

Universidad de Navarra

Facultad de Farmacia



Investigación de extractos ricos en polifenoles con actividad protectora frente al desarrollo de la obesidad: mecanismos nutrigenómicos implicados

Noemi Boqué Terré

Pamplona, 2012

Universidad de Navarra

Facultad de Farmacia



Memoria presentada por D^a **Noemi Boqué Terré** para aspirar al grado de Doctor por la Universidad de Navarra

Noemi Boqué Terré

El presente trabajo ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Ciencias de la Alimentación, Fisiología y Toxicología y autorizamos su presentación ante el tribunal que lo ha de juzgar.

Pamplona, 27 de febrero de 2011

V^oB^o Director

Dr. Javier Campión Zabalza

V^oB^o Director

Dr. J. Alfredo Martínez Hernández

Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación de diversas entidades: Asociación de Amigos de la Universidad de Navarra (beca predoctoral 2009-2012), Gobierno de Navarra (beca de formación de tecnólogos y Departamento de Educación 2008-2009), Biosearch S.A. en el marco del proyecto PRONAOS concedido por el Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial (CDTI) y Línea Especial de la Universidad de Navarra (LE/97).

A Jordi

Agradecimientos

Me gustaría expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que han hecho posible de manera directa o indirecta la realización de este trabajo durante los últimos 5 años. Me resulta imposible plasmar en unas hojas todo lo que me han aportado a lo largo de este tiempo, en lo laboral y en lo personal, por eso quiero dedicar aunque sea una pequeña frase a cada una de ellas.

En primer lugar, me gustaría agradecer a la Universidad de Navarra y al Departamento de Ciencias de la Alimentación, Fisiología y Toxicología (CAFT) la oportunidad de desarrollar el presente trabajo y adentrarme así en el mundo de la investigación. Como Diplomada en Dietética Humana y Nutrición, me gustaría hacer una mención especial al departamento CAFT por ofrecer una oportunidad a los dietistas-nutricionistas que quieren iniciar una carrera investigadora basada en materias que en principio no forman parte de nuestra formación, como por ejemplo la biología molecular. Gracias, especialmente a la organización del Máster E-MENU, por formarnos en materias tan desconocidas para nosotros, que nos han proporcionado nuevos conocimientos, una forma distinta de ver la ciencia de la nutrición y sobretodo la posibilidad de explorar nuevos caminos profesionales.

Por supuesto, agradecer a la Asociación de Amigos de la Universidad de Navarra la beca recibida durante estos años y a Biosearch S.A. y el CDTI por la financiación del proyecto.

A mis directores de tesis,

Al profesor Alfredo Martínez por darme la oportunidad de realizar la tesis doctoral y por su apoyo y paciencia durante este largo tiempo, en el que ha habido momentos buenos y malos. También darle las gracias por todos sus consejos y aportaciones científicas.

A Javier Campión, le agradezco de manera especial su apoyo incondicional y la oportunidad que me dio para realizar la tesis bajo su dirección. Gracias por confiar en mi desde el primer momento hasta el último, por transmitirme otra manera de entender la ciencia y la investigación, por todo lo que he aprendido de él, por hacer que confíe en mi misma, por apoyarme en los momentos difíciles pero sobre todo

por felicitar me en los buenos, por buscar soluciones a todo, por hacer que me ría en momentos de desesperación, por ayudarme a conseguir becas, por hacer todo lo posible para que asistiéramos a un congreso internacional y por supuesto, por dirigirme durante estos años para formarme como investigadora (una nueva “dietista molecular”) y conseguir escribir esta tesis de la que estoy muy orgullosa. Y como no, por los buenos momentos que hemos compartido en las cenas, cafés, Lakoras, sidrerías... en los que nos hemos reído, hemos hablado y hemos desconectado del trabajo. Es curioso cómo recuerdo que fue la primera persona que encontré cuando llegué a la Universidad de Navarra y andaba perdida por los pasillos. Ya ese día se sentó conmigo y me ofreció su ayuda. Y ahora puedo decir con total sinceridad que he tenido el mejor director de tesis que podía esperar. Muchas gracias por todo.

A todos los profesores que han contribuido en mi formación durante este tiempo: a Fermín, por brindarme en todo momento palabras de apoyo y ánimo y por estar siempre dispuesto a ayudar; a Marian y Marta, por guiarnos en el desconocido mundo de la docencia y habernos convertido en unas “profesionales”; a Pedro González Muniesa, todavía recuerdo que al cabo de unas horas de conocerte me diste un artículo sobre el consumo de manzanas... sobran las palabras: por estar pendiente absolutamente de TODO y de todo el mundo y por ser un ejemplo a seguir (y por ser el único que se preocupa de que todos los asistentes al café no seamos un ejemplo de obesidad inducida por la dieta de cafetería!!); a Santi, por sus buenos consejos, por todos los buenos momentos que hemos pasado y por alegrarme siempre el día (aunque seas un detractor de Guardiola...)!

A Mónica Olivares y Óscar Bañuelos, de Biosearch S.A., por hacer todo lo posible para que esta tesis haya salido adelante, por demostrar siempre vuestro interés y gratitud por el trabajo realizado, y por supuesto, por respondernos siempre a las innumerables dudas que nos han surgido durante este tiempo. Gracias Mónica por apoyarme y tranquilizarme en el congreso de Sitges! También me gustaría dar las gracias a Belén San Román, que aunque nunca la haya conocido en persona, siempre me dado todo su apoyo desde la distancia (suerte doctora!). Por último, y aunque sólo coincidimos en los inicios del proyecto CENIT-PRONAOS, quiero agradecer a Esther de la Fuente su ayuda, amabilidad y colaboración en todo momento.

A Miguel Galarraga y Carlos Ortiz de Solórzano, por el desarrollo de Adiposoft, que ha sido una herramienta imprescindible para la realización de este trabajo. Querría agradecer especialmente a Miguel su esfuerzo y gran dedicación para mejorar el programa versión a versión, para hacer que nuestro trabajo resulte mucho más fácil, rápido y eficaz. Muchísimas gracias.

A Jesús Sanz, del CSIC, por su inconmensurable ayuda en la caracterización de los extractos, esencial para el presente trabajo. Gracias por hacer tan fácil la colaboración.

Especialmente quiero dar mil gracias a Rocío y Ana Laura: sin vosotras hubiese sido absolutamente imposible llevar a cabo este proyecto. Por las infinitas horas que dedicasteis a esta investigación durante la realización de vuestro Máster (que le valió el premio a Rocío!!!), por vuestro apoyo incondicional, las tardes en el animalario, la preparación de las dietas, las hojas de Excel... y por lo fácil, agradable y divertido que fue trabajar con vosotras en todo momento. Después de tanto esfuerzo espero que disfrutéis de esta tesis que es en parte vuestra!

A Haritz, por su excelente trabajo con Adiposoft, su ayuda en las matanzas... gracias!! que tengas mucha suerte en el futuro.

A Jose Antonio, por el gran esfuerzo dedicado a la preparación de las dietas y el manejo de los animales.

A Ana Lorente y Vero, las “profes” del laboratorio. Sin vosotras tampoco habría sido posible la realización de este trabajo. Gracias por todo lo que me habéis enseñado y por estar siempre dispuestas a ayudar! Y felicidades por vuestro trabajo, siempre IMPECABLE.

A Paula y Bea, por hacer nuestro trabajo más fácil y disponer siempre de una sonrisa para todos.

A Diego, porque siempre has sido un ejemplo a seguir: por tu inteligencia, tu dedicación al trabajo, tu compañerismo, tu generosidad infinita y tu gran corazón. Por todo lo que he aprendido de ti y por la huella que has dejado en mí, gracias por todo.

A Helen, con lo importante que eres para mí, qué pena que no puedas estar en la fase final de mi tesis!!! Ya sabes que siempre te admiré por tu gran inteligencia y capacidad de sacrificio además de por ser una amiga de verdad, que siempre estaba allí, en los buenos y los malos momentos. Siempre recordaré todo lo que hemos vivido dentro y fuera del trabajo. Nos vemos en Brasil!

A Carmen, en fin qué te voy a contar que ya no sepas! Mi compañera de máster, mi compañera de piso, mi amiga... Mi vida en Pamplona no habría sido lo mismo sin ti. Cuantas risas, fiestas, tracas, cenas, Vaivenes, almuerzos y otros momentos no tan dulces que hemos compartido. Por ser como eres, te quiero mucho.

A todos mis compareños/as de la sala de ordenadores: A Paúl, por ser un compañero excepcional, por su infinita paciencia y generosidad, y por la pasión que demuestra por la investigación (ya lo dice Javier, que tienes genes de jefe!) y por todo lo que he aprendido de ti sobre epigenética!; a Laura, aunque ya no estés en ordenadores todavía me doy la vuelta para preguntarte dudas... he aprendido muchísimo de ti. En fin, por todo lo que hemos vivido juntas, si es que esto de compartir jefe une mucho verdad?; a Tara, porque con el tiempo he ganado una amiga a la que echaré muchísimo de menos (te espero en el Camp Nou...la venganza!); a Adri, por nuestros sueños (y por nuestro sueño) y por haber tenido el placer de haber compartido contigo la escritura de esta tesis, ánimos futura doctora! y mil gracias por los puntos suspensivos...; a Ceci, por tu risa contagiosa, tu sentido del humor, tu amistad y por ser mi compi de habitación en Estambul!!! qué gran viaje...; a Aurora, por sacarme siempre una sonrisa y animarme incansablemente (pero sobretodo por darme de merendar!); a Pablo, por ayudarme en cultivos, por todos los buenos momentos que hemos pasado fuera del laboratorio y por su sentido del humor “magnífico”; a Patri, por las horas compartidas en prácticas y por los cruasanes de chocolate!; a Pilar, por ser la alegría y el optimismo del departamento y por tus 500 páginas de tesis; a Ana Gómez, por tu enorme generosidad y por todo lo que nos hemos reído juntas; a Mery, por tu simpatía, tus suspiros y tu pasión por Osasuna; a Marta, por los momentos compartidos en la sala de Western Blot y por resolver siempre mis dudas; a Pedro, por soltarnos una carcajada cada vez que cogía el teléfono.

Por supuesto, no quiero olvidarme de mis compañeros del piso de abajo: Jaione, Carlos, Jonai y Asun, cada uno de ellos con un sentido del humor especial que me encanta y que considero imprescindible para que el día a día sea mucho más fácil y los problemas se volatilicen. Muchísimas gracias a todos.

A las nuevas incorporaciones: Miguel López, Usune, Idoia y Sonia. Gracias por vuestra simpatía y energía (A Sonia quizás le sobre un poco...). Muchísima suerte a todos, que ya veis que todo tiene un final!

A todos los que han pasado por el departamento: A Cris, Esti, Blanca, Almu, Bea, Idoia e Itzi. Aunque parezca ya muy lejos, pasamos muchísimos momentos juntas que nunca olvidaré.

A María de los Mozos, cuantos momentos buenos recuerdo contigo aunque sólo estuvieras un añito en el departamento! Et mereixes el millor.

A Marta Salvadó, sembla mentida però ja estic escrivint els agraïments de la tesis! ja sé que en el fons no vols que acabi però espero que et sentís orgullosa quan tinguis a les mans aquesta tesis. Vam començar juntes fent el Màster al departament i has acabat sent la meva família de Pamplona. És imposible fer un resum de tot el que hem viscut, només vull que sàpigues que no ho oblidaré mai i que la Mi encara que torni a casa no deixarà mai de ser la Mi que tu vas “crear”. Infinites gràcies per tot!!! Et prometo que et vindré a veure moltes vegades (i queda per escrit).

A mi cuadrilla de Pamplona: a Javi, Carlos, Jose, Rafa, Fermín, Iban e Iñaki. Sois en gran parte culpables de que me cueste tanto irme de aquí. Por todas las cenas, fiestas, conciertos... y por haber hecho que me sienta como en casa desde el primer día que llegué a Pamplona. Nunca pensé que iba a hacer tan grandes amigos, os espero en Barcelona!

A Melba, Sonia, David y Nuria, per estar sempre amb mi des de la distància i per ser els primers i els últims que heu confiat i heu cregut en mi. M'heu demostrat el vostre suport incondicional, encara que la tornada s'hagi retrassat una miqueta...Espero que no oblideu mai els increïbles moments que hem viscut a Pamplona: el rexy, el chiquito, els San Fermins, els mitjons que caminaven sols, la Paloma, el Pacharan, la Sidra, els chuletons, el bar dels gordos, el “Señora, le

cruzo??”... quin fart de riure només de pensar-hi. Us estimo moltíssim! Ens veiem molt aviat.

Al meu germà, ara que tornava a casa i va tu i marxes a l'altra punta del món!!! De fet, mentre estic escrivint aquestes línies tu estás volant cap a Australia amb la Cristina!!! Espero que estiguis orgullós de que la teva germaneta ja tingui la seva tesis doctoral (encara que treballi amb rates, són coses de l'ofici...). Espero que et vagi com a mínim la meitat de bé del que m'ha anat a mi a Pamplona. Bon viatge!

A la meva mare, per fer-ho possible TOT. Per ajudar-me quan vaig decidir marxar, pel suport econòmic (evidentement!), per haver suportat que hagués de treballar amb rates, per les caixes de fruita i verdura que prenia cap a Pamplona i per compartir els gols del Barça per telèfon! Per estar sempre amb mi, GRÀCIES.

Al meu pare, perquè espero que estiguis orgullós de que hagi arribat fins aquí!!! Gràcies per tot.

Als meus avis, perquè els trobo molt a faltar i m'agradaria molt que poguessin ser aquí per veure aquesta tesis.

A l'Alba, perquè siguis on siguis estic segura que estàs orgullosa de la teva cosina. Eres i seràs sempre un exemple de fortalesa, de lluita i d'esperit de sacrifici. Perquè almenys tots haguem après a ser com tu en els moments difícils i no ens rendim MAI, fins a l'últim sospir. Perquè els tiets segueixin amb l'exemple i no es rendeixin. Per la noia més bonica i més tendra que he conegut mai, sempre estaràs amb nosaltres. T'estimo.

A Jordi, ninet!!! ja et pensaves que no t'escriuria res eh! ja queda tan poquet carinyu!! un pas més i aviat podrem començar una nova vida junts. Gràcies per compartir amb mi els bons moments i recolzar-me i animar-me quan els ànims decauen, per buscar la part positiva de les coses, per intentar treure el millor de mi, per estimar-me tant i per fer que t'estimi tant.

GRACIAS a todos por hacer que estos años en Pamplona hayan sido los mejores de mi vida

Abreviaturas

Acaca	Acetil-CoA Carboxilasa alfa
Acl	ATP Citrato Liasa
ACTH	Hormona Adrenocorticotrópica
Aebp1	Proteína Potenciadora de Unión al Adipocito
AGL	Ácidos Grasos Libres
Asp	Proteína Estimuladora de Acilación
Brs3	Receptor de la Bombesina 3
C/EBPs	Proteínas de Unión a los Activadores CCAAT
Cav1	Caveolina 1
CD36	Cluster de diferenciación 36
Cdkn1a	Inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas 1a
Cdkn1b	Inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas 1b
Cdkn1c	Inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas 1c
Cpt1b	Carnitina Palmitoiltransferasa 1b
CRH	Hormona Liberadora de Corticotropina
DEXA	Absorciometría de Rayos X de Energía Doble
Dgat1	Diacilglicerol Aciltransferasa
DIO	Obesidad Inducida por la Dieta
DNMTs	Metiltransferasas de ADN
DR	Resistentes a la Dieta
EGCG	Epigallocatequina-3-gallato
ER α	Receptor de Estrógenos α
ETP	Plataforma Tecnológica Europea
Fasn	Sintasa de Ácidos Grasos
FTO	Gen asociado a la obesidad y a la masa grasa

Glut1	Transportador de la glucosa 1
Glut4	Transportador de la glucosa 4
Gpat	Glicerofosfato Aciltransferasa
Gpr77	Receptor Acoplado a la Proteína G
Gys1	Glucógeno Sintasa 1
HF	Alta en grasas
HFS	Alta en grasas y sacarosa
Hk2	Hexoquinasa 2
HS	Alta en sacarosa
Hsd11b1	11 β -Hidroxiesteroide Deshidrogenasa Tipo 1
Hspa5	Proteína relacionada con el choque el calor 5
IL6	Interlequina 6
IMC	Índice de Masa Corporal
IPGTT	Test de Tolerancia Intraperitoneal a la Glucosa
IRS1	Sustrato del Receptor de la Insulina 1
Lipe	Lipasa Sensible a Hormonas
Lpl	Lipoproteína Lipasa
Mc4r	Receptor de la Melanocortina 4
MCP1	Proteína quimiotáctica monocítica
Mgll	Monoacilglicerol Lipasa
Nr3c1	Receptor de Glucocorticoides
Nrip1	Receptor Nuclear 1
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAI1	Inhibidor del Activador del Plasminógeno 1
Pck1	Fosfoenolpiruvato Carboxiquinasa
Pdk4	Piruvato Deshidrogenasa Quinasa
Pnpla2	Triacilglicerol Lipasa

Ppargc1a	PPARg coactivador 1 alfa
PPARs	Receptores Activadores de la Proliferación de los Peroxisomas
Ptp1b	Proteína-tirosina Fosfatasa 1b
QLT	Loci por Caracteres Cuantitativos
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real
Scd1	Estearoil-CoA Desaturasa 1
Sfrp5	Proteína Secretada Relacionada con Frizzled
Sirt1	Sirtuina 1
Socs3	Supresor de la Señalización de Citoquina 3
Sreb1/Srebp1	Proteína de Unión a Elementos de Respuesta a Esteroles 1
TAC	Tomografía Axial Computarizada
TNFa	Factor de Necrosis Tumoral alfa
UCPs	Proteínas Desacoplantes

Índice

I. INTRODUCCIÓN	1
1. La obesidad	3
1.1. Diagnóstico y clasificación	4
1.2. Etiopatogenia.....	5
1.3. Complicaciones asociadas	6
1.4. Modelos animales de obesidad.....	8
1.4.1. Modelos genéticos de obesidad.....	9
1.4.2. Modelos dietéticos de obesidad	9
2. El tejido adiposo.....	12
2.1. Desarrollo del tejido adiposo blanco	13
2.2. Tejido adiposo e inflamación	15
3. Nutrigenómica y nutriepigenética	17
3.1. Biología del adipocito: genes implicados	18
3.2. Regulación de la expresión génica en el músculo esquelético.....	22
3.3. Modificaciones nutriepigenéticas.....	23
4. Los polifenoles	25
4.1. Clasificación.....	26
4.2. Ingesta dietética.....	27
4.3. Absorción y metabolismo	29
4.4. Efectos biológicos	30
4.5. Alteraciones epigenéticas.....	32
4.6. Efectos sobre la obesidad y el síndrome metabólico	35
5. Bibliografía	40
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	57
1. Hipótesis.....	59
2. Objetivo general	59

3. Objetivos específicos	59
III. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	61
1. Diseño general.....	63
2. Diseño experimental (Capítulo 1)	65
3. Diseño experimental (Capítulo 2)	66
4. Diseño experimental (Capítulo 3)	67
IV. RESULTADOS.....	69
<u>Capítulo 1.</u> Influence of dietary macronutrient composition on adiposity and cellularity of different fat depots in Wistar rats	71
<u>Capítulo 2.</u> Screening of polyphenolic plant extracts for anti-obesity properties in Wistar rats	91
<u>Capítulo 3.</u> Prevention of diet-induced obesity by apple polyphenols in Wistar rats through regulation of adipocyte gene expression and DNA methylation patterns	113
V. DISCUSIÓN.....	157
1. Discusión general	159
2. Modelos de obesidad inducida por la dieta en ratas Wistar	160
3. Efectos de la dieta HFS	163
3.1. Peso corporal y adiposidad.....	163
3.2. Metabolismo glucídico y lipídico.....	164
3.3. Histología del tejido adiposo	165
3.4. Lipólisis	165
3.5. Gasto energético y cociente respiratorio	166
3.6. Expresión génica	166
3.7. Metilación del ADN	170
4. Cribado de extractos vegetales ricos en polifenoles para la prevención de la obesidad inducida por la dieta en ratas Wistar	170

5. Efectos antiobesogénicos y mecanismos implicados de la suplementación de la dieta HFS con un extracto rico en polifenoles de manzana.....	173
5.1. Peso corporal y adiposidad.....	173
5.2. Metabolismo glucídico y lipídico.....	174
5.3. Histología del tejido adiposo y lipólisis	175
5.4. Gasto energético y cociente respiratorio	175
5.5. Expresión génica	176
5.6. Metilación del ADN	179
VI. CONCLUSIONES	183
VII. BIBLIOGRAFÍA	187
VIII. ANEXOS	205
Anexo 1. Some cyclin-dependent kinase inhibitors-related genes are regulated by vitamin C in a model of diet-induced obesity	207
Anexo 2. Healthy properties of proanthocyanidins.....	217
Anexo 3. Vitamin C inhibits leptin secretion and some glucose/lipid metabolic pathways in primary rat adipocytes.....	229
Anexo 4. Selenoprotein-P is Down-Regulated in Prostate Cancer, Which Results in Lack of Protection Against Oxidative Damage.....	243
Anexo 5. Natural Inhibitors of Pancreatic Lipase as New Players in Obesity Treatment.....	257
Anexo 6. Otras publicaciones	273
Anexo 7. Contribuciones a congresos	277

I. Introducción

1. LA OBESIDAD

A lo largo de la historia de la humanidad, la ganancia de peso y el exceso de grasa corporal se han considerado símbolos de salud y prosperidad, pero hoy día estos mismos conceptos se han convertido en una amenaza para la salud que afecta miles de personas en todo el mundo [1]. La prevalencia de la obesidad se ha duplicado en las últimas dos décadas, llegándose a considerar la epidemia del siglo XXI y uno de los retos más importantes y serios de la salud pública [2]. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2008 unos 200 millones de hombres en el mundo presentaban obesidad, mientras que la cifra en mujeres alcanzó los 300 millones [3]. En España, los últimos datos de la OMS sitúan la prevalencia de obesidad en un 27% mientras que el sobrepeso alcanza valores muy superiores, con un 62% [4]. Además, ya no es un problema únicamente de la sociedad del primer mundo sino que está empezando a extenderse por países menos desarrollados [5]. Igualmente abarca un rango cada vez más grande de edades, poniéndose de manifiesto un grave problema de obesidad infantil [6]. Por otra parte, la obesidad no sólo afecta a la salud sino que perjudica gravemente la economía global: implica casi un 7% del coste sanitario total en la región europea y el doble si hablamos de costes indirectos [7]. También afecta al desarrollo social, ya que está ampliamente extendida en grupos socio-económicos bajos [8].

En la lucha contra la obesidad, la industria alimentaria ha sido frecuentemente cuestionada por los productos que comercializa y su posible relación con la obesidad. Pero adicionalmente, los productores de alimentos han ido incorporando nuevos ingredientes y elaborando productos novedosos con el objetivo de ayudar a los consumidores a obtener y mantener su peso adecuado [9]. Estos productos, se limitaban en un principio a los denominados “alimentos light”, habitualmente alimentos desnatados o sin azúcar. Hoy en día, sin embargo, el énfasis está puesto en el potencial que tienen los alimentos para promover el estado de salud, mejorar el bienestar y reducir el riesgo de enfermedades como la obesidad. En este sentido, surge el concepto de “alimentos funcionales” para indicar que algunos alimentos pueden ejercer acciones beneficiosas sobre ciertas funciones del organismo que van más allá de sus efectos nutricionales considerados tradicionalmente [10]. Así, para la industria, la obesidad aparece como una diana clave para el desarrollo de estos alimentos.

1.1. Diagnóstico y Clasificación

La obesidad se define como un exceso de grasa corporal que induce a un aumento significativo de riesgo en la salud [3]. Aún así, el parámetro más usado para el diagnóstico de la obesidad es el Índice de Masa Corporal (IMC), que paradójicamente no tiene en cuenta el porcentaje de grasa corporal, pero que goza de una buena reproducibilidad y facilidad de utilización. El IMC relaciona el peso con la altura y permite clasificar la obesidad en distintos grados (Tabla 1). El principal inconveniente del citado índice recae en su ineficacia a la hora de diferenciar entre los distintos compartimientos del organismo, de modo que no es posible conocer si hay un exceso de masa grasa, o por el contrario se trata de una mayor peso de la masa muscular o una acumulación de líquido. Por eso, existen otros índices para determinar la distribución de la grasa en el organismo y poder calcular el riesgo de comorbilidades que presenta el paciente. Así, la circunferencia de la cintura nos sirve para detectar un exceso de masa grasa intra-abdominal, relacionado con las principales complicaciones metabólicas de la obesidad y la aparición del síndrome metabólico. Los pliegues cutáneos son otro de los métodos de los que disponemos para diferenciar entre los compartimientos grasos y magros del cuerpo.

Tabla 1. Clasificación internacional para la obesidad, sobrepeso y bajo peso en adultos, según el IMC (modificado de [11]).

CLASIFICACIÓN	IMC (kg/m ²)	
	Puntos de corte principales	Puntos de corte adicionales
Bajo peso	<18,50	<18,50
Delgadez severa	<16,00	<16,00
Delgadez moderada	16,00 – 16,99	16,00 – 16,99
Delgadez leve	17,00 – 18,49	17,00 – 18,49
Normopeso	18,50 – 24,99	18,50 – 22,99
Sobrepeso	≥25,00	≥25,00
Pre-obesidad	25,00 – 29,99	25,00 – 27,49
		27,50 – 29,99
Obesidad	≥30,00	≥30,00
Obesidad tipo I	30,00 – 34,99	30,00 – 32,49
		32,50 – 34,99
Obesidad tipo II	35,00 – 39,99	35,00 – 37,49
		37,50 – 39,99
Obesidad tipo III	≥40,00	≥40,00

Otras técnicas más complejas cada vez más utilizadas en la práctica clínica y en la investigación son los aparatos de impedancia bioeléctrica, la Absorciometría de Rayos X de Energía Doble (DEXA), la Resonancia Magnética Nuclear (RMN), la Tomografía Axial Computarizada (TAC) o la pletismografía por desplazamiento de aire [1].

1.2. Etiopatogenia

La obesidad es el resultado de un desequilibrio prolongado entre la energía ingerida y el gasto energético, que conduce a un balance energético positivo. Se trata de una enfermedad crónica multifactorial resultado de las interacciones entre el estilo de vida, factores neuroendocrinos y la predisposición genética [12,13]. De hecho, la modificación de los hábitos dietéticos en las últimas décadas, marcada por cambios tanto cuantitativos como cualitativos [14], es uno de los factores que más ha favorecido la aparición de esta epidemia. Estos cambios generan una situación de claro desequilibrio dietético, afectado principalmente por una mayor concentración de grasas y azúcares simples en los alimentos preparados, una mayor ingesta de grasas saturadas (esencialmente provenientes de grasas animales), y una disminución en la ingesta de hidratos de carbono complejos y fibra alimentaria, así como de frutas y verduras. Al mismo tiempo esta situación se acompaña de cambios en el estilo de vida, con una reducción significativa de la actividad física en el trabajo y durante el tiempo libre.

En cuanto a los factores neuroendocrinos implicados en la obesidad, destacan las hormonas que promueven la acumulación de lípidos, insulina y cortisol, así como las hormonas que favorecen la movilización de lípidos, hormona de crecimiento y hormonas sexuales esteroideas. Así, un desequilibrio entre estas hormonas está relacionado con el Síndrome de Cushing (aumento de cortisol e insulina, disminución de hormonas esteroideas y hormona de crecimiento), la menopausia o edad avanzada (disminución de hormonas esteroideas y hormona de crecimiento), una excesiva ingesta de alcohol (elevación del cortisol, disminución de hormonas esteroideas), fumar (elevación periódica del cortisol) así como la ansiedad y el estrés asociado al estilo de vida actual (aumento de cortisol) [12]. Por otra parte, la ingesta se regula por mecanismos neuroendocrinos, puesto que la fase cefálica de la digestión está en buena parte dirigida por la actividad de neuropéptidos hipotalámicos, como el neuropéptido Y, que juntamente con factores gastrointestinales (como la ghrelina) que actúan a nivel

hipotalámico, promueven la sensación de apetito que favorece la ingesta de nutrientes. En la parte opuesta de la balanza están los mecanismos implicados en el gasto energético. La energía liberada procede de la termogénesis inducida por la acción de nutrientes y hormonas.

Por otra parte, existen suficientes evidencias que indican que la obesidad tiene un componente genético. De hecho, entre el 40 y el 70% de la variabilidad del peso corporal se ha atribuido a la herencia genética [15]. Además, desde un punto de vista evolutivo, los individuos con genes «ahorradores» han podido verse favorecidos, ya que la función reproductiva es dependiente de las reservas calóricas y las personas más resistentes a la desnutrición han podido sobrevivir en mayor proporción en épocas de penuria de alimentos [16]. Sin embargo, sólo se han descrito un número reducido de mutaciones genéticas puntuales responsables del desarrollo de esta enfermedad ya que la obesidad se debe mayoritariamente a la interacción entre genes y ambiente. Así, los resultados de la última revisión de “The Human Obesity Gene Map” demuestran que hasta el momento sólo se han descrito 176 casos de obesidad debidos a mutaciones puntuales, correspondientes a 11 genes, mientras que se han identificado más de 200 genes potencialmente implicados en la obesidad [17]. En la actualidad la herramienta más utilizada para detectar nuevas variantes genéticas relacionadas con la obesidad y con sus comorbilidades asociadas son los estudios de asociación del genoma completo (en inglés GWAS). En estos estudios se comparan los genomas de un grupo de personas con la enfermedad a estudiar (casos) y otro grupo de personas sanas (controles) para detectar variaciones genéticas asociadas a dicha enfermedad. El primer gen que se relacionó incuestionablemente con obesidad a partir de estos análisis tras replicarse su asociación en varias poblaciones diferentes fue el FTO (Gen asociado a la obesidad y a la masa grasa) [18,19]. A partir de entonces, se han realizado nuevos GWAS en los que se han identificado nuevas variantes genéticas asociadas a la obesidad [20,21,22,23].

1.3. Complicaciones de la obesidad

La obesidad se considera una enfermedad en sí misma. Aún así no hay que olvidarse que significa un factor de riesgo para numerosas enfermedades crónicas, destacando principalmente aquellas debidas a cambios metabólicos como la diabetes, enfermedades cardiovasculares e hipertensión [24]. De este modo la obesidad contribuye a disminuir la esperanza de vida así como a afectar la calidad de vida de quienes la padecen. De

hecho, las enfermedades que acompañan la obesidad son las responsables de que esta esté relacionada con más muertes que la malnutrición: al menos 2,8 millones de adultos mueren cada año como resultado de esta enfermedad. A continuación se exponen algunas de ellas [25]:

1) *Anomalías lipídicas*: aumento del colesterol total y triglicéridos, acompañado de un aumento de las VLDL, LDL y un descenso de las HDL.

2) *Resistencia a la insulina y diabetes tipo 2*: el riesgo aumenta con el grado de obesidad, la duración de la misma y la distribución central de la grasa corporal. Se crea una situación de insulino-resistencia, alcanzando el máximo deterioro en la utilización periférica de la insulina en individuos con un porcentaje de grasa corporal superior al 30%.

3) *Alteraciones respiratorias*: aparición de la apnea del sueño debido a la disminución del volumen de los pulmones provocado por un exceso de masa grasa que presiona el diafragma; disfunción pulmonar, síndrome de Pickwick e hipertensión pulmonar.

4) *Alteraciones cardiovasculares*: íntimamente relacionadas con la obesidad visceral, aparecen enfermedades como la cardiopatía isquémica, miocardiopatía, arritmias, accidente vasculocerebral, insuficiencia cardíaca...

5) *Hipertensión arterial*: existe una relación directa entre obesidad androide, hiperinsulinismo e hipertensión arterial. La combinación de obesidad e hipertensión conduce a un engrosamiento de la pared ventricular con un mayor volumen cardíaco y así una mayor probabilidad de fallo cardíaco.

6) *Alteraciones tumorales*: los pacientes obesos tienen aumentado el riesgo de padecer ciertos cánceres. En mujeres, aumenta el riesgo de cáncer de mama, endometrio, vesícula y ovario. En hombres los más frecuentes son el cáncer de recto y de próstata. La frecuencia de los cánceres de riñón y colon aumenta por igual en ambos sexos.

7) *Alteraciones articulares*: la osteoartritis está significativamente aumentada en la obesidad. Además puede aparecer artrosis, hernias discales y gota e hiperuricemia. Las

complicaciones osteoarticulares representan uno de los factores más importantes dentro de los costes económicos originados por la obesidad.

8) *Alteraciones digestivas*: pueden alterar significativamente la calidad de vida del paciente. Destacamos el reflujo gastroesofágico, la esteatosis y esteatohepatitis no alcohólica, debido a un acúmulo de grasa en los hepatocitos acompañado en muchos casos por un estado inflamatorio, y la colelitiasis, resultado de una bilis sobresaturada por una mayor excreción de colesterol.

9) *Alteraciones renales*: son debidas principalmente a la hipertensión arterial, provocando proteinuria y daño renal. También pueden aparecer litiasis y glomerulopatías.

10) *Alteraciones endocrinas*: principalmente aquellas relacionadas con el eje renina-aldosterona, el eje hipotálamo-hipófiso-adrenal, tiroides y el sistema reproductivo.

11) *Alteraciones neurológicas*: especialmente accidentes cerebrovasculares e hipertensión intracraneal.

12) *Alteraciones psicológicas*: la obesidad se asocia muy frecuentemente a depresión, ansiedad y un rechazo social que limita la calidad de vida del paciente.

1.4. Modelos animales de obesidad

El estudio de la obesidad y sus patologías asociadas requiere el desarrollo de modelos animales que reproduzcan las características fenotípicas de esta enfermedad de la manera más fiel posible. Además del importante papel en el cribado de nuevos compuestos para el control de la ingesta y/o peso corporal, los modelos animales se han usado para la identificación de las bases fisiológicas y genéticas de la obesidad, así como para evaluar la eficacia de nuevos agentes antiobesogénicos [26]. En general, se pueden clasificar en modelos genéticos y modelos dietéticos. Algunos de los modelos en roedores más utilizados se resumen a continuación:

1.4.1. Modelos genéticos de obesidad

- *Modelos animales monogénicos*: como el ratón diabético (*db/db*), el ratón obeso (*ob/ob*), el ratón Tubby (*tub*), el ratón amarillo (*Ay*), el ratón graso (*fat*) y la rata Zucker (*fa/fa*). Estos modelos espontáneos de obesidad han permitido localizar algunos genes y caracterizar su participación en la obesidad y las consecuencias de su ausencia o alteración [16].
- *Modelos animales poligénicos*: como los ratones obesos *New Zealand*, el ratón BSB, la rata *Osborne-Mendel* y la rata del desierto. Los modelos animales poligénicos de obesidad suelen tener mayor interés para evaluar las interacciones de la susceptibilidad genética con otras variables dietéticas, ambientales y metabólicas, aunque su interpretación puede resultar, en ocasiones, compleja [16].
- *Modelos transgénicos y knockout*: los animales transgénicos se obtienen en el laboratorio eliminando o incorporando fragmentos de ADN en su genoma, de esta manera se consigue la anulación, sobreexpresión o regulación de algunos genes candidatos relacionados con la incidencia de obesidad. Así, se han obtenido roedores obesos transgénicos mediante la sobreexpresión de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) o mediante la inhibición de la expresión de UCPs, del receptor de glucocorticoides y del receptor adrenérgico $\beta 3$ [16]. También podemos encontrar modelos animales *knockout* para el receptor de la melanocortina 4 (*Mc4r*), para el receptor de la bombesina 3 (*Brs3*) y para el receptor de estrógenos α (*ER α*), entre otros [27].
- *Caracterización de loci por caracteres cuantitativos (QLT) [16]*: esta estrategia requiere el cruzamiento de dos razas de roedores con genoma conocido, y el posterior análisis del fenotipo resultante para caracterizar las regiones cromosómicas implicadas en la heredabilidad del rasgo y sus posibles homologías en el genoma humano.

1.4.2. Modelos dietéticos de obesidad

Una hipótesis que crece en importancia es que la epidemia de obesidad que se ha generado en la sociedad actual puede ser consecuencia de una mayor disponibilidad de alimentos palatables con un elevado contenido en grasa, azúcares y energía. Se han realizado numerosos estudios en roedores con el fin de caracterizar las respuestas de los

animales expuestos a dietas con elevado contenido energético y se han observado dos tipos de respuestas; algunos animales muestran un aumento de los depósitos grasos y se les ha denominado roedores obesos inducidos por la dieta (DIO *Diet-induced obese*); otras cepas de roedores parecen ser resistentes al aumento de peso cuando son alimentados con dietas altas en grasa y se les denomina roedores resistentes a la dieta (DR *Dietary resistant*) [28]. Los modelos más ampliamente utilizados son las ratas Wistar y Sprague-Dawley, y en el caso de los ratones los C57BL/6 aunque hay que destacar que la respuesta a la dieta es dependiente de la cepa [29,30,31,32,33,34]. Por otro lado, las dietas que producen obesidad tienen un efecto gradual sobre la grasa corporal por lo que la duración del tratamiento es una variable importante. A continuación se detallan algunas de las dietas más normalizadas:

- *Dietas altas en grasas (HF, High-fat)*: Contienen entre un 30-78% de la energía total en forma de grasa [35]. Los efectos de estas dietas se traducen en un incremento del peso corporal de los animales, debido principalmente a un aumento del tejido adiposo. Además, estos animales desarrollan insulino-resistencia, intolerancia a la glucosa, hiperleptinemia y una moderada dislipidemia. Por otra parte, está ampliamente extendido el uso de la comúnmente denominada “dieta de cafetería” la cual genera un modelo de obesidad en roedores proporcionando sin límite a los animales comida apetitosa como chocolate, galletas, paté o patatas fritas. Se trata de una dieta hipercalórica e hiperlipídica que induce una hiperfagia voluntaria y un rápido aumento de peso [36,37,38,39]. Este modelo comparte además características comunes a la dieta occidental como son hiperfagia, hiperglucemia, resistencia a la insulina y en general condiciones comunes al síndrome metabólico [40] por lo que se considera un modelo ampliamente aceptado para el estudio de la obesidad [41,42]. En general, y aunque se han descrito algunas diferencias en los perfiles metabólicos de los animales según la dieta utilizada, se considera razonable la uniformidad del fenotipo obtenido independientemente de que la dieta sea comercial o manual [26].
- *Dietas altas en grasas y sacarosa (HFS, High-fat-sucrose)*: contienen alrededor de un 40% de grasa y un elevado contenido en sacarosa (entre un 15 y un 40%). Provoca un aumento en el peso y la adiposidad corporal, una marcada hiperglucemia y resistencia a la glucosa, además de hiperinsulinemia e hiperleptinemia [43,44,45,46].

- *Dietas altas en sacarosa (HS, High-sucrose)*: suelen contener entre un 40 y un 70% de sacarosa. Esta dieta es comúnmente usada para obtener un modelo de obesidad asociado a una hipertigliceridemia e insulino-resistencia. Se ha visto que induce un incremento del tejido adiposo, una clara hiperglucemia e hiperinsulinemia, disminuye la sensibilidad a la insulina y aumenta los niveles de ácidos grasos y la presión arterial [47,48]. Estos efectos se atribuyen principalmente a la fructosa, que junto la glucosa conforma la sacarosa [49].

Los cambios observados en los modelos animales de obesidad inducida por la dieta son significativamente consistentes con los observados en pacientes obesos humanos. De hecho, varios estudios genómicos comparando cambios en la expresión génica en ratas y humanos obesos, revelan importantes similitudes en distintos tejidos y vías afectadas por la obesidad [50]. En conclusión, estos estudios refuerzan la validez de los modelos animales de obesidad inducida por la dieta como una herramienta para el estudio de la obesidad en humanos.

Finalmente, hay que hacer mención especial a los modelos dietéticos para el estudio de fármacos y compuestos en la prevención y el tratamiento de la obesidad. Aunque es frecuente la evaluación de los efectos agudos de potenciales agentes antiobesogénicos, estos modelos sirven sólo para seleccionar ciertos compuestos con una determinada potencia, eficacia y ausencia de efectos secundarios, ya que los efectos de nuevos agentes para el tratamiento o prevención de la obesidad requieren ser demostrados en un periodo largo de tiempo para asegurar una reducción mantenida del peso corporal. Por otra parte, Vickers et al [26], en una reciente publicación, concluyen que los modelos genéticos presentan ciertas limitaciones para evaluar los efectos de un compuesto en la pérdida de peso debido a su falta de reproducibilidad en humanos. Así, sugieren que los modelos animales dietéticos son los más adecuados para determinar los efectos de fármacos o extractos en la obesidad y para realizar cribado, debido a su origen poligénico y al desarrollo de hiperleptinemia.

2. EL TEJIDO ADIPOSO

El tejido adiposo es el principal reservorio de energía del organismo cuya principal función es la captación de lípidos circulantes en momentos de exceso de energía (fase posprandial) y la liberación de ácidos grasos en situaciones que requieren energía [51]. El tejido adiposo está constituido por diferentes tipos de células como los preadipocitos, adipocitos blancos y marrones, células endoteliales, fibroblastos, células inmunitarias y células nerviosas. De este modo, podemos diferenciar entre los adipocitos y la fracción estroma-vascular, en la que se incluyen el resto de células que componen el tejido. Aún así, un 85% del tejido adiposo blanco está constituido por adipocitos blancos maduros, caracterizados por su considerable capacidad de expansión (son capaces de variar su diámetro unas 20 veces) y por almacenar una gran cantidad de lípidos [52]. Debido a que el 90% del volumen celular está ocupado por lípidos, el núcleo y el citoplasma son desplazados a la periferia de los adipocitos. Los adipocitos marrones por el contrario, se caracterizan por su enorme concentración de mitocondrias en el citoplasma, ya que su principal función es la producción de calor mediante la termogénesis, valiéndose de los lípidos que tiene almacenados [52]. Además se diferencian de los adipocitos blancos por ser multiloculares [53]. Según el tipo de adipocitos se diferencia entre tejido adiposo blanco y tejido adiposo pardo. Este último se encuentra muy desarrollado en mamíferos de pequeña talla y durante el período neonatal de muchas especies [54]. En neonatos humanos, el tejido es muy abundante, pero su importancia va disminuyendo progresivamente con la edad.

El tejido adiposo blanco se distribuye en distintos depósitos grasos, que se localizan a nivel subcutáneo o visceral. En ratas, los depósitos grasos viscerales más abundantes son el retroperitoneal que se encuentra detrás de los riñones, junto a la musculatura dorsal, el gonadal (ovárico o epididimal), situado alrededor de las gónadas, y el mesentérico, que rodea los intestinos (Figura 1). El depósito subcutáneo más abundante en ratas es el que se encuentra en la región inguinal (Figura 1). Según su localización anatómica, los distintos depósitos grasos van a tener funciones diferentes [52].

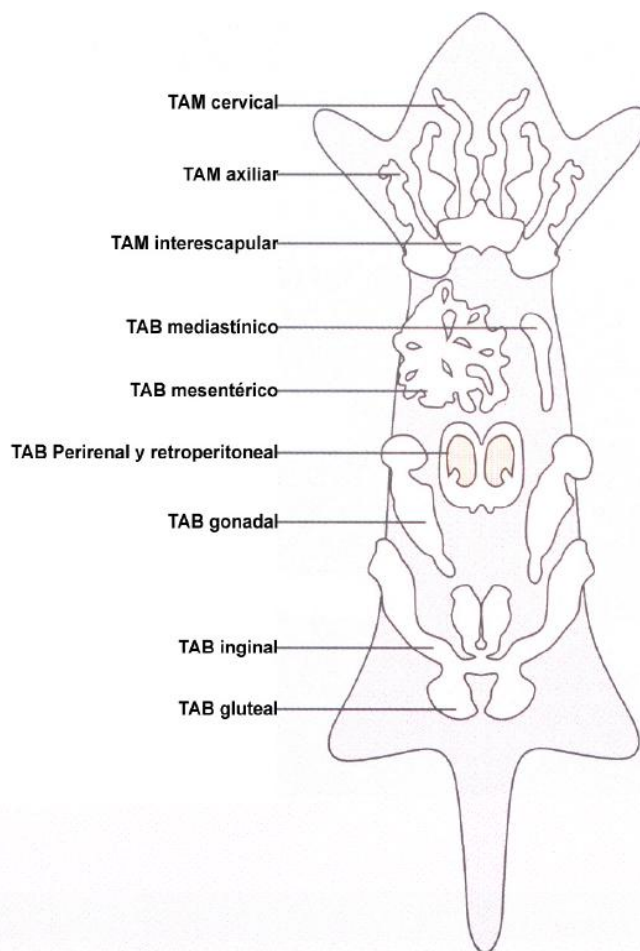


Figura 1. Localización de los depósitos grasos en ratas (TAM, Tejido adiposo marrón; TAB, Tejido adiposo blanco) (modificado de [55]).

2.1. Desarrollo del tejido adiposo blanco

La formación del tejido adiposo blanco comienza antes del nacimiento. La mayor expansión del mismo tiene lugar rápidamente tras el nacimiento pero su desarrollo es un proceso continuo a lo largo de la vida [53]. De hecho, el tejido adiposo blanco es el único tejido del cuerpo que puede experimentar cambios de tamaño una vez en la etapa adulta. El crecimiento de este tejido puede ser debido a un incremento en el número de adipocitos (hiperplasia) así como a un aumento de su tamaño debido a una acumulación de lípidos (hipertrofia) [56]. Además, los adipocitos hipertrofiados secretan factores de crecimiento que inducen la proliferación de los preadipocitos, creando así un ciclo vicioso [57]. La hiperplasia del tejido adiposo está asociada con las formas más severas de obesidad y presentan el peor pronóstico para su tratamiento, ya que la adquisición de nuevas células grasas parece ser un proceso irreversible.

En la rata, el crecimiento de este tejido ocurre en estadios bien definidos; del nacimiento a las 4 semanas de edad, el crecimiento es hiperplásico. De las 4 a las 14 semanas de edad ocurren ambos crecimientos hipertróficos e hiperplásicos. Después de las 14 semanas de edad la masa del tejido adiposo incrementa predominantemente por un crecimiento hipertrófico [58]. Este crecimiento puede variar en respuesta a distintas dietas hipercalóricas. Así, es bien conocida la capacidad de estos animales para generar nuevas células grasas en respuesta a dietas con alto contenido en carbohidratos y grasas [59]. Además, las diferencias en cuanto a la expansión del tejido adiposo dependen también de la localización del depósito graso, siendo el mesentérico el que presenta la mayor capacidad de expansión y el subcutáneo el que tiene una mayor capacidad proliferativa [56,60]. Esto puede ser debido a la distinta perfusión del tejido adiposo así como a la distinta inervación por el sistema nervioso simpático [61,62].

La hiperplasia del tejido adiposo, también referida como adipogénesis, es el resultado del reclutamiento de nuevos adipocitos a partir de células precursoras y comprende la proliferación de nuevos preadipocitos seguido de la diferenciación de éstos hasta adipocitos maduros [63] (Figura 2). Se trata de un proceso muy complicado, caracterizado por múltiples cambios en la morfología celular, sensibilidad a hormonas y expresión génica, que finalmente llevan al fenotipo del adipocito maduro, expresando los genes que controlan el metabolismo lipídico y la termogénesis [39]. En los preadipocitos existe un receptor para los ácidos grasos, que interviene en el proceso de síntesis de las enzimas necesarias para la diferenciación celular, estableciéndose así una relación entre factores alimentarios y la adipogénesis [64]. Es importante señalar que la obesidad que se acompaña con insulino-resistencia está asociada a un aumento de la población de adipocitos de tamaño muy pequeño, debido a la dificultad de estas células para terminar el proceso de diferenciación [65].

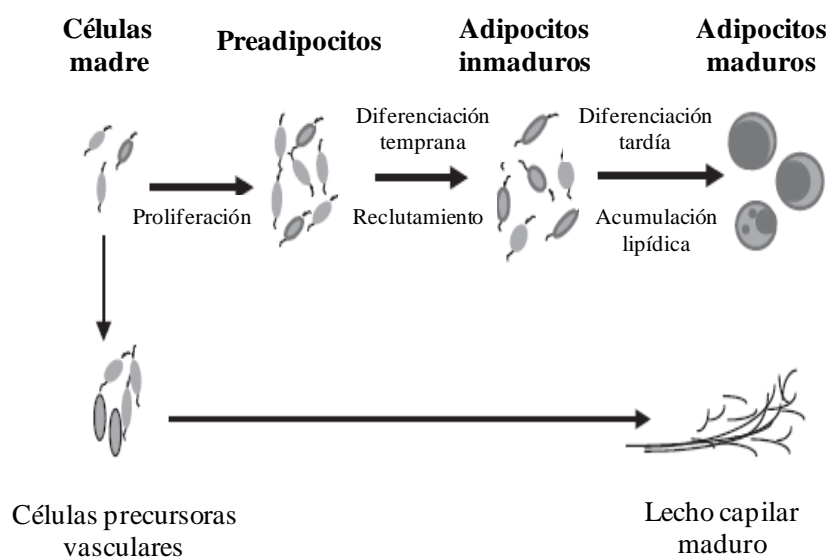


Figura 2. Representación esquemática de las características básicas de la expansión del tejido adiposo. Los principales procesos involucrados son la proliferación de las células madre y la diferenciación de estas células en células adiposas o vasculares (modificado de [63]).

2.2. Tejido adiposo e inflamación

Históricamente, al tejido adiposo se le han atribuido funciones meramente estructurales, como aislante térmico y protector de órganos internos, y de reserva energética. Sin embargo, hoy en día la evidencia científica ha demostrado que posee múltiples funciones que regulan la homeostasis general [66]. El concepto del tejido adiposo blanco como un órgano homeostático apareció gracias al descubrimiento de la leptina en el año 1994, una proteína deficiente en un tipo de obesidad hereditaria. Desde entonces se han descubierto más de 50 citoquinas y otras moléculas segregadas por el tejido adiposo blanco, que participan en una gran variedad de procesos fisiológicos y fisiopatológicos [66].

La obesidad se considera un estado de inflamación crónica, con una elevada concentración de marcadores de la inflamación, tales como la proteína C reactiva y numerosas citoquinas inflamatorias, acompañadas de un incremento de células blancas [67]. El exceso de tejido adiposo blanco contribuye a mantener este estado proinflamatorio generando un aumento de la secreción de adipoquinas que a la vez activan la producción de la proteína C-reativa. Este estado de inflamación estimula la

formación de macrófagos, que penetran en los adipocitos, generando a la vez una mayor secreción de adipoquinas [68]. De esta manera se forma un círculo vicioso, atrayendo más macrófagos al tejido adiposo y conduciendo a un estrés oxidativo. En este sentido, una de las mayores contribuciones para el conocimiento de la naturaleza inflamatoria de la obesidad fue la identificación de la citoquina factor de necrosis tumoral alfa (TNF α). Posteriormente, el descubrimiento de niveles circulantes elevados de otras moléculas como la interleuquina (IL)-6, el fibrinógeno, la proteína quimiotáctica monocítica (MCP1) así como el inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI1) o la resistina en estados de obesidad apoyan la relación entre inflamación y obesidad. Por ejemplo, la IL6 interfiere en la señalización de la insulina en parte por la regulación que ejerce en la expresión del sustrato del receptor de la insulina 1 (IRS1) y del supresor de la señalización de citoquinas (Socs)-3. Por otro lado, la resistina, expresada principalmente en macrófagos, parece estar involucrada en el reclutamiento de otras células inmunitarias y en la secreción de factores proinflamatorios como TNF α . La mayoría de las funciones de la resistina (así como de otras citoquinas relacionadas con la inflamación) parecen estar reguladas por el factor de transcripción NF κ B [69]. Finalmente, la identificación de la proteína secretada relacionada con frizzled (Sfrp5), una nueva adipoquina con propiedades anti-inflamatorias, ha abierto una nueva vía para conocer la interacción entre nutrición e inflamación [70]. Sfrp5 se expresó en el tejido adiposo blanco de ratones pero los niveles de ARNm disminuyeron en el tejido adiposo de varios roedores obesos, así como en el tejido adiposo visceral de individuos obesos [71].

Este estado crónico de inflamación parece ser el responsable de la aparición del síndrome metabólico en pacientes obesos (Figura 3), generando múltiples complicaciones metabólicas, como la resistencia a la insulina, la dislipidemia o la alteración en la coagulación, incrementando el riesgo de padecer enfermedades como el cáncer, la diabetes tipo 2 o enfermedades cardiovasculares [72]. Numerosos estudios relacionan el síndrome metabólico con un exceso de grasa visceral, ya que ésta se correlaciona mejor que el tejido adiposo subcutáneo con el aumento de marcadores inflamatorios. Una posible explicación es que al estar en contacto con la circulación portal, las sustancias producidas por la grasa visceral entran en contacto con el hígado de forma más directa [73].

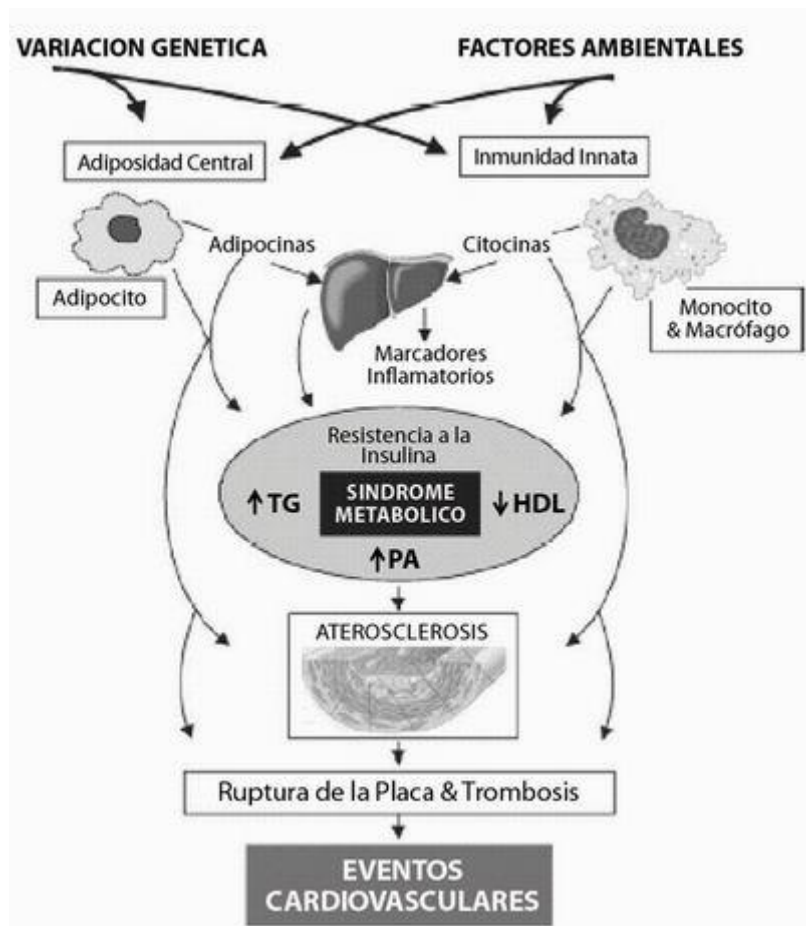


Figura 3. Fisiopatología del síndrome metabólico (modificado de [72]).

3. NUTRIGENÓMICA Y NUTRIEPIGENÉTICA

La nutrigenómica es la ciencia que estudia el efecto que ejercen los nutrientes y compuestos bioactivos en la expresión génica [74]. En los últimos años, el desarrollo de la transcriptómica (estudio de la expresión génica a nivel de ARNm) ha permitido un estudio más profundo de los mecanismos moleculares implicados en los efectos saludables de ciertos compuestos dietéticos así como en enfermedades relacionadas con la nutrición. Además, ha permitido identificar nuevos genes e interacciones genes-nutrientes [75]. La nutrigenómica podría orientar al diseño de nuevos alimentos funcionales para el control de la obesidad basándose en el conocimiento de la bioactividad, el mecanismo de acción y el efecto de determinados nutrientes sobre el sistema de control de peso [76,77]. Estos efectos pueden depender no sólo de los nutrientes en sí, sino de sus combinaciones y condiciones en que se dispongan.

Un ciencia emergente, importante para el estudio de las interacciones entre genes y nutrientes, es la epigenética. El término epigenética se refiere al estudio de aquellos mecanismos que modifican la expresión génica sin cambios en la secuencia de nucleótidos del ADN. Los procesos epigenéticos incluyen metilaciones del ADN, modificaciones de histonas, remodelación de la cromatina o la acción de miARNs, entre otros [78]. Inicialmente, se creía que las modificaciones epigenéticas eran unidireccionales, pero estudios recientes han demostrado que el epigenoma es en realidad muy dinámico, cambiando en respuesta a estímulos como la disponibilidad de nutrientes, el ejercicio físico y la edad, entre otros [79]. En este sentido, existe evidencia científica que demuestra que algunos nutrientes y factores dietéticos pueden alterar la expresión génica a través de modificaciones epigenéticas [78,80]; así ha surgido el término nutriepigenética [81] definido como la aplicación de las ciencias modernas al estudio de las modificaciones que ejercen los nutrientes en la expresión génica distintas a cambios en la secuencia del ADN.

3.1. Biología del adipocito: genes implicados

El fenotipo obeso es el resultado de alteraciones en distintas vías metabólicas a nivel de diferentes órganos así como el control neuronal de los tejidos periféricos. Sin embargo, la mayoría de genes relacionados con la obesidad se expresan en el órgano más afectado, el tejido adiposo. Los siguientes procesos biológicos, implicados en el metabolismo del adipocito, pueden estar sujetos a modificaciones en la regulación de la expresión génica (causadas por ejemplo por la dieta) desarrollando obesidad [82]:

a) **adipogénesis:** aunque los fenómenos moleculares implicados en la diferenciación de los adipocitos no son totalmente conocidos, se ha sugerido un modelo que incluye varias etapas: inhibición del crecimiento, expansión clonal, cambios tempranos en la expresión de genes y diferenciación terminal. Las dos primeras etapas están reguladas principalmente por los inhibidores de ciclinas dependientes de quinasas, como Cdkn1a, Cdkn1b y Cdkn1c. Conforme la expansión clonal cesa, se inicia la activación transcripcional coordinada de genes específicos del adipocito. Hasta ahora, se han descrito dos familias de factores de transcripción, las C/EBPs (proteínas de unión a los activadores CCAAT) y PPAR γ (receptor activador de la proliferación de los peroxisomas *gamma*), que han sido identificadas como “directores” reguladores de la

transcripción de genes adipogénicos [83]. La sirtuina 1 (Sirt1) actúa como represor de PPAR γ , inhibiendo por tanto la adipogénesis [84]. Otros factores que también parecen estar implicados en el proceso de diferenciación son la proteína de unión a elementos de respuesta a esteroides 1 (Srebf1) [53] y el represor de la transcripción Aebp1 (proteína potenciadora de unión al adipocito) [85]. Finalmente, durante la fase final de la diferenciación se expresan y sintetizan también otros genes y productos específicos de los adipocitos como aP2, una proteína fijadora de ácidos grasos específica de adipocitos, la perilipina, una proteína asociada a las gotas lipídicas [53], o Hspa5, un marcador de estrés en el retículo endoplasmático [86].

b) **lipólisis y lipogénesis:** un gran porcentaje del volumen de células grasas está compuesto por lípidos, los cuales están en constante renovación gracias a la lipólisis y la lipogénesis: alrededor de 50-200g de lípidos se renuevan diariamente (Figura 4). Un pequeño impacto genético en el almacenamiento de lípidos puede, por tanto, tener un impacto importante en las reservas lipídicas del adipocito [82]. Durante la lipólisis, los triglicéridos almacenados en el tejido adiposo son hidrolizados hasta ácidos grasos y glicerol. Los ácidos grasos pueden ser liberados o reesterificados en el adipocito, mientras que el glicerol precisa de las acuaporinas para facilitar su transporte a través de la membrana adipocitaria. La enzima triacilglicerol lipasa (Pnpla2) inicia el proceso de lipólisis mediante la hidrólisis del triacilglicerol a diacilglicerol. El paso limitante de la lipólisis está controlado por la lipasa sensible a hormonas (Lipe). Esta enzima cataliza la hidrólisis de triglicéridos hasta monoglicéridos. Finalmente, éstos son degradados por la monoacilglicerol lipasa (Mgll). Este proceso puede ser estimulado por ciertas hormonas como las catecolaminas. Otras hormonas, como la insulina, ejercen un efecto inhibitorio de la lipólisis. Además, parece existir un ritmo basal de lipólisis que es independiente de hormonas [53] y que es controlada por la perilipina, evitando la acción de las lipasas. Por otra parte, los triglicéridos se acumulan en el adipocito a través de tres vías: la lipogénesis *de novo* a partir de precursores no lipídicos, la captación de ácidos grasos del plasma y la reesterificación de ácidos grasos derivados de la lipólisis adipocitaria. La lipoproteína lipasa (Lpl) es la responsable de hidrolizar los triglicéridos que viajan en el plasma a través de las lipoproteínas mientras que la lipogénesis está regulada entre otros por el factor de transcripción Srebp1c [87]. El Srebp1c está involucrado en la regulación de genes relacionados con la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos, incluyendo la ATP-citrato liasa (Acl), acetil-CoA carboxilasa alfa (Acaca), sintasa de

ácidos grasos (Fasn), diacilglicerol aciltransferasa (Dgat1), estearoil-CoA desaturasa-1 (Scd1) y glicerofosfato aciltransferasa (Gpat). La actividad de la Lpl así como de la Dgat1 está regulada por la proteína estimuladora de acilación (Asp) que actúa a través del receptor Gpr77 de la membrana adipocitaria [88]. Al contrario de la lipólisis, la lipogénesis se ve estimulada por la insulina [89].

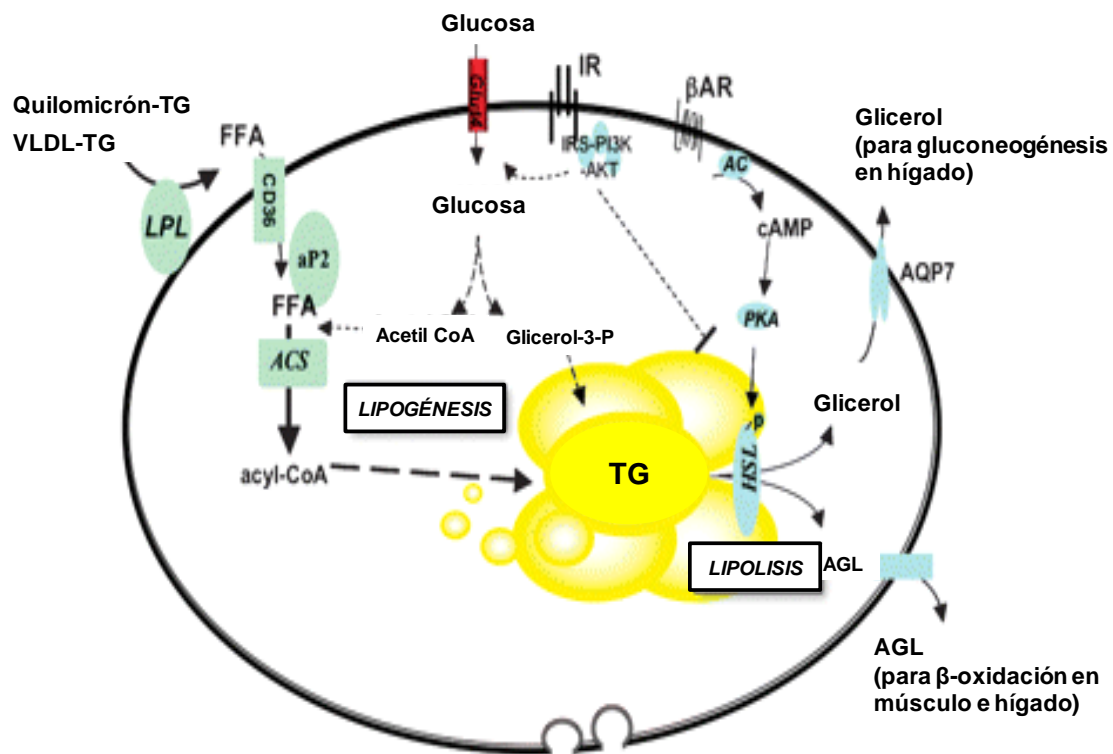


Figura 4. Metabolismo lipídico de los adipocitos. Los adipocitos disponen de la maquinaria bioquímica necesaria para ejercer correctamente sus funciones de reserva energética corporal. Para ello, debe mediar la lipogénesis [conversión de AGL a triglicéridos (TG)] y la lipólisis (hidrólisis de los triglicéridos a AGL y glicerol). Estos procesos son sensibles a la insulina (la insulina estimula la captación de glucosa y la lipogénesis e inhibe la lipólisis) y están sujetos a una regulación adrenérgica (que estimula la lipólisis y la termogénesis adaptativa en el tejido adiposo marrón). AC, adenilata ciclasa, ACS, acil-CoA sintetasa, AGL, Ácidos grasos libres, Ap2, proteína citosólica transportadora de lípidos, AR, receptor adrenérgico, HSL, hormona sensible a la lipasa, IR, receptor de la insulina, LPL, lipoproteína lipasa, PKA, proteína quinasa A (modificado de [90]).

c) **oxidación mitocondrial:** aunque la grasa parda, relacionada con la oxidación de la grasa, sea escasa en la gente adulta, es posible demostrar algunas funciones *in vivo* de estos adipocitos en la edad adulta. Además, recientemente se ha demostrado que las

mitocondrias de las células grasas blancas tienen más importancia de la que se le había dado hasta el momento. El factor de transcripción PPAR γ coactivador 1 α (Ppargc1a) parece ser un importante coordinador de la transcripción de genes implicados en la termogénesis con la inducción de las proteínas desacoplantes (UCPs), genes de la cadena respiratoria mitocondrial y de la biogénesis mitocondrial [91]. Por otro lado, la proteína de interacción con receptores nucleares 1 (Nrip1) se ha descrito como un correpresor que controla la expresión de genes relacionados con la respiración mitocondrial y la β -oxidación [92].

d) **metabolismo glucídico:** en el adipocito, el metabolismo glucídico juega un papel importante en la homeostasis de la glucosa plasmática. La utilización de la glucosa como fuente de energía para las células requiere primeramente su transporte dependiente de la insulina hacia el interior, en el caso de los adipocitos a través de Glut4. Además, la captación de glucosa mediante Glut4 puede estar mediada por la acción de la caveolina 1 (Cav1), que interacciona además con el receptor de la insulina, por lo que se considera que es un elemento importante para el control de la señalización de la insulina [93]. Una vez allí, las hexoquinas fosforilan la glucosa a glucosa-6-fosfato. La fosforilación de la glucosa permite su utilización a través de las distintas vías metabólicas, como la glucólisis, cuyo paso final está catalizado por el complejo piruvato deshidrogenasa, regulado a su vez por la piruvato deshidrogenasa quinasa (Pdk4), o la gliconeogénesis mediada por la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (Pck1). Finalmente, la proteína-tirosina fosfatasa 1b (Ptp1b) regula negativamente la vía de señalización de la insulina [94].

e) **función endocrina:** el adipocito emite y recibe señales modulando procesos como el gasto energético, la ingesta, la sensibilidad a la insulina, funciones endocrinas y reproductivas, metabolismo óseo, inmunidad e inflamación [73]. Algunas de estas señales tienen efectos locales en el metabolismo del tejido adiposo, en tanto que otras tienen acción sistémica e integran una red de señales que participan en la regulación de funciones en diversos tipos de células localizadas en órganos distantes, tales como hipotálamo, hígado, páncreas, músculo esquelético, etc. Así, las células grasas secretan numerosos compuestos peptídicos y no peptídicos que participan en distintos procesos [95]:

- regulación del peso corporal: como la leptina.
- inflamación: como la IL6, TNFa, MCP1, resistina, visfatina y apelina.
- metabolismo lipídico: como la lipoproteína lipasa y la apolipoproteína E.
- metabolismo del retinol y el colesterol: como la proteína de unión al retinol.
- función vascular: como el inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 y el angiotensinógeno.
- actividades autocrinas y paracrinas que regulan la celularidad del tejido adiposo: como el factor de crecimiento similar a insulina-1 y la hormona de crecimiento.

De las diversas proteínas secretadas por el adipocito, la leptina es una de las más importantes, ya que a través de esta hormona el tejido adiposo se comunica con el sistema nervioso central y participa en la regulación neuroendocrina de la homeostasis energética. Además, tiene efectos biológicos en diversos procesos celulares como la reproducción, hematopoyesis, angiogénesis, respuesta inmune, control de la presión sanguínea y formación de hueso [95].

3.2. Regulación de la expresión génica en el músculo esquelético

El músculo esquelético es uno de los tejidos más sensibles a la acción de la insulina y es el órgano más importante para la captación y utilización de la glucosa. De hecho, en el periodo posprandial hasta un 85% de la glucosa del organismo es captada por el tejido muscular [96]. Además, en situaciones de ayuno, el músculo esquelético también utiliza los ácidos grasos provenientes de la hidrólisis de los triglicéridos para la obtención de energía [97]. Las diferencias estructurales entre distintos músculos van a condicionar sus funciones. Así, las fibras blancas o de contracción rápida están asociadas a un metabolismo glicolítico mientras que las fibras rojas o de contracción lenta se asocian a un metabolismo oxidativo. Mientras que en el músculo gastrocnemio predominan las fibras blancas, en el músculo soleo y el extensor digital largo (EDL) predominan las fibras rojas [98]. De esta manera, el tipo de fibras musculares van a determinar el metabolismo del músculo.

El metabolismo muscular está regulado, de forma parecida al tejido adiposo, por receptores que responden a hormonas como la leptina, adiponectina, insulina o apelina, mientras que recientemente se han descubierto que algunas moléculas expresadas por el músculo tienen una acción metabólica en el tejido adiposo, sugiriendo así un

intercambio de “señales” entre ambos tejidos para el mantenimiento del peso corporal [99]. Además, la obesidad se caracteriza por una acumulación ectópica de grasa en tejidos periféricos como el músculo, contribuyendo así a una mayor insulino-resistencia debido a una deficiencia en la acción de la insulina [100]. Por esta razón, la regulación de la expresión génica en el músculo esquelético es de vital importancia para el estudio de los mecanismos implicados en la obesidad y la insulino-resistencia [101]. Esta regulación va a afectar tanto a genes oxidativos como lipolíticos, lipogénicos y/o inflamatorios. Así, se ha relacionado la obesidad con una reducción en la expresión de *Ppargc1a* en el músculo, originando una disminución de su capacidad oxidativa [101], y con un incremento de la expresión del transportador de ácidos grasos CD36 [102]. Asimismo, también está relacionada con alteraciones en factores de transcripción y enzimas implicadas en la oxidación de ácidos grasos como *Ppara*, *Ppard* y la carnitina palmitoiltransferasa 1b (*Cpt1b*) [103,104], en la síntesis de glucógeno como la glucógeno sintasa 1 (*Gys1*) [105] y en el metabolismo de los glucocorticoides como la 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1 (*Hsd11b1*) [106] o el receptor de glucocorticoides *Nr3c1* [107]. El metabolismo de la glucosa también tiene un papel fundamental en el músculo, implicando genes como *Glut4*, *Pdk4* y hexoquinasa 2 (*Hk2*), que participan también en el metabolismo del adipocito como se ha comentado en el apartado anterior. Finalmente, se ha relacionado la inducción de *Socs3* como un posible mecanismo implicado en la inflamación y la resistencia insulínica mediada por la leptina [108].

3.3. Modificaciones nutriepigenéticas

Los crecientes avances científicos están promoviendo el conocimiento de la implicación de los mecanismos epigenéticos en la aparición, desarrollo y terapia de enfermedades como la obesidad y la diabetes tipo 2 [78]. La mayoría de estudios se han centrado en el estudio de la metilación (Figura 5) de las islas CpG (regiones genómicas con una elevada frecuencia de dinucleótidos CG presentes en una amplia mayoría de los promotores) en el ADN genómico. En este contexto, la búsqueda de promotores de genes susceptibles de ser regulados epigenéticamente y con un rol en el desarrollo de la obesidad (genes epiobesogénicos) podría ser de gran interés. Así, se ha visto que la leptina y *Glut4* sufren una hipometilación durante la adipogénesis, hecho que corresponde con su sobreexpresión en adipocitos maduros [109]. Campión y col han

propuesto otros genes epiobesogénicos como Ppargc1a, Pparg, TNF α , el receptor de glucocorticoides, Lpl, Fabp4, Cav1 o Socs3 [78]. Los mismos autores describen una lista de genes que han reportado cambios en la metilación del ADN, detectados principalmente en el cáncer, pero con funciones biológicas relacionadas con la adipogénesis, inflamación, metabolismo de la grasa y señalización de la insulina [78]. Además, se ha descrito recientemente como los niveles de metilación de diferentes genes pueden ser utilizados como un biomarcador de respuesta a una dieta hipocalórica [110,111,112].

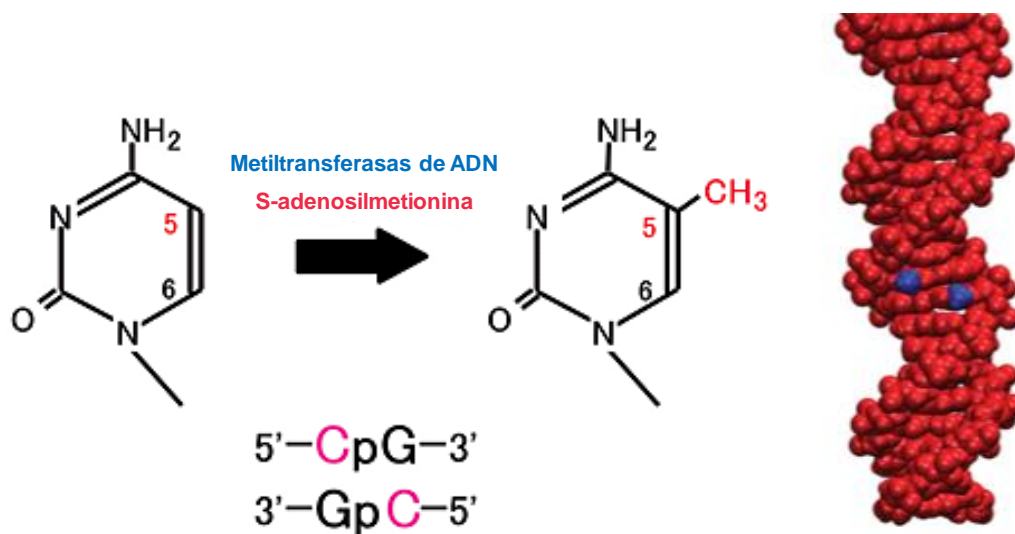


Figura 5. Metilación de la Citosina del ADN. Una familia de tres enzimas activas, las metiltransferasas de ADN (DNMTs), catalizan la metilación de la posición 5 del anillo de la citosina, usando S-adenosilmetionina como molécula donante del grupo metilo (CH₃). La metilación se produce en citosinas seguidas de una guanina, llamados sitios CpG (modificado de [113]).

Por otra parte, se ha visto que ciertos componentes de la dieta pueden modificar la metilación de ADN en promotores de genes expresados en distintos tejidos. En general, los factores dietéticos que afectan la metilación, actúan mediante dos mecanismos: cambiando la disponibilidad de donadores de grupos metilo o bien alternado la actividad de enzimas involucradas en la metilación del ADN. Así se ha visto como nutrientes como el ácido fólico, metionina, colina, betaína, vitamina B6 y vitamina B12 pueden modificar la metilación del ADN [78] mientras que una dieta alta en grasas modifica la regulación de la ingesta mediante cambios en el patrón de metilación del

ADN de receptores dopaminérgicos [114]. Otros estudios confirman el efecto de las dietas altas en grasas en la metilación del ADN, produciendo una disminución de la metilación del promotor de Mc4r en el cerebro [115], una hipermetilación de genes glicolíticos hepáticos [116] y una hipermetilación en los promotores de los genes Pparg [117] y leptina [118] en el tejido adiposo blanco. Los cambios epigenéticos también pueden afectar a la descendencia; así se ha visto que una restricción proteica en la dieta materna durante el embarazo implica cambios en la metilación del ADN de GR, Ppara y del receptor X del hígado [119,120] mientras que la alimentación de las madres con una dieta alta en grasas altera la metilación de genes relacionados con el metabolismo de la dopamina y los opioides [121] así como de genes relacionados con la disfunción β -pancreática [122].

Por último, algunos estudios sugieren que ciertos compuestos bioactivos de los alimentos como los polifenoles del té (epicatequinas) y de las semillas de uva (proantocianidinas), la genisteina de la soja, la curcumina de la especie cúrcuma o los isotiocianatos presentes en crucíferas pueden ejercer efectos beneficios en enfermedades crónicas como el cáncer gracias a la modulación de la metilación del ADN [123,124].

4. LOS POLIFENOLES

Los polifenoles son antioxidantes presentes en alimentos vegetales de forma natural, caracterizados por la presencia de uno o más anillos aromáticos con varios grupos hidroxilo. Estas moléculas son los metabolitos secundarios más abundantes de las plantas [125], compuestos que permiten a las plantas interactuar con el ambiente y les proporcionan un mecanismo de defensa frente la radiación ultravioleta o la agresión de patógenos, parásitos y predadores. Además son parcialmente responsables de las propiedades organolépticas de los alimentos vegetales. Por ejemplo, se sabe que los polifenoles son los compuestos responsables de las diferencias de olor y color entre el vino blanco, rosado y tinto [126].

La dieta humana está compuesta por una gran cantidad de alimentos de origen vegetal, como verduras, frutas, chocolate y bebidas (café, té, vino...). Estos alimentos contienen una cantidad muy relevante de polifenoles por lo que la ingesta diaria de polifenoles en la dieta humana se estima en 1g/día [127]. Así, la importancia de los polifenoles recae

en la abundancia de estos compuestos en la dieta, sus propiedades antioxidantes y su habilidad para regular varios procesos biológicos/bioquímicos [125].

4.1. Clasificación

Hasta el momento, se han identificado más de 8.000 estructuras fenólicas distintas en el mundo vegetal [128,129]. Las estructuras pueden variar desde simples ácidos fenólicos hasta moléculas altamente polimerizadas como los taninos. En la naturaleza, se encuentran en forma de glucósidos (conjugados con uno o más residuos de azúcar) aunque en algunos casos se pueden producir uniones directas entre una molécula de azúcar y un carbono aromático. La gran diversidad y amplia distribución de los polifenoles entre las plantas han llevado a distintas formas de clasificar estos compuestos: según su origen, su función biológica o su estructura química. La siguiente clasificación (Figura 6) se ha realizado en función del número de anillos aromáticos y de los elementos estructurales unidos a los anillos, distinguiendo así entre lignanos, ácidos fenólicos, flavonoides y estilbenos. En global, se dividen en 10 clases distintas de polifenoles (Figura 6). Los más comunes e importantes son los ácidos fenólicos y los flavonoides, estos últimos dividiéndose en varias subclases con más de 5.000 compuestos. Los ácidos fenólicos son moléculas simples como el ácido cafeico, cumárico o clorogénico, que representan aproximadamente un tercio del total de la ingesta dietética de polifenoles; los flavonoides son los responsables de los dos tercios restantes [130]. La estructura de los flavonoides permite una multitud de sustituciones y variaciones en el anillo pirona dando lugar a flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavanonas, antocianidinas y flavanoles (catequinas y proantocianidinas). Dentro de todos estos grupos las flavonas (p.e. apigenina y luteolina), los flavonoles (p.e. quercitina y kampferol) y sus glicósidos son los compuestos más abundantes en vegetales. Las proantocianidinas son las estructuras más complejas, ya que provienen de la polimerización de catequinas.

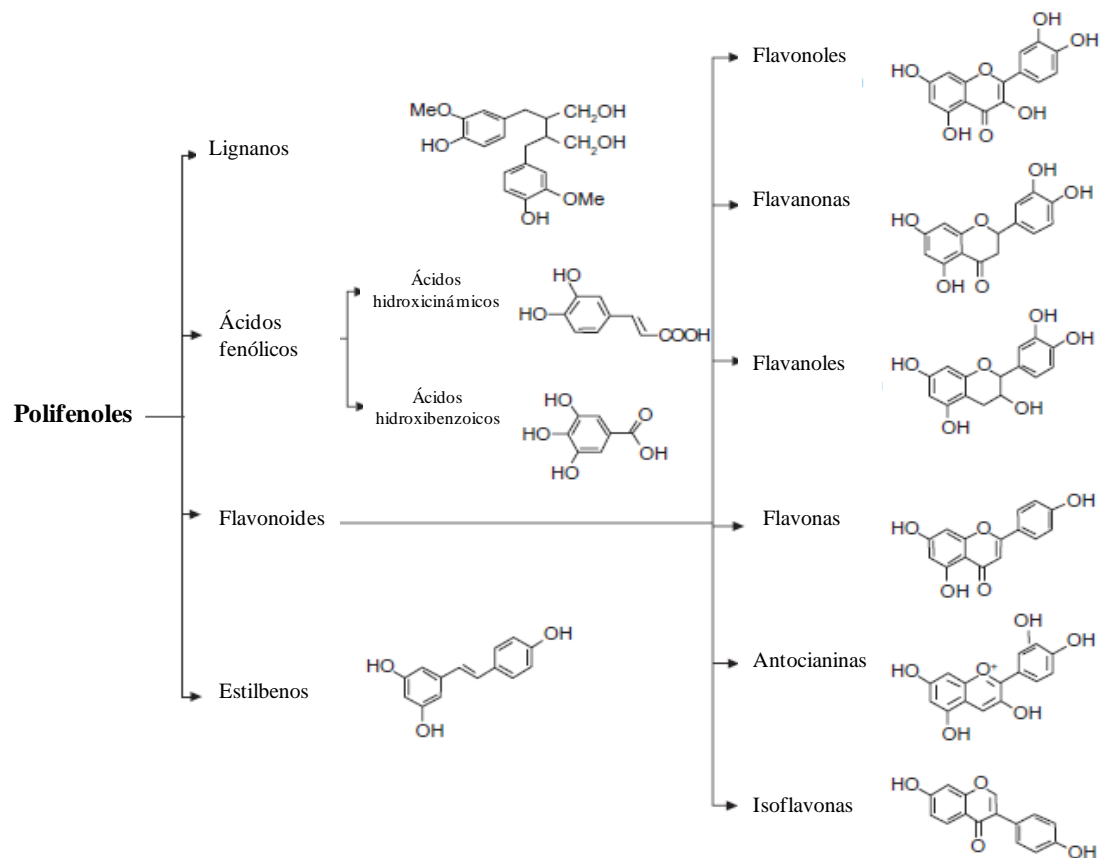


Figura 6. Clasificación y estructura química de las clases mayoritarias de los polifenoles (modificado de [131]).

4.2. Ingesta dietética

Las frutas y las bebidas como el té y el vino constituyen las principales fuentes de polifenoles de la dieta [130,132]. Algunos polifenoles, como la quercetina, se encuentran en todos los productos vegetales (frutas, verduras, cereales, legumbres, infusiones...) mientras que otros son específicos de alimentos en particular (las flavanonas en los cítricos, las isoflavonas en la soja o la floridzina en la manzana). En muchos casos, los alimentos contienen complejas mezclas de polifenoles. La manzana es uno de los pocos alimentos del cual se disponen datos precisos sobre su composición. Así, se ha visto que contienen mayoritariamente flavanoles (principalmente epicatequinas y procianidinas) además de ácido clorogénico y pequeñas cantidades de otros ácidos hidroxicinámicos, glicósidos de fletina y quercetina y antocianinas. Estos polifenoles están presentes en cantidades sustanciales en la pulpa de la fruta pero la concentración en la piel es mayor. Además, se han estudiado las diferencias de

composición entre variedades de manzanas. El perfil de polifenoles es prácticamente idéntico en todas las variedades aunque la concentración puede variar de 0,1 a 5g de polifenoles totales/Kg peso e incluso pueden llegar a 10g/Kg en algunas variedades de manzanas de sidra [125]. En legumbres y cereales los principales compuestos fenólicos son los flavonoides, ácidos fenólicos y taninos. Entre los vegetales, los principales flavonoides presentes son la quercetina seguida del kaempferol. El principal aporte de quercetina lo constituye la cebolla, la col rizada, la lechuga y el tomate, siendo las principales fuentes de kaempferol la col rizada fresca, el brócoli, las judías verdes francesas y las judías verdes troceadas. Por otra parte, la patata es una de las verduras con mayor contenido en ácido clorogénico. Las frutas destacan en la dieta por su alto contenido en flavonoles, principalmente quercetina. El ácido cafeico es el ácido hidroxicinámico predominante en la mayoría de frutas, constituyendo el 75% del total de estos ácidos y encontrándose en ciruelas, manzanas, albaricoques y arándanos. Sin embargo, el ácido p-cumárico es el componente mayoritario, dentro del grupo de los ácidos hidroxicinámicos, de los cítricos y de la piña. Finalmente, el vino es una fuente muy estudiada de compuestos fenólicos, sobre todo de ácidos fenólicos, antocianinas, taninos y flavonoides mientras que el té es una de las bebidas con un mayor contenido en compuestos fenólicos de interés nutricional, destacando por su alta concentración en catequinas, flavonoles, flavonas y ácidos fenólicos (ácido gálico y ácido clorogénico) [130,132].

La ingesta total de polifenoles es difícil de establecer debido al déficit de información de las tablas de composición y la gran variabilidad de ingesta entre personas. La principal causa de estas diferencias son las preferencias alimentarias individuales. En España, el consumo total de catequinas y proantocianidinas se ha estimado en 18-31 mg/día siendo las principales fuentes las manzanas, peras, uvas y vino tinto [133]. Si consideramos el consumo de flavonoles, flavanonas, flavanoles e isoflavonas nos da un total diario de 100-150 mg en poblaciones desarrolladas, a los cuales deberíamos añadir el consumo variable de ácidos hidroxicinámicos (dependiente del consumo de café), antocianinas y proantocianidinas. Finalmente, la ingesta total de polifenoles probablemente llegue a 1 g por día en personas que consumen varias raciones de fruta y verdura al día [125].

4.3. Absorción y metabolismo

La gran diversidad estructural de los polifenoles implica diferencias en su biodisponibilidad y consecuentemente en su actividad biológica. Esto significa que los polifenoles más abundantes en la dieta no tienen por qué ser los más activos en el organismo [125,127] ya que puede existir diferencias en su actividad intrínseca, su absorción, metabolización o velocidad de eliminación. Además, los metabolitos que se encuentran en la sangre y tejidos pueden presentar una actividad biológica diferente a los compuestos iniciales [125].

Las características fisicoquímicas de los polifenoles parecen dictar su absorción y metabolismo. Por ejemplo, la estructura química, el grado de modificación química (glicosilación, conjugación...), el peso molecular, el grado de polimerización y la solubilidad son factores críticos. Así, los ácidos fenólicos son fácilmente absorbidos, seguidos de las catequinas, flavanonas y glucósidos de quercetina. Sin embargo, la absorción de los polifenoles de mayor tamaño, como las proantocianidinas, es muy baja [130].

Los polifenoles se metabolizan inicialmente en el tracto gastrointestinal (Figura 7). Los glicósidos son hidrolizados a sus correspondientes aglicones antes de su absorción. Tanto los aglicones como los polifenoles de bajo peso molecular son absorbidos directamente. Los polifenoles no absorbidos son transportados al colon dónde pueden ser hidrolizados por la microflora para poder ser absorbidos como compuestos más simples o ser eliminados a través de las heces. Durante el proceso de absorción, los polifenoles son conjugados en el intestino y posteriormente en el hígado. Este proceso incluye metilaciones, glucuronidaciones y sulfataciones. Es un proceso común de detoxificación que restringe sus potenciales efectos tóxicos y facilita su eliminación por vía urinaria o biliar gracias al aumento de su hidrofiliación. En el plasma, los polifenoles suelen circular unidos a la albúmina y pueden ser transportados a distintos tejidos, especialmente en aquellos donde serán metabolizados. Estudios farmacocinéticos sobre la absorción y eliminación de los polifenoles demuestran que los niveles máximos en sangre ocurren generalmente 2 horas después de la ingesta [130]. Además, teniendo en cuenta que los aglicones pueden ser reabsorbidos por circulación enterohepática, se ha visto un segundo pico en la concentración plasmática 7 horas

después de la administración de genisteína en ratas [134] y 10 horas después de la ingesta de hesperidina en humanos [135].

La vida media exacta de los polifenoles en plasma es difícil de calcular pero se ha visto que es de alrededor de 2 horas para las antocianinas y 2-3 horas para los flavanoles, excepto para la epigallocatequina gallato que se elimina más lentamente. Finalmente, la vida media los flavonoles como la quercetina es de 11-28 horas [125] por lo que la ingesta repetida de flavanoles pueden resultar en una acumulación de estos en el plasma y los tejidos, mientras que las catequinas y antocianinas no tienen tendencia a acumularse [136].

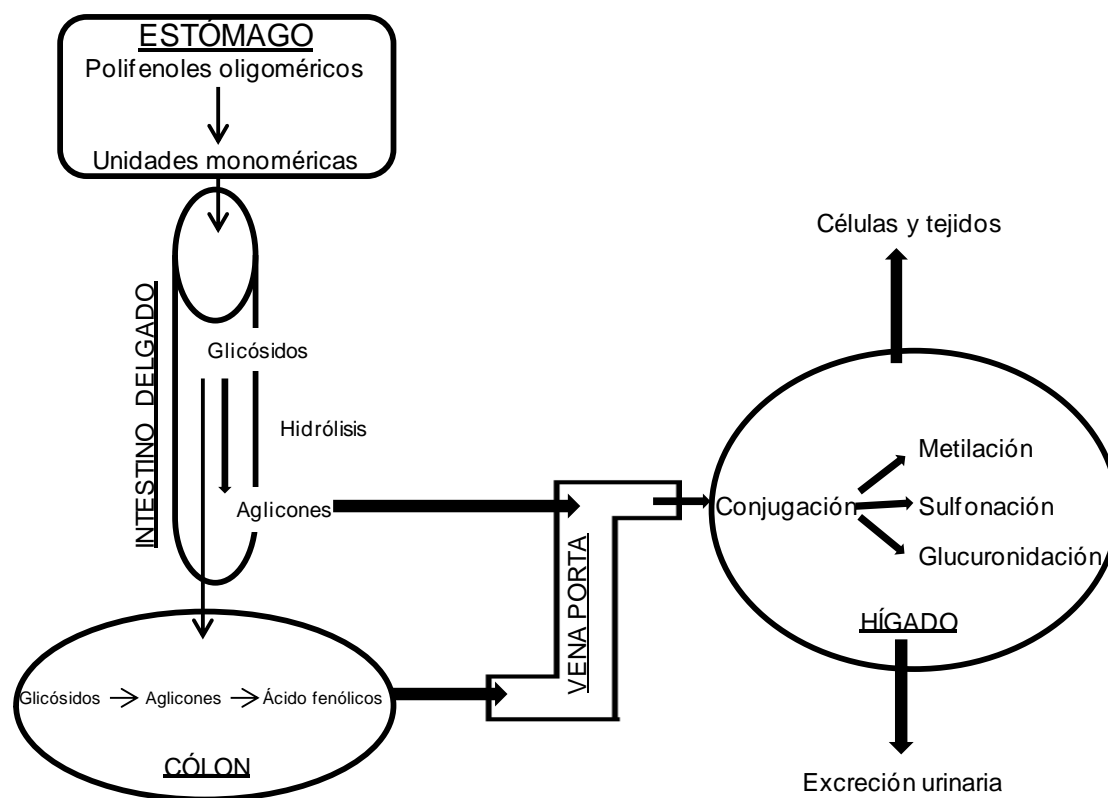


Figura 7. Vías de absorción de los polifenoles (modificado de [132]).

4.4. Efectos biológicos

Los polifenoles son considerados potentes antioxidantes *in vitro* y han demostrado ser incluso más potentes que la vitamina C, E y carotenoides [137]. Sin embargo, y a pesar de su gran distribución en el mundo vegetal, los efectos de los polifenoles en la salud han sido objeto de atención de los nutricionistas desde hace sólo unos años. Hasta

mediados de los años 90, los antioxidantes más estudiados fueron los carotenoides, vitaminas antioxidantes y minerales. De hecho, la primera evidencia proveniente de estudios epidemiológicos referente a los efectos beneficiosos de los polifenoles en humanos provienen de un estudio de Hertog y col de 1993 [138], donde se correlacionó la ingesta de flavonoles con el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares. El estudio de las propiedades antioxidantes de los polifenoles (especialmente los flavonoides) y sus efectos en la prevención de enfermedades, empezó a tomar importancia a partir de 1995 (Figura 8). El factor principal por lo que su investigación se ha visto retrasada es la considerable diversidad y complejidad de sus estructuras químicas [139].

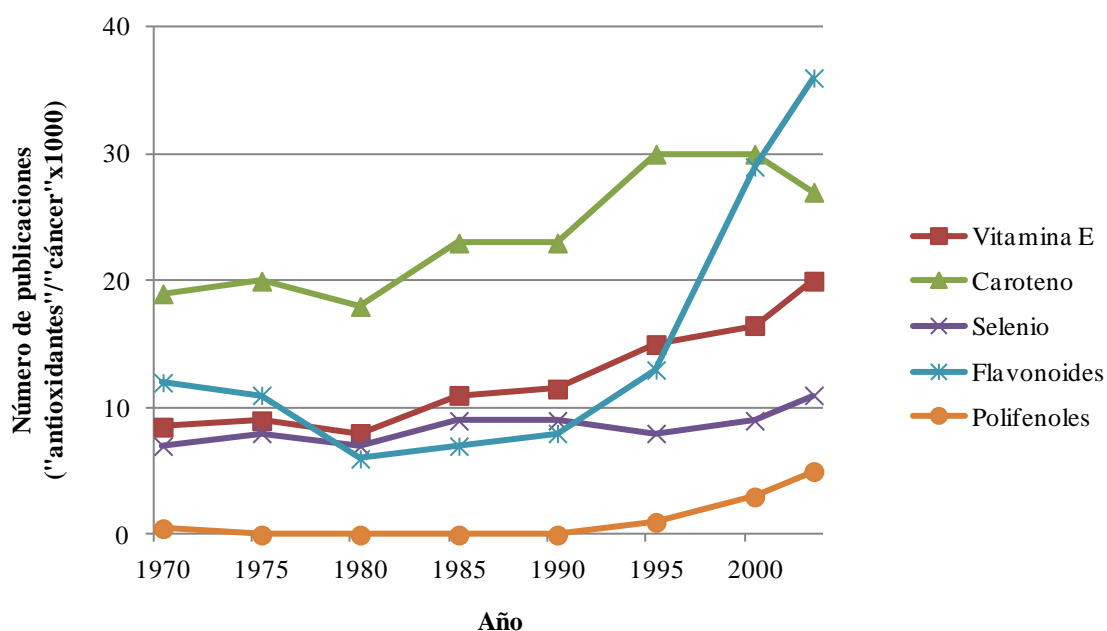


Figura 8. Aumento del número de publicaciones relacionadas con antioxidantes en los últimos 30 años. Publicaciones registradas en la base de datos Medline. La palabra clave “cáncer” se utilizó como referencia, para tener en cuenta el aumento general en el número de publicaciones (modificado de [139]).

Durante muchos años, los beneficios asociados a los polifenoles se han atribuido principalmente a sus propiedades antioxidantes, neutralizando los radicales libres y protegiendo así las células frente al estrés oxidativo. Sin embargo, actualmente este concepto parece ser un punto de vista muy simplificado de su modo de acción. Así, las células responden a los polifenoles preferentemente mediante interacciones directas con

receptores o enzimas involucradas en señales de transducción, lo cual puede resultar en cambios en el estado redox de la célula [139]. Además, los polifenoles pueden actuar tanto como antioxidantes como prooxidantes. Como antioxidantes, los polifenoles pueden aumentar la supervivencia celular; como prooxidantes, pueden inducir apoptosis y prevenir el crecimiento de tumores. En general, los procesos biológicos afectados por los polifenoles incluyen alteración de la expresión génica, aumento de la apoptosis, regulación de la proliferación y diferenciación celular, disminución de la agregación plaquetaria, aumento de la vasodilatación, modulación de la señalización intracelular, activación de la glicoproteína P y modulación de la actividad enzimática [140].

Los múltiples efectos biológicos atribuidos a los polifenoles confieren a estas moléculas un efecto preventivo en numerosas enfermedades. Así, numerosos estudios epidemiológicos y experimentos *in vivo* e *in vitro* han demostrado los efectos protectores de los polifenoles sobre el cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes, osteoporosis, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades inflamatorias intestinales, infecciones, alergias, asma y el envejecimiento [141,142,143,144,145,146,147,148].

A diferencia de los micronutrientes (vitaminas y minerales), los polifenoles no son requeridos para el mantenimiento de las funciones vitales en humanos. Sin embargo, Williamson y col sugieren que, debido a sus efectos beneficiosos para el mantenimiento de la salud humana y la prevención de enfermedades, los polifenoles son “esenciales para conseguir una expectativa de vida completa”, es decir: ayudan a aumentar las probabilidades de alcanzar la expectativa de vida determinada genéticamente para cada persona [149].

4.5. Alteraciones epigenéticas

Los efectos preventivos de algunos polifenoles en el cáncer pueden explicarse en parte por la modulación de varios componentes de la maquinaria epigenética (Figura 9) incluyendo cambios en el patrón de la metilación del ADN, la regulación de modificaciones de histonas y cambios en la expresión de algunos miARNs. Esto es de gran interés, ya que las modificaciones epigenéticas ocurren tempranamente y son

potencialmente reversibles, remarcando las propiedades quimiopreventivas de los polifenoles como una posibilidad atractiva desde un punto de vista clínico.

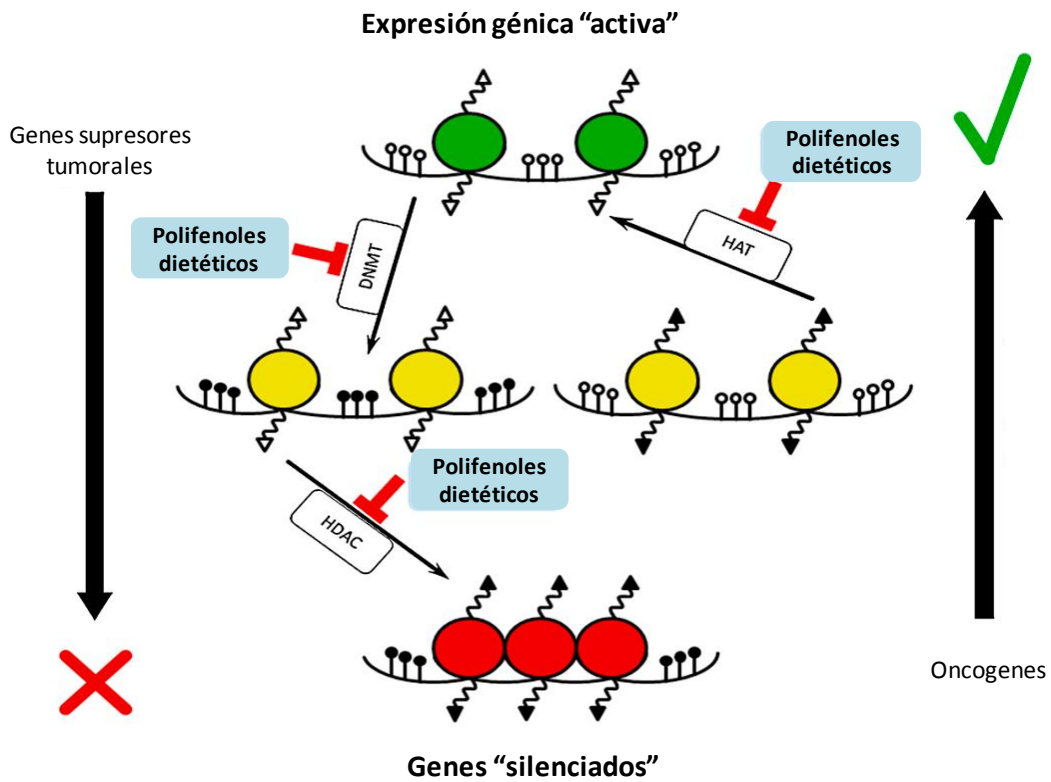


Figura 9. Efectos de los polifenoles en la metilación del ADN y modificaciones de histonas. En el cáncer, los genes supresores tumorales están "inactivados" (mostrados como círculos rojos) mientras que los oncogenes están "activados" (círculos verdes). Varias enzimas participan en la regulación epigenética de la expresión génica. La metiltransferasa de ADN (DNMT) es la responsable de transferir un grupo metilo a la citosina. Las histonas acetilasas (HAT) y histonas deacetilasas (HDAC) son las responsables de la acetilación y deacetilación de los residuos de lisina en las histonas, respectivamente. Los polifenoles pueden afectar estas enzimas revirtiendo la disregulación epigenética en células cancerosas (modificado de [150]).

Los polifenoles han mostrado un potencial inhibidor de las DNMTs *in vitro* y una habilidad para revertir la silenciamiento inducida por metilación de varios genes supresores tumorales. Así, Fang y col [151] demostraron que el tratamiento de células humanas de cáncer esofágico con epigallocatequina-3-gallato (EGCG) revierte la hipermetilación de varios genes supresores tumorales como p16, Rar, Mgmt y Mlh1, de

una forma dosis y tiempo dependiente. Kato y col [152] observaron como el tratamiento de células cancerosas con EGCG revirtió parcialmente el estado de hipermetilación del gen Reck aumentando así su expresión. Cuando se estudió el efecto de la curcumina en la línea celular de leucemia MV4-11 se observó una disminución en la metilación global del ADN genómico comparable al agente hipometilante decitabina [153]. El ácido rosmarínico ha sido descubierto recientemente como un potente inhibidor de la actividad de las DNMTs en extractos nucleares de células cancerosas de mama. En la siguiente figura se muestran las plantas y polifenoles más estudiados en relación a la inducción de alteraciones epigenéticas en células cancerosas (Figura 10).

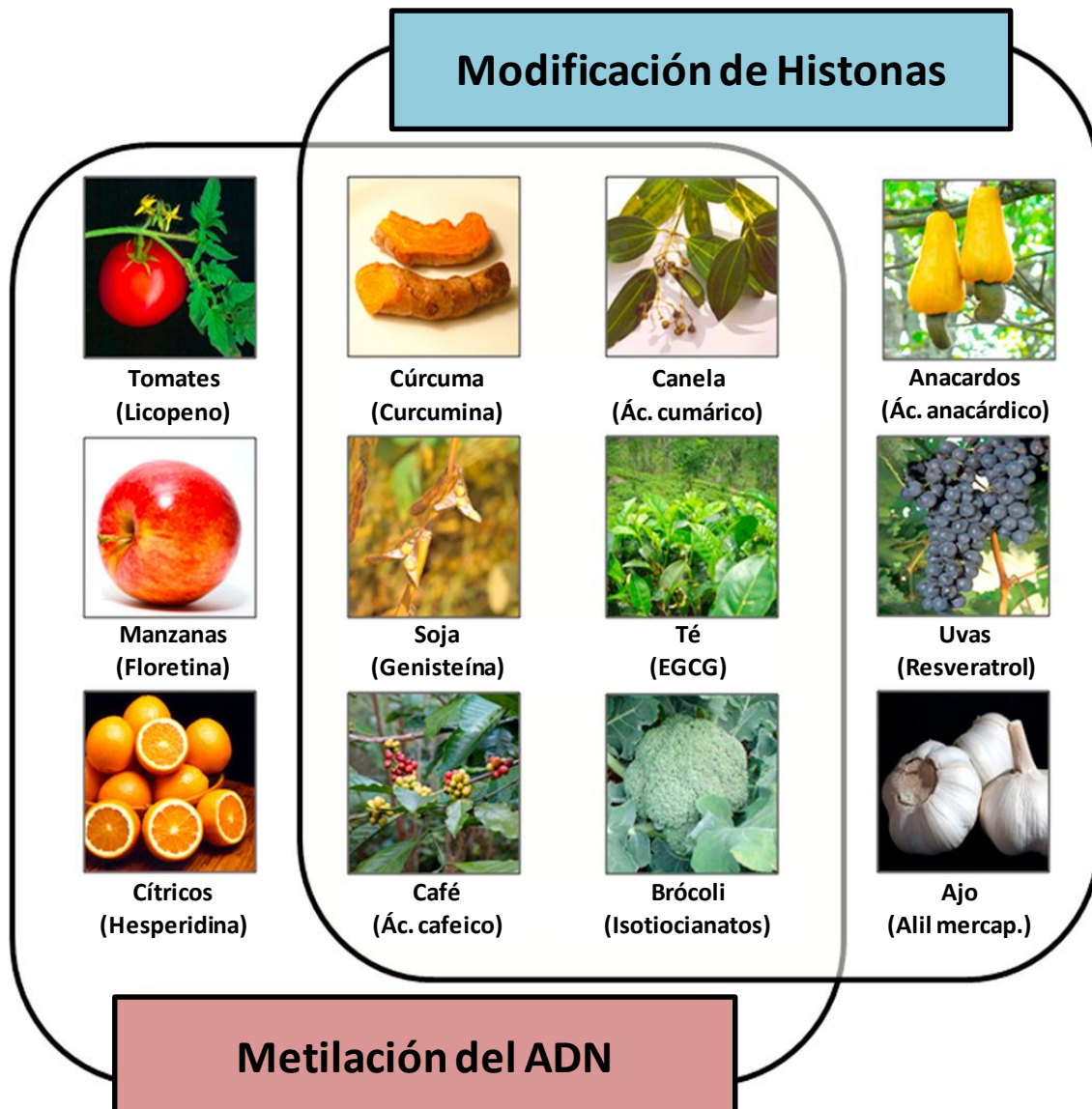


Figura 10. Plantas con un papel evidenciado en la inducción de modificaciones epigenéticas en células cancerosas. Los principios activos de cada una de las plantas (mayoritariamente polifenoles) se muestran entre paréntesis (modificado de [150]).

La evidencia de los efectos moduladores de los polifenoles en la metilación del ADN *in vivo* es menos concluyente. El consumo de genisteína se correlacionó positivamente con los cambios en la metilación del ADN de la próstata de ratones [154] mientras que el tratamiento con el mismo polifenol en ratones neonatales previno la hipermetilación del promotor de *Nsbp1* que persistió durante toda su vida [155]. Por otra lado, la ingesta de un extracto de polifenoles extraídos de la manzana en ratones *ApcMin/+* alimentados con una dieta alta en grasas o control, previno la formación de pólipos intestinales acompañado de cambios en la metilación global del ADN [156]. En cambio, la suplementación con polifenoles provenientes del té no cambió el patrón de metilación del ADN de la próstata de ratones transgénicos con adenocarcinoma o *wild-type*, y tampoco indujo cambios en el tejido hepático e intestinal [157].

4.6. Efectos sobre la obesidad y el síndrome metabólico

La obesidad es comúnmente asociada a defectos en el metabolismo de la glucosa y a la resistencia a la insulina [158]. En este sentido, existe cierta evidencia científica que demuestra el efecto beneficioso de los polifenoles sobre el metabolismo glucídico. La floridzina presente en las manzanas y otras frutas parece inhibir el transporte de glucosa vía el cotransportador de sodio-glucosa, además de inhibir la reabsorción renal de glucosa. Así, en un modelo animal transgénico de diabetes tipo 2, el tratamiento con floridzina mejoró la hiperglucemia y disminuyó la masa grasa, sin cambios en los niveles de insulina ni en la sensibilidad a esta hormona [159]. Además los polifenoles pueden inhibir la amilasa pancreática y enzimas glicosidasas [160], disminuyendo así la liberación de glucosa a partir del almidón y otros azúcares. Los polifenoles presentes en el té verde pueden inhibir la glutamato deshidrogenasa [161], enzima implicada en la regulación de la secreción de insulina. Los polifenoles de la canela se consideran “miméticos” de la insulina [162,163,164]. Aunque en algunos estudios la canela no ha demostrado resultados beneficiosos sobre el metabolismo glucídico y el síndrome metabólico [165,166,167], otros estudios han demostrado un efecto de los polifenoles

de la canela en la regulación de la glucemia [168,169] y en la mejora de la sensibilidad a la insulina [164]. Efectos similares se han descrito para las procianidinas [170].

Por otro lado, las catequinas del té verde incrementan el gasto energético y la oxidación de la grasa en humanos y en animales [171]. Así, en ratones alimentados con una dieta alta en grasas, la suplementación durante 4 semanas con 0,5% y 1% de EGCG disminuyó la acumulación de grasa de una forma dosis-dependiente, debido a una disminución de la absorción de nutrientes y un aumento de la oxidación lipídica [172]. Efectos parecidos se observaron cuando se analizaron los efectos agudos del EGCG [173], acompañados de una reducción en la incorporación de lípidos en el tejido adiposo, músculo e hígado, y una disminución en la expresión de genes hepáticos lipogénicos en la etapa posprandial. Otros autores demuestran el potencial efecto antiobesogénico del EGCG en animales obesos, en los cuales la suplementación con 1% EGCG durante 5 meses disminuyó la cantidad de tejido adiposo hasta alcanzar los niveles de los animales alimentados con una dieta control [174]. Además, ratones alimentados con una dieta alta en grasas suplementada con catequinas (0,5%) presentaron una ganancia de peso un 18% menor en comparación con sus respectivos controles [175]. Otros polifenoles han demostrado propiedades parecidas. Así, la genisteína [176] y el resveratrol [177] redujeron el peso corporal y la cantidad de masa grasa en modelos animales. El perfil bioquímico se analizó en todos los estudios mencionados. En general, los niveles de ácidos grasos libres, triglicéridos, glucosa, insulina y colesterol fueron modificados por el consumo de polifenoles.

El estado de inflamación crónica característico de la obesidad y el síndrome metabólico también se ha visto mejorado por el consumo de polifenoles. Así, la suplementación de ratas obesas con quercetina (10mg/Kg/día) disminuyó la producción de TNF α así como la expresión de iNOS por el tejido adiposo visceral [178].

En cuanto a los efectos de los polifenoles en el hígado, se ha observado la capacidad de un extracto de polifenoles procedentes de la mora para modular la actividad de enzimas hepáticas relacionadas con la lipólisis y la lipogénesis, explicando así la menor acumulación de triglicéridos hepáticos y la mejora del perfil lipídico plasmático [179]. De manera similar, el ácido clorogénico y los polifenoles del limón han demostrado un mismo efecto en el hígado, acompañado además de una sobreexpresión de PPAR α [117,180]. Por último, los beneficios de los polifenoles frente la esteatosis hepática

pueden atribuirse a una reducción en la expresión de *Srebf1* y sus genes diana, como se observó en ratones alimentados con un extracto de polifenoles provenientes del café [181].

Varios polifenoles han demostrado tener un efecto inhibitor de la adipogénesis (tanto en la diferenciación como la proliferación de adipocitos) y la secreción de adipocitoquinas [170,182,183,184], mientras que otros polifenoles ejercen una activación de la lipólisis [170,185] o inhiben la captación de glucosa en adipocitos [170,186]. Las propiedades antiobesogénicas de otros polifenoles se atribuyen a la inhibición de la absorción de lípidos a nivel intestinal [187,188] o a un incremento en el gasto energético [181]. Por otro lado, las antocianidinas aumentan la actividad nuclear de PPAR γ en adipocitos humanos, desencadenando un aumento en la expresión de Glut4 y adiponectina [189]. Finalmente, se ha propuesto que las mitocondrias podrían ser un elemento diana para los polifenoles, alterando su función y previniendo así la disfunción de los adipocitos propia de la obesidad [190]. Así, se ha visto como el resveratrol mejora la función mitocondrial y protege frente a la obesidad mediante la activación de *Sirt1* y *Ppargc1a* [177].

Una reciente revisión [191] sobre los efectos preventivos del té verde y el EGCG frente a los síntomas del síndrome metabólico, sugiere que los principales mecanismos implicados en su acción contra la obesidad, insulino-resistencia, hipertensión e hipercolesterolemia incluyen la modulación de la absorción y el metabolismo de la grasa, el aumento de la utilización de la glucosa, la disminución de la lipogénesis *de novo* y sus efectos antioxidantes. Otros estudios, añaden a estos mecanismos la inducción de la termogénesis, y la inhibición de enzimas como *Acaca*, *Fasn* y catecol-O-metiltransferasa [188]. Los mecanismos de acción del EGCG del té verde han sido los más estudiados en comparación a otros polifenoles, debido principalmente al elevado consumo de este té a nivel mundial.

La curcumina es otro de los polifenoles más estudiados por su potencial en la prevención de la obesidad y el síndrome metabólico. La revisión realizada por Aggarwal [163] señala las posibles dianas de la curcumina relacionadas con la obesidad. Así, sus acciones se resumen en la regulación de la expresión de TNF α y otros biomarcadores inflamatorios, la supresión de la activación de NF- κ B, la inhibición de la vía de Wnt/ β -catenina y JNK, la inhibición de la glucógeno sintasa quinasa y la

interrupción de la vía de la leptina mediante la inhibición de la fosforilación del receptor de la leptina (Ob-R).

Las propiedades beneficiosas de los polifenoles frente a enfermedades como la obesidad y la diabetes pueden explicarse también por la regulación de la expresión génica. Así, la ingesta de genisteína en ratones con obesidad inducida por una dieta alta en grasas redujo la hipertrofia de los adipocitos mediante la sobreexpresión de genes implicados en la oxidación de ácidos grasos y la disminución de la expresión de genes relacionados con la adipogénesis y la lipogénesis [192]. La disminución del peso corporal y el tejido adiposo inducido por los polifenoles extraídos de la acacia en ratones obesos se acompañó con un cambio en la expresión génica tanto en el músculo, aumentando la expresión de genes relacionados con el gasto energético, como en el hígado, disminuyendo la expresión de genes implicados en la vía de la lipogénesis, así como en el tejido adiposo, aumentando la expresión de la adiponectina y disminuyendo la expresión de TNF α [193]. Otros extractos ricos en polifenoles han demostrado ejercer una regulación del nivel de ARNm de genes relacionados con la función vascular y la inflamación, como las quimiocinas Ccl2 y Ccr2 [194], la ciclooxigenasa 2 [195] y Cav1 [196]. También se ha observado como los polifenoles regulan la expresión de genes inflamatorios en el hipocampo de ratas con deterioro cognitivo, como la IL-1 β , TNF α y NF-kappaB [197]. En ratas alimentadas con una dieta alta en grasas y azúcares simples, la suplementación con un extracto polifenólico de uvas fue capaz de disminuir el contenido lipídico del músculo, reduciendo la expresión del transportador de ácidos grasos CD36 y de Cpt1b y sobreexpresando el transportador de glucosa Glut4, favoreciendo así la sensibilidad a la insulina [198]. También en el músculo, un extracto polifenólico de manzana aumentó la expresión de Ppara y Ppard [199]. Otros estudios, han demostrado un papel de los polifenoles en la regulación de genes apoptóticos y del ciclo celular [200,201]. Por último, los numerosos estudios publicados sobre los efectos beneficiosos de los polifenoles extraídos del té verde han puesto de manifiesto la regulación del ARNm por estas moléculas. Así, la ingesta de estos polifenoles junto con una dieta alta en fructosa, aumentó los niveles expresión del receptor de insulina, Gys1, Pparg y los transportadores de glucosa Glut1 y Glut4 en el miocardio, mientras que redujo los niveles de Srebp1c y CD36 [202]. En el hígado y el músculo esquelético de ratas alimentadas con la misma dieta, los polifenoles del té verde aumentaron los niveles de expresión de distintos genes de la familia de los transportadores de la glucosa y la

señalización de la insulina [203]. Estudios *in vitro* han demostrado una disminución del ARNm de genes adipogénicos como Pparg, C-EBPb y Fabp4 en células madre mesenquimatosas tratadas con EGCG [204].

5. BIBLIOGRAFÍA

1. WHO (2002) Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Joint WHO expert consultation report.
2. WHO (2004) Global Strategy on Diet, Physical Activity and Health. WHO Technical Report Series 916.
3. WHO (Updated february 2011) Obesity and Overweight. Fact Sheet Number 311.
4. WHO (2011) NCD Country Profiles. ISBN: 9789241502283.
5. Ogunbode AM, Ladipo M, Ajayi IO, Fatiregun AA (2011) Obesity: An emerging disease. Niger J Clin Pract 14:390-4.
6. Gupta N, Goel K, Shah P, Misra A (2012) Childhood obesity in developing countries: epidemiology, determinants, and prevention. Endocr Rev 33:48-70.
7. Muller-Riemenschneider F, Reinhold T, Berghofer A, Willich SN (2008) Health-economic burden of obesity in Europe. Eur J Epidemiol 23:499-509.
8. El-Sayed AM, Scarborough P, Galea S (2012) Unevenly distributed: A systematic review of the health literature about socioeconomic inequalities in adult obesity in the United Kingdom. BMC Public Health 12:18.
9. Martínez-Álvarez J, Gómez-Candela C, Villarino-Marín A (2006) Obesidad y alimentos funcionales: ¿son eficaces los nuevos ingredientes y productos? Rev Med Univ Navarra 4:31-8.
10. Picó C, Oliver P, Priego T, Sánchez J, Palou A (2006) Alimentos funcionales y obesidad: estrategias, eficacia y seguridad Rev Esp Obes 4:156-74.
11. WHO Global Database on Body Mass Index. Retrieved from <http://appswho.int/bmi/index.jsp>.
12. Bjorntorp P (1997) Neuroendocrine factors in obesity. J Endocrinol 155:193-5.
13. Weinsier RL, Hunter GR, Heini AF, Goran MI, Sell SM (1998) The etiology of obesity: relative contribution of metabolic factors, diet, and physical activity. Am J Med 105:145-50.
14. Law C, Power C, Graham H, Merrick D (2007) Obesity and health inequalities. Obes Rev 8 Suppl 1:19-22.
15. Walley AJ, Blakemore AI, Froguel P (2006) Genetics of obesity and the prediction of risk for health. Hum Mol Genet 15 Spec No 2:R124-30.

16. Martínez JA (2004) Determinantes genéticos de la obesidad. *Monografías Humanitas* 6:69-86.
17. Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Argyropoulos G, Walts B, et al (2006) The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity (Silver Spring)* 14:529-644.
18. Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM, et al (2007) A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* 316:889-94.
19. Dina C, Meyre D, Gallina S, Durand E, Korner A, Jacobson P, et al (2007) Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat Genet* 39:724-6.
20. Chambers JC, Elliott P, Zabaneh D, Zhang W, Li Y, Froguel P, et al (2008) Common genetic variation near MC4R is associated with waist circumference and insulin resistance. *Nat Genet* 40:716-8.
21. Loos RJ, Lindgren CM, Li S, Wheeler E, Zhao JH, Prokopenko I, et al (2008) Common variants near MC4R are associated with fat mass, weight and risk of obesity. *Nat Genet* 40:768-75.
22. Speliotes EK, Willer CJ, Berndt SI, Monda KL, Thorleifsson G, Jackson AU, et al (2010) Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. *Nat Genet* 42:937-48.
23. Willer CJ, Speliotes EK, Loos RJ, Li S, Lindgren CM, Heid IM, et al (2009) Six new loci associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation. *Nat Genet* 41:25-34.
24. Andreyeva T, Michaud PC, van Soest A (2007) Obesity and health in Europeans aged 50 years and older. *Public Health* 121:497-509.
25. Forja L, Petrina E, Barbería J (2002) Complicaciones de la obesidad. *ANALES Sis San Navarra* 25:117-26.
26. Vickers SP, Jackson HC, Cheetham SC (2011) The utility of animal models to evaluate novel anti-obesity agents. *Br J Pharmacol* 164:1248-62.
27. Butler AA, Cone RD (2001) Knockout models resulting in the development of obesity. *Trends Genet* 17:S50-4.
28. Speakman J, Hambly C, Mitchell S, Krol E (2007) Animal models of obesity. *Obes Rev* 8 Suppl 1:55-61.

29. Haude W, Stauske D, Volcker CE (1985) Some aspects of lipid metabolism in the liver of Wistar rats with fat diet-induced obesity. *Nahrung* 29:567-76.
30. Madsen AN, Hansen G, Paulsen SJ, Lykkegaard K, Tang-Christensen M, Hansen HS, et al (2010) Long-term characterization of the diet-induced obese and diet-resistant rat model: a polygenetic rat model mimicking the human obesity syndrome. *J Endocrinol* 206:287-96.
31. Paulsen SJ, Jelsing J, Madsen AN, Hansen G, Lykkegaard K, Larsen LK, et al (2010) Characterization of beta-cell mass and insulin resistance in diet-induced obese and diet-resistant rats. *Obesity (Silver Spring)* 18:266-73.
32. Ropelle ER, Pauli JR, Cintra DE, Frederico MJ, de Pinho RA, Velloso LA, et al (2009) Acute exercise modulates the Foxo1/PGC-1alpha pathway in the liver of diet-induced obesity rats. *J Physiol* 587:2069-76.
33. Thomas-Moya E, Gomez-Perez Y, Fiol M, Gianotti M, Llado I, Proenza AM (2008) Gender related differences in paraoxonase 1 response to high-fat diet-induced oxidative stress. *Obesity (Silver Spring)* 16:2232-8.
34. Vrang N, Madsen AN, Tang-Christensen M, Hansen G, Larsen PJ (2006) PYY(3-36) reduces food intake and body weight and improves insulin sensitivity in rodent models of diet-induced obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291:R367-75.
35. Hariri N, Thibault L (2010) High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutr Res Rev* 23:270-99.
36. Boque N, Campion J, Milagro FI, Moreno-Aliaga MJ, Martinez JA (2009) Some cyclin-dependent kinase inhibitors-related genes are regulated by vitamin C in a model of diet-induced obesity. *Biol Pharm Bull* 32:1462-8.
37. Campion J, Milagro FI, Fernandez D, Martinez JA (2008) Vitamin C supplementation influences body fat mass and steroidogenesis-related genes when fed a high-fat diet. *Int J Vitam Nutr Res* 78:87-95.
38. Garcia-Diaz DF, Campion J, Milagro FI, Lomba A, Marzo F, Martinez JA (2007) Chronic mild stress induces variations in locomotive behavior and metabolic rates in high fat fed rats. *J Physiol Biochem* 63:337-46.
39. Rodriguez E, Ribot J, Rodriguez AM, Palou A (2004) PPAR-gamma2 expression in response to cafeteria diet: gender- and depot-specific effects. *Obes Res* 12:1455-63.
40. Cesaretti ML, Kohlmann Junior O (2006) Experimental models of insulin resistance and obesity: lessons learned. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 50:190-7.

41. Holemans K, Caluwaerts S, Poston L, Van Assche FA (2004) Diet-induced obesity in the rat: a model for gestational diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol* 190:858-65.
42. Llado I, Estrany ME, Rodriguez E, Amengual B, Roca P, Palou A (2000) Effects of cafeteria diet feeding on beta3-adrenoceptor expression and lipolytic activity in white adipose tissue of male and female rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24:1396-404.
43. Fonseca V, Dicker-Brown A, Ranganathan S, Song W, Barnard RJ, Fink L, et al (2000) Effects of a high-fat-sucrose diet on enzymes in homocysteine metabolism in the rat. *Metabolism* 49:736-41.
44. Hoane MR, Swan AA, Heck SE (2011) The effects of a high-fat sucrose diet on functional outcome following cortical contusion injury in the rat. *Behav Brain Res* 223:119-24.
45. Kuo LE, Czarnecka M, Kitlinska JB, Tilan JU, Kvetnansky R, Zukowska Z (2008) Chronic stress, combined with a high-fat/high-sugar diet, shifts sympathetic signaling toward neuropeptide Y and leads to obesity and the metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 1148:232-7.
46. la Fleur SE, Luijendijk MC, van Rozen AJ, Kalsbeek A, Adan RA (2011) A free-choice high-fat high-sugar diet induces glucose intolerance and insulin unresponsiveness to a glucose load not explained by obesity. *Int J Obes (Lond)* 35:595-604.
47. Conde SV, Nunes da Silva T, Gonzalez C, Mota Carmo M, Monteiro EC, Guarino MP (2012) Chronic caffeine intake decreases circulating catecholamines and prevents diet-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Br J Nutr* 107:86-95.
48. Pagliassotti MJ, Prach PA, Koppenhafer TA, Pan DA (1996) Changes in insulin action, triglycerides, and lipid composition during sucrose feeding in rats. *Am J Physiol* 271:R1319-26.
49. Thresher JS, Podolin DA, Wei Y, Mazzeo RS, Pagliassotti MJ (2000) Comparison of the effects of sucrose and fructose on insulin action and glucose tolerance. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279:R1334-40.
50. Li S, Zhang HY, Hu CC, Lawrence F, Gallagher KE, Surapaneni A, et al (2008) Assessment of diet-induced obese rats as an obesity model by comparative functional genomics. *Obesity (Silver Spring)* 16:811-8.
51. Hernandez AG (2010) *Tratado de Nutrición 2a ed Tomo IV: Nutrición Clínica*, Ed. Médica Panamericana.

52. Haugen F, Drevon CA (2007) The interplay between nutrients and the adipose tissue. *Proc Nutr Soc* 66:171-82.
53. Moreno MJ, Martinez JA (2002) [Adipose tissue: a storage and secretory organ]. *An Sist Sanit Navar* 25 Suppl 1:29-39.
54. Cannon B, Nedergaard J (1986) Brown adipose tissue thermogenesis in neonatal and cold-adapted animals. *Biochem Soc Trans* 14:233-6.
55. Cinti S (2000) Anatomy of the adipose organ. *Eat Weight Disord* 5:132-42.
56. DiGirolamo M, Fine JB, Tagra K, Rossmanith R (1998) Qualitative regional differences in adipose tissue growth and cellularity in male Wistar rats fed ad libitum. *Am J Physiol* 274:R1460-7.
57. Faust IM, Johnson PR, Stern JS, Hirsch J (1978) Diet-induced adipocyte number increase in adult rats: a new model of obesity. *Am J Physiol* 235:E279-86.
58. Hirsch J, Han PW (1969) Cellularity of rat adipose tissue: effects of growth, starvation, and obesity. *J Lipid Res* 10:77-82.
59. Tulp OL, DeBolt SP, Hansen CT, Michaelis OEt (1991) Effects of dietary carbohydrate and phenotype on adipose cellularity in female SHR/N-cp rats. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 99:229-34.
60. Joe AW, Yi L, Even Y, Vogl AW, Rossi FM (2009) Depot-specific differences in adipogenic progenitor abundance and proliferative response to high-fat diet. *Stem Cells* 27:2563-70.
61. Cousin B, Casteilla L, Lafontan M, Ambid L, Langin D, Berthault MF, et al (1993) Local sympathetic denervation of white adipose tissue in rats induces preadipocyte proliferation without noticeable changes in metabolism. *Endocrinology* 133:2255-62.
62. Crandall DL, DiGirolamo M (1990) Hemodynamic and metabolic correlates in adipose tissue: pathophysiologic considerations. *Faseb J* 4:141-7.
63. Hausman DB, DiGirolamo M, Bartness TJ, Hausman GJ, Martin RJ (2001) The biology of white adipocyte proliferation. *Obes Rev* 2:239-54.
64. Amri EZ, Bonino F, Ailhaud G, Abumrad NA, Grimaldi PA (1995) Cloning of a protein that mediates transcriptional effects of fatty acids in preadipocytes. Homology to peroxisome proliferator-activated receptors. *J Biol Chem* 270:2367-71.
65. McLaughlin T, Deng A, Yee G, Lamendola C, Reaven G, Tsao PS, et al (2010) Inflammation in subcutaneous adipose tissue: relationship to adipose cell size. *Diabetologia* 53:369-77.

66. Calabro P, Yeh ET (2007) Obesity, inflammation, and vascular disease: the role of the adipose tissue as an endocrine organ. *Subcell Biochem* 42:63-91.
67. Festa A, D'Agostino R, Jr., Williams K, Karter AJ, Mayer-Davis EJ, Tracy RP, et al (2001) The relation of body fat mass and distribution to markers of chronic inflammation. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25:1407-15.
68. Vincent HK, Taylor AG (2006) Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int J Obes (Lond)* 30:400-18.
69. Bondia-Pons I, Ryan L, Martinez JA (2012) Oxidative stress and inflammation interactions in human obesity. *J Physiol Biochem* *In press*.
70. Ouchi N, Higuchi A, Ohashi K, Oshima Y, Gokce N, Shibata R, et al (2010) Sfrp5 is an anti-inflammatory adipokine that modulates metabolic dysfunction in obesity. *Science* 329:454-7.
71. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K (2011) Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol* 11:85-97.
72. Reilly MP, Rader DJ (2003) The metabolic syndrome: more than the sum of its parts? *Circulation* 108:1546-51.
73. Shoelson SE, Herrero L, Naaz A (2007) Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology* 132:2169-80.
74. Liu B, Qian SB (2011) Translational regulation in nutrigenomics. *Adv Nutr* 2:511-9.
75. Fenech M, El-Sohehy A, Cahill L, Ferguson LR, French TA, Tai ES, et al (2011) Nutrigenetics and nutrigenomics: viewpoints on the current status and applications in nutrition research and practice. *J Nutrigenet Nutrigenomics* 4:69-89.
76. Palou A, Pico C, Bonet ML (2004) Food safety and functional foods in the European Union: obesity as a paradigmatic example for novel food development. *Nutr Rev* 62:S169-81.
77. Palou A, Serra F, Pico C (2003) General aspects on the assessment of functional foods in the European Union. *Eur J Clin Nutr* 57 Suppl 1:S12-7.
78. Champion J, Milagro FI, Martinez JA (2009) Individuality and epigenetics in obesity. *Obes Rev* 10:383-92.
79. Franks PW, Ling C (2010) Epigenetics and obesity: the devil is in the details. *BMC Med* 8:88.

80. Chaudhary N, Nakka KK, Maulik N, Chattopadhyay S (2012) Epigenetic Manifestation of Metabolic Syndrome and Dietary Management. *Antioxid Redox Signal In press*.
81. Haslberger AG (2010) Epigenetics and human health: linking hereditary, environmental and nutritional aspects. Willey-VCH Verlag GmbH & Co KGaA.
82. Dahlman I, Arner P (2010) Genetics of adipose tissue biology. *Prog Mol Biol Transl Sci* 94:39-74.
83. Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM (2000) Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev* 14:1293-307.
84. Metoyer CF, Pruitt K (2008) The role of sirtuin proteins in obesity. *Pathophysiology* 15:103-8.
85. Kim SW, Muise AM, Lyons PJ, Ro HS (2001) Regulation of adipogenesis by a transcriptional repressor that modulates MAPK activation. *J Biol Chem* 276:10199-206.
86. Basseri S, Lhotak S, Sharma AM, Austin RC (2009) The chemical chaperone 4-phenylbutyrate inhibits adipogenesis by modulating the unfolded protein response. *J Lipid Res* 50:2486-501.
87. Tarling E, Salter A, Bennett A (2004) Transcriptional regulation of human SREBP-1c (sterol-regulatory-element-binding protein-1c): a key regulator of lipogenesis. *Biochem Soc Trans* 32:107-9.
88. Faraj M, Sniderman AD, Cianflone K (2004) ASP enhances in situ lipoprotein lipase activity by increasing fatty acid trapping in adipocytes. *J Lipid Res* 45:657-66.
89. Gathercole LL, Morgan SA, Bujalska IJ, Hauton D, Stewart PM, Tomlinson JW (2011) Regulation of lipogenesis by glucocorticoids and insulin in human adipose tissue. *PLoS One* 6:e26223.
90. Sethi JK, Vidal-Puig AJ (2007) Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *J Lipid Res* 48:1253-62.
91. Crowley VE, Yeo GS, O'Rahilly S (2002) Obesity therapy: altering the energy intake-and-expenditure balance sheet. *Nat Rev Drug Discov* 1:276-86.
92. Christian M, Kiskinis E, Debevec D, Leonardsson G, White R, Parker MG (2005) RIP140-targeted repression of gene expression in adipocytes. *Mol Cell Biol* 25:9383-91.

93. Cohen AW, Combs TP, Scherer PE, Lisanti MP (2003) Role of caveolin and caveolae in insulin signaling and diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285:E1151-60.
94. Shimizu S, Maegawa H, Egawa K, Shi K, Bryer-Ash M, Kashiwagi A (2002) Mechanism for differential effect of protein-tyrosine phosphatase 1B on Akt versus mitogen-activated protein kinase in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrinology* 143:4563-9.
95. Hita MG, Ramírez BEB, Madrigal BR, Godínez S, Panduro A (2022) Funciones endocrinas de la célula adiposa. *Revista de Endocrinología y Nutrición* 10:140-6.
96. Torres SH (1999) [Obesity, insulin resistance and skeletal muscle characteristics]. *Acta Cient Venez* 50:34-41.
97. Frier BC, Jacobs RL, Wright DC (2011) Interactions between the consumption of a high-fat diet and fasting in the regulation of fatty acid oxidation enzyme gene expression: an evaluation of potential mechanisms. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 300:R212-21.
98. Scott W, Stevens J, Binder-Macleod SA (2001) Human skeletal muscle fiber type classifications. *Phys Ther* 81:1810-6.
99. Argiles JM, Lopez-Soriano J, Almendro V, Busquets S, Lopez-Soriano FJ (2005) Cross-talk between skeletal muscle and adipose tissue: a link with obesity? *Med Res Rev* 25:49-65.
100. Miljkovic-Gacic I, Wang X, Kammerer CM, Gordon CL, Bunker CH, Kuller LH, et al (2008) Fat infiltration in muscle: new evidence for familial clustering and associations with diabetes. *Obesity (Silver Spring)* 16:1854-60.
101. Eckardt K, Taube A, Eckel J (2011) Obesity-associated insulin resistance in skeletal muscle: role of lipid accumulation and physical inactivity. *Rev Endocr Metab Disord* 12:163-72.
102. Aguer C, Foretz M, Lantier L, Hebrard S, Viollet B, Mercier J, et al (2011) Increased FAT/CD36 Cycling and Lipid Accumulation in Myotubes Derived from Obese Type 2 Diabetic Patients. *PLoS One* 6:e28981.
103. Kim DS, Itoh E, Iida K, Thorner MO (2009) Growth hormone increases mRNA levels of PPARdelta and Foxo1 in skeletal muscle of growth hormone deficient lit/lit mice. *Endocr J* 56:141-7.
104. van der Leij FR, Cox KB, Jackson VN, Huijkman NC, Bartelds B, Kuipers JR, et al (2002) Structural and functional genomics of the CPT1B gene for muscle-type carnitine palmitoyltransferase I in mammals. *J Biol Chem* 277:26994-7005.

105. Orho-Melander M, Almgren P, Kanninen T, Forsblom C, Groop LC (1999) A paired-sibling analysis of the XbaI polymorphism in the muscle glycogen synthase gene. *Diabetologia* 42:1138-45.
106. Livingstone DE, Jones GC, Smith K, Jamieson PM, Andrew R, Kenyon CJ, et al (2000) Understanding the role of glucocorticoids in obesity: tissue-specific alterations of corticosterone metabolism in obese Zucker rats. *Endocrinology* 141:560-3.
107. Rose AJ, Vegiopoulos A, Herzig S (2010) Role of glucocorticoids and the glucocorticoid receptor in metabolism: insights from genetic manipulations. *J Steroid Biochem Mol Biol* 122:10-20.
108. Eguchi M, Gillis LC, Liu Y, Lyakhovsky N, Du M, McDermott JC, et al (2007) Regulation of SOCS-3 expression by leptin and its co-localization with insulin receptor in rat skeletal muscle cells. *Mol Cell Endocrinol* 267:38-45.
109. Pinnick KE, Karpe F (2011) DNA methylation of genes in adipose tissue. *Proc Nutr Soc* 70:57-63.
110. Bouchard L, Rabasa-Lhoret R, Faraj M, Lavoie ME, Mill J, Perusse L, et al (2010) Differential epigenomic and transcriptomic responses in subcutaneous adipose tissue between low and high responders to caloric restriction. *Am J Clin Nutr* 91:309-20.
111. Cordero P, Campion J, Milagro FI, Goyenechea E, Steemburgo T, Javierre BM, et al (2011) Leptin and TNF-alpha promoter methylation levels measured by MSP could predict the response to a low-calorie diet. *J Physiol Biochem* 67:463-70.
112. Milagro FI, Campion J, Cordero P, Goyenechea E, Gomez-Uriz AM, Abete I, et al (2011) A dual epigenomic approach for the search of obesity biomarkers: DNA methylation in relation to diet-induced weight loss. *Faseb J* 25:1378-89.
113. Herman JG, Baylin SB (2003) Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 349:2042-54.
114. Vucetic Z, Carlin J, Totoki K, Reyes TM (2012) Epigenetic dysregulation of the dopamine system in diet-induced obesity. *J Neurochem* *In press*.
115. Widiker S, Karst S, Wagener A, Brockmann GA (2010) High-fat diet leads to a decreased methylation of the Mc4r gene in the obese BFMI and the lean B6 mouse lines. *J Appl Genet* 51:193-7.
116. Jiang M, Zhang Y, Liu M, Lan MS, Fei J, Fan W, et al (2011) Hypermethylation of hepatic glucokinase and L-type pyruvate kinase promoters in high-fat diet-induced obese rats. *Endocrinology* 152:1284-9.

117. Fujiki K, Kano F, Shiota K, Murata M (2009) Expression of the peroxisome proliferator activated receptor gamma gene is repressed by DNA methylation in visceral adipose tissue of mouse models of diabetes. *BMC Biol* 7:38.
118. Milagro FI, Campion J, Garcia-Diaz DF, Goyenechea E, Paternain L, Martinez JA (2009) High fat diet-induced obesity modifies the methylation pattern of leptin promoter in rats. *J Physiol Biochem* 65:1-9.
119. Lillycrop KA, Phillips ES, Torrens C, Hanson MA, Jackson AA, Burdge GC (2008) Feeding pregnant rats a protein-restricted diet persistently alters the methylation of specific cytosines in the hepatic PPAR alpha promoter of the offspring. *Br J Nutr* 100:278-82.
120. Lillycrop KA, Slater-Jefferies JL, Hanson MA, Godfrey KM, Jackson AA, Burdge GC (2007) Induction of altered epigenetic regulation of the hepatic glucocorticoid receptor in the offspring of rats fed a protein-restricted diet during pregnancy suggests that reduced DNA methyltransferase-1 expression is involved in impaired DNA methylation and changes in histone modifications. *Br J Nutr* 97:1064-73.
121. Vucetic Z, Kimmel J, Totoki K, Hollenbeck E, Reyes TM (2010) Maternal high-fat diet alters methylation and gene expression of dopamine and opioid-related genes. *Endocrinology* 151:4756-64.
122. Ng SF, Lin RC, Laybutt DR, Barres R, Owens JA, Morris MJ (2010) Chronic high-fat diet in fathers programs beta-cell dysfunction in female rat offspring. *Nature* 467:963-6.
123. Katiyar SK, Singh T, Prasad R, Sun Q, Vaid M (2011) Epigenetic Alterations in Ultraviolet Radiation-Induced Skin Carcinogenesis: Interaction of Bioactive Dietary Components on Epigenetic Targets(dagger). *Photochem Photobiol In press*.
124. Meeran SM, Ahmed A, Tollefsbol TO (2010) Epigenetic targets of bioactive dietary components for cancer prevention and therapy. *Clin Epigenetics* 1:101-16.
125. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 79:727-47.
126. Dai J, Mumper RJ (2010) Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15:7313-52.
127. Scalbert A, Williamson G (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 130:2073S-85S.
128. Bravo L (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* 56:317-33.

129. Cheynier V (2005) Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am J Clin Nutr* 81:223S-9S.
130. Martin KR, Appel CL (2010) Polyphenols as dietary supplements: A double-edged sword. *Nutrition and Dietary Supplements* 2:1–12.
131. Spencer JP, Abd El Mohsen MM, Minihane AM, Mathers JC (2008) Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. *Br J Nutr* 99:12-22.
132. Visioli F, De La Lastra CA, Andres-Lacueva C, Aviram M, Calhau C, Cassano A, et al (2011) Polyphenols and human health: a prospectus. *Crit Rev Food Sci Nutr* 51:524-46.
133. de Pascual-Teresa S Analisis de taninos condensados en alimentos. [Analysis of condensed tannins in food.] PhD thesis. Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain, 1999 (in Spanish).
134. Coldham NG, Sauer MJ (2000) Pharmacokinetics of [(14)C]Genistein in the rat: gender-related differences, potential mechanisms of biological action, and implications for human health. *Toxicol Appl Pharmacol* 164:206-15.
135. Setchell KD, Brown NM, Desai P, Zimmer-Nechemias L, Wolfe BE, Brashear WT, et al (2001) Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *J Nutr* 131:1362S-75S.
136. Williamson G, Manach C (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am J Clin Nutr* 81:243S-55S.
137. Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell PG, Bramley PM, Pridham JB (1995) The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic Res* 22:375-83.
138. Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D (1993) Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 342:1007-11.
139. Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M (2005) Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr* 81:215S-7S.
140. Duthie GG, Duthie SJ, Kyle JA (2000) Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. *Nutr Res Rev* 13:79-106.
141. Curtis PJ, Sampson M, Potter J, Dhatariya K, Kroon PA, Cassidy A (2012) Chronic Ingestion of Flavan-3-ols and Isoflavones Improves Insulin Sensitivity and Lipoprotein Status and Attenuates Estimated 10-Year CVD Risk in Medicated

Postmenopausal Women With Type 2 Diabetes: A 1-year, double-blind, randomized, controlled trial. *Diabetes Care* 35:226-32.

142. Edirisinghe I, Burton-Freeman B, Tissa Kappagoda C (2008) Mechanism of the endothelium-dependent relaxation evoked by a grape seed extract. *Clin Sci (Lond)* 114:331-7.

143. Knaze V, Zamora-Ros R, Lujan-Barroso L, Romieu I, Scalbert A, Slimani N, et al (2011) Intake estimation of total and individual flavan-3-ols, proanthocyanidins and theaflavins, their food sources and determinants in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Br J Nutr* 1-14.

144. Pandey KB, Rizvi SI (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev* 2:270-8.

145. Spencer JP, Vafeiadou K, Williams RJ, Vauzour D (2012) Neuroinflammation: Modulation by flavonoids and mechanisms of action. *Mol Aspects Med* 33:83-97.

146. Williams RJ, Spencer JP (2012) Flavonoids, cognition, and dementia: Actions, mechanisms, and potential therapeutic utility for Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med* 52:35-45.

147. Singh A, Holvoet S, Mercenier A (2011) Dietary polyphenols in the prevention and treatment of allergic diseases. *Clin Exp Allergy* 41:1346-59.

148. Kim H, Kong H, Choi B, Yang Y, Kim Y, Lim MJ, et al (2005) Metabolic and pharmacological properties of rutin, a dietary quercetin glycoside, for treatment of inflammatory bowel disease. *Pharm Res* 22:1499-509.

149. Williamson G, Holst B (2008) Dietary reference intake (DRI) value for dietary polyphenols: are we heading in the right direction? *Br J Nutr* 99 Suppl 3:S55-8.

150. Link A, Balaguer F, Goel A (2010) Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: promising role for epigenetics. *Biochem Pharmacol* 80:1771-92.

151. Fang MZ, Wang Y, Ai N, Hou Z, Sun Y, Lu H, et al (2003) Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines. *Cancer Res* 63:7563-70.

152. Kato K, Long NK, Makita H, Toida M, Yamashita T, Hatakeyama D, et al (2008) Effects of green tea polyphenol on methylation status of RECK gene and cancer cell invasion in oral squamous cell carcinoma cells. *Br J Cancer* 99:647-54.

153. Liu Z, Xie Z, Jones W, Pavlovicz RE, Liu S, Yu J, et al (2009) Curcumin is a potent DNA hypomethylation agent. *Bioorg Med Chem Lett* 19:706-9.

154. Day JK, Bauer AM, DesBordes C, Zhuang Y, Kim BE, Newton LG, et al (2002) Genistein alters methylation patterns in mice. *J Nutr* 132:2419S-23S.
155. Tang WY, Newbold R, Mardilovich K, Jefferson W, Cheng RY, Medvedovic M, et al (2008) Persistent hypomethylation in the promoter of nucleosomal binding protein 1 (Nsbp1) correlates with overexpression of Nsbp1 in mouse uteri neonatally exposed to diethylstilbestrol or genistein. *Endocrinology* 149:5922-31.
156. Fini L, Piazzini G, Daoud Y, Selgrad M, Maegawa S, Garcia M, et al (2011) Chemoprevention of intestinal polyps in ApcMin/+ mice fed with western or balanced diets by drinking annurca apple polyphenol extract. *Cancer Prev Res (Phila)* 4:907-15.
157. Morey Kinney SR, Zhang W, Pascual M, Grealley JM, Gillard BM, Karasik E, et al (2009) Lack of evidence for green tea polyphenols as DNA methylation inhibitors in murine prostate. *Cancer Prev Res (Phila)* 2:1065-75.
158. Gallagher EJ, Leroith D, Karnieli E (2011) The metabolic syndrome--from insulin resistance to obesity and diabetes. *Med Clin North Am* 95:855-73.
159. Zhao H, Yakar S, Gavrilova O, Sun H, Zhang Y, Kim H, et al (2004) Phloridzin improves hyperglycemia but not hepatic insulin resistance in a transgenic mouse model of type 2 diabetes. *Diabetes* 53:2901-9.
160. Matsui T, Tanaka T, Tamura S, Toshima A, Tamaya K, Miyata Y, et al (2007) alpha-Glucosidase inhibitory profile of catechins and theaflavins. *J Agric Food Chem* 55:99-105.
161. Li C, Allen A, Kwagh J, Doliba NM, Qin W, Najafi H, et al (2006) Green tea polyphenols modulate insulin secretion by inhibiting glutamate dehydrogenase. *J Biol Chem* 281:10214-21.
162. Anderson RA (2008) Chromium and polyphenols from cinnamon improve insulin sensitivity. *Proc Nutr Soc* 67:48-53.
163. Aggarwal BB (2010) Targeting inflammation-induced obesity and metabolic diseases by curcumin and other nutraceuticals. *Annu Rev Nutr* 30:173-99.
164. Couturier K, Batandier C, Awada M, Hininger-Favier I, Canini F, Anderson RA, et al (2010) Cinnamon improves insulin sensitivity and alters the body composition in an animal model of the metabolic syndrome. *Arch Biochem Biophys* 501:158-61.
165. Altschuler JA, Casella SJ, MacKenzie TA, Curtis KM (2007) The effect of cinnamon on A1C among adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 30:813-6.

166. Vanschoonbeek K, Thomassen BJ, Senden JM, Wodzig WK, van Loon LJ (2006) Cinnamon supplementation does not improve glycemic control in postmenopausal type 2 diabetes patients. *J Nutr* 136:977-80.
167. Baker WL, Gutierrez-Williams G, White CM, Kluger J, Coleman CI (2008) Effect of cinnamon on glucose control and lipid parameters. *Diabetes Care* 31:41-3.
168. Khan A, Safdar M, Ali Khan MM, Khattak KN, Anderson RA (2003) Cinnamon improves glucose and lipids of people with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 26:3215-8.
169. Ziegenfuss TN, Hofheins JE, Mendel RW, Landis J, Anderson RA (2006) Effects of a water-soluble cinnamon extract on body composition and features of the metabolic syndrome in pre-diabetic men and women. *J Int Soc Sports Nutr* 3:45-53.
170. Pinent M, Blade C, Salvado MJ, Blay M, Pujadas G, Fernandez-Larrea J, et al (2006) Procyanidin effects on adipocyte-related pathologies. *Crit Rev Food Sci Nutr* 46:543-50.
171. Wolfram S, Wang Y, Thielecke F (2006) Anti-obesity effects of green tea: from bedside to bench. *Mol Nutr Food Res* 50:176-87.
172. Klaus S, Pultz S, Thone-Reineke C, Wolfram S (2005) Epigallocatechin gallate attenuates diet-induced obesity in mice by decreasing energy absorption and increasing fat oxidation. *Int J Obes (Lond)* 29:615-23.
173. Friedrich M, Petzke KJ, Raederstorff D, Wolfram S, Klaus S (2011) Acute effects of epigallocatechin gallate from green tea on oxidation and tissue incorporation of dietary lipids in mice fed a high-fat diet. *Int J Obes (Lond)* *In press*.
174. Wolfram S, Raederstorff D, Wang Y, Teixeira SR, Elste V, Weber P (2005) TEAVIGO (epigallocatechin gallate) supplementation prevents obesity in rodents by reducing adipose tissue mass. *Ann Nutr Metab* 49:54-63.
175. Murase T, Haramizu S, Shimotoyodome A, Tokimitsu I (2006) Reduction of diet-induced obesity by a combination of tea-catechin intake and regular swimming. *Int J Obes (Lond)* 30:561-8.
176. Kim S, Sohn I, Lee YS, Lee YS (2005) Hepatic gene expression profiles are altered by genistein supplementation in mice with diet-induced obesity. *J Nutr* 135:33-41.
177. Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, et al (2006) Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell* 127:1109-22.

178. Rivera L, Moron R, Sanchez M, Zarzuelo A, Galisteo M (2008) Quercetin ameliorates metabolic syndrome and improves the inflammatory status in obese Zucker rats. *Obesity (Silver Spring)* 16:2081-7.
179. Peng CH, Liu LK, Chuang CM, Chyau CC, Huang CN, Wang CJ (2011) Mulberry water extracts possess an anti-obesity effect and ability to inhibit hepatic lipogenesis and promote lipolysis. *J Agric Food Chem* 59:2663-71.
180. Li SY, Chang CQ, Ma FY, Yu CL (2009) Modulating effects of chlorogenic acid on lipids and glucose metabolism and expression of hepatic peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in golden hamsters fed on high fat diet. *Biomed Environ Sci* 22:122-9.
181. Murase T, Misawa K, Minegishi Y, Aoki M, Ominami H, Suzuki Y, et al (2011) Coffee polyphenols suppress diet-induced body fat accumulation by downregulating SREBP-1c and related molecules in C57BL/6J mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 300:E122-33.
182. Drira R, Chen S, Sakamoto K (2011) Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit adipocyte differentiation in 3 T3-L1 cells. *Life Sci* 89:708-16.
183. Herranz-Lopez M, Fernandez-Arroyo S, Perez-Sanchez A, Barrajon-Catalan E, Beltran-Debon R, Menendez JA, et al (2012) Synergism of plant-derived polyphenols in adipogenesis: Perspectives and implications. *Phytomedicine In press*.
184. Hsu CL, Huang SL, Yen GC (2006) Inhibitory effect of phenolic acids on the proliferation of 3T3-L1 preadipocytes in relation to their antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 54:4191-7.
185. Ogasawara J, Kitadate K, Nishioka H, Fujii H, Sakurai T, Kizaki T, et al (2011) Comparison of the effect of oligonol, a new lychee fruit-derived low molecular form of polyphenol, and epigallocatechin-3-gallate on lipolysis in rat primary adipocytes. *Phytother Res* 25:467-71.
186. Alonso-Castro AJ, Miranda-Torres AC, Gonzalez-Chavez MM, Salazar-Olivo LA (2008) *Cecropia obtusifolia* Bertol and its active compound, chlorogenic acid, stimulate 2-NBDglucose uptake in both insulin-sensitive and insulin-resistant 3T3 adipocytes. *J Ethnopharmacol* 120:458-64.
187. Uchiyama S, Taniguchi Y, Saka A, Yoshida A, Yajima H (2011) Prevention of diet-induced obesity by dietary black tea polyphenols extract in vitro and in vivo. *Nutrition* 27:287-92.

188. Thavanesan N (2011) The putative effects of green tea on body fat: an evaluation of the evidence and a review of the potential mechanisms. *Br J Nutr* 106:1297-309.
189. Scazzocchio B, Vari R, Filesi C, D'Archivio M, Santangelo C, Giovannini C, et al (2011) Cyanidin-3-O-beta-glucoside and protocatechuic acid exert insulin-like effects by upregulating PPARgamma activity in human omental adipocytes. *Diabetes* 60:2234-44.
190. Keijer J, van Schothorst EM (2008) Adipose tissue failure and mitochondria as a possible target for improvement by bioactive food components. *Curr Opin Lipidol* 19:4-10.
191. Sae-tan S, Grove KA, Lambert JD (2011) Weight control and prevention of metabolic syndrome by green tea. *Pharmacol Res* 64:146-54.
192. Kim MH, Kang KS, Lee YS (2010) The inhibitory effect of genistein on hepatic steatosis is linked to visceral adipocyte metabolism in mice with diet-induced non-alcoholic fatty liver disease. *Br J Nutr* 104:1333-42.
193. Ikarashi N, Toda T, Okaniwa T, Ito K, Ochiai W, Sugiyama K (2011) Anti-Obesity and Anti-Diabetic Effects of Acacia Polyphenol in Obese Diabetic KKAY Mice Fed High-Fat Diet. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011:952031.
194. Mukai Y, Sato S (2011) Polyphenol-containing azuki bean (*Vigna angularis*) seed coats attenuate vascular oxidative stress and inflammation in spontaneously hypertensive rats. *J Nutr Biochem* 22:16-21.
195. Shen CL, Samathanam C, Graham S, Dagda RY, Chyu MC, Dunn DM (2011) Green Tea Polyphenols and 1-alpha-OH-Vitamin D(3) Attenuate Chronic Inflammation-Induced Myocardial Fibrosis in Female Rats. *J Med Food* *In press*.
196. Li Y, Ying C, Zuo X, Yi H, Yi W, Meng Y, et al (2009) Green tea polyphenols down-regulate caveolin-1 expression via ERK1/2 and p38MAPK in endothelial cells. *J Nutr Biochem* 20:1021-7.
197. Shukitt-Hale B, Lau FC, Carey AN, Galli RL, Spangler EL, Ingram DK, et al (2008) Blueberry polyphenols attenuate kainic acid-induced decrements in cognition and alter inflammatory gene expression in rat hippocampus. *Nutr Neurosci* 11:172-82.
198. Aoun M, Michel F, Fouret G, Schlernitzauer A, Ollendorff V, Wrutniak-Cabello C, et al (2011) A grape polyphenol extract modulates muscle membrane fatty acid composition and lipid metabolism in high-fat--high-sucrose diet-fed rats. *Br J Nutr* 106:491-501.

199. Nakazato K, Song H, Waga T (2007) Dietary apple polyphenols enhance gastrocnemius function in Wistar rats. *Med Sci Sports Exerc* 39:934-40.
200. Jia X, Han C, Chen J (2002) [Effects of tea polyphenols and tea pigments on cell cycle regulators in rat liver precancerous lesions]. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* 36:225-8.
201. Bournival J, Quessy P, Martinoli MG (2009) Protective effects of resveratrol and quercetin against MPP⁺-induced oxidative stress act by modulating markers of apoptotic death in dopaminergic neurons. *Cell Mol Neurobiol* 29:1169-80.
202. Qin B, Polansky MM, Harry D, Anderson RA (2010) Green tea polyphenols improve cardiac muscle mRNA and protein levels of signal pathways related to insulin and lipid metabolism and inflammation in insulin-resistant rats. *Mol Nutr Food Res* 54 Suppl 1:S14-23.
203. Cao H, Hininger-Favier I, Kelly MA, Benaraba R, Dawson HD, Coves S, et al (2007) Green tea polyphenol extract regulates the expression of genes involved in glucose uptake and insulin signaling in rats fed a high fructose diet. *J Agric Food Chem* 55:6372-8.
204. Ko CH, Siu WS, Wong HL, Shum WT, Fung KP, San Lau CB, et al (2011) Pro-bone and antifat effects of green tea and its polyphenol, epigallocatechin, in rat mesenchymal stem cells in vitro. *J Agric Food Chem* 59:9870-6.

II. Hipótesis y Objetivos

1. HIPÓTESIS

Los extractos vegetales ricos en polifenoles son susceptibles de ser empleados como ingredientes de alimentos funcionales para el control de peso y la prevención de la obesidad.

2. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el posible efecto preventivo de distintos extractos vegetales ricos en polifenoles sobre la ganancia de peso inducida por la dieta en ratas, así como los mecanismos implicados mediante estudios nutrigenómicos y epigenéticos.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar un modelo animal de obesidad inducido por la dieta con utilidad para la evaluación de la actividad biológica de distintos extractos vegetales, mediante la comparación de los efectos obtenidos en el perfil bioquímico e histológico y con el propósito de identificar biomarcadores asociados a la obesidad en modelos animales.

2. Valorar la eficacia del nuevo software *Adiposoft* como herramienta para realizar análisis histológicos del tejido adiposo.

3. Realizar un cribado de distintos extractos vegetales ricos en polifenoles en un modelo de obesidad inducido por la dieta para detectar posibles candidatos para la prevención y/o tratamiento de la ganancia de peso y adiposidad y las alteraciones metabólicas relacionadas.

4. Profundizar en los mecanismos de acción de aquél extracto que demuestre los efectos más significativos en la prevención de la obesidad a través de:

- a) Analizar cambios inducidos por la ingesta del extracto polifenólico en la adiposidad, tanto a nivel tisular como celular.

- b) Investigar el efecto del extracto rico en polifenoles sobre el perfil bioquímico, metabolismo de la glucosa y la resistencia a la insulina.
- c) Caracterizar los efectos del extracto polifenólico sobre la respuesta lipolítica de los adipocitos.
- d) Analizar las alteraciones inducidas por el extracto polifenólico sobre la expresión de genes relacionados con el metabolismo del adipocito y el desarrollo de la obesidad, así como las vías metabólicas implicadas.
- e) Estudiar los efectos del extracto polifenólico sobre la expresión de genes del músculo esquelético relacionados con el desarrollo de la obesidad y la resistencia a la insulina.
- f) Determinar si los cambios en la expresión génica inducidos por el extracto polifenólico pueden estar regulados por alteraciones en los niveles de metilación de diferentes sitios CpGs presentes en los promotores de estos genes.

III. Diseño experimental

1. DISEÑO GENERAL

La presente Tesis Doctoral fue diseñada en base a la realización de tres modelos experimentales con el objetivo de estudiar el efecto de la suplementación con distintos extractos de polifenoles sobre el desarrollo de la obesidad inducida por la dieta en ratas Wistar.

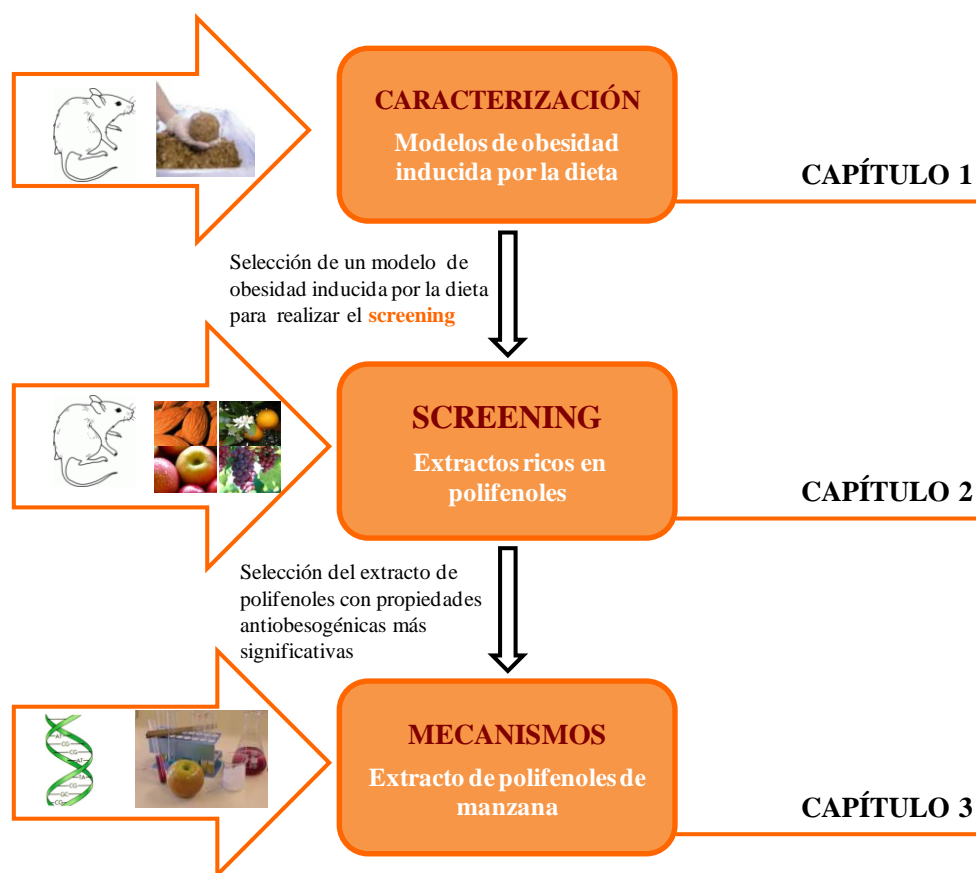


Figura 11. Diseño experimental general

En el primer experimento (Cap.1) se caracterizaron distintos modelos de obesidad inducida por la dieta en ratas Wistar para seleccionar el más adecuado para la evaluación de la actividad biológica de distintos extractos polifenólicos. Para ello, se estudiaron distintas variables fenotípicas y bioquímicas relacionadas con un aumento de adiposidad e insulino-resistencia.

En el segundo experimento (Cap.2) se realizó un cribado de distintos extractos vegetales ricos en polifenoles en un modelo de obesidad inducida por una dieta alta en grasas y sacarosa (seleccionada en el capítulo 1) en ratas Wistar, analizando para ello distintas variables corporales, bioquímicas y hormonales relacionadas con el aumento de adiposidad y la aparición de inulino-resistencia. El experimento se realizó en 2 fases en las que se siguieron las mismas condiciones.

Finalmente, en el tercer experimento (Cap.3) se realizó un estudio sobre los mecanismos implicados en las propiedades antiobesogénicas de los polifenoles de la manzana así como un estudio nutrigénomico y nutriepigenético en adipocitos aislados del tejido adiposo epididimal para evaluar las vías metabólicas afectadas y la posible implicación de una regulación epigenética.

2. DISEÑO EXPERIMENTAL (Capítulo 1)

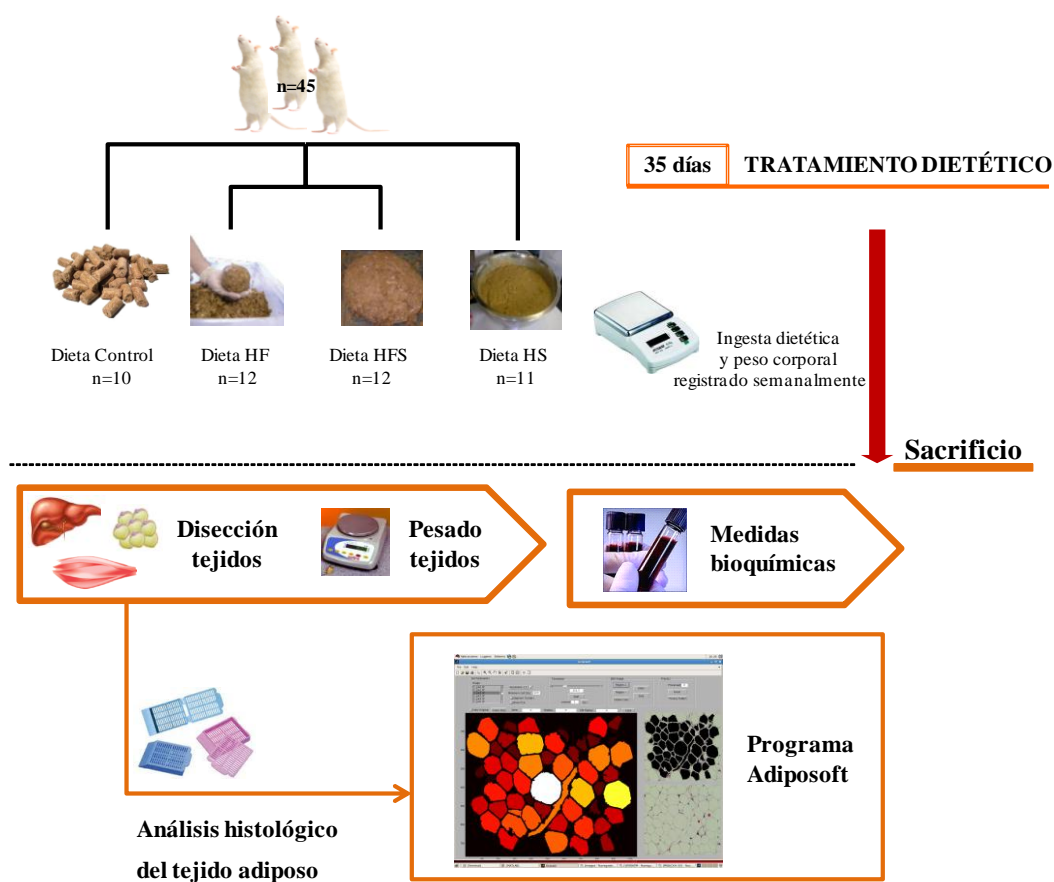


Figura 12. Diseño experimental capítulo 1. El objetivo de este estudio fue la caracterización de distintos modelos de obesidad inducida por la dieta para seleccionar el más adecuado para la evaluación de la actividad biológica de distintos extractos polifenólicos. El ensayo consistió en alimentar ratas Wistar con una dieta alta en grasas (HF), una dieta alta en grasas y sacarosa (HFS) o una dieta alta en sacarosa (HS) durante 35 días. Al finalizar este período, se analizaron diferentes variables de composición corporal y bioquímicas así como la celularidad de distintos depósitos grasos mediante el software *Adiposoft*.

3. DISEÑO EXPERIMENTAL (Capítulo 2)

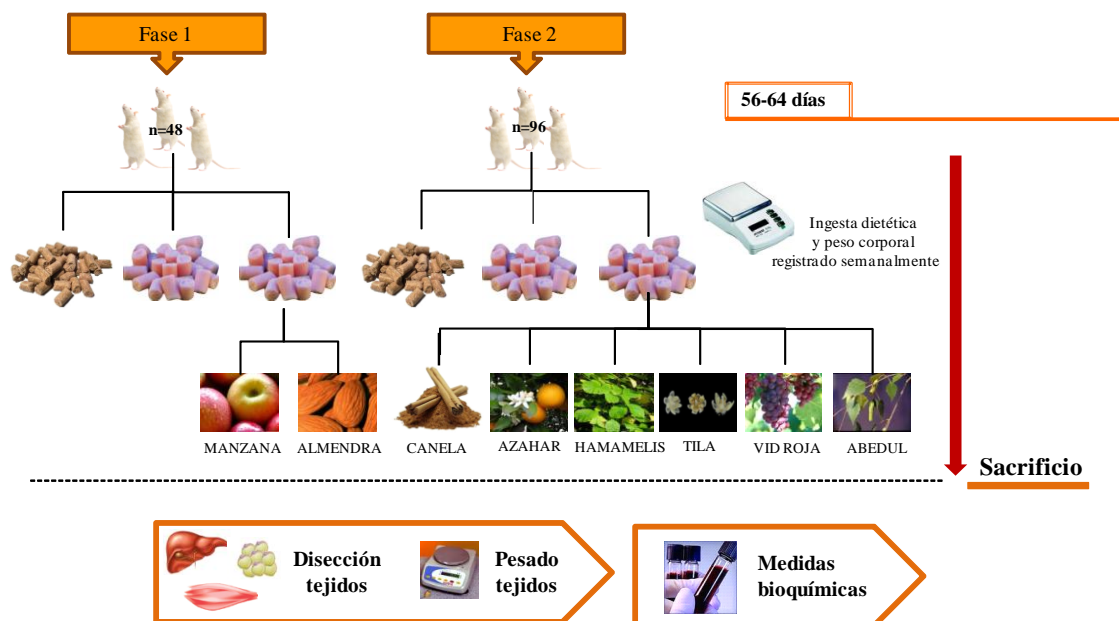


Figura 13. Diseño experimental capítulo 2. El objetivo de este estudio fue la realización de un cribado de distintos extractos vegetales de polifenoles para valorar sus potenciales propiedades antiobesogénicas en un modelo animal de obesidad inducida por la dieta. El ensayo se distribuyó en 2 fases. En cada una de ellas, se alimentaron ratas Wistar con una dieta alta en grasas y sacarosa (HFS) suplementada o no con distintos extractos polifenólicos (2 en la primera fase y 6 en la segunda) durante 56-64 días. Al finalizar este período, se analizaron diferentes variables de composición corporal y bioquímicas.

4. DISEÑO EXPERIMENTAL (Capítulo 3)

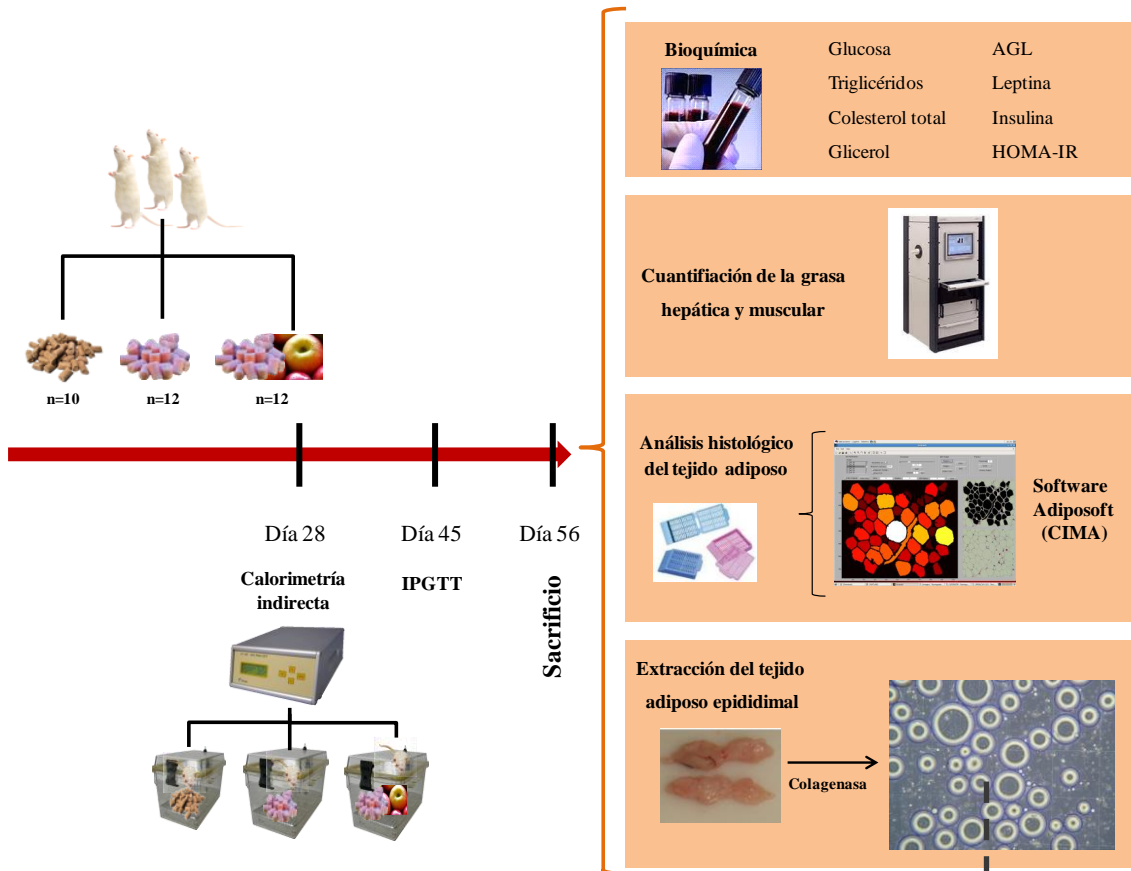


Figura 14. Diseño experimental capítulo 3. Tras seleccionar el extracto de manzana como el extracto más prometedor para el control de la obesidad y sus alteraciones metabólicas relacionadas, se procedió a estudiar los mecanismos implicados en estos efectos. Para ello, se realizaron estudios de calorimetría indirecta así como IPGTT. También se cuantificó el nivel de grasa en hígado y músculo y se estudió la celularidad de distintos depósitos grasos. Además, se extrajeron adipocitos del tejido adiposo epididimal para evaluar diferencias en su respuesta lipolítica así como en la expresión génica. Por último, se realizaron estudios epigenéticos en los promotores de aquellos genes cuya expresión resultó modificada por la ingesta del extracto de polifenoles de manzana. AGL, Ácidos grasos libres; CIMA, Centro de Investigaciones en Medicina Aplicada; IPGTT, Test de Tolerancia Intraperitoneal a la Glucosa.

IV. Resultados

Capítulo 1. Influence of dietary macronutrient composition on adiposity and cellularity of different fat depots in Wistar rats

Influence of dietary macronutrient composition on adiposity and cellularity of different fat depots in Wistar rats

N. Boqué, J. Campión, L. Paternain, D.F. García-Díaz, M. Galarraga, M.P. Portillo, F.I. Milagro, C. Ortiz de Solórzano and J.A. Martínez

J Physiol Biochem, 65 (4), 387-396, 2009

Resumen

El objetivo del estudio fue investigar el papel del contenido en macronutrientes de la dieta sobre indicadores de adiposidad y el desarrollo de hipertrofia/hiperplasia en los depósitos grasos de ratas Wistar usando una estrategia histológica y computacional combinada. Con este propósito, ratas Wistar macho fueron distribuidas en 4 grupos a los que se les asignaron distintas intervenciones nutricionales: grupo Control (pienso); grupo alto en grasa, HF (60% grasa); grupo alto en grasa y azúcares, HFS (45% grasa y 17% sacarosa); y grupo alto en azúcares, HS (42% sacarosa). Tras 35 días las ratas fueron sacrificadas, se recogió la sangre del tronco, distintos tejidos se pesaron y fragmentos de distintos depósitos grasos se guardaron en formaldehído para estudios histológicos con el nuevo software *Adiposoft*. Las ratas alimentadas con dietas HF, HFS y HS aumentaron significativamente el peso corporal y el peso de la grasa total en comparación con las ratas controles, siendo más pronunciados los cambios metabólicos en las ratas del grupo HS que en los otros grupos. Los análisis de celularidad realizados con *Adiposoft* revelaron que el tejido adiposo retroperitoneal es histológicamente diferente al mesentérico y al subcutáneo, ya que presentó un tamaño mayor de los adipocitos. El depósito graso subcutáneo fue el más sensible a la dieta, presentando hipertrofia inducida por la dieta HF e hiperplasia inducida por la dieta HS. El depósito graso mesentérico tuvo una respuesta similar pero atenuada en comparación con el tejido adiposo subcutáneo mientras que el retroperitoneal presentó hiperplasia inducida por la dieta HS. Estos resultados proporcionan nuevas ideas sobre el papel de los macronutrientes en el desarrollo de la obesidad hiperplástica caracterizada por la gravedad de sus manifestaciones clínicas. Finalmente, se presentó una nueva herramienta para el análisis de muestras histológicas de tejido adiposo.

Influence of dietary macronutrient composition on adiposity and cellularity of different fat depots in Wistar rats.

Boqué N¹, Campión J¹, Paternain L¹, García-Díaz DF¹, Galarraga M², Portillo MP³, Milagro FI¹, Ortiz de Solórzano C² and Martínez JA¹.

¹ Department of Nutrition, Food Science, Physiology and Toxicology.

² Center for Applied Medical Research (CIMA). University of Navarra. Pamplona. Spain.

³ Department of Nutrition and Food Science. University of País Vasco. Paseo de la Universidad, 7. 01006.Vitoria. Spain.

CORRESPONDING AUTHOR

Prof. J. Alfredo Martínez
Department of Nutrition, Food Science, Physiology and Toxicology
University of Navarra
C/Irunlarrea s/n
31008 Pamplona, SPAIN
Phone: 0034 948 425600
Fax: 0034 948 425649
E-mail address: jalfmtz@unav.es

SUMMARY

The aim of this study was to investigate the role of dietary macronutrient content on adiposity parameters and adipocyte hypertrophy/hyperplasia in subcutaneous and visceral fat depots from Wistar rats using combined histological and computational approaches. For this purpose, male Wistar rats were distributed into 4 groups and were assigned to different nutritional interventions: Control group (chow diet); high-fat group, HF (60% E from fat); high-fat-sucrose group, HFS (45% E from fat and 17% from sucrose); and high-sucrose group, HS (42% E from sucrose). At day 35, rats were sacrificed, blood was collected, tissues were weighed and fragments of different fat depots were kept for histological analyses with the new software *Adiposoft*. Rats fed with HF, HFS and HS diets increased significantly body weight and total body fat against Control rats, being metabolic impairments more pronounced on HS rats than in the other groups. Cellularity analyses using *Adiposoft* revealed that retroperitoneal adipose tissue is histologically different than mesenteric and subcutaneous ones, in relation to bigger adipocytes. The subcutaneous fat pad was the most sensitive to the diet, presenting adipocyte hypertrophy induced by HF diet and adipocyte hyperplasia induced by HS diet. The mesenteric fat pad had a similar but attenuated response in comparison to the subcutaneous adipose tissue, while retroperitoneal fat pad only presented adipocyte hyperplasia induced by the HS diet intake after 35 days of intervention. These findings provide new insights into the role of macronutrients in the development of hyperplastic obesity, which is characterized by the severity of the clinical features. Finally, a new tool for analyzing histological adipose samples is presented.

Key words: Diet-induced obesity; Macronutrient content; Hypertrophy; Hyperplasia; White adipose tissue.

INTRODUCTION

Obesity is the result of an augmented adipose tissue mass. The enlargement of this fat depot may be the result of an increase in the number of adipocytes (hyperplasia) or an increase in adipocyte size by lipid accumulation (hypertrophy). Moreover, hyperplasia can be due to the presence of new preadipocytes or to an induction of its differentiation (8). It is known that the most severe form of obesity is characterized by an adipose tissue enlargement as a consequence of adipocyte hyperplasia (18) and that it is related with an early age of onset (10). In addition, adipocyte number is apparently unaffected in individuals with hyperplastic obesity following a hypocaloric diet (35). On the other hand, adipocyte cell size can influence insulin sensitivity (1, 32), glucose tolerance (37) and adipose tissue metabolism (22). Also, it has been shown that enlarged adipocytes secrete growth factors that induce adipocyte preadipocyte proliferation (28) as fat cells do not have an unlimited capacity for expansion. There are also regional differences between different fat depots, having the mesenteric region the major growth capacity and the subcutaneous the major proliferation capacity (9, 20). In these sense, a previous study of our group showed this proliferative capacity of the subcutaneous adipose tissue in rats fed with a high-fat diet (3). Furthermore, it is known that it could be due to a differential tissue perfusion or to the innervation density of adipose tissue by the sympathetic nervous system (6, 7).

On the other hand, specific dietary constituents may promote the development of insulin resistance, diabetes and obesity independently of an increased energy intake. In this sense, macronutrient profile can affect diet-induced thermogenesis (17), gene expression (5) or the level of some hormones (13, 33). Moreover, the source and amount of energy can modify adipose tissue growth by hypertrophy and hyperplasia in Holstein Steers, being hypertrophy most affected by the amount of energy and hyperplasia by the source of energy (34). Furthermore, it has been shown that a high-fat diet can modulate the proliferation of adipogenic progenitors in adult mice in a fat-depot depending manner, resulting in adipose tissue hyperplasia (20). Since there are evidence that a dietary treatment can modify adipocytes number and size, the aim of this study was to investigate the role of dietary macronutrient content on adiposity markers and adipocyte hypertrophy/hyperplasia measurements in subcutaneous and visceral fat depots of Wistar rats fed on diets with different proportions of lipids and sugars.

MATERIALS AND METHODS

Animals. Experiments were performed with forty-five male Wistar rats from CIFA (Centre of Pharmaceutical Applied Investigation) of the University of Navarra with an initial weight of 250 g. Animals were kept in an isolated room with a constantly regulated temperature between 21 and 23°C, and controlled (50±10%) humidity in a 12h:12h artificial light/dark cycle. They were distributed into 4 groups and were assigned to different nutritional interventions during 35 days. Thus, Control group (n=10) was fed with a standard pelleted chow diet from Harlan Ibérica (Barcelona, Spain) and the other 3 groups were fed with different hypercaloric diets: a high-fat diet (HF, n=12), a high-fat-sucrose diet (HFS, n=12) and a high-sucrose diet (HS, n=11), whose composition is reported in Table I (23, 27). The HF diet (288 Kcal/100g) consisted in a mix of pate, ham, bacon, biscuits and a standard chow diet; the HFS diet (267 Kcal/100g) consisted in a mix of pate, ham, bacon, biscuits, sweetened condensed milk and a standard chow diet; and the HS diet (339 kcal/100g) consisted in pelleted chow and sweetened condensed milk.

Table I. Composition of the experimental diets.

	Lipids	Protein	Total CHO	Simple sugars
C (n=10)	17%	10%	73%	7%
HF (n=12)	60%	16%	24%	4.5%
HFS (n=12)	45%	20%	35%	17%
HS (n=11)	19%	12%	69%	42%

Values are represented as percentage of total energy. CHO, Carbohydrates.

The different groups of rats had *ad libitum* water and food access, while body weight and food intake were recorded 3 times per week. After finishing the experimental feeding period (day 35) rats were sacrificed, blood was collected from the trunk and serum stored at -20°C, while tissue samples of liver and retroperitoneal, mesenteric, epididymal and subcutaneous (inguinal) WAT were isolated, weighted and stored immediately at -80°C. All the procedures performed agreed with the national and institutional guidelines of the Animal Care and Use Committee at the University of Navarra.

Serum measurements. Serum triglycerides were determined with the RANDOX kit for the *in vitro* diagnostic of triglycerides (Randox LTD Laboratories, Ardmore Road, UK), glucose was measured using the HK-CP kit (ABX Pentra, Montpellier, France), total cholesterol was measured using the Cholesterol-CP kit (ABX Pentra, Montpellier, France) and HDL-cholesterol with the HDL direct-CP kit (ABX Pentra, Montpellier, France) adapted for a COBAS MIRA (Roche, Basel, Switzerland) equipment. Leptin and insulin quantification was performed by specific Elisab Kits following the protocols described by the manufacturer (Linco Research, Missouri, USA). Finally, the homeostatic model assessment (HOMA), as an insulin resistance index, was calculated using the formula: (fasting plasma insulin x plasma glucose)/22.5.

Histological analyses. Small pieces of different fat depots were kept in formaldehyde for histological analyses. These tissues were fixed and stained with hematoxylin/eosin, and acquired using AxioVision Zeiss Imaging software (AxioVision controls via software an Axio Imager M1 Zeiss microscope and an Insight AxioCamm ICc3 camera). The magnification in this case was 20x. The acquired images were stored in uncompressed 24 bit color TIFF format. Finally, these images were analyzed with a new software (*Adiposoft* from CIMA, University of Navarra) in order to determine adipocyte diameters and adipose tissue cellularity. Adipocyte number in each tissue was estimated according to formulas from Lemonnier et al (25).

Statistical analyses. All results are expressed as the average mean \pm standard deviation. Means comparisons were tested for metabolic parameters by Anova test and Student's T test for all the variables. For frequency distribution cell sizes $<25 \mu\text{m}$ were considered debris or very small adipocytes (16) and removed from the analysis. After that, cells were grouped by sizes according to adipocyte diameter (25-50 μm , small adipocytes; 50-90 μm , normal adipocytes; 90-130 μm , big adipocytes; $>130 \mu\text{m}$, very big adipocytes) and analyzed statistical differences by a repeated measures Anova test. Finally, statistical differences of Lemonnier estimations were performed using Mann-Whitney U test. A level of probability up at $p < 0.05$ was set up as statistically significant and $p < 0.01$ as very statistically significant. For the statistical tests, GraphPad Prism Software 4.02 version and SPSS v13.0 was used (San Diego, CA, USA).

RESULTS

Body weight and adiposity. During the experimental period, rats fed with the 3 obesigenic dietary treatments showed hyperphagia (Table II). At the end of the experiment, rats fed with HF and HS diets significantly increased body weight and total body fat (reflected as the sum of retroperitoneal, mesenteric, retroperitoneal and epididymal fat pads) in comparison to Control rats (Table II). HFS diet increased also total body fat; however it did not modify body weight significantly. Liver weight (Table II) was also higher in HF, HFS and HS rats than in Control rats, suggesting diet-induced steatosis.

Table II. Weight related parameters and plasma values of male Wistar rats fed with 4 different dietary treatments during 35 days.

	Group			
	<i>C</i> (n=10)	<i>HF</i> (n=12)	<i>HFS</i> (n=12)	<i>HS</i> (n=11)
<i>Weight related parameters</i>				
Food intake (Kcal/day)	79.7±27.5 ^a	186.4±18.3 ^b	181.8±27.5 ^{b,c}	103.1±5.6 ^d
Food efficiency (g/Kcal)	0.023±0.007 ^a	0.014±0.005 ^b	0.012±0.005 ^b	0.029±0.006 ^{a,c}
Final body weight (g)	388±23 ^a	420±25 ^b	413±39 ^{a,b}	426±24 ^b
Total fat mass (g)	22.61±4.75 ^a	32.09±6.92 ^b	32.84±6.11 ^b	35.42±7.11 ^b
Liver weight (g)	8.85±1.18 ^a	11.19±1.01 ^b	10.38±1.53 ^b	10.4±1.14 ^b
<i>Plasma values</i>				
Glucose (mmol/l)	5.77±0.81 ^a	6.22±1.03 ^a	6.50±1.17 ^a	5.98±1.04 ^a
Total cholesterol (mg/dl)	63.6±7.9 ^a	58.3±12.0 ^a	56.8±11.7 ^{a,b}	48.4±7.2 ^b
HDL-cholesterol (mg/dl)	22.4±2.7 ^a	21.9±6.5 ^{a,b}	20.8±4.6 ^{a,b}	19.3±2.2 ^b
Triglycerides (mg/dl)	86.2±28.5 ^a	70.6±21.2 ^a	69.7±20.7 ^a	132.9±57.6 ^b
FFA (mg/dl)	0.78±0.12 ^a	0.69±0.08 ^{a,b}	0.63±0.09 ^{b,c}	0.91±0.22 ^{a,d}
Leptin (ng/ml)	2.76±1.52 ^a	5.97±2.65 ^b	7.33±3.99 ^{b,c}	9.45±3.66 ^c
Insulin (μU/ml)	7.18±2.94 ^a	14.78±10.92 ^b	19.62±14.65 ^c	31.54±10.13 ^d
HOMA IR	1.92±1.01 ^a	4.36±3.67 ^{a,b}	6.17±5.81 ^{b,c}	8.51±3.51 ^{c,d}

All the results are expressed as the mean ± SD. Statistical analyses were performed using Anova test and Student's T test was used to test differences in the means of each group. Different letters (a, b, c) indicates significative differences between groups of at least p<0.05. Total fat mass indicates the sum of the subcutaneous, retroperitoneal, mesenteric and epididymal fat pads weights. C,Control; HF, High-Fat; HFS,High-Fat-Sugar; HS, High-Sugar; FFA, Free Fatty Acids.

Metabolic parameters and hormone profile. The three diets tested in this study induced marked hyperleptinemia and hyperinsulinemia after 35 days of experimental treatment. Regarding lipid profile, HS diet was the only one that increased free fatty acid and triglycerides levels in Wistar rats, while it caused a decrease in total cholesterol and HDL cholesterol levels (Table II). Finally, HOMA-IR, an indicator of insulin resistance, was higher in HFS and HS groups against control rats.

Histological analyses. The results of adipose tissue cellularity obtained from *Adiposoft* program showed fat depot differences in control rats. Thus, retroperitoneal fat pad had a higher frequency of big adipocytes than subcutaneous ($p<0.01$) and mesenteric ($p<0.001$) fat pads (Rp:15.46%±2.27; Sc:6.21%±2.55; Mes:3.26%±1.27) and a lower frequency of small fat cells ($p<0.001$) in comparison to these two depots (Rp:31.16±2.54; Sc:42.63±4.56; Mes:49.04±0.70). Regarding the effects of obesigenic diets, adipocyte frequency analyses in the subcutaneous adipose tissue showed that HF rats had a reduced frequency of small fat cells ($p<0.001$) and a higher frequency of big adipocytes ($p<0.001$), revealing that HF diet induced an increase in subcutaneous adipocytes size compared with chow diet (Figure 1A). This fact was not observed in HFS and HS diets. In the mesenteric fat depot, it was found exactly the same pattern of adipocyte frequency distribution that in the subcutaneous fat depot (Figure 1B), reaching significance only for small ones ($p<0.01$). Finally, the effects of the dietary treatments on the retroperitoneal fat depot (Figure 1C) resulted in a decrease in the percentage of big fat cells by HS diet in comparison to control diet ($p<0.01$), with no changes in the frequency of the small and normal adipocytes by any of the treatments.

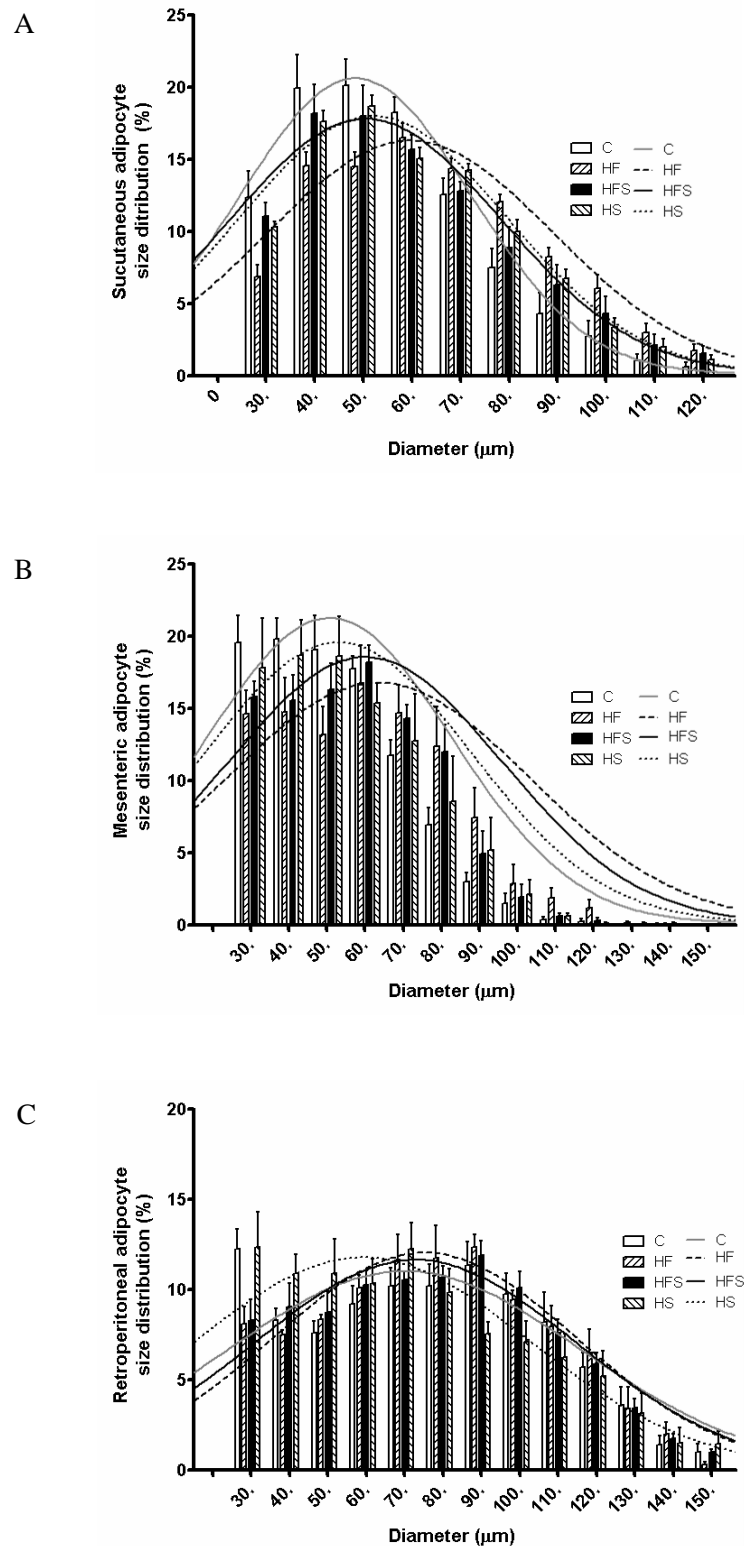


Fig. 1. Adipocyte frequency distribution in subcutaneous (A), mesenteric (B) and retroperitoneal (C) adipose tissue of male Wistar rats fed with chow diet (C), high-fat diet (HF), high-fat-sucrose diet (HFS) and high-sucrose diet (HS) during 35 days (n= 3,4). Non-lineal regression curves (Gauss) are shown in each figure.

Finally, we studied how the dietary treatments could affect different markers of adipose cellularity (cell volume, cells per gram and cells per total fat pad) from each depot (Figure 2 and Table III) using *Adiposoft* histogram data and the algorithm published by Lemnonier et al (24). First of all, cell volume (Figure 2A, 2D, 2E), as a measure of cell hypertrophy, was higher in the subcutaneous fat depot from rats fed with HF diet ($p=0.055$) in comparison with control fed rats. Neither the two other diets nor the HF diet affected this index in mesenteric and retroperitoneal fat depot. On the other hand (Table III), all dietary treatments increased statistically each fat depot weight analyzed (apart from for HFS and mesenteric pad). Remarkably, adipocyte number per gram of fat was not affected by the diets except for HF in the subcutaneous fat pad, which showed lower number of cells than HS fed rats ($p<0.05$), showing again a hypertrophic effect dependent on the macronutrient type (fat vs. carbohydrates).

Table III. Cellularity of three adipose depots of Wistar rats fed with 4 different dietary treatments during 35 days.

	Group			
	<i>C</i> (n=4)	<i>HF</i> (n=4)	<i>HFS</i> (n=4)	<i>HS</i> (n=3)
<i>Subcutaneous pad</i>				
Fat pad weight (g)	5.67±1.25 ^a	7.41±1.98 ^b	8.16±1.54 ^b	9.17±2.41 ^b
Adipocyte number/g (x10 ⁶)	11.47±4.97 ^{ab}	6.60±1.82 ^a	9.51±4.23 ^{ab}	9.16±1.77 ^b
Adipocyte number/fat pad (x10 ⁶)	63.20±24.78 ^a	58.20±11.19 ^a	92.50±48.72 ^{ab}	92.18±11.41 ^b
<i>Mesenteric pad</i>				
Fat pad weight (g)	2.98±0.95 ^a	4.11±1.05 ^b	3.78±0.94 ^{ab}	4.63±1.04 ^b
Adipocyte number/g (x10 ⁶)	11.78±2.16 ^a	8.37±3.68 ^a	9.47±2.38 ^a	11.28±5.14 ^a
Adipocyte number/fat pad (x10 ⁶)	40.76±7.14 ^{ab}	35.55±11.02 ^{ab}	33.80±5.28 ^a	54.01±14.89 ^b
<i>Retroperitoneal pad</i>				
Fat pad weight (g)	7.57±2.08 ^a	10.31±2.50 ^b	10.46±2.34 ^b	10.86±2.51 ^b
Adipocyte number/g (x10 ⁶)	3.27±0.81 ^a	3.43±0.59 ^a	3.46±0.54 ^a	4.33±1.51 ^a
Adipocyte number/fat pad (x10 ⁶)	23.89±2.91 ^a	35.52±8.56 ^{ab}	38.75±11.24 ^b	48.88±8.70 ^b

All the results are expressed as the mean ± SD. Statistical analyses were performed using Mann Whitney U test. Different letters (a, b, c) indicate significant differences between groups of at least $p<0.05$. C, Control; HF, High-Fat; HFS, High-Fat-Sugar; HS, High-Sugar.

Total adipocyte number per fat pad (parameter of hyperplasia) was not changed by HF diet in all the three fat depots (Table III). However, HS diet induced an increase in this total population of adipocytes in the subcutaneous (46%, $p<0.05$) and retroperitoneal (104%, $p<0.05$) fat depots. Finally, HFS diet had an intermediate effect on adipose tissue cellularity comparing fat diet against the carbohydrate enriched diet, with much more heterogeneity between rats than in the other 3 dietary groups.

DISCUSSION

The effect of dietary composition on adiposity and cellularity was studied in the current investigation through the new software *Adiposoft*. For this purpose, three diets with different macronutrient distribution were used to induce obesity in male Wistar rats. Taking into account that obesity is characterized by an increased adipose mass, the three obesogenic diets were able to establish this overweight model. Moreover, the three diets increased liver weight, suggesting the induction of hepatic steatosis (29).

Diet-induced metabolic alterations in HS group were more pronounced than in the other groups. The rise in serum triglycerides and FFA has been explained because diets high in simple sugars markedly stimulate fatty acid synthesis from carbohydrates (19, 21). However, total cholesterol levels decreased with HS dietary treatment. This reduction could be the result of the lower HDL cholesterol levels, as has been previously reported by Kamgang et al (21). These rats showed also hyperinsulinemia, as described by other authors (31). The absence of changes in insulin resistance parameters in HF group could be due to the short experimental period, as other authors had reported changes in glucose, insulin and HOMA index in Wistar rats fed with a HF diet (15, 29).

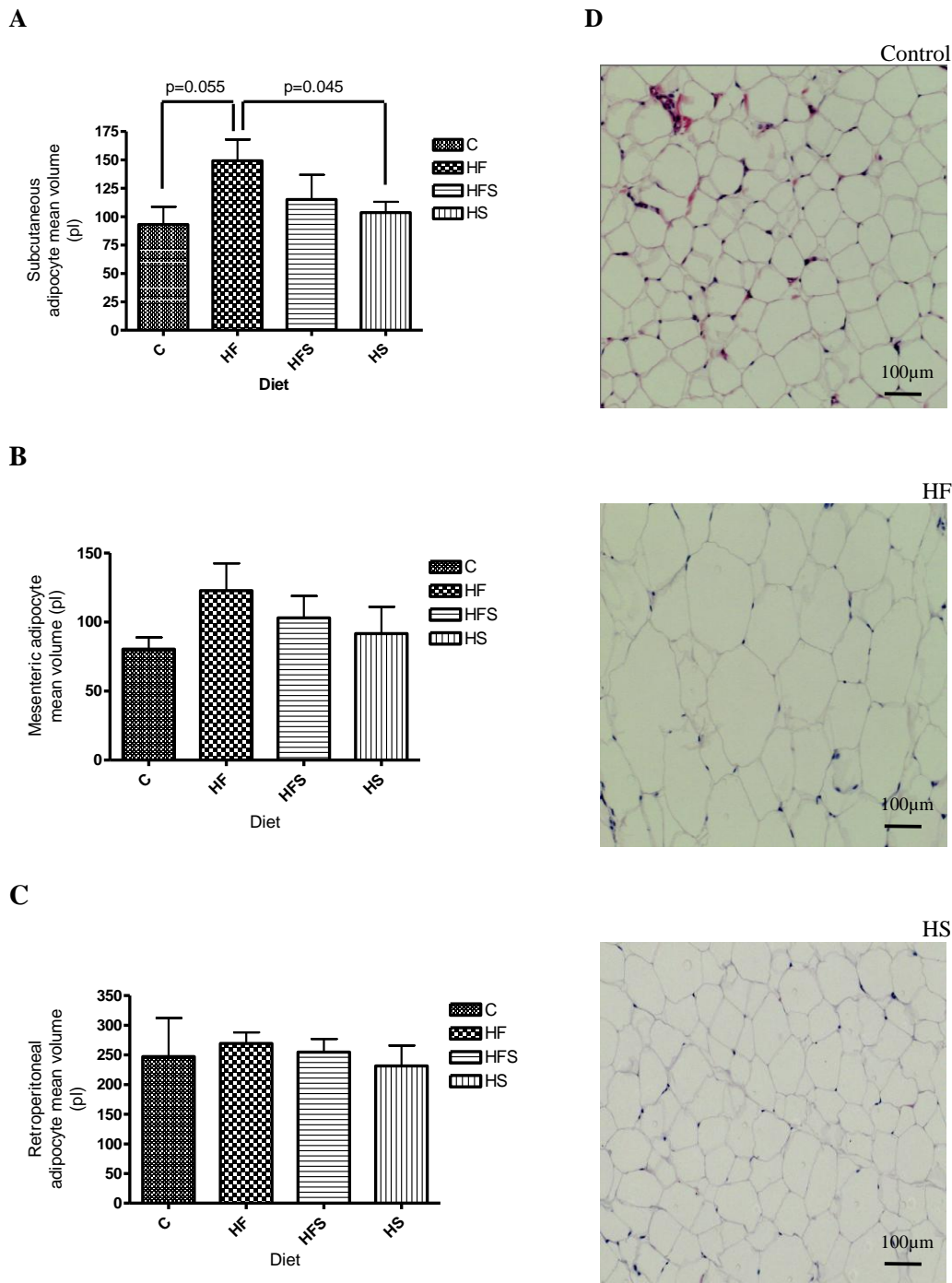


Fig. 2. Effect of chow diet (C), high-fat diet (HF), high-fat-sucrose diet (HFS) and high-sucrose diet on adipocyte size of Wistar rats. **(A)** Mean adipocyte volume of Wistar rats in subcutaneous fat pad. **(B)** Mean adipocyte volume of Wistar rats in mesenteric fat pad. **(C)** Mean adipocyte volume of Wistar rats in retroperitoneal fat pad. Three representative images **(D)** from hematoxylin and eosin stained paraffin sections of subcutaneous fat pads of Wistar rats fed with chow diet, high-fat diet and high-sucrose diet.

Regarding histological analyses, the present investigation showed that retroperitoneal adipose tissue is histologically different than mesenteric and subcutaneous ones, with greater adipocytes in basal conditions (26). On the other hand, rats fed with HF diet developed adipocyte hypertrophy in the subcutaneous adipose tissue without changes in adipocyte number. These results agree with those of Lemonnier et al (24), as a high-fat diet induced an increase in fat cell size in the subcutaneous fat depot of old female Zucker rats. However, in a previous study from our laboratory (3), rats fed with HF diet during 56 days presented an increase in the proliferation of subcutaneous adipocytes, estimated by DNA quantification. It could be explained by the different experimental feeding length and different technical approaches. Thus, according to the theory of the critical fat cell size (11), these differences can be due to lack of time of these adipocytes to achieve a maximal adipocyte size and thereby stimulate new cell production or differentiation. Taking into account that age is a significant factor in diet-induced changes in adipocyte morphology (30), other studies using young adult female rats (aged 2 month, as in our study) fed with a high-fat diet, reported adipocyte hyperplasia in both subcutaneous and visceral fat depots (2, 14), in addition to adipocyte hypertrophy. Likewise, it has been shown in male mice that dietary fats of different origin affect adipose tissue cellularity in a different manner (4).

On the other hand, the HS diet induced an increase in the number of new fat cells in the subcutaneous and retroperitoneal depots of Wistar rats. This has been previously reported by Tulp et al (36). Despite that the present study has not been found a clear adipocyte hypertrophy induced by the HFS diet, other investigations revealed an effect of the same diet on fat cells, increasing subcutaneous and retroperitoneal adipocyte sizes (12).

Regarding fat-depot differences in cellularity, it has been evidenced that mice fed with high-fat diet during 60 days had a greater proportion of new adipocytes in subcutaneous than visceral fat, while adipocyte hypertrophy was more pronounced in visceral adipose tissue (20). Although we have not found this depot-specific action, there are some differences in the methodology of both studies, as the high-fat diet used in such study (20) had only 45% of energy as fat while we used a diet with 60% of energy as fat. Moreover, the experimental period was longer.

Indeed, our findings suggest that rats fed on diets with different rate of fat/sugar develop obesity with different adiposity characteristics in a time dependent manner. Thus, a high-fat intake led mainly to adipocyte hypertrophy in subcutaneous adipose tissue, while a high sugar intake led to an increase of subcutaneous and retroperitoneal fat due to adipocyte hyperplasia. These findings provide new insights into the role of macronutrients, such fat and sugar, in the development of hyperplastic obesity, characterized by the formation of new fat cells and the severity of the clinical features. Finally, the results of this study demonstrated that this new software, *Adiposoft*, is a very useful tool to analyze adipose tissue cellularity, facilitating the determination of adipocytes diameters, volume, area and number in a great number of images, avoiding the relatively complex and delicate protocol for isolating adipocytes from the adipose tissue.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank to Línea Especial (LE/97) from the University of Navarra, the Comunidad de Trabajo de los Pirineos CTP (Navarra) and the Department of Education of the Government of Navarra for financial support. The technical assistance of Vanessa Fernández, Ana Lorente and Jose Antonio Ayala is gratefully acknowledged.

REFERENCES

1. Arner, E., P.O. Westermark, K.L. Spalding, T. Britton, M. Ryden, J. Frisen, S. Bernard, and P. Arner. (2009): Adipocyte Turnover: Relevance to Human Adipose Tissue Morphology. *Diabetes*. **In press**.
2. Aslan, H., B.Z. Altunkaynak, M.E. Altunkaynak, O. Vuraler, S. Kaplan, and B. Unal. (2006): Effect of a high fat diet on quantitative features of adipocytes in the omentum: an experimental, stereological and ultrastructural study. *Obes Surg*. **16**, 1526-1534.
3. Boqué, N., Campión, J., Milagro, F.I., Moreno-Aliaga, M.J., Martinez, J.A. (2009): Some cyclin-dependent kinase inhibitors-related genes are regulated by vitamin C in a model of diet-induced obesity. *Biol Pharm Bull*. **32**, 1462-1468.
4. Bourgeois, F., A. Alexiu, and D. Lemonnier. (1983): Dietary-induced obesity: effect of dietary fats on adipose tissue cellularity in mice. *Br J Nutr*. **49**, 17-26.
5. Capel, F., N. Viguerie, N. Vega, S. Dejean, P. Arner, E. Klimcakova, J.A. Martinez, W.H. Saris, C. Holst, M. Taylor, J.M. Oppert, T.I. Sorensen, K. Clement, H. Vidal, and D. Langin. (2008): Contribution of energy restriction and macronutrient composition to changes in adipose tissue gene expression during dietary weight-loss programs in obese women. *J Clin Endocrinol Metab*. **93**, 4315-4322.
6. Cousin, B., L. Casteilla, M. Lafontan, L. Ambid, D. Langin, M.F. Berthault, and L. Penicaud. (1993): Local sympathetic denervation of white adipose tissue in rats induces preadipocyte proliferation without noticeable changes in metabolism. *Endocrinology*. **133**, 2255-2262.
7. Crandall, D.L. and M. DiGirolamo. (1990): Hemodynamic and metabolic correlates in adipose tissue: pathophysiologic considerations. *Faseb J*. **4**, 141-147.
8. Chen, W.P., B.Y. Ho, C.L. Lee, C.H. Lee, and T.M. Pan. (2008): Red mold rice prevents the development of obesity, dyslipidemia and hyperinsulinemia induced by high-fat diet. *Int J Obes (Lond)*. **32**, 1694-1704.
9. DiGirolamo, M., J.B. Fine, K. Tagra, and R. Rossmanith. (1998): Qualitative regional differences in adipose tissue growth and cellularity in male Wistar rats fed ad libitum. *Am J Physiol*. **274**, R1460-1467.

10. Dugail, I., Quignard-Boulangé, A., Dupuy, F. (1986): Role of adipocyte precursors in the onset of obesity induced by overfeeding in suckling rats. *J. Nutr.* **116**, 524-535.
11. Faust, I.M. (1984): Role of the fat cell in energy balance physiology. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis.* **62**, 97-107.
12. Fernandes-Santos, C., R.E. Carneiro, L. de Souza Mendonca, M.B. Aguilá, and C.A. Mandarim-de-Lacerda. (2009): Pan-PPAR agonist beneficial effects in overweight mice fed a high-fat high-sucrose diet. *Nutrition.* **25**, 818-827.
13. Fernandez-Quintela, A., I. Churruca, and M.P. Portillo. (2007): The role of dietary fat in adipose tissue metabolism. *Public Health Nutr.* **10**, 1126-1131.
14. Gale, S.K., T.B. Van Itallie, and I.M. Faust. (1981): Effects of palatable diets on body weight and adipose tissue cellularity in the adult obese female Zucker rat (fa/fa). *Metabolism.* **30**, 105-110.
15. García-Díaz, D.F., Campion, J., Milagro, F.I., Lomba, A., Marzo, F., Martínez, J.A. (2007): Chronic mild stress induces variations in locomotive behavior and metabolic rates in high fat fed rats. *J Physiol Biochem.* **63**, 337-346.
16. Hausman, D.B., J.B. Fine, K. Tagra, S.S. Fleming, R.J. Martin, and M. DiGirolamo. (2003): Regional fat pad growth and cellularity in obese zucker rats: modulation by caloric restriction. *Obes Res.* **11**, 674-682.
17. Hermsdorff, H.H., A.C. Volp, and J. Bressan. (2007): [Macronutrient profile affects diet-induced thermogenesis and energy intake]. *Arch Latinoam Nutr.* **57**, 33-42.
18. Hirsch, J. and B. Batchelor. (1976): Adipose tissue cellularity in human obesity. *Clin Endocrinol Metab.* **5**, 299-311.
19. Hudgins, L.C., M.K. Hellerstein, C.E. Seidman, R.A. Neese, J.D. Tremaroli, and J. Hirsch. (2000): Relationship between carbohydrate-induced hypertriglyceridemia and fatty acid synthesis in lean and obese subjects. *J Lipid Res.* **41**, 595-604.
20. Joe, A.W., L. Yi, Y. Even, A.W. Vogl, and F.M. Rossi. (2009): Depot-Specific Differences in Adipogenic Progenitor Abundance and Proliferative Response to High-Fat Diet. *Stem Cells.* **27**, 2563-2570.
21. Kamgang, R., R.Y. Mboumi, P. N'Dille G, and J.N. Yonkeu. (2005): Cameroon local diet-induced glucose intolerance and dyslipidemia in adult Wistar rat. *Diabetes Res Clin Pract.* **69**, 224-230.

22. Koska, J., N. Stefan, S. Dubois, C. Trinidad, R.V. Considine, T. Funahashi, J.C. Bunt, E. Ravussin, and P.A. Permana. (2009): mRNA concentrations of MIF in subcutaneous abdominal adipose cells are associated with adipocyte size and insulin action. *Int J Obes (Lond)*. **33**, 842-850.
23. Kuo, L.E., J.B. Kitlinska, J.U. Tilan, L. Li, S.B. Baker, M.D. Johnson, E.W. Lee, M.S. Burnett, S.T. Fricke, R. Kvetnansky, H. Herzog, and Z. Zukowska. (2007): Neuropeptide Y acts directly in the periphery on fat tissue and mediates stress-induced obesity and metabolic syndrome. *Nat Med*. **13**, 803-811.
24. Lemmonier, D. (1972): Effect of age, sex, and site on the cellularity of the adipose tissue in mice and rats rendered obese by a high-fat diet. *J Clin Invest*. **51**, 2907-2915.
25. Lemmonier, D. (1972): Effect of age, sex, and sites on the cellularity of the adipose tissue in mice and rats rendered obese by a high-fat diet. *J Clin Invest*. **51**, 2907-2915.
26. Lopes, P.A., S.V. Martins, M.S. Pinho, C.M. Alfaia, C.M. Fontes, P.O. Rodrigues, G.S. Morais, M.F. Castro, R. Pinto, and J.A. Prates. (2008): Diet supplementation with the cis-9,trans-11 conjugated linoleic acid isomer affects the size of adipocytes in Wistar rats. *Nutr Res*. **28**, 480-486.
27. Llado, I., A. Pons, and A. Palou. (1999): Effects of fasting on lipoprotein lipase activity in different depots of white and brown adipose tissues in diet-induced overweight rats. *J Nutr Biochem*. **10**, 609-614.
28. Marques, B.G., D.B. Hausman, and R.J. Martin. (1998): Association of fat cell size and paracrine growth factors in development of hyperplastic obesity. *Am J Physiol*. **275**, R1898-1908.
29. Milagro, F.I., J. Campion, and J.A. Martinez. (2006): Weight gain induced by high-fat feeding involves increased liver oxidative stress. *Obesity (Silver Spring)*. **14**, 1118-1123.
30. Pouteau, E., S. Turner, O. Aprikian, M. Hellerstein, M. Moser, C. Darimont, L.B. Fay, and K. Mace. (2008): Time course and dynamics of adipose tissue development in obese and lean Zucker rat pups. *Int J Obes (Lond)*. **32**, 648-657.
31. Preuss, H.G., M. Zein, P. MacArthy, D. Dipette, S. Sabnis, and J. Knapka. (1998): Sugar-induced blood pressure elevations over the lifespan of three substrains of Wistar rats. *J Am Coll Nutr*. **17**, 36-47.

32. Roberts, R., L. Hodson, A.L. Dennis, M.J. Neville, S.M. Humphreys, K.E. Harnden, K.J. Micklem, and K.N. Frayn. (2009): Markers of de novo lipogenesis in adipose tissue: associations with small adipocytes and insulin sensitivity in humans. *Diabetologia*. **52**, 882-890.
33. Sánchez, J., Oliver, P., Palou, A., Picó, C. (2004): The inhibition of gastric ghrelin production by food intake in rats is dependent on the type of macronutrient. *Endocrinology*. **145**, 5049-5055.
34. Schoonmaker, J.P., F.L. Fluharty, and S.C. Loerch. (2004): Effect of source and amount of energy and rate of growth in the growing phase on adipocyte cellularity and lipogenic enzyme activity in the intramuscular and subcutaneous fat depots of Holstein steers. *J Anim Sci*. **82**, 137-148.
35. Shi, H., S. Akunuru, J.C. Bierman, K.M. Hodge, M.C. Mitchell, M.T. Foster, R.J. Seeley, and O. Reizes. (2009): Diet-induced obese mice are leptin insufficient after weight reduction. *Obesity (Silver Spring)*. **17**, 1702-1709.
36. Tulp, O.L., S.P. DeBolt, C.T. Hansen, and O.E.t. Michaelis. (1991): Effects of dietary carbohydrate and phenotype on adipose cellularity in female SHR/N-cp rats. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*. **99**, 229-234.
37. Weyer, C., Foley, J.E., Bogardus, C., Tataranni, P.A., Pratley, R.E. (2000): Enlarged subcutaneous abdominal adipocyte size, but not obesity itself, predicts type II diabetes independent of insulin resistance. *Diabetologia*. **43**, 1498-1506.

Capítulo 2. Screening of polyphenolic plant extracts for anti-obesity properties in Wistar rats

Screening of polyphenolic plant extracts for anti-obesity properties in Wistar rats

N. Boqué, J. Campión, R. de la Iglesia, A.L. de la Garza, F.I. Milagro, B. San Román,
O. Bañuelos, J. A. Martínez.

Enviado a Journal of the Science of Food and Agriculture

Resumen

El objetivo del estudio fue llevar a cabo un screening de extractos polifenólicos de plantas para evaluar un posible efecto protector frente a la obesidad utilizando un modelo de obesidad animal inducido por la dieta. Las ratas fueron alimentadas con una dieta con alto contenido en grasa y sacarosa (HFS), con o sin suplementación de diferentes extractos polifenólicos de plantas (almendra, manzana, canela, azahar, hamamelis, tila, vid roja y abedul) durante 56-64 días. Un grupo de ratas alimentadas con pienso se utilizaron como grupo control. La ganancia de peso fue menor en ratas suplementadas con los extractos de manzana, canela, hamamelis y abedul en comparación con el grupo HFS. Por otra parte, la ingesta de los extractos de manzana y canela previno el aumento de la masa grasa promovido por la dieta HFS. La resistencia a la insulina, calculada por el índice HOMA-IR, fue disminuida en ratas alimentadas con los extractos de manzana, canela, hamamelis y abedul. El extracto de manzana también previno la hiperglucemia e hiperleptinemia inducida por la dieta HFS. Sólo los extractos de manzana y canela se consideraron finalmente como extractos potencialmente anti-obesogénicos debido a su capacidad para disminuir la grasa corporal, mientras que la mejora de las complicaciones metabólicas relacionadas con la obesidad por los polifenoles de la manzana señalan este extracto como un ingrediente funcional prometedor para el tratamiento y la prevención de la obesidad y las complicaciones asociadas.

Screening of polyphenolic plant extracts for anti-obesity properties in Wistar rats

Noemi Boqué M.S.C.¹, Javier Campión Ph.D.¹, Rocío de la Iglesia M.S.C.¹, Ana L. de la Garza M.S.C.¹, Fermín I. Milagro Ph.D.¹, Belén San Román M.S.C.², Óscar Bañuelos Ph.D.², J. Alfredo Martínez Ph.D.^{1*}.

¹ Department of Nutrition, Food Science, Physiology and Toxicology. University of Navarra. 31009, Pamplona. Spain. ² Discovery Laboratory. Health and Nutrition Department. Biosearch S.A. 18004, Granada. Spain.

*To whom correspondence should be addressed.

Tel. 0034-948-425600 Fax: 0034-948-425649, e-mail address: jalfmtz@unav.es

CORRESPONDING AUTHOR

Prof. J. Alfredo Martínez
Department of Nutrition, Food Science, Physiology and Toxicology
University of Navarra
C/Irunlarrea s/n
31008 Pamplona, SPAIN
Phone: 0034 948 425600
Fax: 0034 948 425649
E-mail address: jalfmtz@unav.es

Abstract

Objective: To conduct a screening for potential antiobesity polyphenolic plant extracts using a diet-induced animal model.

Methods: Rats were fed a high-fat-sucrose (HFS) diet with or without supplementation of different polyphenolic plant extracts (almond, apple, cinnamon, orange blossom, hamamelis, lime blossom, grape vine, and birch) for 56-64 days. Chow-fed rats were used as control group.

Results: Body weight gain was lower in rats supplemented with apple, cinnamon, hamamelis and birch extracts as compared to HFS non-supplemented group. Moreover, apple and cinnamon extracts prevented the increase in fat mass promoted by the HFS diet. Insulin resistance, estimated by the HOMA-IR index, was reduced in rats fed apple, cinnamon, hamamelis and birch extracts. Apple extract also prevented the HFS-induced hyperglycemia and hyperleptinemia.

Conclusions: Only apple and cinnamon extracts were finally considered as potentially important anti-obesogenic extracts, due to their body fat-lowering effects, while the improvement of obesity-related metabolic complications by apple polyphenols highlights this extract as a promising functional food ingredient for the management of obesity and its metabolic complications.

KEY WORDS: screening, plant extracts, polyphenols, high-fat-sucrose diet, anti-obesity, adipose tissue.

INTRODUCTION

Obesity, defined by the World Health Organization (WHO) as an abnormal or excessive fat accumulation that may impair health, is becoming one of the greatest challenges to global health in this millennium, with more than 200 million men and nearly 300 million women obese globally in 2008.¹ Due to these increasing obesity rates, the WHO has prompted to consider it as the epidemic of XXI century and to promote different strategies to prevent and control its progress.²

Plant extracts, defined as raw or refined products derived from plants or parts of plants (e.g. leaves, stems, buds, flowers, roots, or tubers), are frequently used for the treatment of diseases.³ Nowadays, there is scientific data supporting the evidence that some plant components have beneficial physiological effects.^{4,5} Thus, research concerning new natural compounds addressing the treatment of obesity is increasing due to their low side-effects compared with conventional pharmacological agents as well as their potential applications for the development of new functional foods.

Here, we focused on the research of the potential effects of polyphenolic natural extracts on obesity prevention. Polyphenols possess multiple phenol substructures, consisting in one or more aromatic rings with one or more hydroxyl groups. These compounds are widespread constituents of plant foods (fruits, vegetables, cereals, olive, legumes, *etc.*) and partially responsible for their overall organoleptic properties.⁶ Moreover, polyphenols are the most abundant antioxidants in the diet.⁷

Scientific research provides evidence that polyphenols could offer some protection against the development of chronic diseases such as cardiovascular diseases⁸, cancers⁹, diabetes^{10,11} and neurodegenerative diseases.^{12,13} In the past two decades, interest has been focused on the potential biological effects of polyphenols on the prevention of obesity and associated clinical manifestations. In this sense, it has been shown that dietary polyphenols supplementation reduces body weight gain and adipose tissue in rodents fed a hypercaloric diet, while prevents the dietary-induced hepatic steatosis.^{14,15,16}

In this context, since new extraction technologies and procedures^{17,18} have led to the identification and characterization of many plant polyphenols, rapid and accurate screening for large number of polyphenols is required. Therefore, the purpose of this study was to conduct a screening for potential antiobesity polyphenolic plant extracts using a HFS diet-induced animal model.

MATERIALS AND METHODS

Plant extracts. All plant extracts were provided by Biosearch S.A. (Granada, Spain). The polyphenolic composition of all the extracts tested in this study is given in table 1, accompanied by the scientific name of each plant.

Table 1. Composition and daily doses of polyphenolic plant extracts^a

Plant polyphenolic extract	Scientific name	Active principles	Daily dose (% w/w)
Almond	<i>Prunus dulcis</i> D. A. Webb	35% total polyphenols	1.7%
Apple	<i>Malus domestica</i> Borkh	80% total polyphenols, 5% phloridzine	1.4%
Cinnamon	<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Blume	1% oligomeric proanthocyanidins	2%
Orange blossom	<i>Citrus aurantium</i> L.	6% flavonoids	4%
Hamamelis	<i>Hamamelis virginiana</i> L.	15% total polyphenols	2%
Lime blossom	<i>Tilia tomentosa</i> Moench	1% flavonoids	1%
Grape vine	<i>Vitis vinifera</i> L.	3% flavonoids	3%
Birch	<i>Betula alba</i> L.	2% flavonoids	5%

^a % w/w indicates grams of polyphenolic plant extract per 100 grams of food intake.

Determination of Bioactive Compounds. The determination of total phenols was performed with a spectrophotometric technique using the Folin-Ciocalteu reagent.¹⁹ Gallic acid was used as a standard for the calibration curve. All samples and standards were dissolved in water and the absorbance was measured at 760 nm. Total flavonoids content was determined by HPLC using pure compounds diluted in ethanol

as standards. Samples were dissolved in water:ethanol (1:1). Standard flavonoids used were hesperidin for orange blossom extract, rutin for birch extract, vitexin for grape vine extract and cumarin for cinnamon extract. UV absorbance was measured at 270, 280 and 365 nm depending on the extract. Oligomeric procyanidins were quantified by HPLC using pure catechin diluted in water:ethanol (1:1) as standard. Samples were dissolved in water and the approximate retention times for trimers, tetramers and pentamers were 20, 27 and 30 minutes. UV absorption was determined at 278 nm. Finally, phloridzine was quantified by HPLC using pure compounds diluted in methanol as standards. Samples were dissolved in methanol and its absorbance quantified at 210 nm.

Animals. Assays were separately performed in two experimental sets. Thus, screening for almond and apple polyphenolic plant extracts was carried out during the “Experimental Set 1” while screening for cinnamon, orange blossom, hamamelis, lime blossom, grape vine, and birch polyphenolic plant extracts was performed during the “Experimental Set 2”. For this purpose, male Wistar rats from CIFA (Center for Applied Pharmacobiology Research) of the University of Navarra (Pamplona, Spain) with an initial average weight of 333 ± 30 g were kept in an isolated room with a constantly regulated temperature between 21 and 23°C and controlled humidity (50±10%) under a 12h/12h artificial light/dark cycle. Animals were randomly assigned into 4 different groups (n=12) for the “Experimental Set 1” and 8 different groups (n=12) for the “Experimental Set 2” and were fed a HFS diet with or without supplementation of different polyphenolic plant extracts during 56 and 64 days respectively. Daily doses of each polyphenolic plant extract are shown in Table 1. Chow-fed rats were used as control group in both models and were fed a standard pelleted diet from Harlan Ibérica (Barcelona, Spain) containing 20% of energy as proteins, 67% as carbohydrates (5% sucrose, 62% starch) and 13% as fat by dry weight (290 Kcal/100g). The composition of the HFS diet (473 Kcal/100g) from Research Diets (D12451, New Brunswick, NJ, USA) was 20% of energy as protein, 35% as carbohydrates (18% sucrose, 10% maltodextrin and 7% starch) and 45% as lipids by dry weight.

Rats had *ad libitum* water and food access, while body weight and food intake were recorded weekly. After finishing the experimental feeding period, rats were sacrificed, blood was collected from the trunk and serum stored at -20°C. Tissue samples of liver, muscles and retroperitoneal, mesenteric, epididymal and subcutaneous (inguinal) white adipose tissue (WAT) were isolated, weighed and immediately stored at -80°C. All the performed procedures agreed with the national and institutional guidelines of the Animal Care and Use Committee at the University of Navarra.

Serum measurements. Serum glucose was measured with the HK-CP kit (ABX Pentra, Montpellier, France) and total cholesterol was determined with the Cholesterol-CP kit (ABX Pentra, Montpellier, France) adapted for the COBAS MIRA equipment (Roche, Basel, Switzerland). Leptin and insulin quantification was performed by specific ELISA Kits (Linco Research, Missouri, USA and Mercodia AB, Uppsala, Sweden) in the automated ELISA immunoassay analyzer TRITURUS (Grifols International S.A., Barcelona, Spain). Finally, the homeostatic model assessment-insulin resistance (HOMA-IR) was calculated using the formula: [fasting insulin ($\mu\text{U/mL}$) x fasting glucose (mM)/22.5] as described elsewhere (Pickavance, Brand, Wassermann, & Wilding, 2005).

Statistics. All results are expressed as the percentage increase or decrease induced by almond and apple extracts with respect to the mean of HFS group of “Experimental Set 1” and increase or decrease induced by cinnamon, orange blossom, hamamelis, lime blossom, grape vine and birch extracts with respect to the mean of HFS group of “Experimental Set 2”. The effects of dietary HFS intake were not significantly different between both sets; therefore, when comparing HFS group to control group, the mean of both experimental sets was used. Statistical analyses were performed using the ANOVA test while the Dunnett’s test post-hoc was used to test differences between each group against HFS group. A level of probability up at $p < 0.05$ was set up as statistically significant and $p < 0.01$ as very statistically significant. For the statistical tests, SPSS software for Windows 15.0 was applied (Chicago, IL, USA).

RESULTS

Rats fed a HFS diet exhibited higher body weight gain as compared to chow-fed animals ($\uparrow 60\%$, $p < 0,01$), which was accompanied by an increase in energy food intake ($\uparrow 30\%$, $p < 0,05$). As expected, subcutaneous and visceral fat mass weight was markedly increased by HFS feeding ($\uparrow 69\%$, $p < 0,01$; $\uparrow 63\%$, $p < 0,01$). In addition, glucose levels raised significantly ($\uparrow 12\%$, $p < 0,05$) in animals fed a HFS diet in comparison to control group while the intake of this diet induced a clear hyperinsulinemia and hyperleptinemia in these animals ($\uparrow 156\%$, $p < 0,01$; $\uparrow 160\%$, $p < 0,01$). Our data provide evidence that HFS-diet feeding resulted in a well-established model of diet-induced obesity in male Wistar rats.

Regarding the screening of polyphenolic plant extracts for the prevention of obesity, body weight gain was significantly lower in rats supplemented with apple, cinnamon, hamamelis and birch extracts as compared to HFS non-supplemented animals (Table 2), despite a similar daily food intake in all groups (from 92 to 97 Kcal/rat/day in “Experimental Set 1” and from 94 to 100 Kcal/rat/day in “Experimental Set 2”). Moreover, cinnamon-fed animals had attenuated food efficiency, while birch-fed animals presented a statistical tendency towards lower food efficiency (Table 2). Importantly, apple and cinnamon plant extracts prevented the increase in total WAT promoted by the HFS diet (Table 2). This fact was accompanied by a significant reduction of visceral WAT in animals whose diet was supplemented with apple, while it tended to be lower in cinnamon-fed animals against HFS non-supplemented animals (Table 2). As shown in figure 1, different effects of polyphenolic plant extracts on subcutaneous, retroperitoneal, epididymal and mesenteric fat pads revealed a depot-specific action. Thus, cinnamon extract intake led to significant reduction of subcutaneous fat mass, without changes in the other fat depots weights, whereas apple extract intake led to significant reduction of epididymal and mesenteric fat mass, with a tendency to decrease subcutaneous fat pad weight.

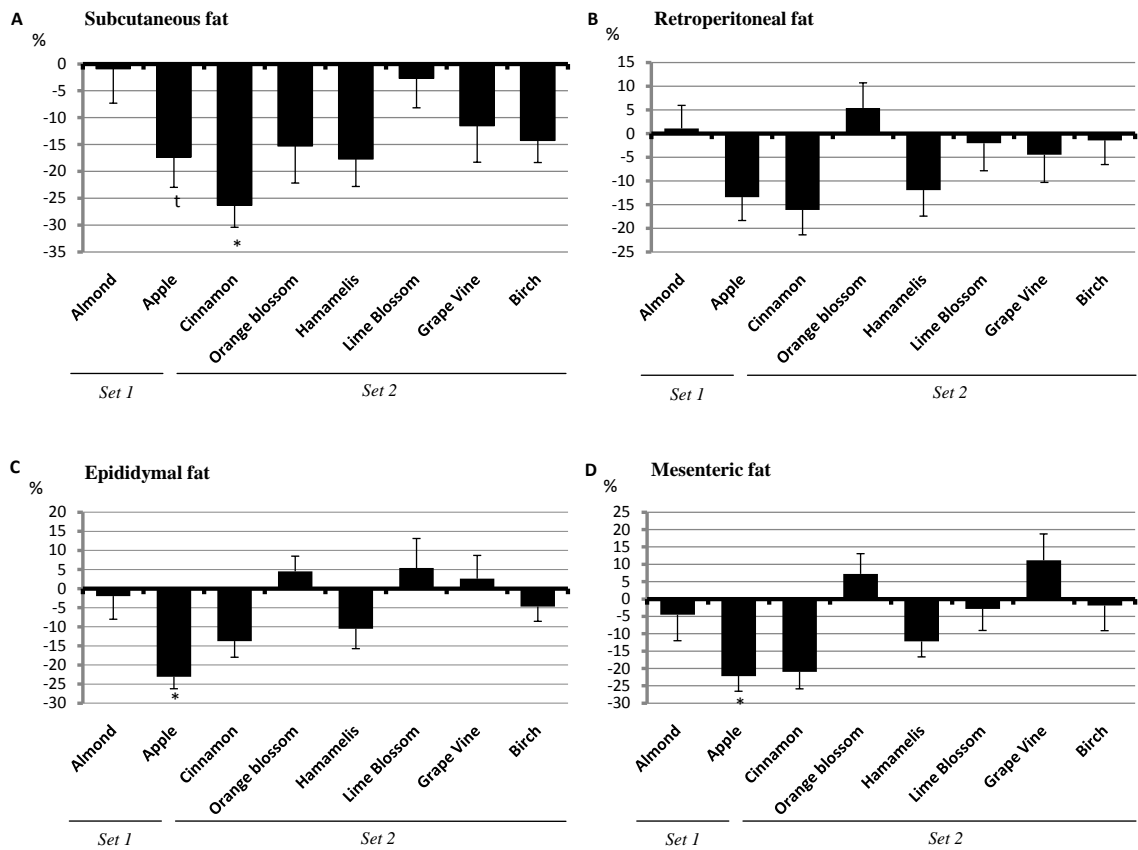


Fig. 1. Percentage increase/decrease of fat depot weights (g/Kg body weight) from male Wistar rats fed a high-fat-sucrose (HFS) diet supplemented with different polyphenolic plant extracts during 64 days respect to HFS-fed rats (considered as 0). A, Subcutaneous fat depot; B, Retroperitoneal fat depot; C, Epididymal fat depot; D, Mesenteric fat depot.

Table 2. Body-related and tissue measurements of male Wistar rats fed with HFS diet with or without supplementation of different plant extracts ^a

	Group (HFS + plant extract)							
	Experimental Set 1				Experimental Set 2			
	Almond (n=12)	Apple (n=12)	Cinnamon (n=12)	Orange blossom (n=12)	Hamamelis (n=12)	Lime blossom (n=12)	Grape vine (n=12)	Birch (n=12)
Body weight measurements (% change)								
Final body weight	↓ 3.01% ± 2.07%	↓ 4.83% ± 2.52%	↓ 8.99% ± 2.23%	↓ 4.45% ± 2.83%	↓ 7.31% ± 2.57%	↓ 6.18% ± 3.81%	↓ 1.97% ± 2.38%	↓ 7.60% ± 2.94%
Weight gain	↓ 11.20% ± 3.37%	↓ 17.30% ± 4.67% **	↓ 24.67% ± 3.98% **	↓ 13.08% ± 5.20%	↓ 19.69% ± 3.58% *	↓ 15.70% ± 6.27%	↓ 7.38% ± 4.03%	↓ 19.61% ± 5.35% *
Food efficiency	↓ 13.74% ± 7.90%	↓ 21.84% ± 8.88%	↓ 23.01% ± 4.35% *	↓ 11.00% ± 5.32%	↓ 13.61% ± 3.85%	↓ 11.55% ± 6.57%	↓ 6.50% ± 4.07%	↓ 17.67% ± 5.48% t
Tissue weights (% change)								
Total WAT weight	↓ 1.02% ± 5.22%	↓ 18.24% ± 3.90% *	↓ 19.08% ± 4.00% *	↓ 0.62% ± 3.66%	↓ 13.25% ± 4.26%	↓ 0.25% ± 5.36%	↑ 0.21% ± 5.35%	↓ 5.31% ± 3.60%
Visceral WAT weight	↓ 2.08% ± 5.26%	↓ 19.02% ± 3.99% *	↓ 16.11% ± 4.23% t	↑ 5.38% ± 3.25%	↓ 11.44% ± 4.33%	↑ 0.75% ± 5.79%	↑ 5.00% ± 5.06%	↓ 1.65% ± 4.16%
Liver weight	↓ 3.89% ± 3.04%	↑ 0.07% ± 2.96%	↑ 4.49% ± 8.98%	↓ 0.01% ± 3.22%	↑ 8.10% ± 2.55%	↑ 3.67% ± 4.02%	↑ 2.98% ± 2.00%	↑ 11.21% ± 1.96% *
Soleus muscle weight	↓ 7.75% ± 4.00%	↑ 4.45% ± 4.05%	↑ 6.87% ± 4.43%	↑ 0.59% ± 3.68%	↑ 19.92% ± 4.32% *	↑ 0.39% ± 8.38%	↑ 13.67% ± 2.85%	↑ 1.30% ± 4.53%
EDL muscle weight	↑ 0.32% ± 2.54%	↑ 3.77% ± 2.31%	↑ 5.29% ± 4.17%	↑ 1.89% ± 5.29%	↑ 11.52% ± 4.81%	↑ 2.92% ± 3.22%	↑ 0.78% ± 5.47%	↓ 6.15% ± 5.15%
Gastrocnemius muscle weight	↓ 0.01% ± 2.07%	↑ 6.86% ± 2.41% t	↑ 9.16% ± 2.22%	↑ 0.83% ± 3.16%	↑ 7.11% ± 3.27%	↑ 2.07% ± 2.80%	↑ 2.47% ± 3.45%	↑ 2.90% ± 2.14%
Total muscle weight	↓ 0.42% ± 2.16%	↑ 5.75% ± 2.28%	↑ 8.20% ± 2.38%	↑ 1.10% ± 3.36%	↑ 8.82% ± 3.21%	↑ 2.26% ± 2.83%	↑ 2.60% ± 3.58%	↑ 0.57% ± 2.59%

^aAll the results (mean ± SE) are expressed as the percentage increase (↑)/decrease (↓) compared to the respective HFS control group. Food efficiency was calculated as grams of body weight gain per 100 Kcal of food intake. Tissue weights were calculated as grams per Kg of body weight. Statistical analyses were performed using Anova test and Dunnett's test was used to test differences between each group against HFS group. Total WAT weight indicates the sum of the subcutaneous, retroperitoneal, mesenteric and epididymal fat pad weights. Visceral WAT weight indicates the sum of the retroperitoneal, mesenteric and epididymal fat pad weights. Total muscle weight indicates the sum of the soleus, EDL and gastrocnemius muscle weight. HFS, high-fat-sugar; WAT, white adipose tissue; EDL, extensor digitorum longus; *; p<0.05; **; p<0.01; t; p<0.1.

On the other hand, in order to determine whether body weight loss could be due at least in part to changes in liver or muscle weights, these values were analyzed. Liver weight was unchanged in all groups except in animals fed birch extract that presented an increased hepatic mass (Table 2). Likewise, regarding effects of polyphenolic extracts on muscle mass, total muscle weight was unchanged in supplemented rats. Even so, hamamelis extract was able to increase soleus muscle weight (Table 2), while apple extract consumption led to a slightly but not significant increase in gastrocnemius muscle weight as compared to HFS-fed rats.

Given that biochemical measurements are important to assess possible benefits of plant polyphenols on obesity and metabolic syndrome, we evaluated whether the ingestion of the polyphenolic extracts tested in this study together with a HFS diet could revert the effects of this obesogenic diet on serum values. Therefore, we selected the most effective extracts (as evaluated by the results previously described) and we measured biochemical parameters in the supplemented groups with apple, cinnamon, hamamelis and birch extracts. These results showed that supplementation with apple extract was able to prevent the hyperglycemia caused by HFS diet (Table 3). Moreover, although cholesterol levels were not affected by HFS feeding, supplementation of this diet with apple extract decreased cholesterol serum levels, whereas supplementation with birch extract resulted in an unexpected increase in cholesterol levels in comparison to HFS group (Table 3). Interestingly, apple extract prevented the HFS-induced hyperleptinemia (Table 3). Finally, rats supplemented with hamamelis extract displayed lower insulin levels than HFS-fed animals, and the same occurred with rats supplemented with apple, although it did not reach statistical significance. Even so, the four analyzed plant extracts were able to improve insulin resistance as determined by HOMA-IR index (Table 3).

Table 3. Biochemical measurements of male Wistar rats fed with HFS diet with or without supplementation of different plant extracts^a

	Group (HFS + plant extract)			
	Experimental Set 1	Experimental Set 2		
	Apple (n=12)	Cinnamon (n=12)	Hamamelis (n=12)	Birch (n=12)
Biochemical measurements				
Glucose (mmol/l)	↓ 13.41% ± 3.40% *	↓ 0.76% ± 4.67%	↓ 7.55% ± 3.77%	↓ 3.20% ± 2.99%
Total cholesterol (mg/dl)	↓ 14.52% ± 4.94% *	↓ 3.64% ± 5.01%	↓ 0.26% ± 4.80%	↑ 21.70% ± 3.09% *
Leptin (ng/ml)	↓ 26.63% ± 7.91% *	↓ 22.26% ± 13.04%	↓ 28.35% ± 7.20%	↓ 11.38% ± 9.61%
Insulin (μU/ml)	↓ 36.11% ± 10.88% t	↓ 27.26% ± 14.30%	↓ 45.72% ± 7.97% **	↓ 29.13% ± 13.20%
HOMA-IR	↓ 48.20% ± 8.64% *	↓ 33.21% ± 7.78% *	↓ 43.18% ± 8.18% **	↓ 32.89% ± 10.39% *

^aAll the results are expressed as the percentage increase/decrease respect HFS group ± SE. Statistical analyses were performed using Anova test and Dunnet's test post-hoc, or using Student's t-test when two groups were compared. HFS, high-fat-sucrose; HOMA-IR, homeostatic model assessment of insulin resistance. ↑, increase respect HFS group; ↓, decrease respect HFS group. *, p<0.05; **, p<0.01; t, p<0.1.

DISCUSSION

Recent evidence concerning protective effects of polyphenols administration against chronic diseases^{21,22} has become of great interest to the food industry regarding research on new polyphenol-rich ingredients for the development of functional foods or nutritional supplements. Since obesity is one of the key targets for new functional foods²³, the aim of this study was to screen different polyphenolic plant extracts for the prevention of obesity using a diet-induced obesity rodent model.

The establishment of a diet-induced obesity model is essential for the study of natural compounds with anti-obesity properties. Thus, combinations of simple carbohydrate and saturated fat-rich dietary components have been used in rodents to mimic signs and symptoms of human obesity and metabolic syndrome.^{24,25} Indeed, HFS-fed animals is considered probably the best model to test pharmaceutical and nutraceutical preparations for the treatment or prevention of diet-induced human obesity and metabolic syndrome, as concluded in some reviews.²⁶ Therefore, the first objective of this work was to establish a diet-induced obesity model in male Wistar rats. As described before by our research group^{24,25}, long-term HFS feeding resulted in increased body weight, food efficiency and adiposity as well as development of marked hyperleptinemia and insulin resistance, leading to commonly associated undesirable Western diet features.

Next step, and the main objective of this study, was to test different polyphenolic plant extracts in diet-induced obesity animals and select those that could exhibit some promising anti-obesity properties, as assessed by the effects observed on body weight gain and tissue weights. Taking into account that apple, cinnamon, hamamelis and birch plant extracts prevented the increase in body weight gain induced by HFS diet, while cinnamon and birch extracts also reduced food efficiency, this was considered as an important issue for the identification of potential anti-obesity polyphenolic plant extracts. Notably, apple and cinnamon were the only plant extracts that reduced total and visceral WAT weight increase in Wistar rats. It is well known that a key issue in the prevention of obesity is to impede diet-induced body fat accumulation. Furthermore, fat depot-specific effects of these plant extracts, revealed that apple anti-adiposity effects were more pronounced in epididymal and retroperitoneal fat depots (both visceral fat pads) whereas cinnamon effects were more important at subcutaneous level. This finding has to be considered, inasmuch as obesity-associated complications are particularly related to visceral adipose tissue, which is more metabolically active and produces larger amounts of adipocytokines.²⁷ Moreover, the anti-adipogenic effects of apple polyphenols were previously described in a chow-fed rat model, although there were not changes in body weight gain.²⁸

On the other hand, birch extract supplementation led to higher hepatic mass, indicating a possible increase in liver fat deposition. Even so, specific analyses to determine hepatic fat content, like hepatic triglycerides measurement or lipid staining, should be performed. Furthermore, lack of muscle mass loss in polyphenol-supplemented groups is important to be considered, as sometimes lower body weight is due to reduced lean mass instead of reduced body fat.²⁹ Accordingly, results from this preliminary screening revealed that of the eight polyphenolic extracts tested, apple, cinnamon, hamamelis and birch presented significant properties against the obesogenic effects of HFS intake.

With the purpose of determining the polyphenolic plant extracts that could enhance the biochemical profile aggravated by HFS feeding, biochemical measurements were analyzed in these extracts that were selected as the most promising anti-obesity extracts in the preliminary screening. Reduction in HOMA-IR, an insulin resistance

index, in the four analyzed groups evidenced that apple, cinnamon, hamamelis and birch polyphenols could improve the insulin resistance state associated to obesity. These findings agree with the results presented in several articles ^{30,31} pointing out that different plant polyphenolic extracts present beneficial actions on insulin resistance. However, only apple extract could prevent HFS-diet induced hyperglycemia. In line with this glucose-lowering effect, Johnston et al. ³² described substantial reduction of glycemia in humans by naturally occurring phenolic compounds in apple juice. Although we did not find any changes in serum glucose levels of cinnamon-supplemented diet-induced obese rats, Jia Q et al. ³³ reported that polyphenolic oligomers found in cinnamon reduced glucose levels in Wistar and streptozotocin-induced diabetic rats fed a standard laboratory diet. Moreover, cinnamon polyphenols have been described to reduce fasting serum glucose in subjects with type 2 diabetes or metabolic syndrome.³⁴

On the other hand, prevention of HFS-diet induced hyperleptinemia by apple extract supplementation was consistent with the reduced total WAT weight, as this adipokine is secreted in direct proportion to body fat amount.³⁵ Moreover, apple extract was the only one that was able to inhibit diet-induced hypercholesterolemia. This effect has been previously shown in overweight humans supplemented with apple polyphenols ³⁶ but it has not been evidenced in supplemented chow-fed animals.²⁸ Surprisingly, birch extract supplementation resulted in increased levels of serum cholesterol. This fact could be possibly explained by the increased hepatic mass seen in this group.

Regarding the possible mechanisms implicated on the anti-obesogenic effects of polyphenols, *in vitro* studies demonstrated that they could act as inhibitors of adipocyte differentiation ^{37,38}, lipogenesis ³⁹, lipolysis ⁴⁰ or intestinal lipid absorption ⁴¹ as well as inducers of fatty acid oxidation ³⁹ or antagonist at cannabinoid receptors.⁴² Moreover, the effects of polyphenols on lipogenesis, lipid absorption and energy homeostasis have been validated *in vivo*.^{14,15,16,43} Another mechanism that could explain their antiobesity properties is the attenuation of inflammatory changes, evidenced in coculture of adipocytes and macrophages.^{44,45}

CONCLUSIONS

The screening performed in this work, led to the identification of four polyphenolic plant extracts with potential anti-obesity properties (apple, cinnamon, hamamelis and birch extracts) as they presented some beneficial effects on different weight parameters. Even so, only apple and cinnamon extracts were finally considered as significant anti-obesigenic extracts, due to their body fat-lowering effects. Actually, apple polyphenolic extract displayed the most outstanding properties, highlighting this extract as the most promising functional food ingredient for the prevention of obesity, as reflected by the improvement of obesity-related metabolic complications, such as hyperglycemia and hyperleptinemia.

ABBREVIATIONS USED

HFS	High-fat-sucrose
HOMA-IR	Homeostatic model assessment-Insulin resistance
UV	Ultraviolet
WAT	White adipose tissue
WHO	World Health Organization

FUNDINGS AND ACKNOWLEDGMENTS

Research related to this work was funded by Biosearch SA in the framework of the PRONOS project granted by the Center for Industrial Technological Development (CDTI) and by the Asociación de Amigos de la Universidad de Navarra. The technical assistance of Vanessa Fernández and Ana Lorente is gratefully acknowledged.

REFERENCES

1. WHO, Obesity and Overweight. *Fact Sheet Number 311* (Updated february 2011).
2. WHO, Global Strategy on Diet, Physical Activity and Health. *WHA document A57/9* (2004).
3. Hasani-Ranjbar S, Nayebi N, Larijani B, Abdollahi M, A systematic review of the efficacy and safety of herbal medicines used in the treatment of obesity. *World J Gastroenterol* **15**:3073-85 (2009).
4. Chandan BK, Saxena AK, Shukla S, Sharma N, Gupta DK, Suri KA, Suri J, Bhadauria M, Singh B, Hepatoprotective potential of Aloe barbadensis Mill. against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity. *J Ethnopharmacol* **111**:560-6 (2007).
5. Moustafa AM, Ahmed SH, Nabil ZI, Hussein AA, Omran MA, Extraction and phytochemical investigation of Calotropis procera: effect of plant extracts on the activity of diverse muscles. *Pharm Biol* **48**:1080-190 (2010).
6. Dai J MR, Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* **15**:7313-52 (2010).
7. Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M, Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr* **81**:215S-7S (2005).
8. Vita JA, Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function. *Am J Clin Nutr* **81**:292S-7S (2005).
9. Lambert JD, Hong J, Yang GY, Liao J, Yang CS, Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. *Am J Clin Nutr* **81**:284S-91S (2005).
10. Matsui T, Ebuchi S, Kobayashi M, Fukui K, Sugita K, Terahara N, Matsumoto K, Anti-hyperglycemic effect of diacylated anthocyanin derived from Ipomoea batatas cultivar Ayamurasaki can be achieved through the alpha-glucosidase inhibitory action. *J Agric Food Chem* **50**:7244-8 (2002).
11. Rizvi SI, Zaid MA, Anis R, Mishra N, Protective role of tea catechins against oxidation-induced damage of type 2 diabetic erythrocytes. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **32**:70-5 (2005).
12. Aquilano K, Baldelli S, Rotilio G, Ciriolo MR, Role of nitric oxide synthases in Parkinson's disease: a review on the antioxidant and anti-inflammatory activity of polyphenols. *Neurochem Res* **33**:2416-26 (2008).

13. Markus MA, Morris BJ, Resveratrol in prevention and treatment of common clinical conditions of aging. *Clin Interv Aging* **3**:331-9 (2008).
14. Beltran-Debon R, Rull A, Rodriguez-Sanabria F, Iswaldi I, Herranz-Lopez M, Aragonés G, Camps J, Alonso-Villaverde C, Menendez JA, Micol V, Segura-Carretero A, Joven J, Continuous administration of polyphenols from aqueous rooibos (*Aspalathus linearis*) extract ameliorates dietary-induced metabolic disturbances in hyperlipidemic mice. *Phytomedicine* **18**:414-24 (2011).
15. Bose M, Lambert JD, Ju J, Reuhl KR, Shapses SA, Yang CS, The major green tea polyphenol, (-)-epigallocatechin-3-gallate, inhibits obesity, metabolic syndrome, and fatty liver disease in high-fat-fed mice. *J Nutr* **138**:1677-83 (2008).
16. Yang DJ, Chang YY, Hsu CL, Liu CW, Lin YL, Lin YH, Liu KC, Chen YC, Antiobesity and hypolipidemic effects of polyphenol-rich longan (*Dimocarpus longans* Lour.) flower water extract in hypercaloric-dietary rats. *J Agric Food Chem* **58**:2020-7 (2010).
17. Virot M, Tomao V, Le Bourvellec C, Renard CM, Chemat F, Towards the industrial production of antioxidants from food processing by-products with ultrasound-assisted extraction. *Ultrason Sonochem* **17**:1066-74 (2010).
18. Yang L, Jiang JG, Li WF, Chen J, Wang DY, Zhu L, Optimum extraction process of polyphenols from the bark of *Phyllanthus emblica* L. based on the response surface methodology. *J Sep Sci* **32**:1437-44 (2009).
19. Ainsworth EA, Gillespie KM, Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nat Protoc* **2**:875-7 (2007).
20. Pickavance LC, Brand CL, Wassermann K, Wilding JP, The dual PPAR α / γ agonist, ragaglitazar, improves insulin sensitivity and metabolic profile equally with pioglitazone in diabetic and dietary obese ZDF rats. *Br J Pharmacol* **144**:308-16 (2005).
21. Bansal P, Paul P, Mudgal J, P GN, Thomas Pannakal S, Priyadarsini KI, Unnikrishnan MK, Antidiabetic, antihyperlipidemic and antioxidant effects of the flavonoid rich fraction of *Pilea microphylla* (L.) in high fat diet/streptozotocin-induced diabetes in mice. *Exp Toxicol Pathol* **In press** (2011).

22. Jew S, AbuMweis SS, Jones PJ, Evolution of the human diet: linking our ancestral diet to modern functional foods as a means of chronic disease prevention. *J Med Food* **12**:925-34 (2009).
23. Palou A, Pico C, Bonet ML, Food safety and functional foods in the European Union: obesity as a paradigmatic example for novel food development. *Nutr Rev* **62**:S169-81 (2004).
24. Boque N, Campion J, Paternain L, Garcia-Diaz DF, Galarraga M, Portillo MP, Milagro FI, Ortiz de Solorzano C, Martinez JA, Influence of dietary macronutrient composition on adiposity and cellularity of different fat depots in Wistar rats. *J Physiol Biochem* **65**:387-95 (2009).
25. Lomba A, Milagro FI, Garcia-Diaz DF, Marti A, Campion J, Martinez JA, Obesity induced by a pair-fed high fat sucrose diet: methylation and expression pattern of genes related to energy homeostasis. *Lipids Health Dis* **9**:60 (2010).
26. Panchal SK, Brown L, Rodent models for metabolic syndrome research. *J Biomed Biotechnol* **2011**:Article ID 351982 (2011).
27. Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS, Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab* **83**:847-50 (1998).
28. Nakazato K, Song H, Waga T, Effects of dietary apple polyphenol on adipose tissues weights in Wistar rats. *Exp Anim* **55**:383-9 (2006).
29. Breslow MJ, Min-Lee K, Brown DR, Chacko VP, Palmer D, Berkowitz DE, Effect of leptin deficiency on metabolic rate in ob/ob mice. *Am J Physiol* **276**:E443-9 (1999).
30. Decorde K, Teissedre PL, Sutra T, Ventura E, Cristol JP, Rouanet JM, Chardonnay grape seed procyanidin extract supplementation prevents high-fat diet-induced obesity in hamsters by improving adipokine imbalance and oxidative stress markers. *Mol Nutr Food Res* **53**:659-66 (2009).
31. Perez YY, Jimenez-Ferrer E, Zamilpa A, Hernandez-Valencia M, Alarcon-Aguilar FJ, Tortoriello J, Roman-Ramos R, Effect of a polyphenol-rich extract from Aloe vera gel on experimentally induced insulin resistance in mice. *Am J Chin Med* **35**:1037-46 (2007).

32. Johnston KL, Clifford MN, Morgan LM, Possible role for apple juice phenolic compounds in the acute modification of glucose tolerance and gastrointestinal hormone secretion in humans. *J Sci Food Agric* **82**:1800-5 (2002).
33. Jia Q, Liu X, Wu X, Wang R, Hu X, Li Y, Huang C, Hypoglycemic activity of a polyphenolic oligomer-rich extract of *Cinnamomum parthenoxylon* bark in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine* **16**:744-50 (2009).
34. Anderson RA, Chromium and polyphenols from cinnamon improve insulin sensitivity. *Proc Nutr Soc* **67**:48-53 (2008).
35. Klempel MC, Varady KA, Reliability of leptin, but not adiponectin, as a biomarker for diet-induced weight loss in humans. *Nutr Rev* **69**:145-54 (2011).
36. Nagasako-Akazome Y, Kanda T, Ohtake Y, Shimasaki H, Kobayashi T, Apple polyphenols influence cholesterol metabolism in healthy subjects with relatively high body mass index. *J Oleo Sci* **56**:417-28 (2007).
37. Kim CY, Le TT, Chen C, Cheng JX, Kim KH, Curcumin inhibits adipocyte differentiation through modulation of mitotic clonal expansion. *J Nutr Biochem* **22**:910-20 (2011).
38. Wolfram S, Raederstorff D, Wang Y, Teixeira SR, Elste V, Weber P, TEAVIGO (epigallocatechin gallate) supplementation prevents obesity in rodents by reducing adipose tissue mass. *Ann Nutr Metab* **49**:54-63 (2005).
39. Mercader J, Palou A, Bonet ML, Resveratrol enhances fatty acid oxidation capacity and reduces resistin and Retinol-Binding Protein 4 expression in white adipocytes. *J Nutr Biochem* **22**:828-34 (2011).
40. Ogasawara J, Kitadate K, Nishioka H, Fujii H, Sakurai T, Kizaki T, Izawa T, Ishida H, Tanno M, Ohno H, Oligonol, an oligomerized lychee fruit-derived polyphenol, activates the Ras/Raf-1/MEK1/2 cascade independent of the IL-6 signaling pathway in rat primary adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **402**:554-9 (2010).
41. Uchiyama S, Taniguchi Y, Saka A, Yoshida A, Yajima H, Prevention of diet-induced obesity by dietary black tea polyphenols extract in vitro and in vivo. *Nutrition* **27**:287-92 (2011).
42. Seely KA, Levi MS, Prather PL, The dietary polyphenols trans-resveratrol and curcumin selectively bind human CB1 cannabinoid receptors with nanomolar

- affinities and function as antagonists/inverse agonists. *J Pharmacol Exp Ther* **330**:31-9 (2009).
43. Peng CH, Liu LK, Chuang CM, Chyau CC, Huang CN, Wang CJ, Mulberry Water Extracts Possess an Anti-obesity Effect and Ability To Inhibit Hepatic Lipogenesis and Promote Lipolysis. *J Agric Food Chem* **59**:2663-71 (2011).
44. Overman A, Bumrungpert A, Kennedy A, Martinez K, Chuang CC, West T, Dawson B, Jia W, McIntosh M, Polyphenol-rich grape powder extract (GPE) attenuates inflammation in human macrophages and in human adipocytes exposed to macrophage-conditioned media. *Int J Obes (Lond)* **34**:800-8 (2010).
45. Sakurai T, Kitadate K, Nishioka H, Fujii H, Kizaki T, Kondoh Y, Izawa T, Ishida H, Radak Z, Ohno H, Oligomerized grape seed polyphenols attenuate inflammatory changes due to antioxidative properties in coculture of adipocytes and macrophages. *J Nutr Biochem* **21**:47-54 (2010).

Capítulo 3. Prevention of diet-induced obesity by apple polyphenols in Wistar rats through regulation of adipocyte gene expression and DNA methylation patterns.

Prevention of diet-induced obesity by apple polyphenols in Wistar rats through regulation of adipocyte gene expression and DNA methylation patterns

N. Boqué, R. de la Iglesia, A.L. de la Garza, F.I. Milagro, M. Olivares, O. Bañuelos, A.C. Soria, S. Rodríguez-Sánchez, J.A. Martínez, J. Campión.

Enviado a American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism

Resumen

Los polifenoles de la manzana (AP) han demostrado mostrar propiedades antihiperlipidémicas, antihiperlipidémicas y antiinflamatorias. Sin embargo, los posibles efectos sobre la obesidad inducida por la dieta no se han estudiado. Ratas Wistar macho fueron alimentados con una dieta alta en grasas y sacarosa (HFS) con o sin suplementación de un extracto de AP (700 mg/kg peso/día) durante 8 semanas (n=12 por grupo). La suplementación de la dieta HFS con AP previno la ganancia de peso corporal, el aumento de la adiposidad y la hipertrofia de los adipocitos inducidos por la ingesta de la dieta. Por otra parte, AP disminuyó la hiperglucemia, resistencia a la insulina e hiperleptinemia inducida por la dieta HFS. Las ratas suplementadas con AP mostraron una mejora en la tolerancia a la glucosa después de una prueba de tolerancia a la glucosa por vía intraperitoneal y un aumento de la respuesta lipolítica de sus adipocitos a la estimulación por isoproterenol. La ingesta de AP disminuyó los niveles de ARNm de *Lep*, *Plin* y *Srebf1* y el aumento de *Aqp7*, *Aebp1* y *Ppargc1a* en los adipocitos extraídos del tejido adiposo epididimal, sin efectos en la expresión génica del músculo esquelético. Además, estudios epigenéticos mostraron modificaciones en los patrones de metilación de los promotores de los genes *Aqp7*, *Lep*, *Ppargc1a* y *Srebf1* en los adipocitos de ratas suplementadas con manzana en comparación con ratas alimentadas con HFS. En conclusión, el extracto de AP puede tener un efecto anti-obesogénico a través de la regulación de genes implicados en la adipogénesis, lipólisis y la oxidación de ácidos grasos. Mecanismos epigenéticos podrían estar implicados en algunas de las acciones anti-adipogénicas de AP.

Prevention of diet-induced obesity by apple polyphenols in Wistar rats through regulation of adipocyte gene expression and DNA methylation patterns.

Noemi Boqué^a, Rocío de la Iglesia^a, Ana L. de la Garza^a, Fermín I. Milagro^a, Mónica Olivares^b, Óscar Bañuelos^b, A. Cristina Soria^c, Sonia Rodríguez^c, J. Alfredo Martínez^a, Javier Campión^{a*}.

^a Department of Nutrition, Food Science, Physiology and Toxicology. University of Navarra. 31009, Pamplona. Spain. ^b Discovery Laboratory. Health and Nutrition Department. Biosearch S.A. 18004, Granada. Spain. ^c Department of Instrumental Analysis and Environmental Chemistry. Institute of General Organic Chemistry (CSIC). 28006, Madrid, Spain.

* To whom correspondence should be addressed.

Tel. 0034-948-425600 Fax: 0034-948-425649, e-mail address: jcampion@unav.es

CORRESPONDING AUTHOR

Dr. Javier Campión
Department of Nutrition, Food Science, Physiology and Toxicology
University of Navarra
C/Irunlarrea s/n
31008 Pamplona, SPAIN
Phone: 0034 948 425600
Fax: 0034 948 425649
E-mail address: jcampion@unav.es

Abstract

Apple polyphenols (AP) have been reported to display antihyperglycemic, antihyperlipidemic and antiinflammatory properties. However, potential effects against diet-induced obesity (DIO) have not been studied yet. Male Wistar rats were fed a high-fat-sucrose (HFS) diet with or without supplementation of an AP extract (700 mg/Kg body weight/day) during 8 weeks (n=12 per group). Chow-fed rats were used as the control group. Supplementation of HFS diet with AP prevented body weight gain, adiposity increase and adipocyte hypertrophy promoted by this obesogenic diet, without changes in food intake. Moreover, AP decreased the HFS diet-induced hyperglycemia, hyperleptinemia and insulin resistance. Rats supplemented with AP exhibited improved glucose tolerance after an intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) and enhanced lipolytic response of their adipocytes to isoproterenol stimulation. AP intake led to reduced *Lep*, *Plin* and *Srebf1* mRNA levels and increased *Aqp7*, *Aebp1* and *Ppargc1a* mRNA levels in epididymal adipocytes, while having no effect on skeletal muscle gene expression. In addition, epigenetic studies showed statistically different DNA methylation patterns on promoters of *Aqp7*, *Lep*, *Ppargc1a* and *Srebf1* genes in adipocytes from apple-supplemented rats compared to HFS-fed rats. In conclusion, AP extract may have an anti-obesity effect through regulation of genes involved in adipogenesis, lipolysis and fatty acid oxidation as well as increased adipocyte glycerol release. Epigenetic mechanisms could be involved in some AP mediated anti-adipogenic actions.

KEY WORDS: body weight; adipose tissue; insulin resistance; mRNA; epigenetics.

INTRODUCTION

Obesity has a substantial public health impact (1), emerging as one of the most pressing global issues in our times. The enormous economic costs (2) related to its high prevalence (3) and associated chronic diseases (4) have led most governments to consider focusing huge research efforts to combat excessive fat accumulation.

The potential role of plant polyphenols on obesity management has a growing interest within the scientific community and food industries. Indeed, it has been described that different polyphenols found in green tea (5), coffee (6), lemon (7) or grapes seeds (8) prevented diet-induced obesity (DIO) in mice and rats. This anti-obesogenic effect can be explained by several mechanisms including modulation of inflammation (9) energy and lipid metabolism (6), adipogenesis (10) or fat absorption (11).

Apples are a rich source of polyphenols, which consist of a complex mixture of chlorogenic acid, phloridzin, quercetin, catechin, epicatechin, procyanidin and rutin, among others compounds (12). These phenolic substances have been reported to display antihyperglycemic (13), antihyperlipidemic (14), anti-inflammatory (15) and antioxidant properties (16). Furthermore, previous studies demonstrated the effect of apple polyphenols (AP) on fat deposition, by decreasing the weight of visceral adipose tissue in Wistar rats fed a control diet (17) or preventing mesenteric adipose tissue accumulation in high fat-fed Sprague-Dawley rats (18). In the same way, AP were able to decrease triglyceride absorption by inhibiting pancreatic lipase activity in mice and humans (19).

The novel technologies employed in nutrigenomics research are helping to deepen our understanding of how nutrients and other bioactive food components modulate gene expression. These modifications can alter biological responses such as metabolism, cell growth, and differentiation. In this way, Ohta Y et al (18) described an effect of AP on the transcription of genes involved in hepatic fatty acid synthesis. Moreover, there are also many natural compounds, such as resveratrol, curcumin and green tea that have been termed “epigenetic modifiers” as they have an effect on

epigenome enzymatic activities (20). These modifications may alter gene expression but do not involve changes in the DNA sequence itself.

Since the potential effects against DIO have not been well elucidated yet, the purpose of this work was to determine the effect of AP on high-fat-sucrose (HFS) fed rats as well as to conduct a nutrigenomic and epigenetic study to evaluate changes in mRNA expression and DNA methylation induced by the ingestion of AP on rat adipocytes.

MATERIALS AND METHODS

Plant extract. Apple (*Malus Domestica* Borkh) polyphenolic extract was provided by Biosearch S.A. (Granada, Spain). The determination of total phenols was performed with a spectrophotometric technique using the Folin-Ciocalteu reagent. Apple extract was characterized by GC-MS and compounds were identified from their mass spectrum. Samples were dissolved in Milli-Q water and 1 mL of extract was mixed with 0.5 mL of phenyl- β -D-glucoside (internal standard, 1 mg/mL) and evaporated under vacuum. Dried samples were treated with 350 μ L 2.5% hydroxylamine hydrochloride in pyridine (30 min at 75 °C), and 350 μ L of hexamethyldisilazane plus 35 μ L of trifluoroacetic acid (45° C for 30 min). Derivatised samples were centrifuged and 1 μ L of supernatant was injected into a GC-MS. GC-MS analyses were carried out using a Hewlett-Packard 7890 gas chromatograph coupled to a 5975 quadrupole mass detector (both from Agilent, Palo Alto, CA, USA), using helium as carrier gas (average linear velocity ~ 20 cm s⁻¹). A 30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 μ m film thickness fused silica column coated with TRB-1 (crosslinked methyl silicone) from Teknokroma (Barcelona, Spain) was used. Oven temperature was held at 200 °C for 20 min, then programmed to 270 °C at a heating rate of 15 °C min⁻¹, then programmed to 290 °C at 1 °C min⁻¹ and finally programmed to 300 °C at 15 °C min⁻¹ and held for 40 min. The injector temperature was kept at 300 °C and injections were made in split mode with a split ratio 1:20. Mass spectrometer was operated in electronic impact (EI) mode at 70 eV, scanning the 35-700 *m/z* range. Interface and source temperature were 280 °C and 230 °C, respectively. Acquisition was done using HPChem Station software (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA). Total polyphenol

content of the AP extract was 80.5%. The composition of the polyphenols was 3.63 mg quinic acid/g extract; 0.51 mg cumaric acid/g extract; 0.8 mg caffeic acid/g extract; 1.19 mg phloretin/g extract; 28.33 mg phloridzin/g extract; 48.41 mg catechin isomer/g extract; 15.3 mg catechin derivate/g extract; 85.59 mg chlorogenic acid/g extract; and 4.11 mg chlorogenic acid isomer/g extract.

Animals. Male Wistar rats from CIFA (Center for Applied Pharmacobiology Research) of the University of Navarra (Pamplona, Spain) with an initial average weight of 333 ± 30 g were kept in an isolated room with a constantly regulated temperature between 21 and 23°C and controlled humidity ($50 \pm 10\%$) under a 12h/12h artificial light/dark cycle. Animals were randomly assigned into 3 different groups (n=10-12) and were fed a HFS diet with or without supplementation of AP plant extract (700mg/Kg body weight) during 8 weeks. Chow-fed rats were used as control group and were fed a standard pelleted diet from Harlan Ibérica (Barcelona, Spain) containing 20% of energy as proteins, 67% as carbohydrates (5% sucrose, 62% starch) and 13% as fat by dry weight (290 Kcal/100g). The composition of the HFS diet (473 Kcal/100g) from Research Diets (D12451, New Brunswick, NJ, USA) was 20% of energy as protein, 35% as carbohydrates (18% sucrose, 10% maltodextrin and 7% starch) and 45% as lipids by dry weight. Rats had *ad libitum* water and food access, while body weight and food intake were recorded weekly. All the performed procedures agreed with the national and institutional guidelines of the Animal Care and Use Committee at the University of Navarra.

Indirect calorimetry and activity measurements. Oxygen consumption (VO_2) and carbon dioxide production (VCO_2) of individually-caged rats were measured during 24 h using the Oxylet System (Panlab, Barcelona, Spain). Respiratory quotient (RQ) was calculated as the ratio of the volume of CO_2 produced by the volume of O_2 consumed. Energy expenditure was calculated according to Weir equation: $EE = 1.44 \times VO_2 \times 1.44 \times (3.815 + 1.23 \times RQ)$. Locomotor activity was measured by continuous recording of spontaneous activity through extensometric weight transducers placed below the home cage and the number of rearings was monitored by 2 dimensional infrared frames elements. Calculations were performed with the Metabolism 2.0 software (Panlab, Barcelona, Spain).

Intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT). Rats were fasted overnight and after a baseline blood collection (time 0) 1 g/kg of glucose was injected intraperitoneally. Blood samples were collected from the tail vein at time 15, 30, 60, and 90 min after glucose challenge, and blood glucose level was estimated with a Medisense Optium glucometer (Abbot, Illinois, USA)

Animal sacrifice and tissue collection. After finishing the experimental feeding period, rats were sacrificed, blood was collected from the trunk and serum stored at -20°C. Tissue samples of liver, muscles and retroperitoneal, mesenteric, epididymal and subcutaneous (inguinal) white adipose tissue (WAT) were isolated, weighed and immediately stored at -80°C.

Adipocyte isolation. After collecting the adipose tissue, epididymal WAT samples were cut into small pieces and the fragments were digested with collagenase I (2.5 mg/mL) at 37 °C (Worthington Biochemical, Lakewood, NJ, USA) in Krebs-Ringer bicarbonate buffer (KRBA) containing albumin (3.5 g/100 mL) and glucose (6 mM) at 7.4 pH. The ratio of digestion solution for the adipose tissue mass was 2 mL/g. After 30 min of incubation under continuous vigorous shaking (60 cycles/min), the fat cells were filtered through a nylon mesh (400 µm) and washed three times with KRBA to eliminate the stroma-vascular fraction and collagenase.

Lipolysis. Isolated epididymal adipocytes were used to measure *ex vivo* lipolysis. Adipocytes were incubated in Krebs-Ringer HEPES buffer with or without 10^{-9} M and 10^{-6} M isoproterenol (Sigma Chemical, St Louis, MO, USA) during 90 min at 37°C. Lipolysis rate was evaluated by the determination of the amount glycerol released into the media per 100 mg of total lipids. Total lipid content was evaluated gravimetrically after extraction as described previously (21).

Serum measurements. Using an automatized COBAS MIRA equipment (Roche, Basel, Switzerland), circulating glucose levels (HK-CP kit; ABX Pentra, Montpellier, France), serum triglycerides (RANDOX triglycerides kit; Randox LTD Laboratories, Crumlin, UK), total cholesterol (Cholesterol-CP kit; ABX Pentra, Montpellier, France), serum glycerol (RANDOX glycerol kit; Randox LTD

Laboratories, Crumlin, UK) and free fatty acids values (NEFA-HR-2 kit; WAKO Chemicals GmbH, Neuss, Germany) were measured. Leptin and insulin quantification was performed by specific ELISA Kits (Linco Research, Missouri, USA and Mercodia AB, Uppsala, Sweden) in the automated ELISA immunoassay analyzer TRITURUS (Grifols International S.A., Barcelona, Spain). Finally, the homeostatic model assessment (HOMA), as an insulin resistance index, was calculated using the formula: [fasting insulin ($\mu\text{U/mL}$) x fasting glucose (mM)/22.5] as described elsewhere (22).

Hepatic triglycerides measurement. Liver samples were homogenized at 50°C in a lysis buffer containing NaCl 150mM, Tritón-X-100 0,1% and Tris 10mM pH8. After centrifugation, the infranatant was removed and used for the determination of triglycerides content by an enzymatic method (RANDOX triglycerides kit; Randox LTD Laboratories, Crumlin, UK).

Muscle fat quantification. The fat content of gastrocnemius muscle samples was measured by quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopy using the EchoMRI™ system (Echo Medical Systems, TX, USA).

Histological analyses. Small pieces of epididymal and subcutaneous fat depots were kept in formaldehyde for histological analyses. These tissues were fixed and stained with hematoxylin/eosin, and acquired using AxioVision Zeiss Imaging software (AxioVision controls via software an Axio Imager M1 Zeiss microscope and an Insight AxioCamm ICc3 camera). The magnification in this case was 20x. The acquired images were stored in uncompressed 24 bit color TIFF format. Finally, these images were analyzed with an open source software (*Adiposoft* from CIMA, University of Navarra, <http://sw.wikkii.com/wiki/Adiposoft/sw>) in order to determine adipocyte diameters and adipose tissue cellularity. Adipocytes with diameters below 20 μm were not considered for analysis (23). Adipocyte number in each tissue was estimated according to Lemonnier et al (24,25).

Gene expression assays. From frozen rat adipocytes and gastrocnemius skeletal muscle tissue (-80°C), total RNA was isolated by Trizol method (Invitrogen, CA, USA) and purified with the RNeasy kit (Qiagen, Germantown, MD, USA). cDNA was

synthesized using RT² First Strand Kit (Qiagen, Germantown, MD, USA). Next, quantitative real-time PCR was performed using a custom RT² qPCR Primer Assay (Qiagen, Germantown, MD, USA) designed for the study of important key genes expressed in adipocytes involved in different pathways related with obesity (see Supplementary Data: Table 1). For the study of skeletal muscle gene expression, specific Taqman probes for rat (Applied Biosystems, TX, USA) were used (Table 1). The assay was conducted using the ABI PRISM 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, TX, USA). In order to normalize expression values, Gapdh mRNA levels were used as housekeeping for adipocytes RNA and 18S for gastrocnemius muscle RNA. A genomic DNA control primer set was used to detect nontranscribed genomic DNA contamination. Changes in gene expression between groups were calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method and expressed as mean fold change of HFS and HFS+AP samples relative to control samples.

Table 1. Analyzed genes in skeletal muscle.

RefSeq	Gene Symbol	Gene Name
NM_207587.1	<i>Adipor1</i>	Adiponectin receptor protein 1
NM_031349.2	<i>Aplnr</i>	Apelin receptor
NM_031561.2	<i>Cd36</i>	CD36 molecule (thrombospondin receptor)
NM_013200.1	<i>Cpt1b</i>	Carnitine palmitoyltransferase 1b
NM_001109615.1	<i>Gys1</i>	Glycogen synthase 1
NM_017080.2	<i>Hsd11b1</i>	Hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 1
NM_017071.2	<i>Insr</i>	Insulin receptor
NM_012596.1	<i>Lepr</i>	Leptin receptor
NM_012576.2	<i>Nr3c1</i>	Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1
NM_053551.1	<i>Pdk4</i>	Pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4
NM_013196.1	<i>Ppara</i>	Peroxisome proliferator activated receptor alpha
NM_013141.2	<i>Ppard</i>	Peroxisome proliferator-activated receptor delta
NM_031347.1	<i>Ppargc1a</i>	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha
NM_012751.1	<i>Slc2a4</i>	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4
NM_053565.1	<i>Socs3</i>	Suppressor of cytokine signaling 3
X03205	<i>18S</i>	Eucaryotic 18S ribosomal RNA

Epigenetic studies. DNA was isolated from epididymal adipocytes by using the QiamP DNA Mini KIT (Quiagen, Germantown, MD, USA) and its quality was assessed with PicoGreen dsDNA Quantitation Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Genomic DNA was treated with bisulfite by using the EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) and DNA methylation was measured by SEQUENOM MALDI-TOF mass spectrometry (26). For this purpose, primer pairs were designed to generate amplicons (300–500 bp) covering the relevant CpGs (Table 2).

Table 2. Primer sequences for quantitative analysis of the degree of DNA methylation using the MassARRAY system

Genes	Forward primer (5' → 3')	Reverse Primer (3' → 5')	Nº of CpG sites	Localization ^a
<i>Aebp1</i>	GTTTGAGTAGGGATTTGGGTGGTAG	TCCCTCTCCTAACAACTTAAACTC	37	-350 to +161
<i>Aqp7</i>	GTTGGAGTATGAGTTTTGTTTTGG	AAACCCCTATACCTAATCTAACC	7	+314 to +587
<i>Lep</i>	TTTGTTATTTGTTTTGGAATTGGT	CCCCTCTATAATTACCCCAATACA	32	-586 to -18
<i>Plin</i>	GTTAGTTGAGTTTAGGATGGTTGGA	TTTCTCCCTTATCTCTCCTAAA	6	+33 to +437
<i>Ppargc1a</i>	AATAAATGAGGTTGTTGGTTGATT	CAACCTCCCTTCTCTATACAATT	7	-710 to -134
<i>Srebf1</i>	GAATTTAGGTATTTTTGGGGG	CAAAATAATAAATACAAAATCCTCCC	39	+ 9790 to +10080

^a Localization respect to transcriptional start site.

Statistics. All results are expressed as the average mean \pm standard error. Statistical analyses were performed using the ANOVA test while DMS post-hoc was used to test differences between each group against HFS group. Association analyses were performed using the Pearson's correlation test. A level of probability up at $p < 0.05$ was set up as statistically significant and $p < 0.01$ as very statistically significant. For the statistical tests, SPSS software for Windows 15.0 was applied (Chicago, IL, USA).

RESULTS

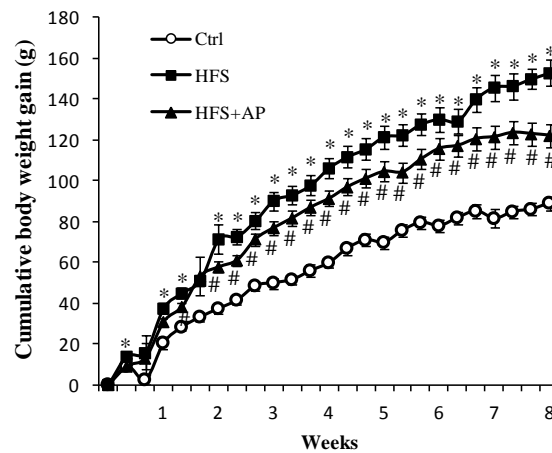
Effect of AP supplementation on body weight, adiposity and food intake

Consistent with our previous reports (24,27), feeding Wistar rats a HFS diet significantly increased body weight compared with a control diet (Figure 1A). Supplementation of HFS diet with AP prevented body weight (Figure 1A) and adiposity gain (Figure 1B) promoted by this obesogenic diet, without changes in food intake (HFS, 92.5 ± 1.8 vs HFS+AP, 97.9 ± 2.5 kcal/rat/day; n.s.). The effects of AP on the prevention of adipose tissue expansion were more pronounced in epididymal and mesenteric visceral fat depots (Figure 1B).

Effect of AP supplementation on metabolic parameters and tissue lipid accumulation

AP was found to protect from HFS diet-induced hyperglycemia, hyperleptinemia and insulin-resistance (assessed by HOMA values), with a strong tendency to decrease insulin levels (Table 3). HFS intake resulted in higher hepatic weight and triglycerides content (Table 3). Even so, AP supplementation could not prevent these effects on liver (Table 3). No differences were found regarding muscle weight and gastrocnemius muscle fat accretion (Table 3).

A



B

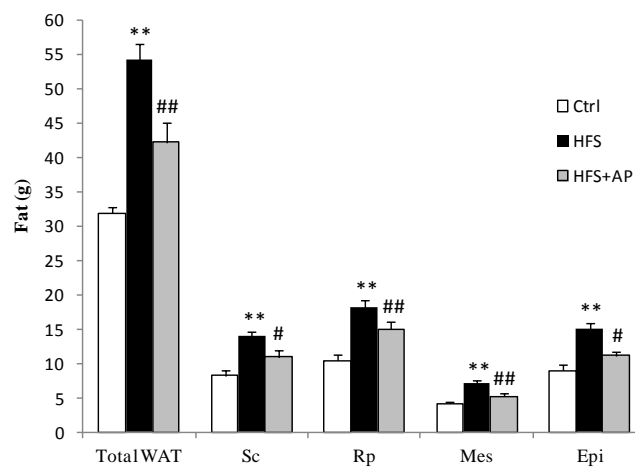


Fig. 1. Effect of apple polyphenols (AP) on body weight gain (A) and fat pad weights (B). Male Wistar rats were fed with high-fat-sucrose (HFS) diet supplemented with or without AP during 56 days. Data are means \pm SE (n=10-12); * p < 0.05, ** p < 0.01 vs. control group. # p < 0.05, ## p < 0.01 vs. HFS group. WAT, white adipose tissue; Sc, subcutaneous; Epi, epididymal; Mes, mesenteric; Rp, retroperitoneal.

Table 3. Biochemical and tissue measurements of male Wistar rats fed with HFS diet with or without supplementation of AP plant extract during 56 days^a

	Mean \pm SE			ANOVA p-value
	Control (n=10)	HFS (n=12)	HFS+AP (n=12)	
Biochemical measurements				
Glucose (mmol/L)	5.45 \pm 0.23	6.36 \pm 0.28 *	5.50 \pm 0.22 #	<0.05
Triglycerides (mg/dL)	136.3 \pm 15.0	100.6 \pm 5.63 *	82.5 \pm 4.91	<0.01
Total cholesterol (mg/dL)	64.0 \pm 6.44	74.3 \pm 3.54	63.5 \pm 3.67	ns
Leptin (ng/mL)	9.12 \pm 2.28	22.9 \pm 3.69 **	14.6 \pm 2.60 #	<0.001
Insulin (μ U/mL)	7.59 \pm 0.99	16.0 \pm 1.38 **	11.8 \pm 1.27 t	<0.05
HOMA-IR	2.18 \pm 0.55	6.65 \pm 1.19 **	3.45 \pm 0.60 #	<0.01
Glycerol (μ mol/L)	284.5 \pm 19.8	223.6 \pm 16.8 *	204.5 \pm 9.3	<0.01
FFA (mmol/L)	0.98 \pm 0.02	0.66 \pm 0.04 **	0.72 \pm 0.05	<0.001
Tissue measurements				
Liver weight (g)	9.50 \pm 0.26	10.9 \pm 0.46 *	10.3 \pm 0.35	<0.05
Liver triglycerides (μ mol/mg)	24.8 \pm 1.43	49.4 \pm 6.60 **	44.8 \pm 3.94	<0.01
Gastrocnemius muscle weight (g)	2.39 \pm 0.05	2.48 \pm 0.06	2.51 \pm 0.07	ns
EDL muscle weight (g)	0.89 \pm 0.02	0.95 \pm 0.03	0.93 \pm 0.03	ns
Soleus muscle weight (g)	0.17 \pm 0.01	0.18 \pm 0.01	0.18 \pm 0.01	ns
Gastrocnemius muscle fat (%)	3.73 \pm 0.16	3.80 \pm 0.18	3.67 \pm 0.15	ns

^a All the results are expressed as the mean \pm SE. Statistical analyses were performed using ANOVA test and DMS test post-hoc. *, p<0.05, **, p<0.01 vs Control; #, p<0.05, t, p<0.1 vs HFS. HFS, High-Fat-Sucrose; AP, Apple Polyphenols; HOMA-IR, Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance; FFA, Free Fatty Acids; EDL, extensor digitorum longus.

Effect of AP supplementation on adipose tissue histology

Results from histological studies demonstrated that HFS intake induced changes in cellularity of epididymal fat pad. These rats developed adipocyte hypertrophy, reflected with a decreased number of adipocytes per gram (Table 4). Supplementation of HFS with AP markedly reversed the enlargement of adipocyte volume induced by HFS diet intake and thereby increasing the number of adipocytes per gram (Table 4). A similar

pattern was observed in the subcutaneous adipose tissue although it was not statistically significant.

Table 4. Cellularity of adipose tissue of Wistar rats fed with HFS diet with or without supplementation of AP plant extract during 56 days^a

	Mean±SE			ANOVA p-value
	Control (n=5)	HFS (n=4)	HFS+AP (n=5)	
<i>Epididymal fat pad</i>				
Adipocyte density (x10 ⁶ cells/gr)	7.02 ± 0.13	4.50 ± 0.33 **	5.71 ± 0.43 #	<0.01
Adipocyte number (x10 ⁶ cells/pad)	74.7 ± 10.2	69.7 ± 2.20	63.9 ± 6.97	ns
Adipocyte volume (pL)	131.2 ± 2.37	208.3 ± 17.3 **	150.8 ± 4.13 #	<0.01
<i>Subcutaneous fat pad</i>				
Adipocyte density (x10 ⁶ cells/gr)	8.48 ± 1.51	5.73 ± 0.96	8.40 ± 1.43	ns
Adipocyte number (x10 ⁶ cells/pad)	62.0 ± 7.23	73.6 ± 9.29	86.4 ± 19.9	ns
Adipocyte volume (pL)	127.8 ± 22.0	178.4 ± 36.6	121 ± 17.6	ns

^a All the results are expressed as the mean ± SE. Statistical analyses were performed using ANOVA test and DMS test post-hoc. **, p<0.01 vs Control; #, p<0.05 vs HFS. HFS, High-Fat-Sucrose; AP, Apple Polyphenols.

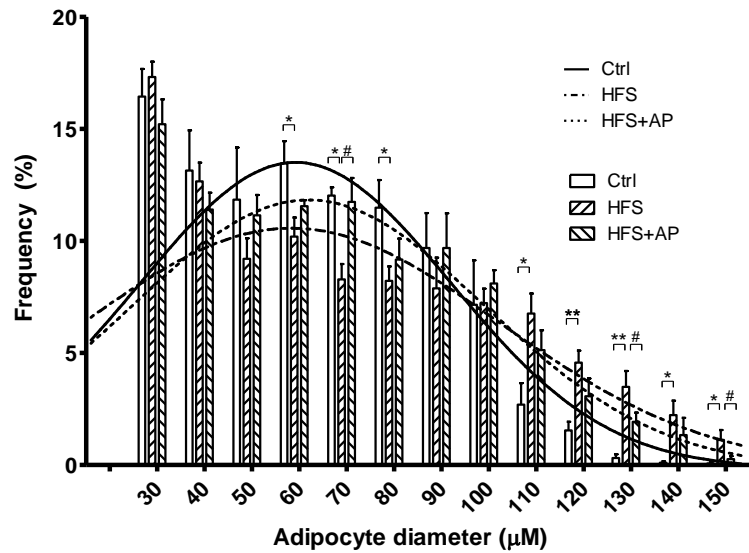
After that, the frequency distribution of adipocyte diameters was analyzed. A general shift towards higher proportion of large fat cells (diameter >110 µm) and lower proportion of medium adipocytes (diameter 60-80 µm) in the epididymal fat pad of HFS-fed rats was found (Figure 2A). AP supplementation reversed this increase on the population of large adipocytes, especially on these fractions including very large cells, with diameters higher than 130 µm (Figure 2A). Indeed, the overall pattern of fat cell distribution in the epididymal adipose tissue of AP-supplemented group was about halfway between control and HFS group. Therefore, a variation in cell size (hypertrophy), rather than cell number (hyperplasia), accounted for differential fat pad weight between the groups. In contrast, we could not detect any significant changes in the adipocyte frequency distribution of subcutaneous depot between the 3 dietary groups (Figure 2B), although it was found a similar pattern than in the epididymal depot.

Effects of AP supplementation on energy metabolism and locomotor activity

Rats fed with HFS diet displayed decreased RQ than control rats, suggesting a higher utilization of fat as energy source (Figure 3A). These differences were especially important during the dark phase (12-h) period (Figure 3A). Nevertheless, no changes in

energy expenditure were obtained (Figure 3B), even when corrected by lean mass (Ctrl, 289.9 ± 33.7 vs HFS, 314.8 ± 21.6 vs HFS+AP, 326.0 ± 32.5 Kcal/Kg lean mass/h; $p > 0.1$). RQ and energy expenditure were not affected by consumption of AP together with the HFS diet (Figure 3A, 3B).

A



B

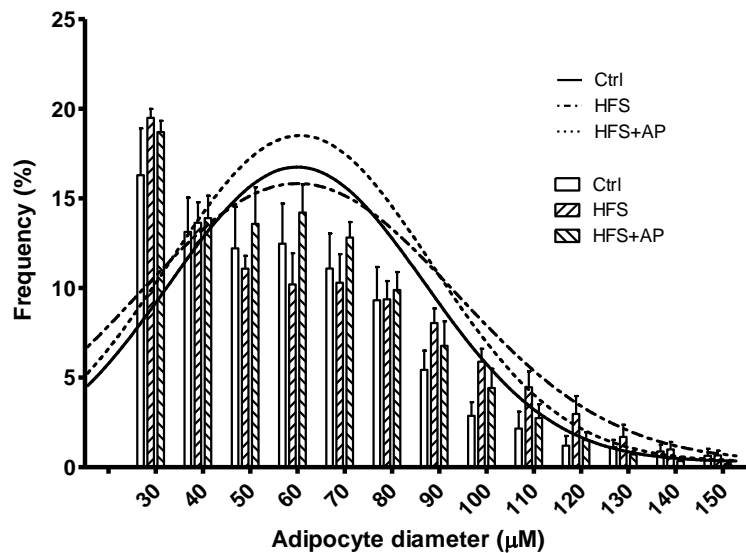


Fig. 2. Effect of apple polyphenols (AP) on epididymal (A) and subcutaneous (B) adipocyte size frequency distribution of male Wistar rats fed with high-fat-sucrose (HFS) diet supplemented with or without AP during 56 days. Data are means \pm SE (n=4-5); * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control group. # $p < 0.05$ vs. HFS group.

When the spontaneous locomotor activity of the animals was measured (Figure 3C), it was detected a higher number of activity counts in rats fed HFS diet compared to rats fed control diet, only during the light phase (12-h). This effect was not modified by AP supplementation. Finally, the number of vertical movements was used as a measure of rearing. There were not found significant differences between all groups concerning this variable (Figure 3D).

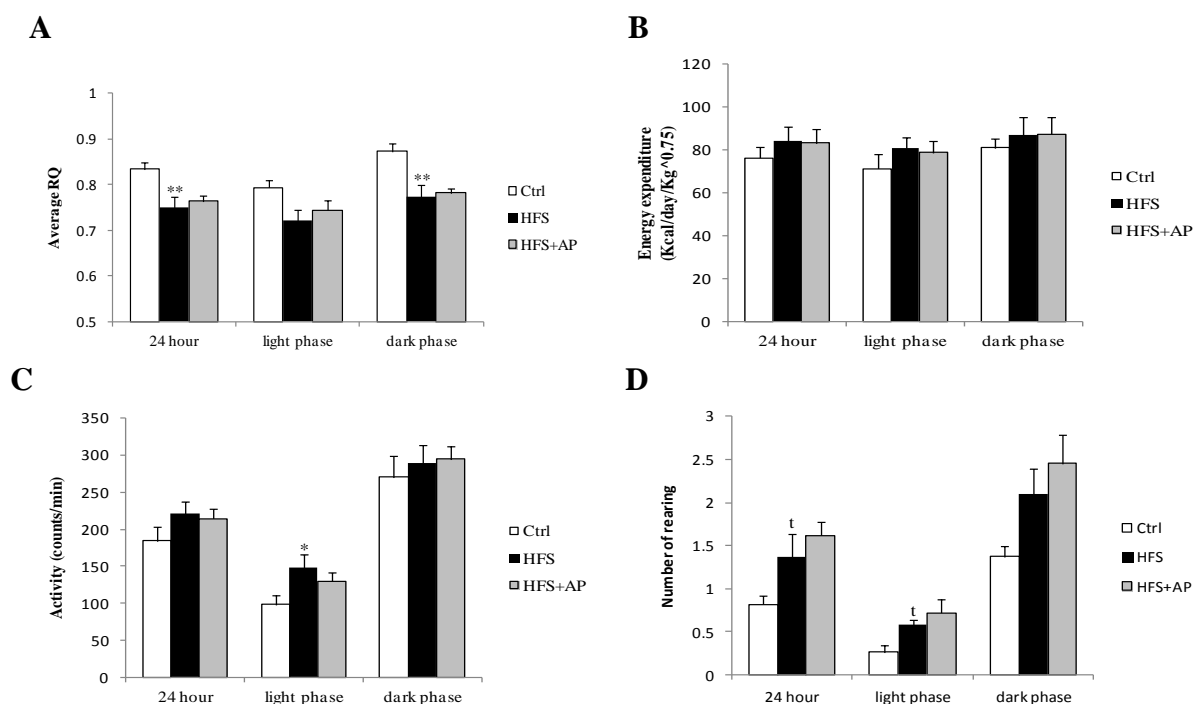


Fig. 3. Effect of apple polyphenols (AP) on respiratory quotient (RQ) (A), energy expenditure (B), activity (C) and rearing (D) of male Wistar rats fed with high-fat-sucrose (HFS) diet supplemented with or without AP during 56 days. Data are means \pm SE (n=6); *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; t, $p < 0.1$ vs control group.

Effect of AP supplementation on IPGTT

AP supplementation reversed the increase in blood glucose levels observed in HFS-fed rats after the IPGTT. Thus, AP caused a significant decrease in serum glucose levels at 30 mins after the intraperitoneal glucose load (Figure 4A) compared with the HFS group. Likewise, there was a significant decrease in the total area under the curve by AP (Figure 4B), almost to control levels. This finding suggests an important effect of AP on the improvement of glucose tolerance.

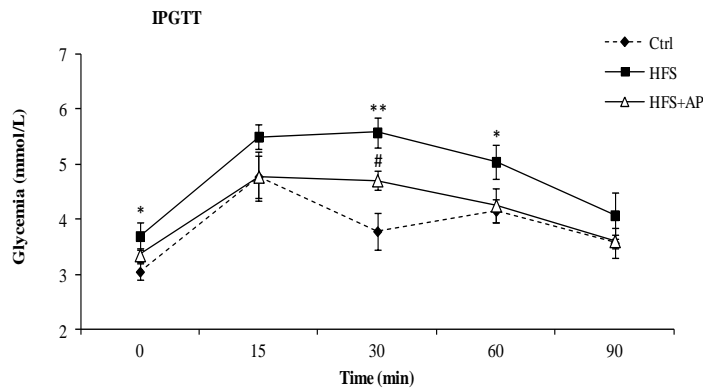
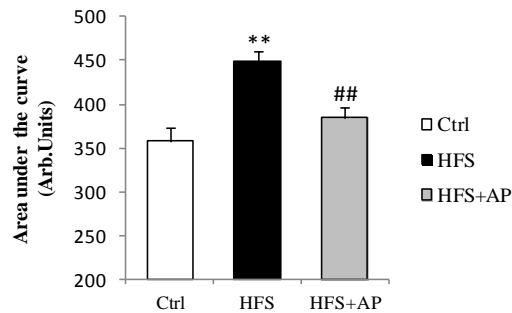
A**B**

Fig. 4. Effect of apple polyphenols (AP) on glucose tolerance of male Wistar rats fed with high-fat-sucrose (HFS) diet supplemented with or without AP during 56 days. Glucose curves (**A**) and area under the curves (**B**) of a 90-min IPGTT are shown. For the IPGTT twelve-hour-fasted rats were acutely injected (intraperitoneally) with glucose. Data are means \pm SE (n=5); * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs control group. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs HFS group.

Effect of AP supplementation on adipocyte *ex vivo* lipolysis

We further explored the lipolytic capacity of epididymal adipocytes from animals supplemented chronically with AP was studied (Figure 5). Glycerol release during basal lipolysis was not different between all groups. As expected, stimulation of lipolysis by isoproterenol (10^{-6} M) resulted in higher glycerol release by control adipocytes. However, HFS intake impaired the catecholamine-induced lipolytic activity of adipocytes. Interestingly, supplementation with AP tended to restore the lipolytic response of fat cells to isoproterenol stimulation.

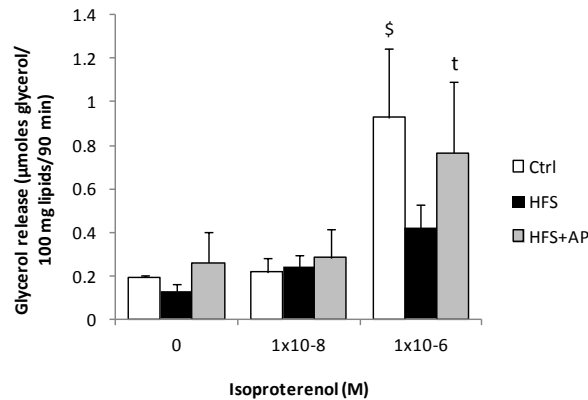


Fig. 5. Effect of apple polyphenols (AP) on basal and isoproterenol-stimulated lipolysis of isolated epididymal adipocytes from male Wistar rats fed with high-fat-sucrose (HFS) diet supplemented with or without AP during 56 days. Data are means \pm SE (n=5); \$, $p < 0.05$; t, $p < 0.1$ vs the corresponding basal values.

AP supplementation alters gene expression in WAT adipocytes while having no effects on skeletal muscle

To examine AP-induced gene expression modifications in isolated epididymal adipocytes, a quantitative RT-PCR primer array was performed. This assay was designed by our group and included 43 genes involved in different pathways like adipogenesis, lipogenesis, lipolysis, inflammation, glucose metabolism, fatty acid oxidation or energy expenditure (see Supplementary Data: Table 1).

Some genes were regulated by HFS feeding in adipocytes but supplementation with AP did not modify its expression (Figure 6). Thus, acetyl-coenzyme A carboxylase alpha (Acaca), stearoyl-coenzyme A desaturase 1 (Scd1) and fatty acid synthase (Fasn), three genes implicated in lipogenesis, were downregulated by HFS intake. Adiponutrin (Adpn), a lipase that have a role in energy mobilization and storage in adipocytes, was overexpressed in HFS group compared with control group. The mRNA levels of caveolin 1 (Cav1), a critical regulator of insulin signaling and lipid droplet biogenesis and metabolism, were also increased by HFS. Gene expression levels of monoacylglycerol lipase (Mgl1) tended to be lower in adipocytes from HFS group as compared to control ones. Finally, uncoupling protein 2 (Ucp2) was significantly upregulated by HFS consumption.

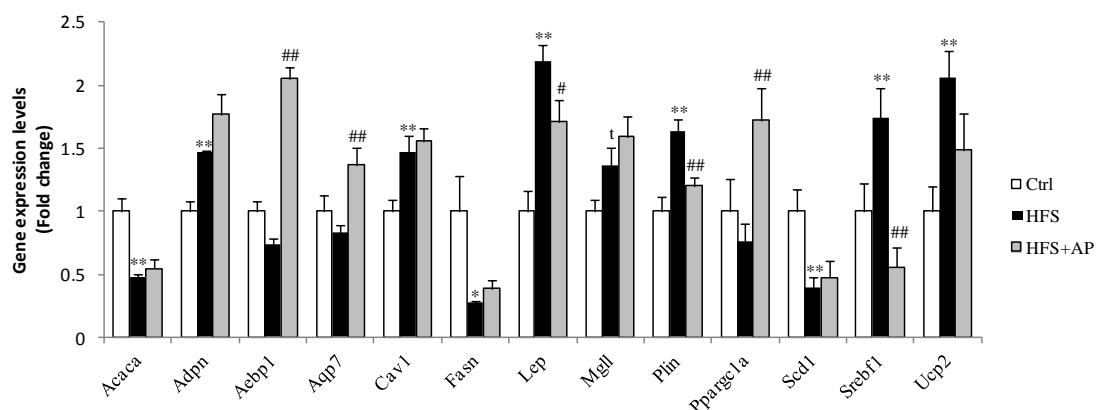


Fig. 6. Effect of apple polyphenols (AP) on mRNA levels in isolated epididymal adipocytes from male Wistar rats fed with high-fat-sucrose (HFS) diet supplemented with or without AP during 56 days. Results were normalized to GAPDH mRNA levels and expressed as fold change respect to controls (control set at unit). Data are means \pm SE (n=5-6); ** p < 0.01 vs control group. #p < 0.05, ## p < 0.01 vs HFS group. See supplementary data: Table 1.

mRNA levels of another set of genes were modified by both HFS and AP supplementation (Figure 6). Hence, gene expression levels of leptin were importantly upregulated by HFS whereas this effect was normalized by AP supplementation. The role of leptin in the regulation of energy expenditure and food intake has been clearly evidenced. The same pattern was observed for perilipin (Plin), which coats lipid storage droplets in adipocytes, and sterol regulatory element binding transcription factor 1 (Srebf1) gene, a transcription factor important for sterol and triglycerides synthesis. Accordingly, we have found higher expression levels of Plin and Srebf1 in adipocytes from HFS-fed animals in comparison to control ones, while this increase was significantly abolished when animals were fed with HFS diet plus AP.

Interestingly, some genes were only regulated by AP supplementation (Figure 6). Thus, the transcriptional repressor of adipogenesis, adipocyte enhancer binding protein 1 (Aebp1), aquaporin 7 (Aqp7), that facilitates glycerol transport, and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha (Pparg1a), implied in mitochondrial biogenesis and fatty acid oxidation were significantly overexpressed in the supplemented group compared with the HFS group. Finally,

although the ANOVA p-value was not statistically significant for adiponectin ($p=0.091$) we thought that it is important to point out the significant upregulation of adiponectin gene expression by AP compared to HFS ($p=0.034$), considering its role on insulin sensitivity.

Given that AP supplementation led to improvement of insulin resistance, we investigated whether these effects could be the result of altered gene expression in skeletal muscle, since is a key tissue responsible for maintenance of normal glucose homeostasis. HFS significantly decreased the expression levels of apelin receptor (Figure 7) in gastrocnemius muscle. However, AP supplementation was not able to modify the expression of none of the genes studied (Figure 7).

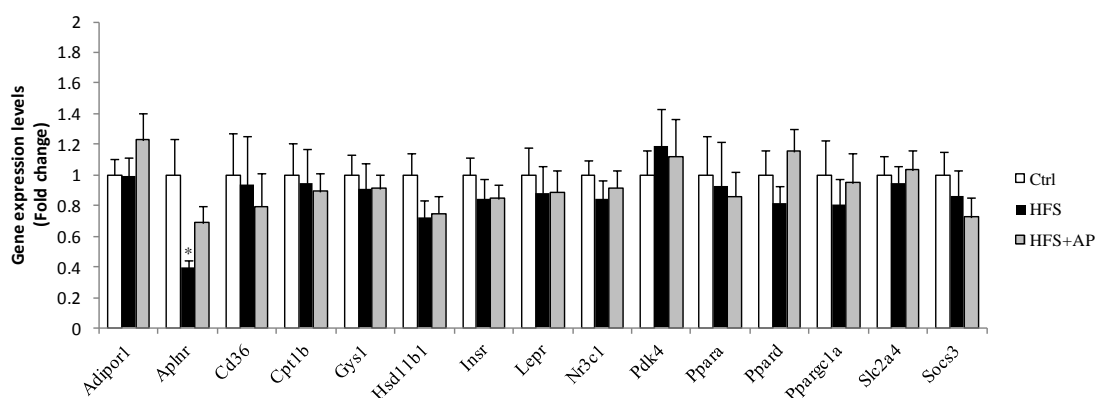


Fig. 7. Effect of apple polyphenols (AP) on mRNA levels in gastrocnemius muscle from male Wistar rats fed with high-fat-sucrose (HFS) diet supplemented with or without AP during 56 days. Results were normalized to 18S mRNA levels and expressed as fold change respect to controls (control set at unit). Data are means \pm SE ($n=5-6$); * $p < 0.05$ vs control group.

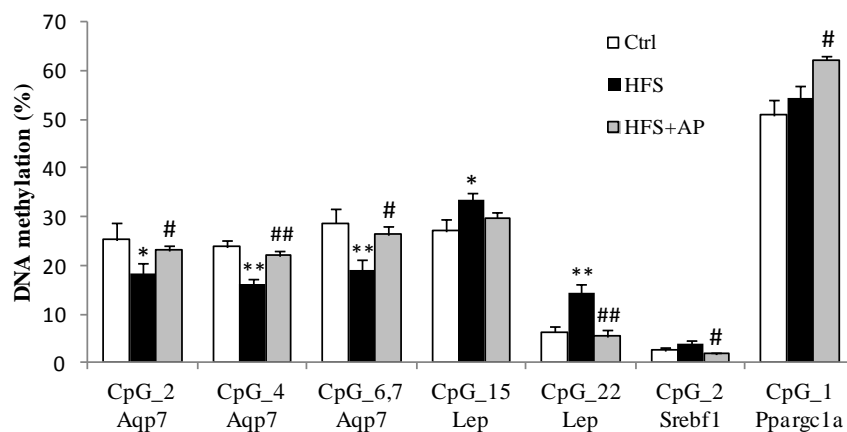
Changes in DNA methylation by HFS diet intake and AP supplementation

In order to achieve a deeper understanding of the regulation of gene expression by AP, an epigenetic study was conducted in isolated epididymal adipocytes. With this purpose, we measured the methylation pattern in the promoters of these genes which expression levels had been modified by AP supplementation (Figure 8 and Supplementary Data: Figure 1). We found significant changes in the degree of DNA methylation of 3 CpG sites of Aqp7 promoter (Figure 8). HFS intake resulted in hypomethylation of these

CpG sites whereas supplementation with AP reversed these effects. The opposite pattern was found in 2 CpG sites of leptin promoter, with increased methylation in HFS group and significant decreased methylation (CpG22) in AP group. Notably, AP could also modify the percentage of DNA methylation in one CpG site of Srebf1 and Pparg1a promoters, two important transcription factors involved in adipocyte metabolism.

Concerning the possible relationship among the degree of methylation of CpG sites and the previously analyzed gene expression levels, we found a significant correlation especially between Lep_CpG22 methylation degree and leptin gene expression and also between Aqp7 promoter total methylation and Aqp7 expression levels. Additionally, there was a negative correlation between total Aqp7 methylation and Lep_CpG22 methylation levels. Finally, correlations analyses revealed other important associations, especially between Aqp7 methylation levels and gene expression, biochemical and phenotypic parameters. Thus, epididymal fat mass was significantly and negatively correlated with Aqp7_CpG4 methylation. Interestingly, Aqp7_CpG4 percentage methylation was inversely correlated with insulin plasmatic levels and leptin mRNA levels.

A



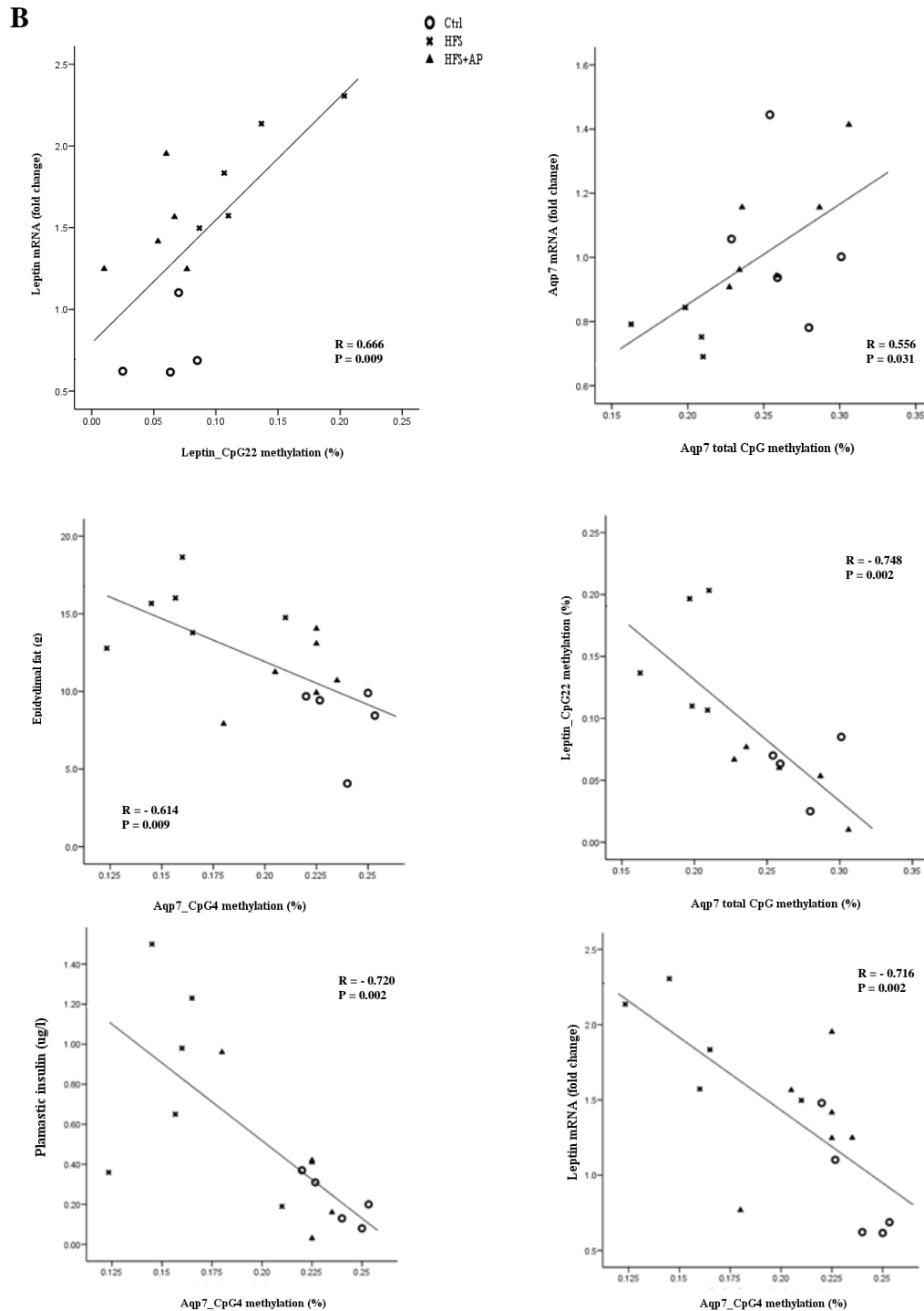


Fig. 8. Effect of apple polyphenols (AP) on the percentage of methylation (A) of specific CpG dinucleotides in gene promoters of isolated epididymal adipocytes from male Wistar rats fed with high-fat-sucrose (HFS) diet supplemented with or without AP during 56 days. (B) Correlation analyses between percentage of DNA methylation and gene expression levels (R, Pearson's correlation coefficient). Data are means \pm SE (n=5-6); * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs control group. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs HFS group. See supplementary data: Figure 2.

DISCUSSION

The results of the present study demonstrated that AP supplementation prevented HFS diet-induced body weight gain, fat accretion and adipocyte hypertrophy as well as the associated metabolic disturbances in Wistar rats. These findings were accompanied by changes in the expression of adipocyte-related genes and DNA methylation of their promoters. Therefore, we have shown that AP could be useful for the prevention and treatment of obesity and its related complications.

The effects of AP on adiposity could not be attributed to a reduction in food intake, since the extract did not induce differences in energy intake between groups. Similar findings have been previously described by other groups. Thus, Nakazato K et al (17) showed that rats fed with chow diet supplemented with 5% AP extract during 3 weeks exhibited lower visceral fat weight, without changes in food intake. Ohta Y et al (18) described a reduction of mesenteric adipose tissue in Sprague-Dawley rats fed with a high-fat diet plus 1% of apple procyanidins during 9 weeks. The dose of AP used in our study (700mg/Kg body weight) corresponds to 1.5% (per 100g of food) approximately. Actually, the extract of AP used in our investigation exhibited a more pronounced effect on adiposity with a similar dose, as it was able to reduce significantly body weight gain as well as subcutaneous and all visceral fat depots weight. However, we could not find any effects on liver fat accumulation.

The mechanisms underlying the anti-obesity effect of AP has not been extensively studied. Hence, one of the major goal of this work was to clarify how such an effect may be mediated. In this way, prevention of adipose tissue accumulation by AP was in accordance with the attenuation of epididymal adipocyte hypertrophy, indicating that AP affects adiposity mainly through a reduction in fat cell size. Although we could not find significant differences in subcutaneous tissue cellularity between the dietary groups, a similar pattern was observed. These effects could be mediated through the increased capacity of these adipocytes to respond to catecholamine-induced lipolysis, since this represent a higher rate of triglyceride hydrolysis, increased mobilization of stored lipids and consequently reduced adipocyte volume (28). In this way, it is well known that stimulated lipolysis is impaired in obesity (21,29) supporting

our results. Moreover, other polyphenols have been reported to decrease β -adrenergic mediated lipolysis mainly via ERK1/2 and PKA signaling (30,31). On the other hand, the suppressed hyperleptinemia observed in the AP-supplemented rats might be due to the reduction in the number of large adipocytes as well as the reduction of total adipose mass per se, given that leptin is known to be almost exclusively released from adipocytes in proportion to adipocyte volume (32).

One of the potential mechanisms implicated in obesity prevention is the stimulation of energy expenditure (33). For this reason, we performed an indirect calorimetry study but we did not find any modifications induced by AP ingestion. Therefore, we cannot explain the effects of AP on body weight and adiposity by differences in energy expenditure. Moreover, AP did not modulate physical activity and vertical movement (rearing) of the animals. As expected, HFS feeding increased fat oxidation, reflected by lower RQ levels. Nevertheless, AP intake did not reflect alterations in substrate oxidation.

In addition to protecting rats from HFS-induced obesity, AP supplementation normalizes glucose levels and HOMA index. In this context, quercetin and phloridzin, polyphenols found in apples, have reported to decrease intestinal glucose uptake (34,35) while quercetin also improved 3T3-L1 glucose uptake (36). The diminished population of larger-sized adipocytes in rats supplemented with AP could explain this improvement of glucose tolerance, as it has been seen that adipocyte size is related with insulin resistance (37) and that large adipocytes exhibit lower insulin-stimulated glucose oxidation (38). These results together with the amelioration of glucose tolerance observed during the IPGTT suggest that AP could be used as a functional ingredient for the treatment of insulin resistance and diabetes.

We next attempted to delineate the mechanisms by which AP reduce adiposity. For this reason, we analyze the expression of adipocyte specific genes. Thus, the enhanced expression of the transcriptional repressor of adipogenesis, *Aebp1*, described in the AP-supplemented group, could indicate an inhibitory role of AP on adipogenesis. Remarkably, it has been previously described that in preadipocytes, *Aebp1* mRNA levels are modulated by some plant extracts (39). *Aebp1* is involved in the

differentiation of preadipocytes into mature adipocytes through its modulatory effect on MAPK activation and its interaction with the fatty-acid binding protein, important for the transport of fatty acids within the adipocyte (40). However, no changes in other key transcription factors related with adipogenesis, like PPAR γ or CEBP α were evidenced. Other polyphenols like procyanidins (41,42), present in apples, exhibited an inhibitory action on the differentiation of preadipocytes into mature adipocytes *in vitro*.

AP significantly reduced the expression levels of Srebf1, but unexpectedly, the expression of its lipogenic target genes was not modified. In this way, it has been shown that mRNA levels of Srebf1 do not always coincide with changes in adipose lipogenic gene expression (43,44). Even so, Srebf1 also participates in the control of adipogenesis (45) while it has been shown that other polyphenolic extracts inhibited adipocyte differentiation through downregulation of Srebf1 (46,47). Decreased Srebf1 expression could be a direct effect of the lower insulin levels of AP-supplemented rats, since we know that Srebf1 is regulated by this hormone.

Ppargc1a is another transcription factor that was upregulated by AP. Ppargc1a is implied in mitochondrial biogenesis and fatty acid oxidation (48). Furthermore, it has been shown that Ppargc1a is involved in the regulation of adipokines, inasmuch it was able to modulate apelin gene expression and release in human white adipocytes (49). We propose that adipocytes from AP-supplemented rats displayed increased oxidation of fatty acids, partially derived from diet and partially from triglyceride hydrolysis. In this sense, we know that endogenous fatty acids in adipocytes are actively oxidized and that increased partitioning of fatty acids towards oxidation is in association with increased lipolysis (50). Besides, it has been seen that induction of lipolysis in white adipocytes and stimulation of the expression of Ppargc1a in brown adipocytes are both activated via the $\beta(3)$ -adrenergic receptors (51). Concomitantly, the increase in Ppargc1a mRNA expression could indicate a partial shift from a white to brown adipose tissue phenotype (52).

Perilipin shapes lipid droplet structure, modulates the access of lipases to the lipid droplet surface and acts as obesity-related gene (53). Perilipin was found to be overexpressed in adipocytes from HFS animals while supplementation with AP

reversed this effect. Higher expression of perilipin levels are related with increased adipogenesis and higher lipid droplets size (54). In this sense, decreased mRNA levels of perilipin in adipocytes from AP-supplemented rats could indicate again an inhibition of adipogenesis by AP. Similar results have been reported in primary human adipocytes treated with the polyphenol genistein (46).

Aqp7 mRNA levels were also upregulated by AP intake. Aqp7 is known to modulate adipocyte glycerol and water permeability thereby controlling triglyceride accumulation and glucose homeostasis (55). In fact, it has been seen that adipocytes from Aqp7-knockout mice were larger and exhibited accumulation of triglycerides compared with wild-type mice adipocytes (56). Accordingly, overexpression of aqp7 could help to explain the increased glycerol released observed in the *ex vivo* lipolysis experiments and the smaller size of the adipocytes of AP-fed rats.

AP supplementation reversed the increased leptin expression levels induced by HFS feeding. The role of leptin in the regulation of energy expenditure and food intake (57,58) has been clearly evidenced. As we have discussed before, serum leptin levels are linked to body fat content. Results of leptin gene expression are in line with the decreased circulating leptin levels and reflect the reduced fat mass observed in AP-supplemented animals.

Regarding the results obtained on skeletal muscle, we have found a significant reduction of apelin receptor expression in the gastrocnemius muscle of HFS-fed rats. This finding agrees with the results presented by Dray et al, who have described the same effect on HF-fed and db/db mice, indicating a state of impaired insulin sensitivity (59). The lack of modifications on muscle gene expression induced by AP suggests that the improvement of obesity and insulin resistance observed in AP-supplemented rats might be explained by a direct effect of AP on WAT adipocytes instead of an effect on muscle tissue.

DNA methylation is involved in the control of gene expression together with other epigenetic processes such as histone modifications and miRNAs (60). Some studies have evidenced a role of AP on the modulation of DNA methylation in relation

with its chemopreventive properties. Thus, Fini et al. discovered that treatment with an AP extract resulted in demethylation of some tumor suppressor and age-related genes in vitro (61) and in vivo (62). Our group has reported previously that leptin promoter is modulated by high-fat diet, inducing an increase in the methylation of the CpG at the position -443 (63). Now, we describe an increase in leptin CpG (position -292 and -198) methylation by HFS diet and a reduction of methylation to normal values by AP in the CpG at the position -198. Likewise, other groups have described an epigenetic regulation of leptin expression by gestational impaired glucose tolerance (64) and perinatal undernutrition (65). We have also observed an increase of Ppargc1a promoter methylation by AP. Different studies have evidenced an epigenetic control of Ppargc1a gene expression by high-fat overfeeding (66) and physical inactivity (67) in human muscle and an association between insulin resistance and liver Ppargc1a DNA methylation in patients with nonalcoholic fatty liver disease (68). On the other hand, we have reported for the first time an epigenetic regulation of Aqp7 gene promoter both by HFS diet and AP and of Srebf1 by AP, pointing out these genes as potential candidates for future epigenetic studies.

Looking at the results of association analysis, only Aqp7 and Leptin promoter methylation levels were significantly correlated with the corresponding gene expression levels. So, we hypothesize that DNA methylation might play a role in the transcription of Aqp7 and Leptin, whereas regulation of Srebf1 and Ppargc1a could be mediated by other processes. Methylation of CpG rich sequences in gene promoter regions usually repress gene expression by interfering with binding of proteins required for transcription. Unexpectedly, we found that DNA methylation was positively correlated with gene expression. However, it has been proposed that if DNA methylation occurs on negative regulatory elements in the promoter, the transcriptional activity could be increased. Thus, hypomethylation of positive regulatory sequences as well as hypermethylation of negative regulatory sequences may result in higher levels of gene expression (69). Finally, the inverse correlation observed between Aqp7_CpG4 percentage methylation and insulin levels as well as leptin expression are especially relevant because it has been described recently that leptin and insulin directly regulates Aqp7 expression through the PI3K/Akt/mTOR pathway in cultured adipocytes (70).

Similar doses of AP have been used in other animal studies (17,18,71) and no adverse effects have been reported. However, extrapolation from animal studies to the human situation is difficult. Therefore, before human intervention trials are designed to evaluate the effects of polyphenols on human obesity a safety assessment of the applied dose should be performed.

Taken together, our results demonstrated that AP extract exerts potent anti-obesogenic and anti-diabetic effects through a direct activity on adipocytes modulating β -adrenergic stimulated lipolysis as well as adipogenic, lipolytic and oxidative-related genes. Furthermore, some of these genes could be subjected to epigenetic regulation. Recently, it has been discovered that the major polyphenol found in green tea, (-)-epigallocatechin gallate, exerts some of its antiadipogenic actions through the 67-kDa laminin receptor in adipocytes (72). Therefore, it would be interesting to investigate whether AP could act through a specific adipocyte receptor. In conclusion, this study highlights AP extract as a promising functional food ingredient for the management of obesity and its metabolic complications.

ABBREVIATIONS USED

AP	Apple polyphenols
DIO	Diet-induced obesity
HFS	High-fat-sucrose
IPGTT	Intraperitoneal glucose tolerance test
RQ	Respiratory quotient
WAT	White adipose tissue
HOMA	Homeostatic model assessment

ACKNOWLEDGMENTS

The technical assistance of Ana Lorente is gratefully acknowledged.

GRANTS

Research related to this work was funded by Biosearch SA in the framework of the PRONAOS project granted by the Center for Industrial Technological Development (CDTI) and by the Asociación de Amigos de la Universidad de Navarra.

DISCLOSURES

The authors have no disclosures to report.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

N.B., F.I.M. and J.C. designed research; N.B., R.I. and A.L.G. were responsible of animal handling; M.O. and O.B. provided extracts; A.C.S and S.R. characterized extracts; N.B. performed experiments; N.B. and J.C. analyzed data; N.B. drafted manuscript; J.A.M., F.I.M. and J.C. revised manuscript.

REFERENCES

1. Faeh D, Braun J, Tarnutzer S, Bopp M. Obesity but not overweight is associated with increased mortality risk. *Eur J Epidemiol* **26**:647-55, 2011.
2. Scarborough P, Bhatnagar P, Wickramasinghe KK, Allender S, Foster C, Rayner M. The economic burden of ill health due to diet, physical inactivity, smoking, alcohol and obesity in the UK: an update to 2006-07 NHS costs. *J Public Health (Oxf)* **33**:527-35, 2011.
3. Hite AH, Meguid MM. Destined for greater obesity. *Nutrition* **27**:1078-9, 2011.
4. Conroy KP, Davidson IM, Warnock M. Pathogenic obesity and nutraceuticals. *Proc Nutr Soc* **70**:426-38, 2011.
5. Wolfram S, Raederstorff D, Wang Y, Teixeira SR, Elste V, Weber P. TEAVIGO (epigallocatechin gallate) supplementation prevents obesity in rodents by reducing adipose tissue mass. *Ann Nutr Metab* **49**:54-63, 2005.
6. Murase T, Misawa K, Minegishi Y, Aoki M, Ominami H, Suzuki Y, Shibuya Y, Hase T. Coffee polyphenols suppress diet-induced body fat accumulation by downregulating SREBP-1c and related molecules in C57BL/6J mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **300**:E122-33, 2011.
7. Fukuchi Y, Hiramitsu M, Okada M, Hayashi S, Nabeno Y, Osawa T, Naito M. Lemon Polyphenols Suppress Diet-induced Obesity by Up-Regulation of mRNA Levels of the Enzymes Involved in beta-Oxidation in Mouse White Adipose Tissue. *J Clin Biochem Nutr* **43**:201-9, 2008.
8. Decorde K, Teissedre PL, Sutra T, Ventura E, Cristol JP, Rouanet JM. Chardonnay grape seed procyanidin extract supplementation prevents high-fat diet-induced obesity in hamsters by improving adipokine imbalance and oxidative stress markers. *Mol Nutr Food Res* **53**:659-66, 2009.
9. Rahman I. Dietary polyphenols mediated regulation of oxidative stress and chromatin remodeling in inflammation. *Nutr Rev* **66 Suppl 1**:S42-5, 2008.
10. Ejaz A, Wu D, Kwan P, Meydani M. Curcumin inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes and angiogenesis and obesity in C57/BL mice. *J Nutr* **139**:919-25, 2009.
11. de la Garza AL, Milagro FI, Boque N, Campion J, Martinez JA. Natural inhibitors of pancreatic lipase as new players in obesity treatment. *Planta Med* **77**:773-85, 2011.

12. Gerhauser C. Cancer chemopreventive potential of apples, apple juice, and apple components. *Planta Med* **74**:1608-24, 2008.
13. Pereira DF, Cazarolli LH, Lavado C, Mengatto V, Figueiredo MS, Guedes A, Pizzolatti MG, Silva FR. Effects of flavonoids on alpha-glucosidase activity: potential targets for glucose homeostasis. *Nutrition* **27**:1161-7, 2011.
14. Nagasako-Akazome Y, Kanda T, Ohtake Y, Shimasaki H, Kobayashi T. Apple polyphenols influence cholesterol metabolism in healthy subjects with relatively high body mass index. *J Oleo Sci* **56**:417-28, 2007.
15. Jung M, Triebel S, Anke T, Richling E, Erkel G. Influence of apple polyphenols on inflammatory gene expression. *Mol Nutr Food Res* **53**:1263-80, 2009.
16. Graziani G, D'Argenio G, Tuccillo C, Loguercio C, Ritieni A, Morisco F, Del Vecchio Blanco C, Fogliano V, Romano M. Apple polyphenol extracts prevent damage to human gastric epithelial cells in vitro and to rat gastric mucosa in vivo. *Gut* **54**:193-200, 2005.
17. Nakazato K, Song H, Waga T. Effects of dietary apple polyphenol on adipose tissues weights in Wistar rats. *Exp Anim* **55**:383-9, 2006.
18. Ohta Y, Sami M, Kanda T, Saito K, Osada K, Kato H. Gene Expression Analysis of the Anti-obesity Effect by Apple Polyphenols in Rats Fed a High Fat Diet or a Normal Diet. *J Oleo Sci* **55**:305-14, 2006.
19. Sugiyama H, Akazome Y, Shoji T, Yamaguchi A, Yasue M, Kanda T, Ohtake Y. Oligomeric procyanidins in apple polyphenol are main active components for inhibition of pancreatic lipase and triglyceride absorption. *J Agric Food Chem* **55**:4604-9, 2007.
20. Szic K, Ndlovu M, Haegeman G, Vanden Berghe W. Nature or nurture: let food be your epigenetic medicine in chronic inflammatory disorders. *Biochem Pharmacol* **80**:1816-32, 2010.
21. Campion J, Martinez JA. Ketoconazole, an antifungal agent, protects against adiposity induced by a cafeteria diet. *Horm Metab Res* **36**:485-91, 2004.
22. Pickavance LC, Brand CL, Wassermann K, Wilding JP. The dual PPARalpha/gamma agonist, ragaglitazar, improves insulin sensitivity and metabolic profile equally with pioglitazone in diabetic and dietary obese ZDF rats. *Br J Pharmacol* **144**:308-16, 2005.

23. Mersmann HJ, MacNeil MD. Variables in estimation of adipocyte size and number with a particle counter. *J Anim Sci* **62**:980-91, 1986.
24. Boque N, Campion J, Paternain L, Garcia-Diaz DF, Galarraga M, Portillo MP, Milagro FI, Ortiz de Solorzano C, Martinez JA. Influence of dietary macronutrient composition on adiposity and cellularity of different fat depots in Wistar rats. *J Physiol Biochem* **65**:387-95, 2009.
25. Lemonnier D. Effect of age, sex, and sites on the cellularity of the adipose tissue in mice and rats rendered obese by a high-fat diet. *J Clin Invest* **51**:2907-15, 1972.
26. Milagro FI, Campion J, Cordero P, Goyenechea E, Gomez-Uriz AM, Abete I, Zulet MA, Martinez JA. A dual epigenomic approach for the search of obesity biomarkers: DNA methylation in relation to diet-induced weight loss. *Faseb J* **25**:1378-89, 2011.
27. Lomba A, Milagro FI, Garcia-Diaz DF, Marti A, Campion J, Martinez JA. Obesity induced by a pair-fed high fat sucrose diet: methylation and expression pattern of genes related to energy homeostasis. *Lipids Health Dis* **9**:60, 2010.
28. Mauriege P, Despres JP, Marcotte M, Ferland M, Tremblay A, Nadeau A, Moorjani S, Lupien PJ, Theriault G, Bouchard C. Abdominal fat cell lipolysis, body fat distribution, and metabolic variables in premenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* **71**:1028-35, 1990.
29. Jocken JW, Blaak EE. Catecholamine-induced lipolysis in adipose tissue and skeletal muscle in obesity. *Physiol Behav* **94**:219-30, 2008.
30. Ogasawara J, Kitadate K, Nishioka H, Fujii H, Sakurai T, Kizaki T, Izawa T, Ishida H, Ohno H. Comparison of the effect of oligonol, a new lychee fruit-derived low molecular form of polyphenol, and epigallocatechin-3-gallate on lipolysis in rat primary adipocytes. *Phytother Res* **25**:467-71, 2011.
31. Pinent M, Blade MC, Salvado MJ, Arola L, Ardevol A. Intracellular mediators of procyanidin-induced lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *J Agric Food Chem* **53**:262-6, 2005.
32. Couillard C, Mauriege P, Imbeault P, Prud'homme D, Nadeau A, Tremblay A, Bouchard C, Despres JP. Hyperleptinemia is more closely associated with adipose cell hypertrophy than with adipose tissue hyperplasia. *Int J Obes Relat Metab Disord* **24**:782-8, 2000.

33. Park S, Kim da S, Kang S. Gastrodia elata Blume water extracts improve insulin resistance by decreasing body fat in diet-induced obese rats: vanillin and 4-hydroxybenzaldehyde are the bioactive candidates. *Eur J Nutr* **50**:107-18, 2011.
34. Manzano S, Williamson G. Polyphenols and phenolic acids from strawberry and apple decrease glucose uptake and transport by human intestinal Caco-2 cells. *Mol Nutr Food Res* **54**:1773-80, 2010.
35. Zhao H, Yakar S, Gavrilova O, Sun H, Zhang Y, Kim H, Setser J, Jou W, LeRoith D. Phloridzin improves hyperglycemia but not hepatic insulin resistance in a transgenic mouse model of type 2 diabetes. *Diabetes* **53**:2901-9, 2004.
36. Fang XK, Gao J, Zhu DN. Kaempferol and quercetin isolated from *Euonymus alatus* improve glucose uptake of 3T3-L1 cells without adipogenesis activity. *Life Sci* **82**:615-22, 2008.
37. Jernas M, Palming J, Sjöholm K, Jennische E, Svensson PA, Gabrielsson BG, Levin M, Sjögren A, Rudemo M, Lystig TC, Carlsson B, Carlsson LM, Lonn M. Separation of human adipocytes by size: hypertrophic fat cells display distinct gene expression. *Faseb J* **20**:1540-2, 2006.
38. Salans LB, Dougherty JW. The effect of insulin upon glucose metabolism by adipose cells of different size. Influence of cell lipid and protein content, age, and nutritional state. *J Clin Invest* **50**:1399-410, 1971.
39. Yamakawa J, Ishigaki Y, Takano F, Takahashi T, Yoshida J, Moriya J, Takata T, Tatsuno T, Sasaki K, Ohta T, Takegami T, Yoshizaki F. The Kampo medicines OrenGEDokuto, Bofutsushosan and Boiogito have different activities to regulate gene expressions in differentiated rat white adipocytes: comprehensive analysis of genetic profiles. *Biol Pharm Bull* **31**:2083-9, 2008.
40. Kim SW, Muise AM, Lyons PJ, Ro HS. Regulation of adipogenesis by a transcriptional repressor that modulates MAPK activation. *J Biol Chem* **276**:10199-206, 2001.
41. Pinent M, Blade MC, Salvado MJ, Arola L, Hackl H, Quackenbush J, Trajanoski Z, Ardevol A. Grape-seed derived procyanidins interfere with adipogenesis of 3T3-L1 cells at the onset of differentiation. *Int J Obes (Lond)* **29**:934-41, 2005.
42. Shoji T, Koborj M, Shinmoto H, Yanagida A, Kanda T, Tsushida T. Inhibitory Effects of Apple Polyphenols on Differentiation of 3T3-L1 Cells into Adipocytes. *Food Sci Technol Res* **6**:119-21, 2000.

43. Bertile F, Raclot T. mRNA levels of SREBP-1c do not coincide with the changes in adipose lipogenic gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* **325**:827-34, 2004.
44. Palmer DG, Rutter GA, Tavare JM. Insulin-stimulated fatty acid synthase gene expression does not require increased sterol response element binding protein 1 transcription in primary adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **291**:439-43, 2002.
45. Kim JB, Spiegelman BM. ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev* **10**:1096-107, 1996.
46. Park HJ, Della-Fera MA, Hausman DB, Rayalam S, Ambati S, Baile CA. Genistein inhibits differentiation of primary human adipocytes. *J Nutr Biochem* **20**:140-8, 2009.
47. Suzuki R, Tanaka M, Takanashi M, Hussain A, Yuan B, Toyoda H, Kuroda M. Anthocyanidins-enriched bilberry extracts inhibit 3T3-L1 adipocyte differentiation via the insulin pathway. *Nutr Metab (Lond)* **8**:14, 2011.
48. Crowley VE, Yeo GS, O'Rahilly S. Obesity therapy: altering the energy intake-and-expenditure balance sheet. *Nat Rev Drug Discov* **1**:276-86, 2002.
49. Mazzucotelli A, Ribet C, Castan-Laurell I, Daviaud D, Guigne C, Langin D, Valet P. The transcriptional co-activator PGC-1alpha up regulates apelin in human and mouse adipocytes. *Regul Pept* **150**:33-7, 2008.
50. Wang T, Zang Y, Ling W, Corkey BE, Guo W. Metabolic partitioning of endogenous fatty acid in adipocytes. *Obes Res* **11**:880-7, 2003.
51. Nguyen KD, Qiu Y, Cui X, Goh YP, Mwangi J, David T, Mukundan L, Brombacher F, Locksley RM, Chawla A. Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. *Nature* **480**:104-8, 2011.
52. Karamanlidis G, Karamitri A, Docherty K, Hazlerigg DG, Lomax MA. C/EBPbeta reprograms white 3T3-L1 preadipocytes to a Brown adipocyte pattern of gene expression. *J Biol Chem* **282**:24660-9, 2007.
53. Beller M, Bulankina AV, Hsiao HH, Urlaub H, Jackle H, Kuhnlein RP. PERILIPIN-dependent control of lipid droplet structure and fat storage in Drosophila. *Cell Metab* **12**:521-32, 2010.

54. Park JR, Jung JW, Seo MS, Kang SK, Lee YS, Kang KS. DNER modulates adipogenesis of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells via regulation of cell proliferation. *Cell Prolif* **43**:19-28, 2010.
55. Rodriguez A, Catalan V, Gomez-Ambrosi J, Fruhbeck G. Role of aquaporin-7 in the pathophysiological control of fat accumulation in mice. *FEBS Lett* **580**:4771-6, 2006.
56. Hibuse T, Maeda N, Funahashi T, Yamamoto K, Nagasawa A, Mizunoya W, Kishida K, Inoue K, Kuriyama H, Nakamura T, Fushiki T, Kihara S, Shimomura I. Aquaporin 7 deficiency is associated with development of obesity through activation of adipose glycerol kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:10993-8, 2005.
57. Masaki T, Yoshimichi G, Chiba S, Yasuda T, Noguchi H, Kakuma T, Sakata T, Yoshimatsu H. Corticotropin-releasing hormone-mediated pathway of leptin to regulate feeding, adiposity, and uncoupling protein expression in mice. *Endocrinology* **144**:3547-54, 2003.
58. van de Wall E, Leshan R, Xu AW, Balthasar N, Coppari R, Liu SM, Jo YH, MacKenzie RG, Allison DB, Dun NJ, Elmquist J, Lowell BB, Barsh GS, de Luca C, Myers MG, Jr., Schwartz GJ, Chua SC, Jr. Collective and individual functions of leptin receptor modulated neurons controlling metabolism and ingestion. *Endocrinology* **149**:1773-85, 2008.
59. Dray C, Debard C, Jager J, Disse E, Daviaud D, Martin P, Attane C, Wanecq E, Guigne C, Bost F, Tanti JF, Laville M, Vidal H, Valet P, Castan-Laurell I. Apelin and APJ regulation in adipose tissue and skeletal muscle of type 2 diabetic mice and humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **298**:E1161-9, 2010.
60. Champion J, Milagro FI, Martinez JA. Individuality and epigenetics in obesity. *Obes Rev* **10**:383-92, 2009.
61. Fini L, Selgrad M, Fogliano V, Graziani G, Romano M, Hotchkiss E, Daoud YA, De Vol EB, Boland CR, Ricciardiello L. Annurca apple polyphenols have potent demethylating activity and can reactivate silenced tumor suppressor genes in colorectal cancer cells. *J Nutr* **137**:2622-8, 2007.
62. Fini L, Piazzini G, Daoud Y, Selgrad M, Maegawa S, Garcia M, Fogliano V, Romano M, Graziani G, Vitaglione P, Carmack SW, Gasbarrini A, Genta RM, Issa JP, Boland CR, Ricciardiello L. Chemoprevention of intestinal polyps in ApcMin/+

- mice fed with western or balanced diets by drinking annurca apple polyphenol extract. *Cancer Prev Res (Phila)* **4**:907-15, 2011.
63. Milagro FI, Campion J, Garcia-Diaz DF, Goyenechea E, Paternain L, Martinez JA. High fat diet-induced obesity modifies the methylation pattern of leptin promoter in rats. *J Physiol Biochem* **65**:1-9, 2009.
 64. Bouchard L, Thibault S, Guay SP, Santure M, Monpetit A, St-Pierre J, Perron P, Brisson D. Leptin gene epigenetic adaptation to impaired glucose metabolism during pregnancy. *Diabetes Care* **33**:2436-41, 2010.
 65. Jousse C, Parry L, Lambert-Langlais S, Maurin AC, Averous J, Bruhat A, Carraro V, Tost J, Letteron P, Chen P, Jockers R, Launay JM, Mallet J, Fafournoux P. Perinatal undernutrition affects the methylation and expression of the leptin gene in adults: implication for the understanding of metabolic syndrome. *Faseb J* **25**:3271-8, 2011.
 66. Brons C, Jacobsen S, Nilsson E, Ronn T, Jensen CB, Storgaard H, Poulsen P, Groop L, Ling C, Astrup A, Vaag A. Deoxyribonucleic acid methylation and gene expression of PPARGC1A in human muscle is influenced by high-fat overfeeding in a birth-weight-dependent manner. *J Clin Endocrinol Metab* **95**:3048-56, 2010.
 67. Alibegovic AC, Sonne MP, Hojbjerg L, Bork-Jensen J, Jacobsen S, Nilsson E, Faerch K, Hiscock N, Mortensen B, Friedrichsen M, Stallknecht B, Dela F, Vaag A. Insulin resistance induced by physical inactivity is associated with multiple transcriptional changes in skeletal muscle in young men. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **299**:E752-63, 2010.
 68. Sookoian S, Rosselli MS, Gemma C, Burgueno AL, Fernandez Gianotti T, Castano GO, Pirola CJ. Epigenetic regulation of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease: impact of liver methylation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha promoter. *Hepatology* **52**:1992-2000, 2010.
 69. Ngo V, Gourdjji D, Laverriere JN. Site-specific methylation of the rat prolactin and growth hormone promoters correlates with gene expression. *Mol Cell Biol* **16**:3245-54, 1996.
 70. Rodriguez A, Catalan V, Gomez-Ambrosi J, Garcia-Navarro S, Rotellar F, Valenti V, Silva C, Gil MJ, Salvador J, Burrell MA, Calamita G, Malagon MM, Fruhbeck G. Insulin- and leptin-mediated control of aquaglyceroporins in human adipocytes

and hepatocytes is mediated via the PI3K/Akt/mTOR signaling cascade. *J Clin Endocrinol Metab* **96**:E586-97, 2011.

71. Yang J, Li Y, Wang F, Wu C. Hepatoprotective effects of apple polyphenols on CCl₄-induced acute liver damage in mice. *J Agric Food Chem* **58**:6525-31,
72. Ku HC, Chang HH, Liu HC, Hsiao CH, Lee MJ, Hu YJ, Hung PF, Liu CW, Kao YH. Green tea (-)-epigallocatechin gallate inhibits insulin stimulation of 3T3-L1 preadipocyte mitogenesis via the 67-kDa laminin receptor pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* **297**:C121-32, 2009.

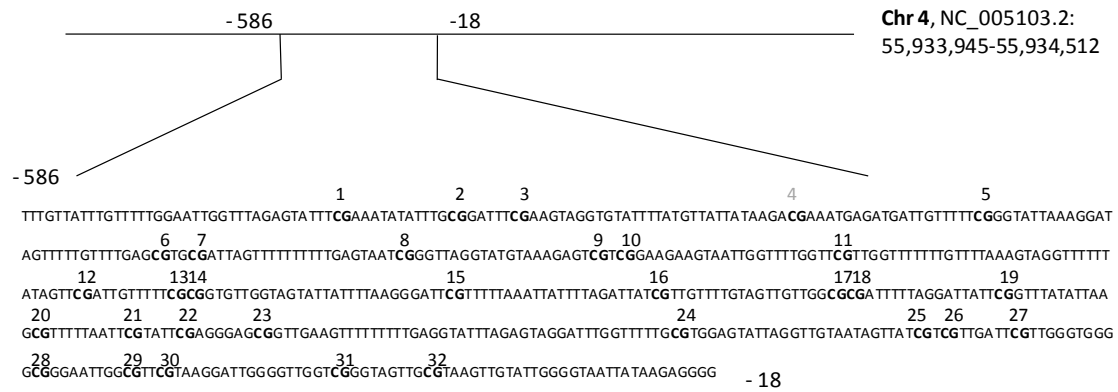
Supplementary Data

Table 1. ANOVA p-value, fold change and implicated pathways of all the genes included in the RT² qPCR Primer Assay, designed for the study of gene expression levels in adipocytes from male Wistar rats fed with HFS diet supplemented with or without AP during 56 days.

RefSeq	Gene Symbol	Gene Name	Fold Change		p-value	Pathway
			HFS vs Ctrl	HFS+AP vs Ctrl		
NM_022193	<i>Acaca</i>	Acetyl-coenzyme A carboxylase alpha	0.476 **	0.544	0.002 †	Lipogenesis
NM_016987	<i>Acly</i>	ATP citrate lyase	1.216	1.226	0.611	Lipogenesis
NM_001007144	<i>Adfp</i>	Adipose differentiation related protein	0.955	1.207	0.775	Lipogenesis/Lipolysis
NM_144744	<i>Adipoq</i>	Adiponectin, C1Q and collagen domain containing	0.767	1.132	0.091	Inflammation/Glucose metabolism
XM_217006	<i>Adpn</i>	Adiponutrin	1.473 **	1.771	0.001 †	Lipogenesis/Lipolysis
XM_223583	<i>Aebp1</i>	AE binding protein 1	0.734	2.054 ##	0.005 †	Adipogenesis
NM_134432	<i>Agt</i>	Angiotensinogen (serpin peptidase inhibitor, clade A, member 8)	0.865	1.691	0.179	Adipogenesis
NM_031612	<i>Apln</i>	Apelin	0.998	1.324	0.440	Inflammation/Glucose metabolism
NM_019157	<i>Aqp7</i>	Aquaporin 7	0.832	1.366 ##	0.020 †	Glycerol metabolism/Lipolysis/Lipogenesis
NM_031556	<i>Cav1</i>	Caveolin 1, caveolae protein	1.476 **	1.553	0.005 †	Glucose metabolism/Lipogenesis
NM_031530	<i>Ccl2</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 2	1.258	1.594	0.369	Inflammation
NM_031561	<i>Cd36</i>	CD36 molecule (thrombospondin receptor)	1.060	1.504	0.155	Inflammation/FA transport
NM_080782	<i>Cdkn1a</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	0.889	1.955	0.165	Adipogenesis
NM_031762	<i>Cdkn1b</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B	0.922	1.195	0.398	Adipogenesis
NM_182735	<i>Cdkn1c</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (P57)	1.441	1.750	0.061	Adipogenesis
NM_012524	<i>Cebpa</i>	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha	1.292	1.339	0.138	Adipogenesis
NM_024125	<i>Cebpb</i>	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	0.996	1.298	0.591	Adipogenesis
NM_053437	<i>Dgat1</i>	Diacylglycerol O-acyltransferase homolog 1 (mouse)	1.267	1.545	0.034 †	Lipogenesis
NM_053365	<i>Fabp4</i>	Fatty acid binding protein 4, adipocyte	1.175	1.539	0.169	Adipogenesis
NM_017332	<i>Fasn</i>	Fatty acid synthase	0.320 *	0.385	0.045 †	Lipogenesis
NM_001003710	<i>Gpr77</i>	G protein-coupled receptor 77	0.865	1.412	0.550	Lipogenesis
NM_012735	<i>Hk2</i>	Hexokinase 2	1.397	0.790	0.409	Glucose metabolism
NM_013083	<i>Hspa5</i>	Heat shock protein 5	1.107	1.396	0.165	Inflammation
NM_012589	<i>Il6</i>	Interleukin 6	0.843	0.780	0.849	Inflammation
NM_013076	<i>Lep</i>	Leptin	2.190 **	1.709 #	0.000 †	EE/Inflammation/Lipolysis
NM_012859	<i>Lipe</i>	Lipase, hormone sensitive	1.183	1.710	0.039 †	Lipolysis
NM_012598	<i>Lpl</i>	Lipoprotein lipase	0.939	1.155	0.578	Lipid storage
NM_138502	<i>Mgll</i>	Monoglyceride lipase	1.369 †	1.591	0.022 †	Lipolysis
NM_177928	<i>Nampt</i>	Nicotinamide phosphoribosyltransferase	0.713	1.067	0.489	Inflammation
XM_221724	<i>Nrip1</i>	Nuclear receptor interacting protein 1	1.054	1.226	0.443	Lipolysis
NM_198780	<i>Pck1</i>	Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (soluble)	0.822	1.070	0.302	Glucose metabolism
NM_053551	<i>Pdk4</i>	Pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4	0.748	1.433	0.173	Glucose metabolism
NM_013094	<i>Plin</i>	Perilipin	1.634 **	1.201 ##	0.002 †	Lipolysis, adipogenesis
XM_341960	<i>Pnpla2</i>	Patatin-like phospholipase domain containing 2	1.353	1.066	0.106	Lipolysis
NM_013124	<i>Pparg</i>	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	1.171	1.245	0.749	Adipogenesis
NM_031347	<i>Ppargc1a</i>	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha	0.765	1.721 ##	0.028 †	EE/FA oxidation
NM_012637	<i>Ptpn1</i>	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 1	1.366	1.658	0.149	Glucose metabolism
NM_144741	<i>Retn</i>	Resistin	1.285	0.745	0.118	Inflammation
NM_139192	<i>Scd1</i>	Stearoyl-Coenzyme A desaturase 1	0.394 **	0.478	0.024 †	Lipogenesis
XM_228146	<i>Sirt1</i>	Sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 1	1.350	1.609	0.086	Adipogenesis/Lipolysis
XM_213329	<i>Srebf1</i>	Sterol regulatory element binding transcription factor 1	1.746 **	0.558 ##	0.006 †	Adipogenesis/Lipogenesis
NM_012675	<i>Tnf</i>	Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	0.942	1.121	0.871	Inflammation
NM_019354	<i>Ucp2</i>	Uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier)	2.056 **	1.483	0.030 †	EE/FA oxidation/Glucose metabolism
NM_017008	<i>Gapdh</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	HSK	HSK		
NM_017314	<i>Ubc</i>	Ubiquitin C	HSK	HSK		
NM_031144	<i>Actb</i>	Actin, beta	HSK	HSK		
NM_017101	<i>Ppia</i>	Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	HSK	HSK		
U26919	<i>RGDC</i>	Rat Genomic DNA Contamination	GDC	GDC		

*All the results were normalized to GAPDH mRNA levels and expressed as fold change respect to controls. Statistical analyses were performed using ANOVA test and DMS test post-hoc. *, p<0.05, **, p<0.01, †, p<0.1 vs Control; #, p<0.05, ##, p<0.01 vs HFS; †, ANOVA p<0.05. HFS, High-Fat-Sucrose; AP, Apple Polyphenols; FA, Fatty Acids; EE, Energy Expenditure; HSK, Houskeeping; GDC, Genomic DNA Control.

C



D

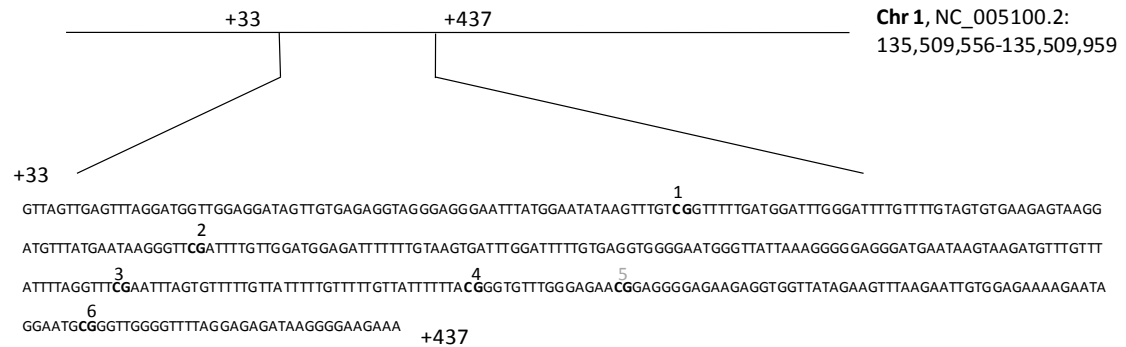


Figure 1. Nucleotide sequences of the CpG island in genes promoter regions showing individual CpG dinucleotides; effect of apple polyphenols (AP) on the percentage of methylation of CpG dinucleotides in gene promoters of isolated epididymal adipocytes from male Wistar rats fed with high-fat-sucrose (HFS) diet supplemented with or without AP during 56 days. **(A)** Aebp1 gene promoter, **(B)** Aqp7 gene promoter, **(C)** Lep gene promoter, **(D)** Plin gene promoter, **(E)** Ppargc1a gene promoter, **(F)** Srebf1 gene promoter. Data are means \pm SE (n=5-6); * p < 0.05, ** p < 0.01 vs control group. # p < 0.05, ## p < 0.01 vs HFS group.

V. Discusión

1. Discusión General

Una creciente evidencia científica confirma los efectos beneficiosos de los polifenoles frente a distintas enfermedades, lo cual está generando un gran interés entre los investigadores para conocer los mecanismos implicados y entre las industrias alimentarias y farmacéuticas con el fin de desarrollar nuevos productos ricos en polifenoles en forma de suplementos o como parte de alimentos funcionales [1]. En efecto, los alimentos funcionales que ayuden a prevenir y/o tratar la obesidad y las enfermedades relacionadas pueden ser una ayuda complementaria a la restricción dietética y al incremento en la actividad física [2]. Según la Plataforma Tecnológica Europea (ETP), creada para fortalecer la competitividad de la industria agroalimentaria europea a través del conocimiento y la innovación [3], la prioridad en el campo de los alimentos funcionales es el estudio de la relación entre los componentes de la dieta y las funciones cerebral, inmune, gastrointestinal y metabólica (obesidad y enfermedades metabólicas relacionadas). Además, la ETP propone el uso de las tecnologías “ómicas” como una de las principales estrategias para alcanzar estos objetivos [3]. Estas tecnologías pueden proporcionar información acerca de los mecanismos de acción de sustancias bioactivas presentes en los alimentos. Por otra parte, se precisan investigaciones de diversas especialidades, incluyendo estudios fisiológicos, bioquímicos, epidemiológicos, fisiopatológicos y de química alimentaria. A partir de los resultados de estos estudios se pretende demostrar que un alimento funcional presenta relevancia biológica, un elemento clave para poder acreditar una declaración de salud [4]. Para ello, se precisa confirmar que la ingesta del compuesto conlleva a la alteración de marcadores que se encuentran en una determinada ruta metabólica que regula un proceso sobre el que pretendemos un efecto beneficioso y en segundo lugar, que esta alteración tiene un impacto clínico.

Los datos disponibles en la literatura científica muestran evidencias de las propiedades saludables de los polifenoles [5,6,7,8,9,10]. Los efectos de estas moléculas sobre la obesidad y el síndrome metabólico se han descrito anteriormente tanto en modelos humanos como en animales [11,12,13,14,15]. Así, se han reconocido propiedades beneficiosas de ciertos polifenoles como la floridzina [16] y otros flavonoides [17] en el metabolismo de la glucosa, mientras que se han observado mejoras en el perfil lipídico en ratones *knockout* para apoE suplementados con una mezcla de polifenoles [18]. Por

otra parte, los efectos de los polifenoles sobre la adiposidad hasta el presente no son del todo concluyentes. En este contexto, diversos estudios realizados en modelos animales sobre las propiedades antiobesogénicas del EGCG presente en el té verde [19] han resultado ser prometedores y han mostrado que el EGCG posee efectos preventivos en la ganancia de peso y la acumulación de masa grasa. Además, estos hallazgos se ven respaldados por los resultados obtenidos en estudios en humanos [11,15,20], aunque todavía existen interrogantes sobre los mecanismos implicados en estas acciones, así como en las relaciones dosis-respuesta. Otros polifenoles han demostrado ciertos beneficios en la obesidad, como la curcumina [13] o los polifenoles presentes en el café [14]. Sin embargo, otros trabajos indican un efecto nulo de ciertos polifenoles o combinaciones de ellos en el peso corporal y la adiposidad [21,22]. De este modo, la suplementación de ratas obesas Zucker *fa/fa* con procianidinas procedentes de semillas de uvas durante 18 semanas no reveló cambios en la adiposidad [22], mientras que la ingesta de chocolate negro enriquecido en polifenoles durante 4 semanas, aunque disminuyó los niveles plasmáticos de glucosa, no indujo cambios antropométricos relevantes en los pacientes con sobrepeso y obesidad [21].

El presente trabajo pretende identificar un extracto vegetal rico en polifenoles beneficioso para la prevención de la ganancia de peso, la adiposidad y los cambios metabólicos asociados a la obesidad, además de estudiar los mecanismos implicados en sus efectos. El extracto en cuestión podría considerarse susceptible de ser utilizado como ingrediente para la elaboración de alimentos funcionales destinados a la prevención de la obesidad.

2. Modelos de obesidad inducida por la dieta en ratas Wistar

El primer objetivo de la Tesis Doctoral fue el desarrollo de un modelo de obesidad inducida por la dieta en ratas Wistar macho con unas características fenotípicas precisas para el estudio de las propiedades antiobesogénicas de distintos compuestos bioactivos así como identificar biomarcadores clave en el control de peso corporal y la obesidad. En el capítulo 1 se estudió el efecto de tres dietas con distinta composición nutricional en el desarrollo de la obesidad: una dieta alta en grasas (*High-fat*, HF), una dieta alta en grasas y sacarosa (*High-fat-sucrose*, HFS) y una dieta alta en sacarosa (*High-sucrose*, HS). Las tres dietas fueron capaces de incrementar la adiposidad, consistente con la

presencia de hiperleptinemia en los tres grupos, que presentó niveles proporcionales a la cantidad de sacarosa de la dieta. El mismo patrón se observó con los niveles de insulina. La relación observada entre la distribución de los macronutrientes en la dieta y la leptinemia podría estar mediada por la acción de la insulina, ya que se ha descrito que esta hormona regula la expresión de la leptina mediante una acción directa en los adipocitos [23]. Además, se ha determinado que en pacientes con diabetes tipo 2, el tratamiento con insulina aumenta los niveles de leptina los cuales preceden el aumento de peso corporal [24]. Por otra parte, la presencia de insulino-resistencia determinada por el índice HOMA-IR sólo se detectó en los grupos alimentados con dieta HFS y dieta HS. Finalmente, y aunque el metabolismo lipídico se vio afectado solamente por la dieta HS, se consideró que el mejor modelo de obesidad fue el inducido por la dieta HFS por presentar características comunes a la obesidad humana como el incremento del tejido adiposo, hiperleptinemia, hiperinsulinemia y resistencia a la insulina, además de tener una composición nutricional más parecida a la dieta hipercalórica consumida en los países occidentales [25].

Los resultados de celularidad obtenidos con el programa *Adiposoft* (software *open source* en colaboración con la Unidad de Morfología e Imagen del Centro de Investigaciones en Medicina Aplicada de la Universidad de Navarra; CIMA) permitieron realizar un exhaustivo análisis histológico del tejido adiposo. El diseño del programa fue motivado por la necesidad de determinar las causas de los cambios en la celularidad del tejido adiposo y la localización específica de estos cambios, de una manera rápida y sencilla [26,27,28]. Estos factores son esenciales para estudiar los mecanismos que conducen a la obesidad y enfermedades metabólicas en modelos animales. Desafortunadamente, las técnicas no invasivas como la resonancia magnética o la tomografía computarizada por rayos X no permiten proveer información sobre la celularidad del tejido adiposo [29]. Por eso, se precisan técnicas *ex vivo* como el análisis de células en suspensión, citometría de flujo o análisis histológicos en cortes de tejido teñidos, por microscopía óptica o electrónica [30,31,32]. Sin embargo, estas técnicas presentan numerosas dificultades como la complejidad de aislar los adipocitos mediante colagenasa, debido a la fragilidad de éstas células, o la necesidad de analizar manualmente las imágenes histológicas captadas por microscopía para contar el número y medir el diámetro de cada célula. El diseño de *Adiposoft* por tanto, significa la aparición de una herramienta automática para cuantificar la celularidad del tejido

adiposo, que reduce el tiempo y el esfuerzo en comparación con las técnicas usadas habitualmente y facilita la determinación del diámetro, volumen, área y número de los adipocitos en una gran cantidad de imágenes. Además, el hecho de que el análisis sea independiente del usuario proporciona resultados mucho más objetivos. La validación del programa se realizó comparando con los resultados obtenidos en adipocitos en suspensión y del análisis manual de muestras histológicas.

Los resultados obtenidos por Adiposoft demostraron como el tejido adiposo retroperitoneal es histológicamente diferente del mesentérico y el subcutáneo, presentando una mayor proporción de adipocitos de tamaño grande en condiciones basales, de acuerdo con los resultados obtenidos por Lopes y col [33]. Además, el consumo de la dieta HS desencadenó una hiperplasia de las células del tejido adiposo subcutáneo y retroperitoneal. Por otro lado, la dieta HFS indujo una hiperplasia en el tejido adiposo retroperitoneal, mientras que la obesidad inducida por una dieta alta en grasas se relacionó principalmente con una hipertrofia de los adipocitos subcutáneos. El aumento en el número de adipocitos inducido por la dieta HS se ha descrito previamente por Tulp y col [34], quienes observaron un aumento en el tamaño del tejido adiposo blanco en ratas SHR/N-cp alimentadas con una dieta alta en azúcares, como resultado de una hiperplasia e hipertrofia de los adipocitos. Por otra parte, los resultados obtenidos en ratas alimentadas con dieta HF corresponden con los descritos por Lemonnier y col [35], ya que la ingesta de una dieta alta en grasas aumentó el tamaño de los adipocitos en el depósito subcutáneo de ratas Zucker hembras. Sin embargo, en un estudio previo de nuestro laboratorio [36], ratas alimentadas con dieta HF durante 56 días presentaron un aumento en la proliferación de adipocitos subcutáneos, estimado por cuantificación de ADN. Las diferencias encontradas pueden deberse a la distinta duración del tratamiento dietético así como a las distintas técnicas usadas. Así, de acuerdo con la teoría del tamaño crítico de las células grasas [37], que sugiere que cuando alcanzan un tamaño máximo empieza una sucesión de señales que resulta en un incremento del número de adipocitos, estas diferencias podrían deberse a la falta de tiempo de los adipocitos para alcanzar este “tamaño máximo crítico” y por tanto estimular la producción de nuevas células o la diferenciación de estas. Además, teniendo en cuenta que la edad es un factor determinante en la celularidad del tejido adiposo [38], otros estudios realizados en ratas hembras jóvenes alimentadas con una dieta alta en grasas y azúcares demostraron el desarrollo de hipertrofia e hiperplasia

tanto en los depósitos grasos viscerales como en el subcutáneo [39,40]. No sólo la edad sino también el sexo de los animales afectan la celularidad del tejido adiposo. Asimismo, se ha descrito previamente como en ratones machos la ingesta de grasas de distinto origen afecta la celularidad del tejido adiposo de manera diferente [41].

En relación a las diferencias en la celularidad de los distintos depósitos grasos, se ha evidenciado que ratones alimentados con dieta HF durante 60 días mostraron una mayor proporción de nuevos adipocitos en los depósitos subcutáneo y viscerales, mientras que la hipertrofia fue más pronunciada en el tejido adiposo visceral [42]. Aunque en el presente trabajo no se ha observado un efecto dependiente del depósito, existen diferencias en el diseño de ambos estudios, como la duración del tratamiento y la composición de las dietas, ya que la dieta HF usada por Joe y col [42] contenía un 45% de grasa mientras que la dieta usada en nuestra investigación contiene un 60% de grasa.

3. Efectos de la dieta HFS

3.1. Peso corporal y adiposidad

El modelo de obesidad inducida por la dieta HFS se confirmó en todos los diseños experimentales realizados en este trabajo. Los efectos de la dieta HFS sobre el incremento de adiposidad se evidenciaron tras 35, 56 y 64 días de ingesta, acompañados por un incremento sustancial del peso de los depósitos grasos subcutáneo y viscerales dependiente del tiempo. La ganancia de peso fue significativa sólo tras una ingesta crónica de la dieta HFS, es decir tras 56 y 64 días de tratamiento dietético. Esta misma dieta se usó para establecer un modelo de obesidad en ratones C57BL/6J y 129X1/SvJ [43], que fueron alimentados durante 3 meses. Asimismo, experimentos posteriores en nuestro grupo han demostrado como los efectos de la dieta HFS en el desarrollo de la obesidad parecen ser independientes de la ingesta energética total [44]. Los animales alimentados con una dieta HFS presentaron además niveles circulantes incrementados de la hormona leptina en todos los tiempos estudiados. La leptina es uno de los marcadores por excelencia del incremento de adiposidad corporal [45], cuyo papel más importante se encuentra relacionado con la regulación del apetito [46]. Por último, no se observaron diferencias según si el origen de la dieta fuese manual o comercial.

3.2. Metabolismo glucídico y lipídico

En el presente trabajo, 35 días de tratamiento dietético no fueron suficientes para aumentar los niveles séricos de glucosa en comparación a los controles. Sin embargo, cuando los animales fueron alimentados durante 56 días o más con una dieta HFS, la glucemia alcanzó niveles significativamente mayores frente a los controles. La hiperglucemia se acompañó al mismo tiempo por una clara hiperinsulinemia y el establecimiento de insulino-resistencia reflejada por el aumento del índice HOMA-IR. Además, cuando se realizaron estudios de tolerancia a la glucosa intraperitoneal se observó como los animales alimentados con dieta HFS presentaban un aumento en los niveles séricos de glucosa en comparación a los controles, indicando una alteración de la tolerancia a la glucosa. La evolución que se produce en la obesidad para desarrollar primero intolerancia a la glucosa y luego diabetes tipo 2 se debe a cambios metabólicos compensadores [47]. Dichos mecanismos son inicialmente una hiperinsulinemia y una hiperglucemia postprandial. La alteración de la homeostasis de la glucosa se atribuye a un desequilibrio en la vía de señalización de la insulina, que implica una disminución de la captación de glucosa por el músculo y los adipocitos, una alteración de la lipogénesis y un aumento de producción de glucosa por el hígado [48]. La etiología de este deterioro en la señalización de insulina está relacionada con un estado crónico de inflamación, modulado entre otros por las hormonas y citoquinas liberadas por los adipocitos [48].

La ingesta de la dieta HFS no generó un modelo representativo de alteración del metabolismo lipídico característico la obesidad. Así, tras 35 días de ingesta, los niveles de triglicéridos y colesterol no se vieron modificados mientras que tras 56 días se observó una hipotrigliceridemia sin cambios en los niveles de colesterol. Inesperadamente, los niveles de ácidos grasos libres se vieron significativamente disminuidos por la ingesta de la dieta tanto a corto como a largo plazo. En este sentido, los resultados de Boivin y col [49] respaldan el concepto que la coexistencia de hipertrigliceridemia y insulino-resistencia puede ser frecuente pero no obligatorio. Después de estos estudios, los autores sugieren que la ingesta de una dieta rica en grasa resulta en un rápido transporte de ácidos grasos a los tejidos desde los triglicéridos derivados de los quilomicrones, llevando a una situación de insulino-resistencia, mientras que los ácidos grasos podrían no estar disponibles para aumentar la producción

endógena de triglicéridos ya que podrían ser principalmente oxidados [49]. En cambio, la alimentación con una dieta rica en carbohidratos estimula la síntesis de triglicéridos en el hígado y el consecuente aumento de partículas VLDL en sangre, que permanecen en sangre más tiempo que los quilomicrones y cuyos lípidos son captados por los tejidos periféricos como el músculo más lentamente [49]. Por último, debe considerarse el hecho que los animales se sacrifican en ayunas, pudiendo generar alteraciones en el metabolismo lipídico el cual puede verse acelerado en respuesta a la falta de alimentos [50].

3.3. Histología del tejido adiposo

La ingesta de una dieta HFS durante 35 días resultó en una hiperplasia del tejido adiposo retroperitoneal, mientras que a los 56 días se observó una hipertrofia del tejido adiposo epididimal inducido por la ingesta de la misma dieta, concluyendo que los efectos de esta dieta en la celularidad del tejido adiposo son depósito-específicos. La hiperplasia inducida por la dieta en el tejido adiposo retroperitoneal implica un aumento de la diferenciación y proliferación de los adipocitos, resultado de la interacción entre factores genéticos, factores locales (ej. factor de crecimiento de la interleuquina 1, leptina...), factores sistémicos (dieta...), vascularización y grado de inervación por el sistema nervioso simpático [26]. Por otro lado, la hipertrofia de los adipocitos epididimales sugiere una regulación de procesos metabólicos como la lipólisis, lipogénesis y la actividad de la lipoproteína lipasa [51]. Otros autores han demostrado un efecto hipertrófico de la dieta HFS en los depósitos subcutáneo y retroperitoneal, aunque el estudio se realizó en ratones y la duración del tratamiento fue de 11 semanas [52]. De esta manera, los distintos efectos de la dieta HFS en el tamaño y el número de adipocitos de cada depósito graso puede deberse a la duración del tratamiento dietético.

3.4. Lipólisis

Los adipocitos extraídos de ratas alimentadas con dieta HFS durante 56 días mostraron una menor respuesta lipolítica inducida por isoproterenol que los adipocitos aislados de ratas alimentadas con dieta control, sin cambios en la lipólisis basal. Este resultado concuerda con el publicado previamente por Campión y col [53] en el que se observó el mismo efecto en adipocitos de ratas alimentadas con una dieta de cafetería durante 42 días. Otros estudios respaldan este efecto [54,55], demostrando así que el desarrollo de

obesidad podría contribuir a la resistencia a la lipólisis inducida por catecolaminas, alterando así la capacidad del tejido adiposo para movilizar lípidos almacenados. Este defecto en la lipólisis podría explicarse por el aumento de citoquinas que caracteriza el estado proinflamatorio de la obesidad [55]. Conjuntamente, evidenciamos una disminución en los niveles circulantes de ácidos grasos libres y glicerol tanto a corto como a largo plazo. Este resultado es sorprendente, ya que un aumento de la lipólisis suele venir acompañado por un aumento de los niveles de ambos metabolitos. Aún así, una posible alteración en la gluconeogénesis hepática inducida por la instauración de insulino-resistencia así como posibles alteraciones en la captación y oxidación de ácidos grasos por tejidos periféricos pueden explicar los resultados obtenidos en el presente trabajo [56,57].

3.5. Gasto energético y cociente respiratorio

La ingesta de la dieta HFS durante 56 días en ratas Wistar macho incrementó la oxidación de la grasa, como se deduce de la disminución en los valores del cociente respiratorio (RQ). Efectos parecidos se han observado en otros modelos de obesidad inducida por la dieta [58,59]. Sin embargo, no se observaron cambios en el gasto energético en las ratas alimentadas con la dieta HFS. En este sentido, otro estudio realizado en nuestro grupo describió que la ingesta de una dieta alta en grasas no indujo cambios en el gasto energético de ratas Wistar después de 69 días de tratamiento [60]; las mismas conclusiones se obtuvieron después de la realización de un estudio con ratas Sprague-Dawley jóvenes alimentadas con una dieta alta en grasas desde las 3 semanas de edad [61]. Además, la ingesta de una dieta con elevado contenido en proteínas durante 2 semanas tampoco modificó el gasto calórico en ratas Wistar [62]. Un aumento en el gasto energético podría explicar la resistencia de ciertos animales a la obesidad, ya que se ha observado un aumento en el gasto energético en ratas resistentes a la obesidad (*obesity-resistant, OR*) después de 5 días de ingesta de una dieta alta en grasas [63], así como una disminución de la actividad física.

3.6. Expresión génica

La ingesta de la dieta HFS durante 56 días fue capaz de modificar el patrón de expresión génica de los adipocitos epididimales. Así, se produjo una disminución de los niveles de ARNm de los genes lipogénicos *Acaca*, *Fasn* y *Scd1*. Esta regulación se ha descrito

previamente en animales alimentados con dietas altas en grasas [64,65,66]. Este hecho puede explicarse como un mecanismo de compensación al exceso de lípidos provenientes de la dieta, tratando de desactivar la vía de la lipogénesis *de novo* a partir de precursores no lipídicos como la glucosa. Otra hipótesis indicaría que debido al consumo crónico de una dieta alta en grasas y azúcares, el tejido adiposo de estos animales contiene adipocitos disfuncionales que son incapaces de administrar el exceso de grasa [67].

Por otra parte, los niveles de expresión de los genes *Adpn*, *Cav1*, *Lep*, *Plin*, *Srebf1*, *Ucp2* se vieron aumentados al finalizar el tratamiento dietético en comparación con los animales alimentados con dieta control. El primero de ellos, la adiponutrina (*Adpn*), es una proteína con capacidad lipolítica y lipogénica, aunque se cree que su función principal es el mantenimiento de la homeostasis energética, promoviendo el almacenamiento de energía en el adipocito en situaciones de exceso energético [68]. El hecho de que tenga una regulación muy parecida a la leptina respalda los resultados obtenidos, además de la evidencia de que su promotor es regulado por la glucosa y la insulina [69] y por el factor de transcripción de *Srebf1* [70]. La expresión de la adiponutrina es casi 50 veces más elevada en ratas genéticamente obesas *fa/fa* [71] y también se ha visto aumentada en el tejido adiposo de humanos obesos [72]. Aún así, los resultados de Oliver y col describieron una disminución de la adiponutrina en el tejido adiposo subcutáneo de ratas Wistar inducida por la ingesta de una dieta de cafetería durante 4 meses [73].

La caveolina 1 participa en la maduración de la gota lipídica adipocítica [74] así como en el transporte de ácidos grasos y colesterol [75] y la regulación de la vía de la insulina [76]. Los resultados obtenidos en el presente trabajo en cuanto a la expresión de *Cav1* concuerdan con los descritos por Gómez-Ruiz y col [76] donde la ingesta de una dieta alta en grasas aumentó los niveles de ARNm de *Cav1* en adipocitos retroperitoneales extraídos de ratas Wistar. Además, ratones *knockout* para *Cav1* mostraron un fenotipo delgado y una resistencia a la obesidad inducida por la dieta [77].

La leptina, uno de los marcadores por excelencia del incremento de adiposidad corporal, es una molécula sintetizada mayoritariamente en los adipocitos blancos [78]. Esta hormona contribuye a la regulación de la homeostasis energética, el metabolismo

(principalmente relacionado con la sensibilidad a la insulina), funciones neuroendocrinas, el metabolismo óseo y la función inmunitaria [79]. Sin embargo, los efectos de la leptina son en gran parte ausentes en los estados de obesidad acompañados con hiperleptinemia, probablemente debido a la aparición de resistencia a la leptina [80]. Este proceso puede ser consecuencia de una menor expresión de los receptores de la leptina hipotalámicos o del tejido adiposo [81], de una reducción en el transporte por la barrera hematoencefálica o por el impedimento de una correcta regulación de la vía de señalización intracelular de la leptina [82]. En el presente trabajo, el aumento de los niveles de expresión de la leptina en los adipocitos epididimales de ratas alimentadas con dieta HFS corresponden con el aumento en los niveles circulantes de esta hormona, además de con un aumento de la adiposidad que explica en gran parte los resultados obtenidos. Además, la regulación de la leptina por la ingesta crónica de una dieta HFS se ha descrito previamente por otros autores [83,84]. Por último, se ha descrito un aumento en la secreción de leptina debido a la ingesta aguda de una comida alta en grasas en ratas con normopeso, cuyos niveles fueron dos veces mayores en aquellas ratas que posteriormente resultaron ser sensibles a la obesidad en comparación a las ratas resistentes a la obesidad, sugiriendo que la secreción de leptina después de una comida rica en grasas podría ser un potente factor de predicción de la acumulación de tejido adiposo en ratas alimentadas con una dieta alta en grasas [85].

La perilipina modela la estructura de las gotas lipídicas así como el acceso de las lipasas a la superficie de las gotas y actúa como un gen relacionado con la obesidad [86]. Una expresión elevada de los niveles de perilipina se relaciona con un aumento de la adipogénesis y un mayor tamaño de las gotas lipídicas [87]. Por tanto, el aumento en los niveles de ARNm de perilipina determinados en los adipocitos de ratas con obesidad inducida por la dieta HFS sugiere un aumento de la adipogénesis así como una hipertrofia de los adipocitos, como se ha descrito anteriormente tras los estudios de celularidad del tejido adiposo epididimal. Por otra parte, la perilipina está involucrada en los procesos que gobiernan la hidrólisis de los triglicéridos en los adipocitos, facilitando la acción de la lipasa Lipe bajo la estimulación por catecolaminas. En concreto, cuando los niveles de AMPc aumentan en los adipocitos, la perilipina es fosforilada por la proteína quinasa A, atenuando así la función de la perilipina como barrera para las lipasas en la superficie de las gotas lipídicas y aumentando por tanto la lipólisis [88].

En relación al Srebf1, un aumento de su expresión en adipocitos se ha relacionado con un aumento de la diferenciación, ya que se trata de un factor de transcripción implicado en la adipogénesis. Aunque no se ha detectado un aumento significativo en el número de adipocitos del tejido adiposo epididimal, probablemente la formación de nuevas células grasas esté estimulada por la ingesta de la dieta alta en grasa y sacarosa, ya que se ha descrito una regulación de Srebf1 por la glucosa y la insulina [89], ambos aumentados en nuestro modelo dietético. Por otra parte, Srebf1 está implicado también en la regulación de la lipogénesis. Sin embargo, aunque su expresión está aumentada por la ingesta de la dieta, la expresión de sus genes diana como Acaca, Scd1 y Fasn está disminuida. En este sentido, se ha demostrado que los niveles de ARNm de Srebf1 no coinciden siempre con los cambios en la expresión de genes lipogénicos en el tejido adiposo [90,91]. De hecho animales *knockout* para Srebf1 no mostraron cambios en la expresión de Acaca y Fasn en los adipocitos [92] mientras que la estimulación de Fasn mediada por insulina no requirió un aumento de la transcripción de Srebf1 en adipocitos *in vitro* [91].

Finalmente, la sobreexpresión de Ucp2 en los adipocitos de ratas alimentadas con dieta HFS podría indicar un aumento de la oxidación de los ácidos grasos, como respuesta a la gran cantidad de estos nutrientes provenientes de la dieta, en un intento de proteger frente la acumulación lipídica en los adipocitos. La misma regulación de Ucp2 se ha descrito en el tejido adiposo de ratas con obesidad inducida por la dieta [93,94]. Aunque hay estudios que sugieren que la resistencia a la obesidad por parte de algunos animales podría venir mediada en parte por un aumento de la expresión de Ucp2 inducido por la ingesta de una dieta rica en grasas [95,96], sugiriendo un papel de este gen en la eficiencia metabólica, otros autores demuestran una sobreexpresión de este gen mediada por la ingesta de una dieta rica en grasas en ratones susceptibles a la obesidad, sin cambios en ratones resistentes a la obesidad [97].

En relación a los resultados obtenidos en el músculo esquelético, se observó una reducción significativa en la expresión del receptor de la apelina en el músculo gastrocnemio de ratas alimentadas con dieta HFS. Este resultado concuerda con los presentados por Dray y col, que han descrito el mismo efecto en ratones alimentados con una dieta alta en grasas y en ratones db/db, indicando una alteración de la sensibilidad a la insulina [98]. Aunque no encontramos cambios en los niveles de

expresión de los otros genes estudiados en el músculo esquelético, otros autores demuestran que la hiperglicemia derivada de la ingesta de una dieta alta en grasas se asocia con una sobreexpresión de los receptores de adiponectina en el músculo [99], mientras que la ingesta de una dieta rica en fructosa provoca insulino-resistencia mediante una reducción de la expresión del receptor de la insulina y Glut4 en el músculo [100]. Otros estudios han descrito un aumento del transporte de ácidos grasos en el músculo en ratas alimentadas con una dieta elevada en grasas y sacarosa mediante el aumento de la expresión de CD36 [101].

3.7. Metilación del ADN

La metilación del ADN está implicada en el control de la expresión de los genes junto con otros procesos epigenéticos tales como modificaciones de histonas y miARNs [102]. Nuestro grupo de investigación ha publicado previamente que la ingesta de una dieta alta en grasas ejerce una modulación epigenética en el promotor de la leptina, induciendo un aumento en los niveles de metilación del CpG en la posición - 443 de dicho gen [103]. En el trabajo actual, se describe un aumento en la metilación de dos sitios CpG del promotor de la leptina (posición -292 y -198) por la dieta HFS. Asimismo, otros grupos han descrito una regulación epigenética de la expresión de la leptina mediada por la alteración de la tolerancia a la glucosa gestacional [104] y por la desnutrición perinatal [105]. Por otro lado, en este trabajo se describe por primera vez en la literatura una regulación epigenética de la Aqp7. Así, la ingesta de la dieta HFS durante 56 días redujo el porcentaje de metilación en tres sitios CpG del promotor de la Aqp7, pudiendo tener un efecto en la regulación de la expresión de este gen.

4. Cribado de extractos vegetales ricos en polifenoles para la prevención de la obesidad inducida por la dieta en ratas Wistar

La evidencia referente a los efectos protectores de la administración de polifenoles frente ciertas enfermedades crónicas ha despertado el interés de las industrias alimentarias en relación a la búsqueda de nuevos ingredientes ricos en polifenoles para el desarrollo de nuevos alimentos funcionales o suplementos nutricionales. Teniendo en cuenta que la obesidad es una de las dianas clave para la nueva generación de alimentos funcionales [106], el segundo objetivo de esta investigación se centró en el cribado de

distintos extractos vegetales ricos en polifenoles para la prevención de la obesidad usando un modelo animal de obesidad inducida por una dieta HFS. Los extractos testados se obtuvieron tras la extracción y purificación de los polifenoles existentes de forma natural en los distintos alimentos vegetales. De esta manera, se obtuvieron mezclas de polifenoles, que por una parte, son más fáciles de obtener que moléculas polifenólicas aisladas y, por otra parte, se ha demostrado un efecto sinérgico de distintos polifenoles en la adipogénesis *in vitro*, es decir una mayor efecto de un extracto combinado de polifenoles en comparación con los mismos componentes individualmente [107].

Al finalizar el período experimental, los extractos de manzana, canela, hamamelis y abedul redujeron significativamente el incremento de peso inducido por la dieta, hecho que se consideró como un hito imprescindible para la identificación de extractos polifenólicos con potenciales efectos para la prevención de la obesidad. Aún más importante y esencial fue el hecho que los extractos de manzana y canela consiguieron disminuir la expansión del tejido adiposo blanco total en comparación a las ratas alimentadas con una dieta HFS, ya que, como es bien sabido, la obesidad se define como una acumulación excesiva de grasa corporal [108]. Además, los efectos depósito específicos de estos extractos revelaron que los efectos antiadipogénicos de los polifenoles de manzana fueron más pronunciados en los depósitos viscerales epididimal y retroperitoneal mientras que los efectos de los polifenoles de la canela fueron más importantes a nivel subcutáneo. Este resultado debe ser considerado, ya que las complicaciones metabólicas asociadas a la obesidad están relacionadas íntimamente con la cantidad de tejido adiposo visceral, el cual es metabólicamente más activo y secreta una cantidad mayor de adipocitoquinas [109]. Además, los efectos antiadipogénicos de los polifenoles de la manzana se han descrito anteriormente en un modelo animal no obeso, aunque no se observaron cambios en la ganancia de peso corporal [110]. También se ha descrito un efecto de la suplementación con polifenoles de la canela (20g/Kg durante 12 semanas) sobre la acumulación de grasa mesentérica en ratas alimentadas con una dieta alta en grasas y fructosa [111].

Por otro lado, la suplementación con el extracto polifenólico de abedul incrementó la masa hepática, indicando un posible aumento en la deposición de grasa en este tejido, aunque se necesitarían análisis específicos sobre el contenido de triglicéridos hepáticos o estudios histológicos para poder afirmar tal conclusión. Además, es importante

considerar que los extractos testados no provocaron una pérdida de masa muscular en los animales, ya que a menudo la pérdida de peso corporal es debido a una pérdida de masa magra en vez de grasa corporal [112]. Por consiguiente, los resultados de este cribado preliminar revelaron que entre los ocho extractos polifenólicos testados, los obtenidos de la manzana, canela, hamamelis y abedul presentaron propiedades protectores frente a los efectos obesogénicos de la ingesta de una dieta alta en grasa y sacarosa.

La reducción del HOMA-IR, un índice de resistencia a la insulina, en los cuatro grupos analizados, evidenció que los extractos de manzana, canela, hamamelis y abedul podrían mejorar el estado de resistencia insulínica asociado a la obesidad. Este hecho es consistente con los resultados presentados en varios artículos [12,113], describiendo las acciones beneficiosas de distintos extractos vegetales ricos en polifenoles en la resistencia a la insulina. Sin embargo, sólo el extracto de manzana pudo prevenir la hiperglucemia inducida por la dieta HFS. En este sentido, Johnston y col [114] describieron una reducción substancial de la glucemia en humanos provocada por los compuestos fenólicos presentes de manera natural en el zumo de manzana. Aunque no se encontró cambios en los niveles de glucosa sérica en las ratas suplementadas con el extracto de canela, Jia Q y col [115] observaron como los polifenoles oligoméricos presentes en la canela redujeron la glucemia en ratas Wistar, así como en ratas diabéticas alimentadas con una dieta estándar de laboratorio. Además, se ha descrito que los polifenoles de la canela reducen la glucosa sérica en ayunas, en sujetos con diabetes tipo 2 o síndrome metabólico [116]. Por último, aunque los efectos del extracto de hamamelis no fueron significativos para la reducción de la adiposidad y la hiperleptinemia, la disminución que provocó en los niveles de insulina debe valorarse para considerar este extracto como un potencial ingrediente para corregir la resistencia a la insulina asociada a la diabetes.

Por otro lado, la prevención de la hiperleptinemia inducida por la dieta HFS mediante la suplementación con el extracto de polifenoles de manzana concuerda con la reducción del peso del tejido adiposo blanco, ya que esta adipoquina es secretada en proporción a la cantidad de grasa corporal [117]. Además, el extracto de manzana fue el único capaz de disminuir los niveles séricos de colesterol, aunque la dieta HFS no fue capaz de inducir hipercolesterolemia. Este efecto se ha demostrado previamente en humanos con sobrepeso, cuya dieta se suplementó con polifenoles de manzana [118]; sin embargo, no

se observaron cambios en animales alimentados con dieta control suplementada con un extracto polifenólico de manzana [110]. Sorprendentemente, la suplementación con el extracto de abedul incrementó significativamente los niveles de colesterol. Este hecho se puede deber al aumento de la masa hepática observado en este grupo, ya que el hígado ejerce un papel clave en la síntesis y el mantenimiento de la homeostasis del colesterol. Además, un aumento en el peso/tamaño del hígado suele ir acompañado por un aumento en la función del hígado y la actividad de los sistemas enzimáticos, habiéndose demostrado una correlación entre el tamaño del hígado en cerdos y los niveles plasmáticos de colesterol [119].

En resumen, el cribado realizado en este trabajo llevó a la identificación de cuatro extractos vegetales ricos en polifenoles con propiedades significativas para la prevención de la obesidad (manzana, canela, hamamelis y abedul), ya que presentaron varios efectos beneficiosos sobre distintos indicadores de composición corporal. Aún así, sólo los extractos de manzana y canela se consideraron finalmente como potenciales extractos antiobesogénicos, debido a su acción preventiva en la acumulación de grasa corporal. Ciertamente, el extracto de polifenoles de manzana mostró las propiedades más relevantes, remarcando este extracto como el ingrediente funcional más prometedor para la prevención de la obesidad, como se refleja por la mejora que indujo en las complicaciones metabólicas asociadas a la obesidad como la hiperglucemia, hiperleptinemia e hiperinsulinemia.

5. Efectos antiobesogénicos y mecanismos implicados de la suplementación de la dieta HFS con un extracto rico en polifenoles de manzana

Tras la realización del cribado, se decidió profundizar en los mecanismos implicados en los efectos antiobesogénicos del extracto rico en polifenoles de manzana, los cuales se detallan a continuación.

5.1. Peso corporal y adiposidad

Los efectos de los polifenoles de la manzana sobre la adiposidad y el peso corporal no pueden atribuirse a una menor ingesta energética, ya que el extracto no disminuyó la

ingesta en comparación al grupo HFS. Resultados similares han sido descritos previamente por otros investigadores [110,120]. Así, Nakazato k y col [110] publicaron como ratas alimentadas con una dieta control suplementada con un extracto de polifenoles de manzana (5%) durante 3 semanas presentaban una reducción del peso de la grasa visceral, sin cambios en la ingesta energética. Ohta Y y col [120] describieron una reducción del tejido adiposo mesentérico en ratas Sprague-Dawley alimentadas con una dieta alta en grasas suplementada con un 1% de procianidinas de manzana durante 9 semanas. La dosis usada en nuestro estudio (700mg/Kg peso) corresponde a un 1,5% (por 100g de comida) aproximadamente. Objetivamente, el extracto de polifenoles de manzana empleado en nuestra investigación mostró un efecto más pronunciado sobre la adiposidad con una dosis similar, ya que fue capaz de disminuir significativamente la ganancia de peso así como el peso de los depósitos grasos subcutáneo, mesentérico, retroperitoneal y epididimal. Sin embargo, no se detectó ningún efecto en la acumulación de grasa hepática y muscular.

5.2. Metabolismo glucídico y lipídico

Además de la protección de la obesidad inducida por una dieta alta en grasa y sacarosa, se ha demostrado que la suplementación con un extracto de manzana rico en polifenoles normaliza los niveles de la glucosa e índice HOMA-IR. En este contexto, la quercetina y la floridzina, polifenoles presentes en el extracto de manzana utilizado en nuestro estudio, han demostrado disminuir la absorción intestinal de glucosa [16,121] mientras que la quercetina también mejoró la captación de glucosa en la línea celular 3T3-L1 [122]. La disminución de la población de adipocitos grandes en las ratas suplementadas con el extracto de polifenoles podría explicar esta mejora en la tolerancia de la glucosa, ya que se ha hallado que el tamaño del adipocito está relacionado con la resistencia de insulina [123] y que los adipocitos grandes presentan una menor oxidación de la glucosa estimulada por la insulina [124]. Estos resultados junto con la mejora de la tolerancia a la glucosa observada durante el IPGTT sugieren que el extracto de polifenoles de manzana podría ser empleado como ingrediente funcional para el tratamiento de la diabetes y la resistencia a la insulina.

5.3. Histología del tejido adiposo y lipólisis

Los mecanismos implicados en los efectos antiobesogénicos del extracto de polifenoles de manzana no han sido estudiados de forma extensiva. Por esta razón, uno de los principales objetivos de este trabajo fue clarificar los factores implicados en estos efectos. En este sentido, la prevención de la acumulación de masa grasa por los polifenoles de manzana está estrechamente relacionada con el hecho de que la hipertrofia de los adipocitos se viese reducida en el tejido adiposo epididimal, indicando que los polifenoles de manzana afectan a la adiposidad principalmente por una reducción del tamaño de los adipocitos. Aunque no se encontraron diferencias significativas en la celularidad del tejido subcutáneo entre los distintos grupos, se observó un patrón similar. Estos efectos podrían ser mediados por la mayor capacidad de estos adipocitos para responder a la lipólisis inducida por catecolaminas, puesto que esto representa un incremento en la tasa de hidrólisis de los triglicéridos, un aumento en la movilización de lípidos almacenados y consecuentemente, una reducción del volumen de los adipocitos. Además, otros polifenoles han mostrado una capacidad para disminuir la lipólisis mediada por los receptores β -adrenérgicos, principalmente vía la señalización de ERK1/2 y de PKA [125,126]. Por otra parte, la supresión de la hiperleptinemia observada en las ratas suplementadas con polifenoles de manzana pudo ser debida a la reducción en el número de adipocitos de tamaño grande así como a la reducción de la masa adiposa total por sí misma, dado que la leptina es secretada casi exclusivamente por los adipocitos en proporción directa al volumen de estas células [45].

5.4. Gasto energético y cociente respiratorio

Uno de los posibles mecanismos implicados en la prevención de la obesidad es el estímulo del gasto energético [127]. Por esta razón, realizamos un estudio de calorimetría indirecta aunque no encontramos ninguna modificación inducida por la ingesta de los polifenoles de manzana. Por lo tanto, no podemos explicar los efectos de los polifenoles de manzana sobre el peso corporal y la adiposidad por diferencias en el gasto energético. Según lo esperado, la alimentación con HFS incrementó la oxidación de grasa, reflejada por valores más bajos de RQ [128]. Sin embargo, la suplementación con polifenoles de manzana no alteró la oxidación de sustratos energéticos. Otros polifenoles como EGCG o los polifenoles del café han demostrado incrementar la

oxidación de la grasa durante la fase nocturna sin mostrar cambios en el gasto energético de ratones con obesidad inducida por la dieta [14,129].

5.5. Expresión génica

Seguidamente intentamos delinear las vías afectadas por la ingesta del extracto de manzana rico en polifenoles que pudieran estar implicadas en la reducción de la adiposidad. Por esta razón, analizamos la expresión de genes del adipocito mediante el diseño de un ensayo RT-PCR *ad hoc*. El ensayo se diseñó en base a la experiencia de nuestro grupo en estudios nutrigenómicos además de una exhaustiva recopilación bibliográfica y la utilización de herramientas específicas como el software Ingenuity [130]. Los cambios en los transcritos detectados por el ensayo RT-PCR están implicados en distintas vías relacionadas con la obesidad y el síndrome metabólico, como la lipogénesis, lipólisis, inflamación, metabolismo de la glucosa, adipogénesis, oxidación de ácidos grasos y gasto energético. Los genes fueron seleccionados en función de los resultados encontrados en la literatura que demuestran que cambios en sus niveles de ARNm son relevantes y desencadenan una cierta actividad biológica.

Los resultados obtenidos en el ensayo RT-PCR demostraron un aumento de la expresión del represor transcripcional de la adipogénesis (Aebp1) en el grupo suplementado con el extracto de manzana, que podría indicar un papel inhibitorio de los polifenoles de manzana en la adipogénesis. Se ha descrito previamente que los niveles de ARNm de Aebp1 en preadipocitos son modulados por algunos extractos vegetales [131]. Aebp1 está implicado en la diferenciación de los preadipocitos a adipocitos maduros a través de su efecto modulador de la activación de MAPK y su interacción con la proteína de unión a los ácidos grasos, importante para el transporte de ácidos grasos dentro del adipocito [132]. Sin embargo, no pudieron observarse cambios en otros factores de transcripción claves implicados en la adipogénesis, como PPAR γ o CEBP α . Otros polifenoles como las procianidinas [133,134], presentes en las manzanas, exhibieron una acción inhibitoria de la diferenciación de preadipocitos a adipocitos maduros *in vitro*.

Por otra parte, el extracto de polifenoles de manzana redujo perceptiblemente los niveles de expresión de Srebf1, aunque la expresión de sus genes diana no se modificó.

Como se ha comentado anteriormente, se ha demostrado que los niveles de ARNm de *Srebf1* no coinciden siempre con los cambios en la expresión de genes lipogénicos en el tejido adiposo [90,91]. La disminución en los niveles de *Srebf1* podría implicar una disminución de la adipogénesis en el tejido adiposo, ya que se ha demostrado que otros extractos polifenólicos inhiben la diferenciación del adipocito mediante la regulación de la expresión de *Srebf1* [135,136]. Los cambios en la expresión de *Srebf1* podría ser un efecto directo de los bajos niveles de insulina en las ratas suplementadas con polifenoles de manzana, puesto que se conoce que *Srebf1* es regulado por esta hormona [89].

Ppargc1a es otro factor de transcripción que fue sobreexpresado por la ingesta del extracto de manzana. *Ppargc1a* está implicado en la oxidación de los ácidos grasos y la biogénesis mitocondrial [137]. Además, se ha demostrado que este gen está implicado en la regulación de ciertas adipoquinas, ya que fue capaz de modular la expresión y la secreción de la apelina en adipocitos blancos humanos [138]. Según éste análisis, se propone que los adipocitos de ratas suplementadas con polifenoles de manzana podrían estar oxidando una mayor cantidad de ácidos grasos, derivados parcialmente de la dieta y parcialmente de la hidrólisis de los triglicéridos. En este sentido, se sabe que los ácidos grasos endógenos se oxidan activamente en el adipocito y que el aumento de la degradación de ácidos grasos hacia esta vía está asociado con el incremento de la lipólisis [139]. Además, la inducción de la lipólisis en los adipocitos blancos y el estímulo de la expresión de *Ppargc1a* en adipocitos marrones están ambos activados vía los receptores adrenérgicos- $\beta(3)$ [140]. Paralelamente, el aumento de la expresión del ARNm de *Ppargc1a* podría indicar un cambio parcial de un fenotipo blanco a un fenotipo marrón del tejido adiposo [141].

En relación a la perilipina, ésta fue sobreexpresada en los adipocitos de animales alimentados con dieta HFS mientras que la suplementación con el extracto de manzana invirtió este efecto. Un aumento en la expresión de los niveles de perilipina se relaciona con un aumento de la adipogénesis y un mayor tamaño de las gotas lipídicas [87]. En este sentido, la disminución de los niveles de ARNm de perilipina en los adipocitos de ratas suplementadas con polifenoles de manzana podría indicar, de nuevo, una inhibición de la adipogénesis por este extracto. En este sentido, ratones *knockout* para la perilipina presentan un fenotipo delgado acompañado de una disminución muy importante en los niveles de triglicéridos del tejido adiposo en comparación a los *wild-*

type, y demuestran ser resistentes a los efectos adipogénicos de una dieta alta en grasas [142,143]. Además, se han encontrado efectos similares en adipocitos primarios humanos tratados con el polifenol genisteína [135].

Los niveles de ARNm de Aqp7 también fueron sobreexpresados por la ingesta del extracto de manzana. La Aqp7 modula la permeabilidad del glicerol y del agua en el adipocito controlando por tanto la acumulación de triglicéridos y la homeostasis de la glucosa [144]. De hecho, los adipocitos de ratones *knockout* para la Aqp7 presentan un mayor volumen y una mayor acumulación de triglicéridos en comparación con los adipocitos de los ratones control [145]. Por consiguiente, la sobreexpresión de Aqp7 podría ayudar a explicar el aumento de secreción de glicerol observado en los experimentos de lipólisis *ex vivo* así como el menor tamaño de los adipocitos de ratas alimentadas con el extracto de manzana. El aumento de secreción de glicerol por los adipocito *ex vivo* no se trasladó en un aumento en los niveles circulantes de este metabolito. En esta línea, el glicerol liberado por el adipocito puede ser captado por el hígado para ser transformado en glucosa mediante la gluconeogénesis, debido a una necesidad de captación de glucosa por los tejidos periféricos en respuesta a la insulino-resistencia que presenta el organismo como consecuencia de la obesidad.

La suplementación con el extracto de manzana rico en polifenoles invirtió la sobreexpresión de la leptina inducida por la alimentación con HFS. Esta hormona actúa en regiones específicas del cerebro (principalmente el hipotálamo) para reducir la ingesta e incrementar el gasto energético modulando la expresión de varios neuropéptidos [146,147]. Como hemos comentado anteriormente, los niveles de leptina sérica se correlacionan con el contenido de grasa corporal. Los resultados de la expresión génica de la leptina coinciden con la disminución en los niveles circulantes de leptina y reflejan por un lado la reducción del tejido graso observada en los animales suplementados con el extracto de manzana y por otro lado, una expresión disminuida de esta hormona por los adipocitos extraídos del tejido adiposo epididimal. Los efectos de los polifenoles en la expresión de la leptina se han descrito previamente, en un estudio donde la suplementación de una dieta alta en grasas con EGCG durante 4 semanas disminuyó los niveles de ARNm de leptina en el tejido adiposo de ratones [129]. Aparentemente, la regulación de la expresión de la leptina por la ingesta de polifenoles en adipocitos aislados no ha sido descrita previamente. La reducción de los niveles

plasmáticos de leptina se han descrito también en hamsters alimentados con una dieta alta en grasas suplementada con un extracto de procianidinas procedentes de las semillas de uva [12] así como en ratas Wistar obesas alimentadas con una dieta hipocalórica suplementada con un extracto de té verde, en comparación a sus respectivos controles. Sin embargo, un estudio reciente realizado en adipocitos humanos SGBS, mostró como el tratamiento durante 48 horas de las células con los polifenoles EGCG, resveratrol y quercetina no modificaron la secreción de leptina [148].

Por último, la ausencia de cambios en la expresión génica del músculo esquelético por la ingesta del extracto de manzana sugiere que sus efectos beneficiosos sobre la obesidad y la resistencia a la insulina observados en los animales suplementados con polifenoles de manzana podría explicarse por un efecto directo de los polifenoles sobre los adipocitos del tejido adiposo blanco en vez de un efecto sobre el músculo.

5.6. Metilación del ADN

Diversos estudios han evidenciado un papel de los polifenoles en la modulación de la metilación del ADN en relación con sus propiedades anti-tumorigénicas [149,150,151]. Además este efecto epigenético se ha descrito también por parte de los polifenoles de manzana, cuando Fini y col descubrieron que el tratamiento con un extracto de polifenoles de manzana dio lugar a una demetilación de varios genes supresores tumorales y relativos a la edad *in vitro* [152] e *in vivo* [153]. Aunque existen algunas evidencias que indican que ciertos polifenoles inducen modificaciones en la acetilación de histonas en proteínas reguladoras del metabolismo [154], aparentemente no existe en la literatura ningún artículo que relacione los efectos de los polifenoles sobre la obesidad o el síndrome metabólico con alteraciones en la metilación del ADN. En el trabajo actual, se describe un aumento en la metilación de dos sitios CpG del promotor de la leptina (posición -292 y -198) por la dieta HFS y una reducción de la metilación hasta alcanzar valores basales del CpG en la posición -198 por los polifenoles de manzana. También se halló un aumento de la metilación del promotor de *Ppargc1a* por el extracto de manzana. Diversos estudios han evidenciado un control epigenético de la expresión génica de *Ppargc1a* por la ingesta de una dieta rica en grasas [155] y por la inactividad física [156] en el músculo humano y una asociación entre la resistencia a la insulina y la metilación del ADN del *Ppargc1a* en el hígado de pacientes con esteatosis

hepática no alcohólica [157]. Por otra parte, por primera se descubre una regulación epigenética del promotor del gen *Aqp7* tanto por la dieta HFS como por el extracto de manzana rico en polifenoles así como una regulación del promotor de *Srebf1* por los polifenoles de manzana, señalando estos genes como potenciales candidatos para futuros estudios epigenéticos.

Valorando los resultados del análisis de asociación, solamente los niveles de metilación del promotor de *Aqp7* y de leptina se correlacionaron significativamente con los niveles correspondientes de expresión génica. De este modo, se puede establecer como hipótesis que la metilación de ADN podría desempeñar un papel en la regulación de la transcripción de *Aqp7* y leptina mientras que la regulación de *Srebf1* y *Ppargc1a* podría estar mediada por otros procesos. La metilación de secuencias ricas en CpG en las regiones promotoras de los genes generalmente reprime la expresión de los genes interfiriendo con la unión de proteínas requeridas para la transcripción [102]. Inesperadamente, los niveles de metilación de los CpGs estudiados se correlacionaron positivamente con la expresión génica. Otros autores han propuesto que si la metilación del ADN ocurre en elementos reguladores negativos del promotor, la actividad transcripcional podría verse aumentada [158]. Estos autores proponen que la hipometilación de secuencias reguladoras positivas así como la hipermetilación de secuencias reguladoras negativas puede dar lugar a niveles más altos de la expresión génica. En este sentido, la expresión del receptor de estrógenos alfa se correlacionó positivamente con los niveles de metilación del ADN en un sitio CpG, localizado en un claro sitio de unión al represor transcripcional TGIF1, que ha demostrado contener un dominio que interactúa con la histona deacetilasa. Después de los estudios de ChIP sugirieron que una estructura cromosómica más “relajada” podría ser la causa del aumento de la transcripción en este sitio del factor de transcripción altamente metilado [159]. Finalmente, la correlación inversa encontrada entre el porcentaje de metilación de *Aqp7_CpG4* y los niveles de la insulina así como la expresión de leptina son especialmente relevantes ya que se ha descrito recientemente que la leptina y la insulina regulan directamente la expresión de *Aqp7* a través de la vía PI3K/Akt/mTOR en adipocitos *in vitro* [160].

La dosis de polifenoles de manzana usada en nuestros estudios es parecida a la usada en otros estudios realizados en animales [110,120,161], sin que en ninguno de ellos se

hayan observado efectos adversos para la salud. Sin embargo, antes de diseñar intervenciones en humanos para evaluar los efectos del extracto polifenólico de manzana en la prevención o el tratamiento de la obesidad, debería realizarse una evaluación en cuanto a la seguridad de la dosis que va a utilizarse, teniendo en cuenta también su biodisponibilidad. En este sentido, se cree que muchos de los efectos beneficiosos de los polifenoles observados *in vitro* no se reproducen en modelos animales o humanos debido a la baja biodisponibilidad de estos compuestos. Por tanto, un prerrequisito para que los polifenoles ejerzan un efecto *in vivo* es que deben ser absorbidos en el tracto gastrointestinal después de su consumo y alcanzar una concentración suficiente en plasma para inducir una actividad biológica. Un estudio reciente sobre el metabolismo de los polifenoles de manzana [162] concluye que los glucósidos de floreína y quercetina son hidrolizados en presencia de saliva mientras que en presencia de jugo gástrico las procianidinas son degradadas en epicatequinas. Además, después de la ingesta de zumo de manzana, se recogieron muestras de suero y orina de los voluntarios donde se detectó ácido cafeico, epicatequina, floreína y quercetina además de observar que un 20% de los polifenoles consumidos se presentaban ahora en forma de ácidos fenólicos e hipúricos hidroxilados.

En conclusión, los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que la ingesta de un extracto de polifenoles de manzana protege frente a la obesidad y la insulino-resistencia mediante una actividad directa sobre los adipocitos, modulando la lipólisis estimulada por catecolaminas así como la expresión de genes adipogénicos, lipolíticos y oxidativos. Además, algunos de estos genes podrían estar sujetos a una regulación epigenética. Recientemente, se ha descubierto que el polifenol principal presente en el té verde, EGCG, ejerce algunas de sus acciones antiadipogénicas a través del receptor de laminina de 67 kDa en los adipocitos [163]. Por lo tanto, sería interesante investigar si los polifenoles mayoritarios del extracto de manzana podrían actuar a través de un receptor específico del adipocito. Este estudio destaca el extracto de polifenoles de manzana como un ingrediente prometedor para el desarrollo de alimentos funcionales para la prevención y el tratamiento de la obesidad y sus complicaciones metabólicas.

La legislación actual no permite la introducción de ningún medicamento en los alimentos, pero sí permite la utilización de un compuesto de origen natural que sea de consumo habitual por humanos para poder incluirlo como ingrediente activo en un

alimento. Por tanto, los extractos seleccionados para este trabajo, al provenir de vegetales de consumo humano, podrían ser utilizados como suplementos nutricionales o ser añadidos a algún alimento, una vez demostrada su efectividad en estudios con humanos.

VI. Conclusiones

1. La caracterización de los modelos de obesidad inducida por una dieta alta en grasas (HF), alta en grasas y sacarosa (HFS) y alta en sacarosa (HS) en ratas Wistar macho refleja que la ingesta de la dieta HFS constituye un modelo de obesidad adecuado para el estudio de los potenciales efectos antiobesogénicos de extractos vegetales, ya que induce un aumento de la adiposidad, hiperleptinemia, hiperinsulinemia y resistencia a la insulina.
2. El nuevo software “Adiposoft” se confirma como un método automático útil para estudiar la histología del tejido adiposo blanco, analizando el número y el tamaño de los adipocitos, reduciendo considerablemente el tiempo y el esfuerzo en comparación con otras técnicas y mejorando así las metodologías existentes de análisis óptico.
3. El cribado realizado para testar las propiedades antiobesogénicas de distintos extractos vegetales ricos en polifenoles en un modelo de obesidad inducido por una dieta alta en grasas y sacarosa, demuestra que los extractos de manzana, canela, hamamelis y abedul previenen la ganancia de peso. Los extractos de manzana y canela muestran además una acción antiadipogénica. Por tanto, el extracto de polifenoles de manzana ha resultado el más prometedor para la prevención de la obesidad, como se refleja por la mejora que induce en las complicaciones metabólicas asociadas a la obesidad.
4. La suplementación con un extracto polifenólico de manzana previene el aumento del peso corporal y de la grasa total y visceral en ratas con obesidad inducida por la ingesta de una dieta alta en grasas y sacarosa, sin inducir cambios en la ingesta calórica.
5. La hipertrofia de los adipocitos del tejido adiposo epididimal inducida por la dieta alta en grasas y sacarosa es prevenida por la suplementación de dicha dieta con el extracto de polifenoles de manzana, sin observarse cambios a nivel hiperplásico.
6. La suplementación de la dieta con un extracto polifenólico de manzana reduce los niveles séricos de glucosa y la resistencia insulínica. Además, induce una mejora en la tolerancia a la glucosa en comparación a las ratas alimentadas con una dieta alta en grasas y sacarosa.
7. La respuesta lipolítica inducida por isoproterenol tiende a mejorar en los adipocitos aislados de grasa epididimal de ratas alimentadas con una dieta alta en grasas suplementada con un extracto de polifenoles de manzana, respecto a los adipocitos de ratas alimentadas con la misma dieta sin suplementación.

8. El estudio nutrigenómico realizado en adipocitos aislados de tejido adiposo epididimal muestra como la suplementación de la dieta con un extracto polifenólico de manzana aumenta el nivel de expresión de genes como *Aebp1*, un represor de la adipogénesis, *Aqp7*, implicado en el transporte de glicerol y *Ppargc1a*, relacionado con la oxidación de ácidos grasos. Además, el extracto de manzana previene el incremento de los niveles de ARNm de *Lep*, *Plin* y el factor de transcripción *Srebf1*, inducidos por la ingesta de la dieta alta en grasas y sacarosa. La suplementación de la dieta con un extracto polifenólico de manzana parece no afectar a la expresión de genes relacionados con la obesidad y la insulino-resistencia en el músculo esquelético.

9. La suplementación de la dieta con un extracto polifenólico de manzana previene la hipometilación del promotor del gen *Aqp7* en tres sitios CpG y reduce el incremento de metilación inducido por la dieta en el promotor del gen de la leptina (CpG en posición -198). Finalmente el extracto de manzana modificó los niveles de metilación de un sitio CpG de dos importantes factores de transcripción: *Srebf1* y *Ppargc1a*.

10. Los niveles de expresión de la leptina y la *Aqp7* se correlacionan positivamente con los niveles de metilación del promotor de la leptina (CpG en posición -198) y del promotor de la *Aqp7* (metilación total) respectivamente. Además, los niveles de metilación de *Aqp7* (CpG en posición +419) se asociaron negativamente con el peso del depósito graso epididimal y con los niveles plasmáticos de insulina y la expresión de leptina en adipocitos.

VII. Bibliografía

1. Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M (2005) Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr* 81:215S-7S.
2. Kim KH, Park Y (2011) Food components with anti-obesity effect. *Annu Rev Food Sci Technol* 2:237-57.
3. Live EtpFF (2006) Towards Implementing the ETP Food for Life. Retrieved from http://etpciaabe/documents/Lead_market_document_ETP_F4Lpdf.
4. EFSA Guidance for applicants on health claims. Retrieved from <http://www.efsa.europa.eu/en/nda/ndaguidelineshtm>.
5. Aquilano K, Baldelli S, Rotilio G, Ciriolo MR (2008) Role of nitric oxide synthases in Parkinson's disease: a review on the antioxidant and anti-inflammatory activity of polyphenols. *Neurochem Res* 33:2416-26.
6. Lambert JD, Hong J, Yang GY, Liao J, Yang CS (2005) Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. *Am J Clin Nutr* 81:284S-91S.
7. Markus MA, Morris BJ (2008) Resveratrol in prevention and treatment of common clinical conditions of aging. *Clin Interv Aging* 3:331-9.
8. Matsui T, Ebuchi S, Kobayashi M, Fukui K, Sugita K, Terahara N, et al (2002) Anti-hyperglycemic effect of diacylated anthocyanin derived from Ipomoea batatas cultivar Ayamurasaki can be achieved through the alpha-glucosidase inhibitory action. *J Agric Food Chem* 50:7244-8.
9. Rizvi SI, Zaid MA, Anis R, Mishra N (2005) Protective role of tea catechins against oxidation-induced damage of type 2 diabetic erythrocytes. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 32:70-5.
10. Vita JA (2005) Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function. *Am J Clin Nutr* 81:292S-7S.
11. Basu A, Sanchez K, Leyva MJ, Wu M, Betts NM, Aston CE, et al (2010) Green tea supplementation affects body weight, lipids, and lipid peroxidation in obese subjects with metabolic syndrome. *J Am Coll Nutr* 29:31-40.
12. Decorde K, Teissedre PL, Sutra T, Ventura E, Cristol JP, Rouanet JM (2009) Chardonnay grape seed procyanidin extract supplementation prevents high-fat diet-induced obesity in hamsters by improving adipokine imbalance and oxidative stress markers. *Mol Nutr Food Res* 53:659-66.

13. Ejaz A, Wu D, Kwan P, Meydani M (2009) Curcumin inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes and angiogenesis and obesity in C57/BL mice. *J Nutr* 139:919-25.
14. Murase T, Misawa K, Minegishi Y, Aoki M, Ominami H, Suzuki Y, et al (2011) Coffee polyphenols suppress diet-induced body fat accumulation by downregulating SREBP-1c and related molecules in C57BL/6J mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 300:E122-33.
15. Nagao T, Hase T, Tokimitsu I (2007) A green tea extract high in catechins reduces body fat and cardiovascular risks in humans. *Obesity (Silver Spring)* 15:1473-83.
16. Zhao H, Yakar S, Gavrilova O, Sun H, Zhang Y, Kim H, et al (2004) Phloridzin improves hyperglycemia but not hepatic insulin resistance in a transgenic mouse model of type 2 diabetes. *Diabetes* 53:2901-9.
17. Mollace V, Sacco I, Janda E, Malara C, Ventrice D, Colica C, et al (2011) Hypolipemic and hypoglycaemic activity of bergamot polyphenols: from animal models to human studies. *Fitoterapia* 82:309-16.
18. Noh JR, Lee IK, Kim YH, Gang GT, Hwang JH, Ly SY, et al (2011) Antiatherogenic Effect of Antioxidant Polyphenols from *Phellinus baumii* in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Ann Nutr Metab* 59:145-53.
19. Sae-tan S, Grove KA, Lambert JD (2011) Weight control and prevention of metabolic syndrome by green tea. *Pharmacol Res* 64:146-54.
20. Brown AL, Lane J, Holyoak C, Nicol B, Mayes AE, Dadd T (2011) Health effects of green tea catechins in overweight and obese men: a randomised controlled cross-over trial. *Br J Nutr* 106:1880-9.
21. Almoosawi S, Fyfe L, Ho C, Al-Dujaili E (2010) The effect of polyphenol-rich dark chocolate on fasting capillary whole blood glucose, total cholesterol, blood pressure and glucocorticoids in healthy overweight and obese subjects. *Br J Nutr* 103:842-50.
22. Terra X, Montagut G, Bustos M, Llopiz N, Ardevol A, Blade C, et al (2009) Grape-seed procyanidins prevent low-grade inflammation by modulating cytokine expression in rats fed a high-fat diet. *J Nutr Biochem* 20:210-8.
23. Saladin R, De Vos P, Guerre-Millo M, Leturque A, Girard J, Staels B, et al (1995) Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature* 377:527-9.

24. Aas AM, Hanssen KF, Berg JP, Thorsby PM, Birkeland KI (2009) Insulin-stimulated increase in serum leptin levels precedes and correlates with weight gain during insulin therapy in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 94:2900-6.
25. Cordain L, Eaton SB, Sebastian A, Mann N, Lindeberg S, Watkins BA, et al (2005) Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. *Am J Clin Nutr* 81:341-54.
26. DiGirolamo M, Fine JB, Tagra K, Rossmanith R (1998) Qualitative regional differences in adipose tissue growth and cellularity in male Wistar rats fed ad libitum. *Am J Physiol* 274:R1460-7.
27. Galinier A, Carriere A, Fernandez Y, Carpenne C, Andre M, Caspar-Bauguil S, et al (2006) Adipose tissue proadipogenic redox changes in obesity. *J Biol Chem* 281:12682-7.
28. Ong KT, Mashek MT, Bu SY, Greenberg AS, Mashek DG (2011) Adipose triglyceride lipase is a major hepatic lipase that regulates triacylglycerol turnover and fatty acid signaling and partitioning. *Hepatology* 53:116-26.
29. Hu HH, Nayak KS, Goran MI (2011) Assessment of abdominal adipose tissue and organ fat content by magnetic resonance imaging. *Obes Rev* 12:e504-15.
30. Eto H, Suga H, Matsumoto D, Inoue K, Aoi N, Kato H, et al (2009) Characterization of structure and cellular components of aspirated and excised adipose tissue. *Plast Reconstr Surg* 124:1087-97.
31. Maroni BJ, Haesemeyer R, Wilson LK, DiGirolamo M (1990) Electronic determination of size and number in isolated unfixed adipocyte populations. *J Lipid Res* 31:1703-9.
32. Verdes JM, Espino L, Goicoa A, Rigueira L, Ramil LA, Fidalgo LE (2011) Quantification of pericaudal adipocyte diameter in dairy cattle during peripartum: a complementary method to study energetic status using conventional histology. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* *In press*.
33. Lopes PA, Martins SV, Pinho MS, Alfaia CM, Fontes CM, Rodrigues PO, et al (2008) Diet supplementation with the cis-9,trans-11 conjugated linoleic acid isomer affects the size of adipocytes in Wistar rats. *Nutr Res* 28:480-6.
34. Tulp OL, DeBolt SP, Hansen CT, Michaelis OEt (1991) Effects of dietary carbohydrate and phenotype on adipose cellularity in female SHR/N-cp rats. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 99:229-34.

35. Lemonnier D (1972) Effect of age, sex, and sites on the cellularity of the adipose tissue in mice and rats rendered obese by a high-fat diet. *J Clin Invest* 51:2907-15.
36. Boque N, Campion J, Milagro FI, Moreno-Aliaga MJ, Martinez JA (2009) Some cyclin-dependent kinase inhibitors-related genes are regulated by vitamin C in a model of diet-induced obesity. *Biol Pharm Bull* 32:1462-8.
37. Faust IM (1984) Role of the fat cell in energy balance physiology. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* 62:97-107.
38. Pouteau E, Turner S, Aprikian O, Hellerstein M, Moser M, Darimont C, et al (2008) Time course and dynamics of adipose tissue development in obese and lean Zucker rat pups. *Int J Obes (Lond)* 32:648-57.
39. Aslan H, Altunkaynak BZ, Altunkaynak ME, Vuraler O, Kaplan S, Unal B (2006) Effect of a high fat diet on quantitative features of adipocytes in the omentum: an experimental, stereological and ultrastructural study. *Obes Surg* 16:1526-34.
40. Gale SK, Van Itallie TB, Faust IM (1981) Effects of palatable diets on body weight and adipose tissue cellularity in the adult obese female Zucker rat (fa/fa). *Metabolism* 30:105-10.
41. Bourgeois F, Alexiu A, Lemonnier D (1983) Dietary-induced obesity: effect of dietary fats on adipose tissue cellularity in mice. *Br J Nutr* 49:17-26.
42. Joe AW, Yi L, Even Y, Vogl AW, Rossi FM (2009) Depot-specific differences in adipogenic progenitor abundance and proliferative response to high-fat diet. *Stem Cells* 27:2563-70.
43. Kuo LE, Kitlinska JB, Tilan JU, Li L, Baker SB, Johnson MD, et al (2007) Neuropeptide Y acts directly in the periphery on fat tissue and mediates stress-induced obesity and metabolic syndrome. *Nat Med* 13:803-11.
44. Lomba A, Milagro FI, Garcia-Diaz DF, Marti A, Campion J, Martinez JA (2010) Obesity induced by a pair-fed high fat sucrose diet: methylation and expression pattern of genes related to energy homeostasis. *Lipids Health Dis* 9:60.
45. Couillard C, Mauriege P, Imbeault P, Prud'homme D, Nadeau A, Tremblay A, et al (2000) Hyperleptinemia is more closely associated with adipose cell hypertrophy than with adipose tissue hyperplasia. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24:782-8.

46. Solomon G, Niv-Spector L, Gonen-Berger D, Callebaut I, Djiane J, Gertler A (2006) Preparation of leptin antagonists by site-directed mutagenesis of human, ovine, rat, and mouse leptin's site III: implications on blocking undesired leptin action in vivo. *Ann N Y Acad Sci* 1091:531-9.
47. Moreno B, Monereo S, Álvarez J (2000) *Obesidad: la epidemia del siglo XXI*. 2ª Ed, Ediciones Díaz de Santos.
48. Martyn JA, Kaneki M, Yasuhara S (2008) Obesity-induced insulin resistance and hyperglycemia: etiologic factors and molecular mechanisms. *Anesthesiology* 109:137-48.
49. Boivin A, Deshaies Y (1995) Dietary rat models in which the development of hypertriglyceridemia and that of insulin resistance are dissociated. *Metabolism* 44:1540-7.
50. Gomez-Ruiz A, Milagro FI, Campion J, Martinez JA, de Miguel C (2011) High-fat diet feeding alters metabolic response to fasting/non fasting conditions. Effect on caveolin expression and insulin signalling. *Lipids Health Dis* 10:55.
51. Cinti S (2000) Anatomy of the adipose organ. *Eat Weight Disord* 5:132-42.
52. Fernandes-Santos C, Carneiro RE, de Souza Mendonca L, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA (2009) Pan-PPAR agonist beneficial effects in overweight mice fed a high-fat high-sucrose diet. *Nutrition* 25:818-27.
53. Campion J, Martinez JA (2004) Ketoconazole, an antifungal agent, protects against adiposity induced by a cafeteria diet. *Horm Metab Res* 36:485-91.
54. Jensen MD (1997) Lipolysis: contribution from regional fat. *Annu Rev Nutr* 17:127-39.
55. Langin D, Dicker A, Tavernier G, Hoffstedt J, Mairal A, Ryden M, et al (2005) Adipocyte lipases and defect of lipolysis in human obesity. *Diabetes* 54:3190-7.
56. Attane C, Foussal C, Le Gonidec S, Benani A, Daviaud D, Wanecq E, et al (2012) Apelin treatment increases complete Fatty Acid oxidation, mitochondrial oxidative capacity, and biogenesis in muscle of insulin-resistant mice. *Diabetes* 61:310-20.
57. Kim DH, Perdomo G, Zhang T, Slusher S, Lee S, Phillips BE, et al (2011) FoxO6 integrates insulin signaling with gluconeogenesis in the liver. *Diabetes* 60:2763-74.

58. Gao J, Ghibaudi L, van Heek M, Hwa JJ (2002) Characterization of diet-induced obese rats that develop persistent obesity after 6 months of high-fat followed by 1 month of low-fat diet. *Brain Res* 936:87-90.
59. Ghibaudi L, Cook J, Farley C, van Heek M, Hwa JJ (2002) Fat intake affects adiposity, comorbidity factors, and energy metabolism of sprague-dawley rats. *Obes Res* 10:956-63.
60. Garcia-Diaz DF, Campion J, Milagro FI, Lomba A, Marzo F, Martinez JA (2007) Chronic mild stress induces variations in locomotive behavior and metabolic rates in high fat fed rats. *J Physiol Biochem* 63:337-46.
61. Furnes MW, Zhao CM, Chen D (2009) Development of obesity is associated with increased calories per meal rather than per day. A study of high-fat diet-induced obesity in young rats. *Obes Surg* 19:1430-8.
62. Stepien M, Gaudichon C, Azzout-Marniche D, Fromentin G, Tome D, Even P (2011) Postprandial nutrient partitioning but not energy expenditure is modified in growing rats during adaptation to a high-protein diet. *J Nutr* 140:939-45.
63. Jackman MR, MacLean PS, Bessesen DH (2010) Energy expenditure in obesity-prone and obesity-resistant rats before and after the introduction of a high-fat diet. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 299:R1097-105.
64. Qiu J, Cheng R, Zhou XY, Zhu JG, Zhu C, Qin DN, et al (2010) Gene expression profiles of adipose tissue of high-fat diet-induced obese rats by cDNA microarrays. *Mol Biol Rep* 37:3691-5.
65. So M, Gaidhu MP, Maghdoori B, Ceddia RB (2011) Analysis of time-dependent adaptations in whole-body energy balance in obesity induced by high-fat diet in rats. *Lipids Health Dis* 10:99.
66. Tovar AR, Diaz-Villasenor A, Cruz-Salazar N, Ordaz G, Granados O, Palacios-Gonzalez B, et al (2011) Dietary type and amount of fat modulate lipid metabolism gene expression in liver and in adipose tissue in high-fat diet-fed rats. *Arch Med Res* 42:540-53.
67. Unger RH, Orci L (2001) Diseases of liporegulation: new perspective on obesity and related disorders. *Faseb J* 15:312-21.
68. Oliver P, Caimari A, Diaz-Rua R, Palou A (2011) Cold exposure down-regulates adiponutrin/PNPLA3 mRNA expression and affects its nutritional regulation in adipose tissues of lean and obese Zucker rats. *Br J Nutr* 1-13.

69. Rae-Whitcombe SM, Kennedy D, Voyles M, Thompson MP (2010) Regulation of the promoter region of the human adiponutrin/PNPLA3 gene by glucose and insulin. *Biochem Biophys Res Commun* 402:767-72.
70. Huang Y, He S, Li JZ, Seo YK, Osborne TF, Cohen JC, et al (2010) A feed-forward loop amplifies nutritional regulation of PNPLA3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:7892-7.
71. Baulande S, Lasnier F, Lucas M, Pairault J (2001) Adiponutrin, a transmembrane protein corresponding to a novel dietary- and obesity-linked mRNA specifically expressed in the adipose lineage. *J Biol Chem* 276:33336-44.
72. Johansson LE, Hoffstedt J, Parikh H, Carlsson E, Wabitsch M, Bondeson AG, et al (2006) Variation in the adiponutrin gene influences its expression and associates with obesity. *Diabetes* 55:826-33.
73. Oliver P, Caimari A, Diaz-Rua R, Palou A (2012) Diet-induced obesity affects expression of adiponutrin/PNPLA3 and adipose triglyceride lipase, two members of the same family. *Int J Obes (Lond)* 36:225-32.
74. Mitsutake S, Zama K, Yokota H, Yoshida T, Tanaka M, Mitsui M, et al (2011) Dynamic modification of sphingomyelin in lipid microdomains controls development of obesity, fatty liver, and type 2 diabetes. *J Biol Chem* 286:28544-55.
75. van Deurs B, Roepstorff K, Hommelgaard AM, Sandvig K (2003) Caveolae: anchored, multifunctional platforms in the lipid ocean. *Trends Cell Biol* 13:92-100.
76. Gomez-Ruiz A, Milagro FI, Campion J, Martinez JA, de Miguel C (2010) Caveolin expression and activation in retroperitoneal and subcutaneous adipocytes: influence of a high-fat diet. *J Cell Physiol* 225:206-13.
77. Razani B, Combs TP, Wang XB, Frank PG, Park DS, Russell RG, et al (2002) Caveolin-1-deficient mice are lean, resistant to diet-induced obesity, and show hypertriglyceridemia with adipocyte abnormalities. *J Biol Chem* 277:8635-47.
78. Simon E, Del Barrio AS (2002) [Leptin and obesity]. *An Sist Sanit Navar* 25 Suppl 1:53-64.
79. Harwood HJ, Jr. (2011) The adipocyte as an endocrine organ in the regulation of metabolic homeostasis. *Neuropharmacology In press*.

80. Mantzoros CS, Magkos F, Brinkoetter M, Sienkiewicz E, Dardeno TA, Kim SY, et al (2011) Leptin in human physiology and pathophysiology. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301:E567-84.
81. Li J, Yan J, Chen K, Wang Q, Zhao X, Zhang Y (2011) High fat diet induces obesity and alters the expression of MCHR1 and OB-Rb in the adipose tissue. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 36:823-9.
82. Lopes Nobre J, Lisboa PC, da Silva Lima N, Franco JG, Firmino Nogueira Neto J, de Moura EG, et al (2011) Calcium supplementation prevents obesity, hyperleptinaemia and hyperglycaemia in adult rats programmed by early weaning. *Br J Nutr In press*.
83. Murase T, Mizuno T, Omachi T, Onizawa K, Komine Y, Kondo H, et al (2001) Dietary diacylglycerol suppresses high fat and high sucrose diet-induced body fat accumulation in C57BL/6J mice. *J Lipid Res* 42:372-8.
84. Roberts CK, Berger JJ, Barnard RJ (2002) Long-term effects of diet on leptin, energy intake, and activity in a model of diet-induced obesity. *J Appl Physiol* 93:887-93.
85. Leibowitz SF, Chang GQ, Dourmashkin JT, Yun R, Julien C, Pamy PP (2006) Leptin secretion after a high-fat meal in normal-weight rats: strong predictor of long-term body fat accrual on a high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290:E258-67.
86. Beller M, Bulankina AV, Hsiao HH, Urlaub H, Jackle H, Kuhnlein RP (2010) PERILIPIN-dependent control of lipid droplet structure and fat storage in *Drosophila*. *Cell Metab* 12:521-32.
87. Park JR, Jung JW, Seo MS, Kang SK, Lee YS, Kang KS (2010) DNER modulates adipogenesis of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells via regulation of cell proliferation. *Cell Prolif* 43:19-28.
88. Greenberg AS, Egan JJ, Wek SA, Garty NB, Blanchette-Mackie EJ, Londos C (1991) Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets. *J Biol Chem* 266:11341-6.
89. Cagen LM, Deng X, Wilcox HG, Park EA, Raghov R, Elam MB (2005) Insulin activates the rat sterol-regulatory-element-binding protein 1c (SREBP-1c) promoter through the combinatorial actions of SREBP, LXR, Sp-1 and NF-Y cis-acting elements. *Biochem J* 385:207-16.

90. Bertile F, Raclot T (2004) mRNA levels of SREBP-1c do not coincide with the changes in adipose lipogenic gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 325:827-34.
91. Palmer DG, Rutter GA, Tavare JM (2002) Insulin-stimulated fatty acid synthase gene expression does not require increased sterol response element binding protein 1 transcription in primary adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 291:439-43.
92. Shimano H, Shimomura I, Hammer RE, Herz J, Goldstein JL, Brown MS, et al (1997) Elevated levels of SREBP-2 and cholesterol synthesis in livers of mice homozygous for a targeted disruption of the SREBP-1 gene. *J Clin Invest* 100:2115-24.
93. Liu R, Sun CH, Fu RX, Yan YS, Wang SR (2003) Expression of uncoupling protein-2 mRNA in diet-induced obesity-resistant rats. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* 37:446-9.
94. Yang NH, Wang CJ, Xu MJ, Hu XF (2005) [UCPs and PPARgamma2 mRNA in diet induced obesity resistant rats]. *Wei Sheng Yan Jiu* 34:556-8.
95. Surwit RS, Wang S, Petro AE, Sanchis D, Raimbault S, Ricquier D, et al (1998) Diet-induced changes in uncoupling proteins in obesity-prone and obesity-resistant strains of mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:4061-5.
96. Watson PM, Commins SP, Beiler RJ, Hatcher HC, Gettys TW (2000) Differential regulation of leptin expression and function in A/J vs. C57BL/6J mice during diet-induced obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279:E356-65.
97. Prpic V, Watson PM, Frampton IC, Sabol MA, Jezek GE, Gettys TW (2002) Adaptive changes in adipocyte gene expression differ in AKR/J and SWR/J mice during diet-induced obesity. *J Nutr* 132:3325-32.
98. Dray C, Debard C, Jager J, Disse E, Daviaud D, Martin P, et al (2010) Apelin and APJ regulation in adipose tissue and skeletal muscle of type 2 diabetic mice and humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298:E1161-9.
99. de Oliveira C, de Mattos AB, Biz C, Oyama LM, Ribeiro EB, do Nascimento CM (2011) High-fat diet and glucocorticoid treatment cause hyperglycemia associated with adiponectin receptor alterations. *Lipids Health Dis* 10:11.
100. Meeprom A, Sompong W, Suwannaphet W, Yibchok-anun S, Adisakwattana S (2011) Grape seed extract supplementation prevents high-fructose diet-induced

- insulin resistance in rats by improving insulin and adiponectin signalling pathways. *Br J Nutr* 106:1173-81.
101. Aoun M, Michel F, Fouret G, Schlernitzauer A, Ollendorff V, Wrutniak-Cabello C, et al (2012) A grape polyphenol extract modulates muscle membrane fatty acid composition and lipid metabolism in high-fat--high-sucrose diet-fed rats. *Br J Nutr* 106:491-501.
 102. Campion J, Milagro FI, Martinez JA (2009) Individuality and epigenetics in obesity. *Obes Rev* 10:383-92.
 103. Milagro FI, Campion J, Garcia-Diaz DF, Goyenechea E, Paternain L, Martinez JA (2009) High fat diet-induced obesity modifies the methylation pattern of leptin promoter in rats. *J Physiol Biochem* 65:1-9.
 104. Bouchard L, Thibault S, Guay SP, Santure M, Monpetit A, St-Pierre J, et al (2010) Leptin gene epigenetic adaptation to impaired glucose metabolism during pregnancy. *Diabetes Care* 33:2436-41.
 105. Jousse C, Parry L, Lambert-Langlais S, Maurin AC, Averous J, Bruhat A, et al (2011) Perinatal undernutrition affects the methylation and expression of the leptin gene in adults: implication for the understanding of metabolic syndrome. *Faseb J* 25:3271-8.
 106. Palou A, Pico C, Bonet ML (2004) Food safety and functional foods in the European Union: obesity as a paradigmatic example for novel food development. *Nutr Rev* 62:S169-81.
 107. Herranz-Lopez M, Fernandez-Arroyo S, Perez-Sanchez A, Barrajon-Catalan E, Beltran-Debon R, Menendez JA, et al (2012) Synergism of plant-derived polyphenols in adipogenesis: Perspectives and implications. *Phytomedicine In press*.
 108. WHO (Updated february 2011) Obesity and Overweight. Fact Sheet Number 311.
 109. Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS (1998) Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab* 83:847-50.
 110. Nakazato K, Song H, Waga T (2006) Effects of dietary apple polyphenol on adipose tissues weights in Wistar rats. *Exp Anim* 55:383-9.
 111. Couturier K, Batandier C, Awada M, Hininger-Favier I, Canini F, Anderson RA, et al (2010) Cinnamon improves insulin sensitivity and alters the body

- composition in an animal model of the metabolic syndrome. *Arch Biochem Biophys* 501:158-61.
112. Breslow MJ, Min-Lee K, Brown DR, Chacko VP, Palmer D, Berkowitz DE (1999) Effect of leptin deficiency on metabolic rate in ob/ob mice. *Am J Physiol* 276:E443-9.
 113. Perez YY, Jimenez-Ferrer E, Zamilpa A, Hernandez-Valencia M, Alarcon-Aguilar FJ, Tortoriello J, et al (2007) Effect of a polyphenol-rich extract from Aloe vera gel on experimentally induced insulin resistance in mice. *Am J Chin Med* 35:1037-46.
 114. Johnston KL, Clifford MN, Morgan LM (2002) Possible role for apple juice phenolic compounds in the acute modification of glucose tolerance and gastrointestinal hormone secretion in humans. *J Sci Food Agric* 82:1800-5.
 115. Jia Q, Liu X, Wu X, Wang R, Hu X, Li Y, et al (2009) Hypoglycemic activity of a polyphenolic oligomer-rich extract of *Cinnamomum parthenoxylon* bark in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine* 16:744-50.
 116. Anderson RA (2008) Chromium and polyphenols from cinnamon improve insulin sensitivity. *Proc Nutr Soc* 67:48-53.
 117. Klempel MC, Varady KA (2011) Reliability of leptin, but not adiponectin, as a biomarker for diet-induced weight loss in humans. *Nutr Rev* 69:145-54.
 118. Nagasako-Akazome Y, Kanda T, Ohtake Y, Shimasaki H, Kobayashi T (2007) Apple polyphenols influence cholesterol metabolism in healthy subjects with relatively high body mass index. *J Oleo Sci* 56:417-28.
 119. Wise T, Ford JJ (1998) Relationships of liver weight, cholesterol, albumin and alpha2-macroglobulin concentrations with ovarian function in swine. *J Steroid Biochem Mol Biol* 67:383-90.
 120. Ohta Y, Sami M, Kanda T, Saito K, Osada K, Kato H (2006) Gene Expression Analysis of the Anti-obesity Effect by Apple Polyphenols in Rats Fed a High Fat Diet or a Normal Diet. *J Oleo Sci* 55:305-14.
 121. Manzano S, Williamson G (2010) Polyphenols and phenolic acids from strawberry and apple decrease glucose uptake and transport by human intestinal Caco-2 cells. *Mol Nutr Food Res* 54:1773-80.
 122. Fang XK, Gao J, Zhu DN (2008) Kaempferol and quercetin isolated from *Euonymus alatus* improve glucose uptake of 3T3-L1 cells without adipogenesis activity. *Life Sci* 82:615-22.

123. Jernas M, Palming J, Sjöholm K, Jennische E, Svensson PA, Gabrielsson BG, et al (2006) Separation of human adipocytes by size: hypertrophic fat cells display distinct gene expression. *Faseb J* 20:1540-2.
124. Salans LB, Dougherty JW (1971) The effect of insulin upon glucose metabolism by adipose cells of different size. Influence of cell lipid and protein content, age, and nutritional state. *J Clin Invest* 50:1399-410.
125. Ogasawara J, Kitadate K, Nishioka H, Fujii H, Sakurai T, Kizaki T, et al (2011) Comparison of the effect of oligonol, a new lychee fruit-derived low molecular form of polyphenol, and epigallocatechin-3-gallate on lipolysis in rat primary adipocytes. *Phytother Res* 25:467-71.
126. Pinent M, Blade MC, Salvado MJ, Arola L, Ardevol A (2005) Intracellular mediators of procyanidin-induced lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *J Agric Food Chem* 53:262-6.
127. Park S, Kim da S, Kang S (2011) *Gastrodia elata* Blume water extracts improve insulin resistance by decreasing body fat in diet-induced obese rats: vanillin and 4-hydroxybenzaldehyde are the bioactive candidates. *Eur J Nutr* 50:107-18.
128. Cooling J, Blundell J (1998) Differences in energy expenditure and substrate oxidation between habitual high fat and low fat consumers (phenotypes). *Int J Obes Relat Metab Disord* 22:612-8.
129. Klaus S, Pultz S, Thone-Reineke C, Wolfram S (2005) Epigallocatechin gallate attenuates diet-induced obesity in mice by decreasing energy absorption and increasing fat oxidation. *Int J Obes (Lond)* 29:615-23.
130. Little AR, Miller DB, Li S, Kashon ML, O'Callaghan JP (2012) Trimethyltin-induced neurotoxicity: Gene expression pathway analysis, q-RT-PCR and immunoblotting reveal early effects associated with hippocampal damage and gliosis. *Neurotoxicol Teratol* 34:72-82.
131. Yamakawa J, Ishigaki Y, Takano F, Takahashi T, Yoshida J, Moriya J, et al (2008) The Kampo medicines Orengedokuto, Bofutsushosan and Boiogito have different activities to regulate gene expressions in differentiated rat white adipocytes: comprehensive analysis of genetic profiles. *Biol Pharm Bull* 31:2083-9.
132. Kim SW, Muise AM, Lyons PJ, Ro HS (2001) Regulation of adipogenesis by a transcriptional repressor that modulates MAPK activation. *J Biol Chem* 276:10199-206.

133. Pinent M, Blade MC, Salvado MJ, Arola L, Hackl H, Quackenbush J, et al (2005) Grape-seed derived procyanidins interfere with adipogenesis of 3T3-L1 cells at the onset of differentiation. *Int J Obes (Lond)* 29:934-41.
134. Shoji T, Koborj M, Shinmoto H, Yanagida A, Kanda T, Tsushida T (2000) Inhibitory Effects of Apple Polyphenols on Differentiation of 3T3-L1 Cells into Adipocytes. *Food Sci Technol Res* 6:119-21.
135. Park HJ, Della-Fera MA, Hausman DB, Rayalam S, Ambati S, Baile CA (2009) Genistein inhibits differentiation of primary human adipocytes. *J Nutr Biochem* 20:140-8.
136. Suzuki R, Tanaka M, Takanashi M, Hussain A, Yuan B, Toyoda H, et al (2011) Anthocyanidins-enriched bilberry extracts inhibit 3T3-L1 adipocyte differentiation via the insulin pathway. *Nutr Metab (Lond)* 8:14.
137. Crowley VE, Yeo GS, O'Rahilly S (2002) Obesity therapy: altering the energy intake-and-expenditure balance sheet. *Nat Rev Drug Discov* 1:276-86.
138. Mazzucotelli A, Ribet C, Castan-Laurell I, Daviaud D, Guigne C, Langin D, et al (2008) The transcriptional co-activator PGC-1alpha up regulates apelin in human and mouse adipocytes. *Regul Pept* 150:33-7.
139. Wang T, Zang Y, Ling W, Corkey BE, Guo W (2003) Metabolic partitioning of endogenous fatty acid in adipocytes. *Obes Res* 11:880-7.
140. Nguyen KD, Qiu Y, Cui X, Goh YP, Mwangi J, David T, et al (2011) Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. *Nature* 480:104-8.
141. Karamanlidis G, Karamitri A, Docherty K, Hazlerigg DG, Lomax MA (2007) C/EBPbeta reprograms white 3T3-L1 preadipocytes to a Brown adipocyte pattern of gene expression. *J Biol Chem* 282:24660-9.
142. Martinez-Botas J, Anderson JB, Tessier D, Lapillonne A, Chang BH, Quast MJ, et al (2000) Absence of perilipin results in leanness and reverses obesity in *Lepr(db/db)* mice. *Nat Genet* 26:474-9.
143. Tansey JT, Sztalryd C, Gruia-Gray J, Roush DL, Zee JV, Gavrilova O, et al (2001) Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:6494-9.

144. Rodriguez A, Catalan V, Gomez-Ambrosi J, Fruhbeck G (2006) Role of aquaporin-7 in the pathophysiological control of fat accumulation in mice. *FEBS Lett* 580:4771-6.
145. Hibuse T, Maeda N, Funahashi T, Yamamoto K, Nagasawa A, Mizunoya W, et al (2005) Aquaporin 7 deficiency is associated with development of obesity through activation of adipose glycerol kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:10993-8.
146. Masaki T, Yoshimichi G, Chiba S, Yasuda T, Noguchi H, Kakuma T, et al (2003) Corticotropin-releasing hormone-mediated pathway of leptin to regulate feeding, adiposity, and uncoupling protein expression in mice. *Endocrinology* 144:3547-54.
147. van de Wall E, Leshan R, Xu AW, Balthasar N, Coppari R, Liu SM, et al (2008) Collective and individual functions of leptin receptor modulated neurons controlling metabolism and ingestion. *Endocrinology* 149:1773-85.
148. Derdemezis CS, Kiortsis DN, Tsimihodimos V, Petraki MP, Vezyraki P, Elisaf MS, et al (2011) Effect of Plant Polyphenols on Adipokine Secretion from Human SGBS Adipocytes. *Biochem Res Int* 2011:285618.
149. Fang MZ, Wang Y, Ai N, Hou Z, Sun Y, Lu H, et al (2003) Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines. *Cancer Res* 63:7563-70.
150. Kato K, Long NK, Makita H, Toida M, Yamashita T, Hatakeyama D, et al (2008) Effects of green tea polyphenol on methylation status of RECK gene and cancer cell invasion in oral squamous cell carcinoma cells. *Br J Cancer* 99:647-54.
151. Masuda M, Ishida C, Arai Y, Okamura T, Ohsawa M, Shimakage M, et al (1998) Dual action of CD30 antigen: anti-CD30 antibody induced apoptosis and interleukin-8 secretion in Ki-1 lymphoma cells. *Int J Hematol* 67:257-65.
152. Fini L, Selgrad M, Fogliano V, Graziani G, Romano M, Hotchkiss E, et al (2007) Annurca apple polyphenols have potent demethylating activity and can reactivate silenced tumor suppressor genes in colorectal cancer cells. *J Nutr* 137:2622-8.
153. Fini L, Piazzini G, Daoud Y, Selgrad M, Maegawa S, Garcia M, et al (2011) Chemoprevention of intestinal polyps in *ApcMin/+* mice fed with western or

- balanced diets by drinking annurca apple polyphenol extract. *Cancer Prev Res (Phila)* 4:907-15.
154. Bai Y, Mao QQ, Qin J, Zheng XY, Wang YB, Yang K, et al (2010) Resveratrol induces apoptosis and cell cycle arrest of human T24 bladder cancer cells in vitro and inhibits tumor growth in vivo. *Cancer Sci* 101:488-93.
 155. Brons C, Jacobsen S, Nilsson E, Ronn T, Jensen CB, Storgaard H, et al (2010) Deoxyribonucleic acid methylation and gene expression of PPARGC1A in human muscle is influenced by high-fat overfeeding in a birth-weight-dependent manner. *J Clin Endocrinol Metab* 95:3048-56.
 156. Alibegovic AC, Sonne MP, Hojbjerre L, Bork-Jensen J, Jacobsen S, Nilsson E, et al (2010) Insulin resistance induced by physical inactivity is associated with multiple transcriptional changes in skeletal muscle in young men. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299:E752-63.
 157. Sookoian S, Rosselli MS, Gemma C, Burgueno AL, Fernandez Gianotti T, Castano GO, et al (2010) Epigenetic regulation of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease: impact of liver methylation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha promoter. *Hepatology* 52:1992-2000.
 158. Ngo V, Gourdjji D, Laverriere JN (1996) Site-specific methylation of the rat prolactin and growth hormone promoters correlates with gene expression. *Mol Cell Biol* 16:3245-54.
 159. Furst RW, Kliem H, Meyer HH, Ulbrich SE (2012) A differentially methylated single CpG-site is correlated with estrogen receptor alpha transcription. *J Steroid Biochem Mol Biol* 130:96-104.
 160. Rodriguez A, Catalan V, Gomez-Ambrosi J, Garcia-Navarro S, Rotellar F, Valenti V, et al (2011) Insulin- and leptin-mediated control of aquaglyceroporins in human adipocytes and hepatocytes is mediated via the PI3K/Akt/mTOR signaling cascade. *J Clin Endocrinol Metab* 96:E586-97.
 161. Yang J, Li Y, Wang F, Wu C (2010) Hepatoprotective effects of apple polyphenols on CCl4-induced acute liver damage in mice. *J Agric Food Chem* 58:6525-31.
 162. Kahle K, Kempf M, Schreier P, Scheppach W, Schrenk D, Kautenburger T, et al (2011) Intestinal transit and systemic metabolism of apple polyphenols. *Eur J Nutr* 50:507-22.

163. Ku HC, Chang HH, Liu HC, Hsiao CH, Lee MJ, Hu YJ, et al (2009) Green tea (-)-epigallocatechin gallate inhibits insulin stimulation of 3T3-L1 preadipocyte mitogenesis via the 67-kDa laminin receptor pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* 297:C121-32.

VIII. Anexos

Anexo 1. Some cyclin-dependent kinase inhibitors-related genes are regulated by vitamin C in a model of diet-induced obesity

Some Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors-Related Genes Are Regulated by Vitamin C in a Model of Diet-Induced Obesity

Noemí BOQUÉ, Javier CAMPIÓN, Fermín Ignacio MILAGRO, María-Jesús MORENO-ALIAGA, and José Alfredo MARTINEZ*

Institute of Nutrition and Food Science, University of Navarra; Pamplona 31008, Spain.

Received March 31, 2009; accepted May 22, 2009; published online May 28, 2009

The aim of this research was to investigate differential gene expression of cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs) in white adipose tissue (WAT) and liver from high-fat fed male Wistar rats with or without vitamin C (VC) supplementation (750 mg/kg of body weight). After 56 d of experimentation, animals fed on a cafeteria diet increased significantly body weights and total body fat. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) studies showed that cafeteria diet decreased p21 and p57 mRNA expression in subcutaneous WAT and increased p21 mRNA in liver. Overall, these data provide new information about the role of high fat intake on mRNA levels of several CKIs with implications in adipogenesis, cell metabolism and weight homeostasis. Interestingly, VC supplementation partially prevented diet-induced adiposity and increased p27 mRNA in liver without any changes in the other tissues and genes analyzed. Thus, hepatic mRNA changes induced by ascorbic acid indicate a possible role of these genes in diet-induced oxidative stress processes.

Key words cyclin-dependent kinase inhibitor; cafeteria diet; ascorbic acid; adipose tissue; fatty liver

Cell cycle progression implies the up and down-regulation of a number of genes.¹⁾ The key genes of this pathway are p21 (Cdkn1a), p27 (Cdkn1b) and p57 (Cdkn1c), which belong to the Cip/Kip family of cyclin-dependent kinases inhibitors (CKIs). They are regulated by the F-box protein Skp2²⁾ and in the case of p21 it is also under the control of the p53 tumor suppressor protein, which is activated when DNA is damaged.³⁾ During the last years, many investigations have focused on CKIs research due to their relationship with cancer.^{4–6)} Promising results have prompted that several scientific groups devote their efforts to investigate the relation of these molecules with other biological processes like adipogenesis⁷⁾ or β -cell function⁸⁾ among other functions. In this context, it has been recently reported a role of the Cip/Kip family in adipogenesis by regulating adipocyte proliferation and differentiation.^{9–13)} Specifically, it has been described that p21 and p27 are major regulators of adipocyte number *in vivo* and knockout animals lacking one or both of these proteins provide models for adipocyte hyperplasia studies.¹¹⁾ Moreover, Okada *et al.* (2007) have observed that abdominal irradiation was able to decrease the body weight gain of *ob/ob* mice and induce p21 gene expression in adipose tissue.¹²⁾ They have also reported that this reduction of body weight was accompanied by decreased adipose tissue weight without changes in adipocyte size. On the other hand, it has been described that mice fed with a high-fat diet during 25 weeks develop adipocyte hyperplasia and hypertrophy,¹³⁾ which was accompanied by a diminished p27 expression and an up-regulation of Skp2 protein in white adipose tissue (WAT). In this way, Skp2 *knockout* mice had a decrease in both subcutaneous and visceral fat pad mass and adipocyte number.¹⁴⁾ Furthermore, p53 has also been related to obesity, since it has been demonstrated that this gene is highly induced in adipocytes from *ob/ob* mice in a fed state¹⁵⁾ and that it plays an important role in the pathogenesis of fatty liver.¹⁶⁾

In this context, cafeteria diet fed animals is an accepted model of obesity induced by high-fat feeding that shares common Western diet features and drives to metabolic syn-

drome conditions.^{17,18)} Moreover, an enhanced oxidative stress status arising from an excessive release of reactive oxygen species has been documented in obese patients and overweight animals.^{19,20)} In this context, adiposity and hyperinsulinemia may enhance liver oxidative stress in cafeteria in comparison to control rats.²¹⁾ Moreover, pharmacological doses of vitamin C (VC), which have not been related with toxicity,²²⁾ have a protective role in the development of adiposity induced by a high fat diet, and p21 and p57 may play a possible role in this effect.^{23,24)} In this sense, CKIs and cell cycle progression are regulated by oxidative stress and reactive oxygen species (ROS),²⁵⁾ which allow to hypothesize a potential role of these genes in the development of diet-induced obesity.

The aim of this study was to analyze potential variations in mRNA levels of some key genes involved in cell cycle regulation in a rat model of obesity, and to determine a possible protective role of VC in preventing diet-induced adiposity through the regulation of CKIs.

MATERIALS AND METHODS

Animals Briefly, experiments were performed with twenty-five male Wistar rats from CIFA (Centre of Pharmaceutical Applied Investigation) of the University of Navarra with an initial weight of 250 g. Animals were kept in an isolated room with a constantly regulated temperature between 21 and 23 °C, and controlled (50±10%) humidity in a 12h artificial light cycle. They were randomized in three groups: Control group (*n*=8), Cafeteria group (*n*=8) and Cafeteria+VC (CafVitC) group (*n*=9). Control rats were fed with a standard pelleted chow diet from Harlan Ibérica (Barcelona, Spain) while Cafeteria and CafVitC rats were fed with a high-fat diet (cafeteria diet: 50% fat, 39% carbohydrates and 11% protein) to generate a diet-induced obesity model. Moreover, CafVitC group included a daily dose of VC (Pancreac Química SA, Barcelona, Spain) of 750 mg/kg rat, adequately distributed with the cafeteria diet. The different

* To whom correspondence should be addressed. e-mail: jalfmtz@unav.es

groups of rats had *ad libitum* water and food access, while body weight and food intake were daily recorded. At the sacrifice day (56 d), every animal was weighted for being anesthetized in a fasted state with Ketamine (50 mg/kg intraperitoneally (i.p.), Parke-Davis, Madrid, Spain) and Medetomidine (0.025 mg/kg i.p., Pfizer SA, Madrid, Spain). Body composition was measured using an EM-SCAN (Springfield, IL, U.S.A.) as described elsewhere.^{17,26} After the sacrifice by decapitation, blood was collected and serum was stored at -20°C , while tissue samples of liver and retroperitoneal and subcutaneous WAT were isolated, weighted and stored immediately at -80°C . All the procedures performed agreed with the national and institutional guidelines of the Animal Care and Use Committee at the University of Navarra.

Serum and Tissue Measurements Serum triglycerides were determined with the RANDOX kit for the *in vitro* diagnostic of triglycerides (Randox LTD, Laboratories, Ardmore Road, U.K.), glucose was measured using the HK-CP kit (ABX diagnostics, Montpellier, France) and total protein with total protein 250 kit (ABX-Diagnostic, Geneva, Switzerland) adapted for a COBAS MIRA (Roche, Basel, Switzerland) equipment. Hepatic malondialdehyde (MDA) was determined by a colorimetric assay for lipid peroxidation (Bioxytech, Portland, Geneve, OR, U.S.A.) and leptin and insulin quantification was performed by radioimmunoassay (RIA) following the protocol described by the manufacturer (Linco Research, MI, U.S.A.). Finally, the homeostatic model assessment (HOMA), as an insulin resistance index, was calculated using the following formula: (fasting plasma insulin \times plasma glucose)/22.5.

Determination of DNA Content Total DNA content from liver and from subcutaneous and retroperitoneal adipose tissues was analyzed using a fluorimetric technique (CyQUANT Cell Proliferation Assay Kit C-7026). Briefly, 250 mg of tissue was homogenized in a lysis buffer (NaCl 150 mM, Tris 10 mM pH 8, Triton-X-100 0.1%). Then, 0.5 μl of the dye was added to a 200 μl of the diluted sample and DNA was quantified using a bacteriophage λ DNA standard curve in a Polarstar fluorometer with an excitation wavelength of 480 nm and an emission wavelength of 520 nm as described elsewhere.²⁷

Gene Expression Analysis From frozen rat tissues (-80°C), total RNA was isolated by Trizol method (Invitrogen, CA, U.S.A.). Purified RNA was treated with DNase (Ambion, TX, U.S.A.) and used to generate cDNA with reverse transcriptase Maloney Murine Leukemia reverse transcriptase (M-MLV). Next, quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) was performed on an ABI PRISM 7000

HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, CA, U.S.A.). Specific Taqman probes for rat (Applied Biosystems) p21 (Rn00589996_m1), p57 (Rn00711097_m1), p27 (Rn00582195_m1), Skp2 (Rn01402565_g1), p53 (Rn00755717_m1), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (Rn99999916_s1) and 18S (Hs99999901_s1) were used. Changes in gene expression between Control, Cafeteria and CafVitC groups were calculated using the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method. In order to normalize expression values, Genorm software was applied for liver and retroperitoneal adipose tissue, whereas GAPDH was the housekeeping for subcutaneous adipose tissue.

Statistics All results are expressed as the average mean \pm standard error. Means comparisons were tested by Kruskal–Wallis test and groups were separated using the *U* Mann–Whitney test. Association analyses were performed using the Spearman correlation test. A level of probability up at $p < 0.05$ was set up as statistically significant and $p < 0.01$ as very statistically significant. For the statistical tests, SPSS software for Windows 15.0 was used (Chicago, IL, U.S.A.).

RESULTS

Animals fed on cafeteria diet during 56 d increased significantly body weight ($p = 0.003$), adiposity as total body fat ($p = 0.001$), and energy food intake ($p = 0.001$) in comparison to control chow fed group (Table 1). Moreover, high-fat diet induced a marked hyperleptinemia ($p = 0.002$), hyperglycemia, hyperinsulinemia and increased HOMA-index. In addition, liver weight and the levels of hepatic malondialdehyde, a parameter of tissue oxidative stress, were significantly affected by this diet ($p = 0.014$ and $p = 0.012$, respectively). On the other hand, when was compared to cafeteria group (Table 1), VC supplementation on high fat diet (CafVitC group) reduced significantly body weight gain ($p = 0.024$), as well as total body fat and leptinemia ($p = 0.009$ and $p = 0.034$), protecting thus against cafeteria-induced overweightness. Interestingly, this action on weight gain was independent of energy intake (Table 1) as it is indicated by the significant reduction of efficiency in CafVitC group compared to cafeteria group ($p = 0.036$).

Regarding the main goal of this work, gene expression control within proliferative pathway by high fat diet and VC supplementation in rats, RT-PCR analyses showed tissue and fat pad-specific regulation (Figs. 1–3). Thus, in the liver (Fig. 1) cafeteria diet induced a significant increase (two folds, $p = 0.021$) of p21 mRNA when was compared to chow fed rats. The analysis of the remaining genes concerning this

Table 1. Body Composition, Energy Intake, Serum Leptin and Hepatic MDA in the Experimental Dietary Groups (Control, Cafeteria and CafVitC)

	Control (n=8)	Cafeteria (n=8)	CafVitC (n=9)	C vs. Caf <i>p</i>	Caf vs. CafVitC <i>p</i>	C vs. CafVitC <i>p</i>
Final body weight (g)	409.38 \pm 11.68	503.25 \pm 22.63	447.44 \pm 10.90	**	*	*
Total body fat content (g/100 g)	14.21 \pm 0.94	21.87 \pm 1.36	17.55 \pm 0.74	**	**	n.s.
Energy food intake (kcal)	83.76 \pm 1.30	154.76 \pm 10.91	150.70 \pm 4.27	**	n.s.	**
Efficiency (g/100 kcal)	3.07 \pm 0.13	2.73 \pm 0.21	2.14 \pm 0.09	n.s.	*	**
Plasma leptin (ng/ml)	3.35 \pm 1.01	14.26 \pm 2.01	8.32 \pm 1.34	**	*	**
Liver weight (g)	8.96 \pm 8.96	12.21 \pm 1.21	10.37 \pm 0.68	*	n.s.	n.s.
MDA/protein ratio ($\mu\text{mol/g}$)	0.30 \pm 0.03	0.54 \pm 0.06	0.47 \pm 0.09	*	n.s.	n.s.

All the results are expressed as the mean value \pm standard error. Statistical analyses were performed using Kruskal–Wallis test and groups were separated using the *U* Mann–Whitney test. n.s., not significant; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; C, Control; Caf, Cafeteria; CafVitC, Cafeteria+VC.

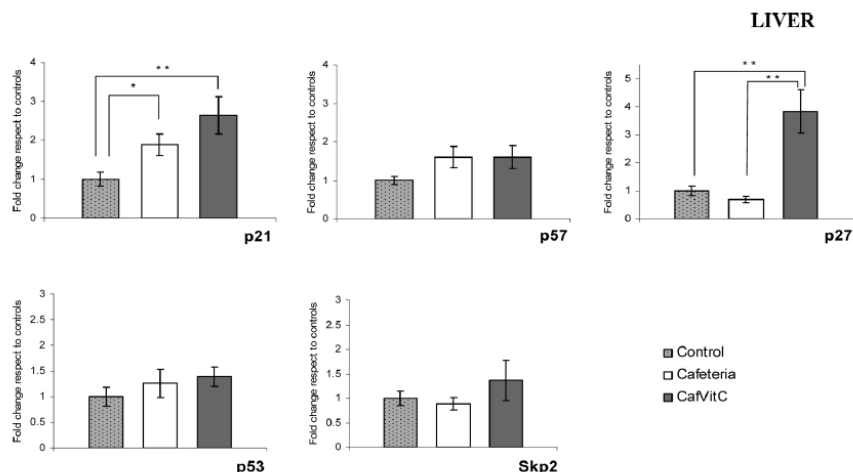


Fig. 1. Gene Expression Analysis Detected by RT-PCR in Liver of Control, Cafeteria and CafVitC Groups

All results are expressed as fold of change respect to controls (control set at unity), and showed as mean±S.E.M. (dotted bars, Control group; white bars, Cafeteria group; grey bars, CafVitC group; * $p<0.05$; ** $p<0.01$).

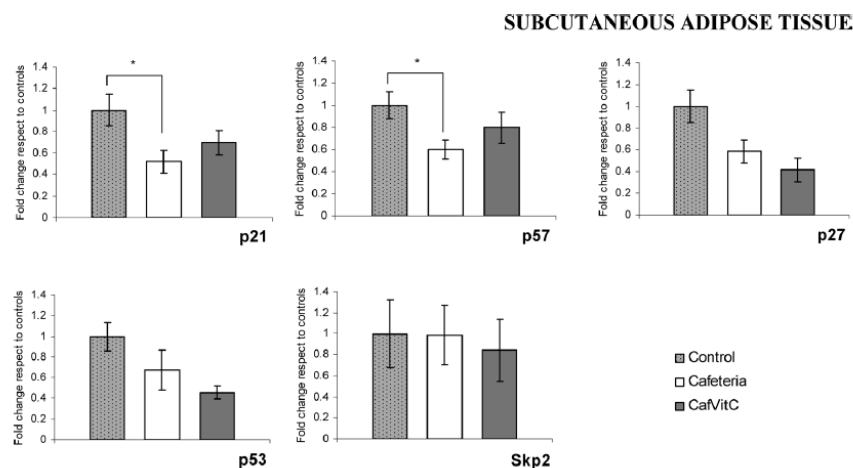


Fig. 2. Gene Expression Analysis Detected by RT-PCR in Subcutaneous WAT of Control, Cafeteria and CafVitC Groups

All results are expressed as fold of change respect to controls (control set at unity), and showed as mean±S.E.M. (dotted bars, Control group; white bars, Cafeteria group; grey bars, CafVitC group; * $p<0.05$).

metabolic pathway analyzed in liver did not show statistical changes in gene expression by high fat intake, despite of a tendency to increase p57 and p53 mRNA levels. When the effect of VC supplementation was studied in liver, the only gene significantly overexpressed was the key-protein p27 mRNA (about five folds, $p=0.002$). Finally, total DNA amount was similar between the three groups indicating that there does not apparently exist a diet or VC induced hepatocyte proliferation (C: 11.01 ± 0.12 , Caf: 10.07 ± 0.97 , CafVitC: 10.39 ± 0.71 mg of DNA per total weight depot).

Rats fed on cafeteria diet showed a significant decrease of p21 and p57 mRNA expression levels (both almost two folds, $p=0.019$ and $p=0.040$) in subcutaneous adipose tissue in comparison to the Control group (Fig. 2). Both p27 and p53 mRNAs showed a tendency to a decreased expression, without reaching statistical significance. Interestingly, concerning

the hypothesis of a possible VC-controlled adipocyte hyperplasia, this antioxidant administration did not affect significantly any of the investigated genes when CafVitC group was compared against Cafeteria group. In the case of the retroperitoneal fat depot, cell cycle controlling mRNAs expression was not seemingly affected (Fig. 3) by either high fat intake nor VC supplementation, indicating a depot-specific gene expression regulation depending on WAT body localization. In order to clarify proliferation diet induced proliferation, total DNA content was analyzed in the two fat pads. Thus, DNA amount in Cafeteria group increased more than 300% ($p=0.003$) and CafVitC group 2 fold ($p=0.008$) in comparison to control group (C: 1.00 ± 0.08 , Caf: 3.23 ± 0.04 , CafVitC: 1.92 ± 0.21 mg of DNA per weight depot). In the case of retroperitoneal adipose tissue, despite of showing significant differences ($p=0.012$), total DNA

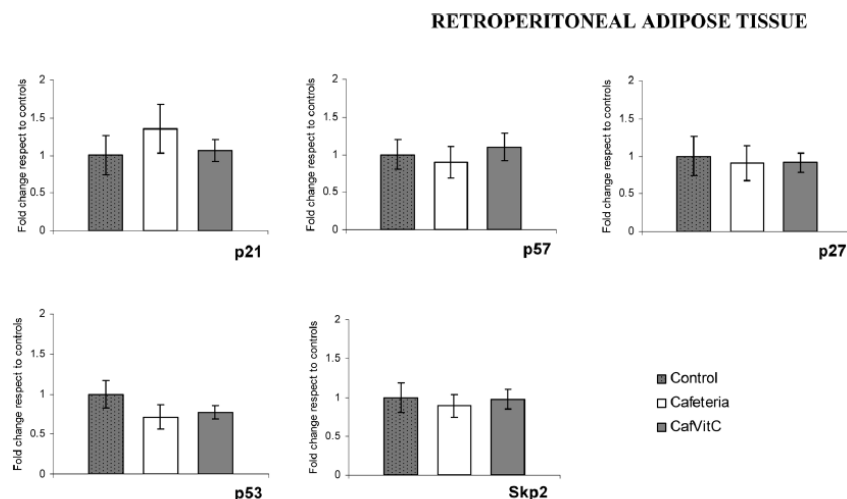


Fig. 3. Gene Expression Analysis Detected by RT-PCR in Retroperitoneal WAT of Control, Cafeteria and CafVitC Groups

All results are expressed as fold of change respect to controls (control set at unity), and showed as mean \pm S.E.M. (dotted bars, Control group; white bars, Cafeteria group; grey bars, CafVitC group).

from high-fat group was less increased (about 50%) in comparison to controls rats (C: 0.56 ± 0.02 , Caf: 0.78 ± 0.06 , CafVitC: 1.02 ± 0.13 mg of DNA per total weight depot).

Finally, in order to characterize the role of these genes as possible biomarkers of high-fat induced obesity or a VC protective effect, we analyzed the correlation of gene expression data with some of the biological key-variables affected by the experimental diets (Fig. 4). In relation to WAT, and despite the lack of significant changes in p53 mRNA levels by cafeteria diet, association analyses for Control and Cafeteria groups revealed that subcutaneous p53 mRNA levels may be a very relevant marker of adiposity (Fig. 4A), associated to total body fat (Spearman = -0.678 , $p=0.005$). Moreover, and specially for subcutaneous adipose depot, a very significant and negative association (Spearman = -0.581 , $p=0.007$) was detected after analyzing p21 mRNA gene expression and total DNA content from this depot, showing again a potential role of this protein in cell cycle regulation by high-fat diet. On the other hand, association analysis for Cafeteria and CafVitC groups indicated p27 mRNA as the cell-cycle key gene in relation to the protective effect of VC in liver. Thus, statistical studies showed significant correlations between p27 and almost all the analyzed variables, presenting stronger negative associations (Fig. 4B) between this gene and total body fat (Spearman = -0.875 , $p<0.001$), serum leptin levels (Spearman = -0.703 , $p=0.002$) and MDA (Spearman = -0.778 , $p<0.001$).

DISCUSSION

The main goal of this research was to investigate possible changes in the regulation of several cell-cycle controlling genes as affected by a diet with high fat content and the role of VC supplementation in two WAT depots and liver. The current study revealed a differential tissue and fat pad-specific regulation of the analyzed genes, which was evidenced

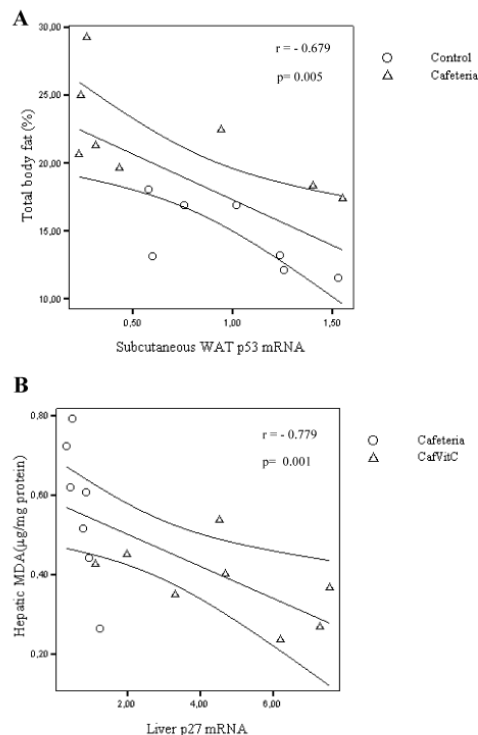


Fig. 4. Correlation Analyses between Oxidative Stress and Adiposity Markers with mRNA Gene Expression

(A) Total body fat and p53 gene expression correlation in subcutaneous WAT. (B) Hepatic MDA and p27 gene expression correlation in liver. Gene expression is expressed as fold of change respect to controls (○, Cafeteria; △, CafVitC; MDA, liver malondialdehyde; r , Spearman correlation coefficient).

in three genes of the subcutaneous adipose tissue (p21, p57 and p53) and one in liver (p21). On the other hand, this study found that the p27 gene was upregulated by vitamin C in liver. Some of those genes were selected after a microarray assay from a previous experiment, revealing a myriad of changes at the transcriptional level.²³⁾

It is widely recognized that high fat intake induces both adipocyte hyperplasia and hypertrophy,^{28,29)} generating an increased adiposity, chronic inflammation and obesity-related features such as insulin resistance and hyperleptinemia.¹⁸⁾ Several publications have recently confirmed that some of the genes of CKIs family may be related to the process of cell proliferation and differentiation within the adipose tissue,^{30,31)} which could involve hyperplasia mechanisms concerning obesity onset.

Adipocyte hyperplasia begins with a number of cell divisions (mitotic clonal expansion), followed by a growth arrest that induces gene expression for fat metabolism, thereby accumulating large cytosolic fat droplets.⁷⁾ Cell division occurs when D and E type cyclins bind to their CDK partners and allows the cell cycle progression from G1 to S phase. This progression can be inhibited by cyclin-dependent kinase inhibitors, which bind and inactivate cyclin/CDK complexes and so they play a regulatory role in differentiation, apoptosis, tumor suppression and cell cycle progression.³⁰⁾ In this sense, some studies have revealed that expression of p21 and p27 inhibitors in 3T3-L1 is almost undetectable in subconfluent cells, increases slightly in confluent cells and markedly during differentiation.^{31,32)}

Here, it is described a marked inhibition of p21 and p57 mRNAs by a high-fat intake in the subcutaneous adipose tissue and a strong negative association between p53 mRNA levels and total body fat, when Control and Cafeteria groups were analyzed. This finding supports the hypothesis that the decrease of these mRNA levels by consuming a cafeteria diet could lead to an increase of preadipocyte proliferation. These data agree with other *in vivo* studies, where it has been shown an increase on body weight and adipose tissue in a p21/p27 knockout mouse.¹¹⁾ Moreover, we have demonstrated for the first time a role of p57 in the development of diet-induced obesity, possibly by modulating the proliferation and differentiation processes on subcutaneous adipose tissue cells. Thus, in different cell lines, downregulation of p57 gene is involved in the cell cycle progression.^{33,34)} Therefore, p57 could participate in adipocyte proliferation although further studies are warranted.

Regarding the mechanisms of action of these CKIs in adipogenesis, it could be related at a transcriptional level with E2F,³⁵⁾ the proliferation cell nuclear antigen (PCNA),³⁶⁾ and peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ .³⁷⁾ Thus, p27 knockout mice had no change in CCAAT-enhancer-binding proteins (C/EBP) α level, but they did have increased PPAR γ , which may suggest that p27 deficiency results in altered adipogenesis.⁹⁾ Moreover, it has been shown that adipogenesis is induced by cyclin D3, through PPAR γ up-regulation.³⁸⁾ In this sense, it has been demonstrated that FoxO1, which is required for PPAR γ -enhanced adipocyte differentiation, regulates the cell cycle through transcriptional regulation of p27 and p21, among other genes.³⁹⁾

On the other hand, data from experiments of total DNA content in adipose tissue indicated that when animals were

fed with cafeteria diet during 56 d, the number of cells (showed as total DNA) from subcutaneous adipose tissue increased in a massive way in comparison to control group. However, in the retroperitoneal adipose tissue the proliferation was less important, suggesting that the fat tissue expansion in this depot is carried out in a different way than in subcutaneous adipocytes. Thus, these results lead together to the significant association reported and match with the results obtained from gene expression assays, confirming a possible role of p21 protein in the increased proliferation high-fat induced.

Regarding fat-depot differences between CKIs expression in the subcutaneous and the retroperitoneal adipose tissue, it could be due to the different proliferating capacity of these two depots. Thus, DiGirolamo *et al.*⁴⁰⁾ described regional adipose growth differences, with a high proliferating rate of the subcutaneous adipose tissue compared with the visceral one, which has been confirmed also in humans.⁴¹⁾ Moreover, the results of DNA experiments indicated that hyperplasia was higher in the subcutaneous than in the retroperitoneal fat pad. So, the dietary management induced changes in body weight and adiposity which could be due to an increase of adipose tissue cellularity in the subcutaneous adipose tissue, marked by the decreased expression of CKIs, with minor effects on the retroperitoneal depot.

Otherwise, p53 could be involved in the reduction of p21 mRNA in subcutaneous adipocytes induced by the diet, since it has been described a p53 response element in the human p21 promoter,^{15,42)} but not in the diminished expression of p57. So, the increased accumulation of intracellular lipids due to the high-fat diet intake, may be a cellular stress associated to large adipocytes that could lead to the activation of the p53/p21 pathway, required for survival of hypertrophic adipocytes. Thus, it has been proposed that p53 might influence cellular turnover processes and might shorten the life span of adipocytes.¹⁵⁾

Curiously, it seems that Skp2 gene expression is not apparently involved in the regulation of the studied genes,^{13,43)} although it has been reported a role for the F-box protein Skp2 in the degradation of p27,³⁰⁾ p57,⁴⁴⁾ p21⁴⁵⁾ and E2F-1.⁴⁶⁾ Thus, Skp2 mediates polyubiquitylation, targeting modified substrates for degradation by the 26S proteasome.⁴⁷⁾ Some authors have reported that Skp2 expression increases when preadipocytes are induced to differentiate, and that inhibition of Skp2 led to accumulation of p27 suggesting that the absence of Skp2 may have effects on mitotic clonal expansion.¹⁴⁾

The profiling pattern induced by the cafeteria diet feeding on the set of analyzed genes in the liver seems to be completely different to the adipose tissue outcome. The diet caused a significant increase of p21 mRNA expression and a tendency to increase the expression of p57 mRNA levels. These results are in some accordance with those obtained from other authors,⁴⁸⁾ who demonstrated an overexpression of p21 gene in the non-alcoholic fatty liver of rodents. Thus, it has been proposed that this increase in gene expression is due to a response to the oxidative stress and the hypoxia generated by fat accumulation in the hepatocytes. Probably, p21 action consists in the inhibition of hepatocyte cell cycle, since other authors have observed that steatotic livers have lower phosphorylation of retinoblastoma proteins, avoiding

the liberation of E2F transcription factors and so resulting in the arrest of fatty hepatocytes in G1 phase of the cell cycle.⁴⁹ This situation may inhibit the hepatic tissue capacity of regeneration and lead to the fatty liver pathogenesis, since the overexpression of p21 in the liver was followed by hepatic lipid accumulation and increased hepatic triglycerides.¹² In fact, high fat diet is known to induce liver oxidative stress in the animals²¹ and contribute to hepatic disorders aggravating the cafeteria-induced metabolic syndrome. Thus, increased hepatic ROS and lipid peroxidation causes inflammation and non-alcoholic fatty liver disease,⁵⁰ a clinical relevant issue, that is a major cause of liver-related morbidity, which has been related to human obesity in epidemiological studies.²⁰

In spite of the lack of effect of VC supplementation in adipose tissue gene expression profiling, this antioxidant induced a clear and promising effect specifically on p27 mRNA gene expression in liver. Moreover, correlation studies indicate a strong and very significant statistical association between hepatic MDA and p27 mRNA levels, when Cafeteria and CafVitC groups were analyzed. Thus, this antioxidant could induce the upregulation of p27 mRNA as a protective mechanism against cafeteria-induced oxidative stress, leading to a possible reduction of hepatic lipid peroxidation, mediated or not by intratisular ROS.⁵¹

In conclusion, this study confirms a tissue-specific regulation of some cell cycle key genes as affected by cafeteria diet and ascorbic acid in WAT and in the liver, suggesting the importance of cell cycle modulation in adipogenesis processes. Moreover, the results of this experiment open a promising field to modify the expression of Cip/Kip family genes in adipose tissue, taking into account the role of several epigenetic mechanisms involved in their regulation.^{52,53} Finally, this research may be useful in order to investigate the possible administration of pharmacological agents,⁵⁴ or functional ingredients⁵⁵ such as saponins, for inhibiting some of the damaging effects of the westernized diets involving a high fat consumption and a low antioxidant intake.

Acknowledgments The authors wish to thank to Línea Especial (LE/97) from the University of Navarra, MEC grant (AGL2006-04716/ALI), as well as Department of Education of the Government of Navarra for financial support.

REFERENCES

- 1) Beijersbergen R. L., Bernards R., *Biochim. Biophys. Acta*, **1287**, 103–120 (1996).
- 2) Lin D. I., Diehl J. A., *Trends Biochem. Sci.*, **29**, 453–455 (2004).
- 3) Appella E., Anderson C. W., *Eur. J. Biochem.*, **268**, 2764–2772 (2001).
- 4) Lee C. C., Ichihara T., Yamamoto S., Wanibuchi H., Sugimura K., Wada S., Kishimoto T., Fukushima S., *Carcinogenesis*, **20**, 1697–1708 (1999).
- 5) Liu W. M., Scott K. A., Shahin S., Propper D. J., *Eur. J. Biochem.*, **271**, 2773–2781 (2004).
- 6) Zhao J., Yang C. L., Zhao S. Y., *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, **29**, 289–292 (2007).
- 7) Tang Q. Q., Otto T. C., Lane M. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 44–49 (2003).
- 8) Kassem S. A., Ariel I., Thornton P. S., Hussain K., Smith V., Lindley K. J., Aynsley-Green A., Glaser B., *Diabetes*, **50**, 2763–2769 (2001).
- 9) Lin J., Della-Fera M. A., Li C., Page K., Choi Y. H., Hartzell D. L., Baile C. A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **300**, 938–942 (2003).
- 10) Nakayama K., Ishida N., Shirane M., Inomata A., Inoue T., Shishido N., Horii I., Loh D. Y., Nakayama K., *Cell*, **85**, 707–720 (1996).
- 11) Naaz A., Holsberger D. R., Iwamoto G. A., Nelson A., Kiyokawa H., Cooke P. S., *FASEB J.*, **18**, 1925–1927 (2004).
- 12) Okada S., Kobayashi K., Ishikawa M., Inoue N., Yamada N., Shimano H., *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **40**, 123–130 (2007).
- 13) Sakai T., Sakaue H., Nakamura T., Okada M., Matsuki Y., Watanabe E., Hiramatsu R., Nakayama K., Nakayama K. I., Kasuga M., *J. Biol. Chem.*, **282**, 2038–2046 (2007).
- 14) Cooke P. S., Holsberger D. R., Cimafranca M. A., Meling D. D., Beals C. M., Nakayama K., Nakayama K. I., Kiyokawa H., *Obesity*, **15**, 1400–1408 (2007).
- 15) Yahagi N., Shimano H., Matsuzaka T., Najima Y., Sekiya M., Nakagawa Y., Ide T., Tomita S., Okazaki H., Tamura Y., Iizuka Y., Ohashi K., Gotoda T., Nagai R., Kimura S., Ishibashi S., Osuga J., Yamada N., *J. Biol. Chem.*, **278**, 25395–25400 (2003).
- 16) Yahagi N., Shimano H., Matsuzaka T., Sekiya M., Najima Y., Okazaki S., Okazaki H., Tamura Y., Iizuka Y., Inoue N., Nakagawa Y., Takeuchi Y., Ohashi K., Harada K., Gotoda T., Nagai R., Kadowaki T., Ishibashi S., Osuga J., Yamada N., *J. Biol. Chem.*, **279**, 20571–20575 (2004).
- 17) Lamas O., Martínez J. A., Martí A., *J. Nutr. Biochem.*, **15**, 418–425 (2004).
- 18) Garcia-Diaz D., Campion J., Milagro F. I., Martínez J., *Mol. Cell. Biochem.*, **305**, 87–94 (2007).
- 19) Vincent H. K., Taylor A. G., *Int. J. Obes.*, **30**, 400–418 (2006).
- 20) Furukawa S., Fujita T., Shimabukuro M., Ikawi M., Yamada Y., Nakajima Y., Nakayama O., Makishima M., Matsuda M., Shimomura I., *J. Invest.*, **114**, 1752–1761 (2004).
- 21) Milagro F. I., Campion J., Martínez J. A., *Obesity*, **14**, 1118–1123 (2006).
- 22) Tarín J. J., Pérez-Albalá S., Pertua J. F., Cano A., *Theriogenology*, **57**, 1539–1550 (2002).
- 23) Campion J., Milagro F. I., Fernandez D., Martínez J. A., *J. Physiol. Biochem.*, **62**, 71–80 (2006).
- 24) Campion J., Milagro F. I., Fernandez D., Martínez J. A., *Int. J. Vit. Nutr. Res.*, **78**, 87–95 (2008).
- 25) O'Reilly M. A., *Antioxid. Redox Signal*, **7**, 108–118 (2005).
- 26) Berraondo B., Martínez J. A., *Obes. Res.*, **8**, 255–261 (2000).
- 27) Elliott W. M., Auersperg N., *Biotech. Histochem.*, **68**, 29–35 (1993).
- 28) Ghorbani M., Claus T. H., Himms-Hagen J., *Biochem. Pharmacol.*, **54**, 121–131 (1997).
- 29) Hausman G. J., Hausman D. B., *J. Clin. Invest.*, **116**, 3103–3106 (2006).
- 30) Auld C. A., Morrison R. F., *Obesity*, **14**, 2136–2144 (2006).
- 31) Morrison R. F., Farmer S. R., *J. Biol. Chem.*, **274**, 17088–17097 (1999).
- 32) Reichert M., Eick D., *Oncogene*, **18**, 459–466 (1999).
- 33) Nakano N., Urasawa K., Takagi Y., Saito T., Kaneta S., Ishikawa S., Higashi H., Tsutsui H., Hatakeyama M., Kitabatake A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **338**, 1661–1667 (2005).
- 34) Jin R. J., Lho Y., Wang Y., Ao M., Revelo M. P., Hayward S. W., Wills M. L., Logan S. K., Zhang P., Matusik R. J., *Cancer Res.*, **68**, 3601–3608 (2008).
- 35) Sharma N., Timmers C., Trikha P., Saavedra H. I., Obery A., Leone G., *J. Biol. Chem.*, **281**, 36124–36131 (2006).
- 36) Cazzalini O., Perucca P., Savio M., Necchi D., Bianchi L., Stivala L. A., Ducommun B., Scovassi A. I., Prosperi E., *Nucleic Acids Res.*, **36**, 1713–1722 (2008).
- 37) Sarruf D. A., Iankova I., Abella A., Assou S., Miard S., Fajas L., *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 9985–9995 (2005).
- 38) Martí A., Wirbelauer C., Scheffner M., Krek W., *Nat. Cell Biol.*, **1**, 14–19 (1999).
- 39) Yun S. J., Kim E. K., Tucker D. F., Kim C. D., Birnbaum M. J., Bae S. S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **371**, 138–143 (2008).
- 40) DiGirolamo M., Fine J. B., Tagra K., Rossmanith R., *Am. J. Physiol.*, **274**, 1460–1467 (1998).
- 41) Van Harmelen V., Röhrig K., Hauner H., *Metabolism*, **53**, 632–637 (2004).
- 42) el-Deiry W. S., Tokino T., Velculescu V. E., Levy D. B., Parsons R., Trent J. M., Lin D., Mercer W. E., Kinzler K. W., Vogelstein B., *Cell*, **75**, 817–825 (1993).
- 43) Zhong L., Georgia S., Tschen S. I., Nakayama K., Nakayama K. I., Bhushan A., *J. Clin. Invest.*, **117**, 2869–2876 (2007).
- 44) Kamura T., Hara T., Kotoshiba S., Yada M., Ishida N., Imaki H., Hatakeyama S., Nakayama K., Nakayama K. I., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 10231–10236 (2003).

- 45) Bornstein G., Bloom J., Sitry-Shevah D., Nakayama K., Pagano M., Hershko A., *J. Biol. Chem.*, **278**, 25752—25757 (2003).
- 46) Marti A., Wirbelauer C., Scheffner M., Krek W., *Nat. Cell Biol.*, **1**, 14—19 (1999).
- 47) Nakayama K. I., Nakayama K., *Semin. Cell Dev. Biol.*, **16**, 323—333 (2005).
- 48) Donthamsetty S., Bhawe V. S., Mitra M. S., Latendresse J. R., Mehendale H. M., *Hepatology*, **45**, 391—403 (2007).
- 49) Nakayama K. I., Nakayama K., *Semin. Cell Dev. Biol.*, **16**, 323—333 (2005).
- 50) Matsuzawa N., Takamura T., Kurita S., Misu H., Ota T., Ando H., Yokoyama M., Honda M., Zen Y., Nakanuma Y., Miyamoto K., Kaneko S., *Hepatology*, **46**, 1392—1403 (2007).
- 51) Sacca P., Caballero F., Batlle A., Vazquez E., *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **36**, 1945—1953 (2004).
- 52) Pogribny I. P., James J., *J. Nutr. Biochem.*, **8**, 355—359 (1997).
- 53) Gévry N., Chan H. M., Laflamme L., Livingston D. M., Gaudreau L., *Genes Dev.*, **21**, 1869—1881 (2007).
- 54) Egawa K., Nishigori H., Kunimoto S., Takeuchi T., Nose K., *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 899—904 (1998).
- 55) Kimura H., Ogawa S., Jisaka M., Kimura Y., Katsube T., Yokota K., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **41**, 1657—1665 (2006).

ANEXO 2: de la Iglesia R, Milagro FI, Campión J, Boqué N, Martínez JA. Healthy properties of proanthocyanidins. *Biofactors*. 2010 May-Jun; 36(3):159-68 [Enlace](#)

ANEXO 3: Garcia-Diaz DF, Campion J, Milagro FI, Boque N, Moreno-Aliaga MJ, Martinez JA. Vitamin C inhibits leptin secretion and some glucose/lipid metabolic pathways in primary rat adipocytes. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2010; 45(1):33-43.

ANEXO 4: Gonzalez-Moreno, O., Boque, N., Redrado, M., Milagro, F., Campion, J., Endermann, T., Takahashi, K., Saito, Y., Catena, R., Schomburg, L. and Calvo, A. (2011), Selenoprotein-P is down-regulated in prostate cancer, which results in lack of protection against oxidative damage. *Prostate*, 71: 824–834. doi: 10.1002/pros.21298

ANEXO 5: de la Garza A, Milagro F, Boque N, Campion J, Martinez J. Natural inhibitors of pancreatic lipase as new players in obesity treatment. *Planta Medica* [serial online]. 2011;(8):773.

Anexo 6. Otras publicaciones

Bondia-Pons I, Boqué N, Paternain L, Santamaría E, Fernández J, Campión J, Milagro F, Corrales F, Martínez JA. Liver proteome changes induced by a short-term high-fat-sucrose diet in Wistar rats. J Nutrigenet Nutrigenomics. Aceptado (en prensa).

Galarraga M, Campión J, Munoz-Barrutia A, Boqué N, Moreno H, Martinez JA, Milagro F, Ortiz-de-Solorzano C. Adiposoft: An automated software for the analysis of white adipose tissue cellularity in histological sections. Enviado a Journal of Lipid Research.

Anexo 7. Contribuciones a congresos

2007 - *Chronic mild stress induce variations in locomotive behaviour and metabolic rates in high fat fed rats.* Garcia-Diaz DF, Campion J, Milagro FI, Lomba A, Boqué N, Fanjul MC, Marzo F and Martinez JA. 4th Meeting of the CTP Network. Burdeos.

2008 - *High-fat diet and vitamin C supplementation in rats modify the expression of cyclin-dependent kinase inhibitors in liver and adipose tissue.* Boqué N, Campión J, Milagro FI and Martínez JA. 16th European Congress on Obesity (ECO). Ginebra. Publicado en: Int J Obes, 2008;32, Suppl 1:138.

2009 - *La vitamina C modifica la captación de glucosa y la lipólisis, regulando la expresión/secreción de adipoquinas en cultivos de adipocitos primarios de rata.* Garcia-Diaz DF, Campion J, Milagro FI, Boqué N, Moreno-Aliaga MJ and Martinez JA. XV Congreso latinoamericano de nutrición. Santiago de Chile. Publicado en: Revista Chilena de Nutrición, 2009;36, Suppl 1:708.

2010 - *Efectos de la distribución de macronutrientes de la dieta en dos modelos de obesidad, ad libitum o pair fed, en ratas Wistar.* Boqué N, Lomba A, Paternain L, Milagro FI, Campion J, Martínez JA. II congreso Fesnad, Barcelona. Publicado en: Nutrición Hospitalaria, 2010;25, Suppl 1:194-95.

2010 - *The effect of fish proteins and peptides on type 2 diabetes and related metabolic disorders.* Rioux LE, Boqué N, Pilon G, Lavigne C, Rudkowska I, Hasan F, Mitchell P, Jacques H, Vohl M, McLeod R, Gill T and Marette A. First International Marine Ingredients Conference. Oslo.

2010 - *Screening for salmon and cod peptidic fractions in cell-based assays reveal biological activities on inflammation, lipolysis and glucose uptake.* Boqué N, Rioux LE, Lavigne C, Hasan F, McLeod R, Gill T, Marette A. IV Congress of the International Society of Nutrigenetics/Nutrigenomic (ISNN). Pamplona. Publicado en: Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics, 2010;3:89.

2010 - *Early life stress modifies the response to an obesigenic diet in the adult state.* Paternain L, Boqué N, Milagro FI, Martisová E, Ramírez MJ, Martínez JA, Campión J. IV Congress of the International Society of Nutrigenetics/Nutrigenomic (ISNN). Pamplona. Publicado en: Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics, 2010;3:107.

2011 - *Screening of polyphenolic plant extracts for anti-obesity properties in Wistar rats.* Boqué N, Campión J, de la Iglesia R, de la Garza AL, Milagro FI, Martínez JA. 18th European Congress on Obesity (ECO). Estambul. Publicado en: Obesity Reviews, 2011;12, Suppl 1:184.

2011 - *Effects of natural inhibitors of pancreatic lipase in the treatment of obesity.* de la Garza AL, Boqué N, Campión J, Olivares M, Bañuelos O, Martínez JA, Milagro FI. 11th European Nutrition Conference (FENS). Madrid. Publicado en: Annals of Nutrition & Metabolism, 2011;58, Suppl 3:20-21.

Comunicaciones orales

2009 - *Influence of dietary macronutrient composition on adiposity and cellularity of different fat depots in Wistar rats.* Boqué N, Campión J Paternain L, Galarraga M, García-Díaz DF, Milagro FI, Ortiz de Solórzano C and Martínez JA. 6th Meeting of the CTP Network. Huesca.

2011 - *Nutrigenomic and epigenetic study about the preventive effects of apple polyphenolic extract supplementation on diet-induced obesity.* Boqué N, Campión J, de la Iglesia R, Milagro FI, San Román B, Bañuelos O, Martínez JA. 5th International Conference on Polyphenols and Health (ICPH). Sitges.