J.I. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 2006; 444: 1027-31.

Vael C., Desager K. The importance of the development of the intestinal microbiota in infancy. *Curr Opin Pediatr.* 2009; 21: 794-800.

Van der Heijden Roel A, Fareeba Sheedfar, Martine C Morrison, Pascal PH Hommelberg, Danny Kor, Niels J Kloosterhuis, Nanda Gruben, Sameh A Youssef, Alain de Bruin, Marten H Hofker, Robert Kleemann, Debby PY Koonen, and Peter Heeringa. High-fat diet induced obesity primes inflammation in adipose tissue prior to liver in C57BL/6j mice. *AGING*, April 2015, Vol. 7 No.4, 256 – 67.

Van Heek Margaret, Douglas S. Compton, Constance F. France, Richard P. Tedesco, Ahmad B. Fawzi, Michael P. Graziano, Edmund J. Sybertz, Catherine D. Strader, and Harry R. Davis, Jr. Diet-induced Obese Mice Develop Peripheral, but Not Central, Resistance to Leptin. *J. Clin. Invest.* 1997; 99(3), p. 385–390

Velagapudi Vidya R., Rahil Hezaveh, Christopher S. Reigstad, Peddinti Gopalacharyulu, Laxman Yetukuri, Sama Islam, Jenny Felin, Rosie Perkins, Jan Borén, Matej Orešič and Fredrik Bäckhed. The gut microbiota modulates host energy and lipid metabolism in mice. *Journal of Lipid Research*, Volume 51, 2010 1101- 12.

Verdugo Becerra María de los Ángeles. Papel de las p38MAPK en el desarrollo del daño hepático producido por obesidad. Trabajo de título para obtención de doctorado. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid, 2013.

Vojarova Barбора, Weyer Christian, Kristin Hanson, P. Antonio Tataranni, Clifton Bogardus, and Richard E. Pratley. Circulating Interleukin-6 in Relation to Adiposity, Insulin Action, and Insulin Secretion. *Obesity Research*. 2001, 9(7); p. 414- 7.

Wajchenberg Bernardo Le´O. Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue: Their Relation to the Metabolic Syndrome. *Endocrine Reviews*, 2000; 21(6): 697–738.

Weight and Height: Implications for Population Studies. *OBESITY*, 2007;15: 197- 208.

Wells S.E., Flavell D.M., Bisset G.W., Houston P.A., Christian H., Fairhall K.M., Robinson I.C. Transgenesis and neuroendocrine physiology: a transgenic rat model expressing growth hormone in vasopressin neurones. *J Physiol*. 2003, 15; 551(Pt 1) p. 323-36.

White, M.F., The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia*, 1997. 40 Suppl 2: p. S2-17.

WHO: The International Classification of adult underweight, overweight and obesity according to BMI http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html

Wilson M. The gastrointestinal tract and its indigenous microbiota. Microbial inhabitants of humans. Their ecology and role in health and disease. University of Cambridge Press. 2005; 251-317.

Wu Chien-Chen, Wei-Lien Weng, Wen-Lin Lai, Hui-Ping Tsai, Wei-Hsien Liu, Meng-Hwan Lee, and Ying-Chieh Tsai. Effect of *Lactobacillus plantarum* Strain K21 on High-Fat Diet-Fed Obese Mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, Article ID 391767, 9 páginas.

Yamakawa T., Tanaka S., Yamakawa Y., Kiuchi Y., Isoda F., Kawamoto S., Okuda K., Sekihara H. Augmented production of tumor necrosis factor-alpha in obese mice. *Clin Immunol Immunopathol.* 1995; 75 (1) p. 51-6.

Yatsunencko T., Rey F.E., Manary M.J., Trehan I., Dominguez- Bello M.G., Contreras M., et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 2012; 486: 222- 7.

Yatsuya Hiroshi, Li Yuanying, Esayas Haregot Hilawe, Ota Atsuhiko, Wang Chaochen, Chiang Chifa, Zhang Yan, Uemura Mayu, Osako Ayaka, Ozaki Yukio, Aoyama Atsuko. Global Trend in Overweight and Obesity and Its Association With Cardiovascular Disease Incidence. *Circulation Journal*, 2014 (78): 2807- 2818.

Yazdi Fereshteh, Susanne M. Clee and David Meyre. Obesity genetics in mouse and human: back and forth, and back again. *PeerJ* 3:e856; DOI 10.7717/peerj.856

S.I. Yun, H.O. Park and J.H. Kang. Effect of *Lactobacillus gasseri* BNR17 on blood glucose levels and body weight in a mouse model of type 2 diabetes. *Journal of Applied Microbiology* 107 (2009) 1681–1686.

Zhang, Y. R. et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 1995; 425-432

Zimmet Paul, Alberti K. G. y Shaw Jonathan. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*, 2011, 414: 782 – 7

Zivkovic A.M., German J.B., Lebrilla C.B., Mills D.A. Human milk glycomiome and its impact on the infant gastroin-testinal microbiota. Proc Natl Acad Sci, 2011; 108 Suppl 1:4653-58.

Zoetendal Erwin G., Antoon D. L. Akkermans, Wilma M. Akkermans-van Vliet, J. Arjan G. M. de Visser, Willem M. de VosThe Host Genotype Affects the Bacterial Community in the Human Gastronintestinal Tract. Microbial Ecology in Health and Disease, 2001, (13) 3: 129-134.

