

**Efectos de la combinación de biomoléculas presentes en los alimentos, ácido linoléico conjugado, resveratrol y quercetina, sobre la acumulación de grasa corporal**

**Effects of the combination of biomolecules present in foodstuffs, conjugated linoleic acid, resveratrol and quercetin, on body fat accumulation**



*Noemí Arias Rueda*

TESIS DOCTORAL  
DOCTORAL THESIS

Vitoria-Gasteiz, 2015



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

*A mi abuela*



## *Agradecimientos. Acknowledgements.*

*En primer lugar quisiera agradecer la realización de esta Tesis Doctoral a mis directoras. Sin vuestra ayuda no hubiera llevado a cabo este trabajo. A M<sup>a</sup> del Puy Portillo, por abrirme las puertas al inmenso mundo de la investigación y despertar en mí la ilusión del querer saber; por ver en ti un ejemplo de investigadora entregada a la ciencia. A M<sup>a</sup> Teresa Macarulla, porque nunca olvidaré mis inicios en el animalario a tu lado; por dejar que te conociera tan rápido y sentir tu cercanía. Por vuestro apoyo y confianza, a las dos, gracias.*

*Agradezco también al Gobierno Vasco la concesión de una Beca de Formación de Personal Investigador así como a la Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea y al Wenner-Gren Institute of Stockholm University, por haberme proporcionado la infraestructura necesaria para la consecución del presente trabajo.*

*A mis niñas: Ana Gracia, Andrea Mosqueda, Idoia Larretxi, Itziar Eseberri y Saioa Gomez. Gracias por hacerme sentir afortunada de venir a cacharrear al laboratorio todos los días. Por nuestras historias, viajes, fiestas, conversaciones y cafés... por todo ello, ¿quién dijo pereza? Nada mejor que no percibir esa sensación cuando suena el despertador, y eso, os lo debo a vosotras. A mi Paki de Alberite, “mi primera alumna” y a quien recurro para resolver cualquier cuestión (no hay wikipedia que te alcance); A Andrea, por tus consejos, tus detalles, por tantos momentos que hemos vivido juntas y cómo no, por tus moyetes-quesadillas-gelatinas-tacos-galletas... A Ido, porque tantas veces has sido tú la vía de escape a mis problemas personales...Porque me encanta hablar contigo y porque sólo tú haces que una cena que comienza a las 20:00h termine a las 8:00h; A Saio, con quien más tiempo he pasado en los últimos 10 años. Hemos empezado y terminado una carrera juntas, un máster y una tesis (casi nada). Porque gracias a ti, comenzar la tesis resultó sencillo (cómo olvidar aquellas tardes en el laboratorio intentando solucionar el mundo con una molécula llamada resveratrol); A Itziar, porque sin duda, mi mayor descubrimiento en estos dos últimos años lleva tu nombre y apellidos. Jamás pensé que aquella chica calladita e introvertida del principio pudiera llegar a aportarme tanto en lo personal y profesional (tus preguntas siempre empiezan con un “seguramente sea una pregunta estúpida pero...” y acaban con interminables teorías científicas), porque sin ser consciente me has devuelto la ilusión de seguir investigando en multitud de ocasiones. En definitiva, por vuestras aportaciones, por compartir conmigo varias locuras de tipo vegano, por mi cuarto de hora de risa tonta después de la comida y por todo... ¡GRACIAS A TODAS!*

*A mis cuasí-hermanos, Jonatan Miranda y Leixuri Aguirre, especialmente a vosotros dos es a quienes debo gran parte de este trabajo y una pequeña parte de quien soy hoy.*

*A Leixu, por enseñarme que las cosas importantes de la vida no se encuentran en un tubo de ensayo; porque tú me has hecho más fuerte y no imaginas en cuantas ocasiones recurro a qué es lo que me diría Leixu y cual sería su razonamiento. Porque siempre has estado ahí, desde el primer día que te conocí, en la distancia, en lo académico y en lo personal. Porque trabajar contigo siempre es un placer y porque tú eres Leixuri para todo y para mí lo has sido todo durante este tiempo.*

*A Jona, por ser mi ejemplo a seguir; porque tú me has enseñado a pensar y son incontables las ocasiones en las que me has inspirado; porque cuando hablamos de ciencia, se realza en mí el sentimiento de querer ser mejor investigadora. Gracias por aguantar que recurra a ti a todas horas.*

*Al resto de personas que forman parte del área de Nutrición y Bromatología y por supuesto, a quien casi podría dirigirla, Andrés Sánchez. No sé qué sería de nosotros sin tu eficacia. A Arrate Lasa, por estar a mi lado y al de todos desde el día cero. Porque nadie muestra una disponibilidad como la tuya cuando de ayudar se trata. A Itziar Txurruca, por tus innumerables preparaciones, porque hablar contigo es avivar el sentimiento de querer ser mejor persona; por ser un referente para todos tanto en lo personal como en lo profesional. A Edurne Simón, siempre, siempre, aprendo de tus palabras, de tus actos. Porque eres una Super Woman y aún me pregunto cómo lo haces. Por tu empatía con las personas y tu*

*sentido del compromiso. A Goiuri Alberdi... no te perdono que seas una Talent y estés tan lejos. Te echo de menos. A M<sup>a</sup> Pilar Fernandez, mi Pili, por cuidarme de forma subliminal. No hay un solo consejo tuyo que pase desapercibido para mí. A Laura Zabaleta, por abrir mis ojos ante cosas cotidianas de la vida. A Mariam Bustamante, por tu bondad y sentido infinito de la justicia. A Alaitz Berrizabalgoitia, Alfredo Fernandez, Bittor Rodriguez, Carlos Abecia, Diego Rada, Idoia Labayen, Iñaki Etaio e Iñaki Milton, Jesús Salmerón, Marta Albisu, Mónica Ojeda, Natalia Ruiz de Erentzun, Olaia Martinez, Patxi Pérez y cómo no, a Usune Etxeberria, porque a lo largo de estos años numerosas han sido también vuestras aportaciones.*

*A quienes son objeto de mi orgullo: Bea, David, Eli, Joara, María, Nago, Vane, Bego, Aiker y Txo. Mil gracias. Porque este trabajo no hubiera sido posible sin vuestra amistad. Sin duda sois lo mejor y mi felicidad os la debo a vosotros. Por estar ahí siempre apoyándome y dándome consejos, escuchando mis penas y compartiendo mis alegrías. Por permitirme haceros partícipes también de esta tesis y hacerme tomar consciencia de que después del laboratorio hay una vida cargada de emociones, de planes, de viajes, de risas, de conversaciones intensas. Porque me haceis sentir muy especial teniéndoos a mi lado. ¡Por la amistad!*

*A David, por entender mi mundo, mis inquietudes y mis cambios de humor en momentos difíciles. En definitiva, por entender mi carrera y soportar pacientemente nuestro escaso tiempo libre juntos. Gracias, especialmente, por este último año durante el cual el hecho de llegar a casa cada día y poder sentirte cerca ha sido mi premio, mi recompensa tras un día largo. Te quiero infinito.*

*A lo más grande de mi vida, mi familia. Aita, ama, porque todo, absolutamente TODO, os lo debo a vosotros. Por vuestro apoyo, vuestro cariño incondicional, por confiar constantemente en mí, por vuestra inmejorable educación. No tengo palabras suficientes para definir cuánto os debo. A mis hermanos: Rubén, David, Juan (no imaginas lo orgullosa que estoy de la portada de esta tesis, e indudablemente, de su autor) y María (“tatis”), y a mi gran tío, Alejo, porque cuando estoy con vosotros mi mundo se para.*

*I would also like to thank Professors Barbara Cannon and Jan Nedergaard the opportunity to work with you and your team in the Department of Molecular Biosciences, the Wenner-Gren Institute (MBW) of Stockholm University. I do not have enough words to thank the way you welcomed me from the first day, nor to describe the professional knowledge and motivation that this stay brought me. In this line, I would like to thank first to Jessica and Jasper for teaching me everything at the lab. I really found too easy to start with your help. Thank you for your availability, your interest and for answering all my questions (which were many). Thanks also to, Alex, for being the best office mate and because I cannot wait for your Nobel Prize award ceremony invitation; to Amanda, for commonly surprising me in the midweek with a funny plan; to Anastasia, for making everything easy and organizing plans for everybody; to my sweet Annia, for your peace, your stories, your friendship; to Ineke, because with you everything is funny; to John, for helping me to improve my English; to Marie, for your closeness, and Sofia, for liven up the meals and breaks and for many good times. Thanks also to other people in the department, Abbe, Ana, Anders, Gabriella, Gustavo, Ida, Irina, Natasha, Niclas, Nodi, Robert, Tania and Tore, for your support.*

*Last but not least, special mention deserves Hanna Sorensen, my darling, because undoubtedly you made my stay in Sweden. Thank you for your friendship, for filling my calendar of funny plans, for your Sunday cooking lessons, for your constant support, for taking care of me all the time, for your own Spanish words... Thank you for EVERYTHING. I really like you and love you. Finally, thank you very much to my friends, Marci and Greg, because you were almost vital for me during this period.*

**Gracias, eskerrik asko, thank you**

# ÍNDICE. INDEX

## ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS/ ABBREVIATIONS</b> .....	<b>8</b>
<b>LISTADO DE ARTÍCULOS/ LIST OF PAPERS</b> .....	<b>12</b>
<b>INTRODUCCIÓN/ INTRODUCTION</b> .....	<b>14</b>
1. OBESIDAD .....	16
1.1. <i>Definición de obesidad</i> .....	16
1.2. <i>Etiología de la obesidad</i> .....	16
1.3. <i>Epidemiología de la obesidad</i> .....	17
1.4. <i>Tratamiento de la obesidad</i> .....	17
2. TEJIDO ADIPOSO .....	20
2.1. <i>Unidad funcional del tejido adiposo: el adipocito</i> .....	20
2.2. <i>Hipertrofia e Hiperplasia del tejido adiposo</i> .....	21
2.3. <i>Clasificación, localización y función del tejido adiposo</i> .....	21
2.3.1. Tejido adiposo blanco (TAB).....	23
2.3.2. Tejido adiposo marrón (TAM) .....	24
2.3.3. Adipocitos beige y “marronización” .....	26
3. METABOLISMO LIPIDICO .....	34
3.1 <i>Digestión y absorción de los lípidos de la dieta</i> .....	34
3.2 <i>Captación tisular de triglicéridos: lipoproteína lipasa (LPL)</i> .....	34
3.3 <i>Lipogénesis de novo</i> .....	37
3.4 <i>Lipolisis</i> .....	42
3.5 <i><math>\beta</math>-Oxidación de los AG</i> .....	45
3.6 <i>Termogénesis</i> .....	48
4. BIOMOLÉCULAS ACTIVAS .....	52
4.1 <i>Ácido Linoleico Conjugado (CLA)</i> .....	53
4.1.1 Estructura e isómeros y síntesis del CLA .....	53
4.1.2 Fuentes alimentarias de CLA .....	55
4.1.3 Ingesta media de CLA .....	56
4.1.4 Metabolismo del CLA .....	57
4.1.5 Efectos beneficiosos del CLA en obesidad y mecanismos de acción involucrados .....	58
4.1.6 Efectos adversos y seguridad del CLA .....	60
4.2 <i>Resveratrol</i> .....	62
4.2.1 Estructura y síntesis del resveratrol .....	63
4.2.2 Fuentes alimentarias e ingesta media de resveratrol .....	64
4.2.3 Procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción del resveratrol .....	66
4.2.4 Biodisponibilidad del resveratrol .....	69
4.2.5 Efectos beneficiosos del resveratrol en obesidad y mecanismos de acción involucrados .....	70
4.2.6 Efectos adversos y seguridad del resveratrol.....	75
4.3 <i>Quercetina</i> .....	76
4.3.1 Estructura y síntesis de la quercetina .....	76
4.3.2 Fuentes alimentarias e ingesta media de quercetina .....	77
4.3.3 Procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción de quercetina .....	79
4.3.4 Biodisponibilidad de la quercetina .....	84
4.3.5 Efectos beneficiosos de la quercetina en obesidad y mecanismos de acción involucrados .....	84
4.3.6 Efectos adversos y seguridad de la quercetina .....	87
<b>OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICOS/ AIM AND SPECIFIC OBJECTIVES</b> .....	<b>90</b>
<b>DISEÑO EXPERIMENTAL/ EXPERIMENTAL DESIGN</b> .....	<b>96</b>

# ÍNDICE. INDEX.

---

<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN/ RESULTS AND DISCUSSION .....</b>	<b>114</b>
MANUSCRITO 1 - MANUSCRIPT 1 .....	116
MANUSCRITO 2 - MANUSCRIPT 2 .....	130
MANUSCRITO 3 - MANUSCRIPT 3. ....	146
MANUSCRITO 4 - MANUSCRIPT 4 .....	164
MANUSCRITO 5 - MANUSCRIPT 5 .....	180
MANUSCRITO 6 - MANUSCRIPT 6 .....	198
PATENTE - PATENT .....	212
<b>RECAPITULACIÓN/ SUMMARY .....</b>	<b>246</b>
<b>CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS .....</b>	<b>282</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA/ REFERENCES.....</b>	<b>286</b>

# ABREVIATURAS. ABBREVIATIONS

---

## ABREVIATURAS/ ABBREVIATIONS

AC: adenilato ciclasa/ adenylate cyclase  
ACC: acetil-CoA carboxilasa/ acetyl-CoA carboxylase  
ACO: acil-CoA oxidasa/ acyl-CoA oxidase  
ACP: proteína transportadora de acilos/acyl coupling protein  
ACS: acil-CoA sintetasa/ acyl-CoA synthetase  
ACTH: hormona adrenocorticotropa/ adrenocorticotropic hormone  
AESAN: Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición/ Spanish Agency for Consumer Affairs, Food Safety and Nutrition  
AG: ácidos grasos  
AGNE: ácidos grasos no esterificados  
AgRP: péptido relacionado con la proteína Agouti/ Agouti-related peptide  
Akt: proteína quinasa B/ protein kinase B  
ALT: alanina aminotransferasa/ alanine aminotransferase  
AMPC: adenosina 3',5'-monofosfato cíclica/ 3',5'-cyclic adenosine monophosphate  
AMPK: proteína quinasa activada por AMP5'/ 5' AMP-activated protein kinase  
ANGPTLs: proteínas relacionadas con angiopoyetina/angiopoietin-like protein  
aP2: proteína de unión a ácidos grasos 2/ fatty acid-binding protein 2  
AR: receptor alfa adrenérgico/ adrenergic receptor alpha  
AST: aspartato aminotransferasa/ aspartate aminotransferase  
ATGL: triacilglicérido lipasa del tejido adiposo/ adipose triglyceride lipase  
ATP: adenosín trifosfato/ adenosine triphosphate  
AUC: área bajo la curva/ area under the curve  
BAT: brown adipose tissue  
BMI: body mass index  
BMP: proteína morfogénica ósea/ bone morphogenetic protein  
BW: body weight  
C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ : proteína de unión a CCAAT ( $\alpha$  ó  $\beta$ )/ CCAAT-enhancer-binding protein ( $\alpha$  or  $\beta$ )  
CACT: acilcarnitina translocasa/ acyl-carnitine traslocase  
CART: péptido relacionado con la cocaína y la anfetamina/ cocaine and amphetamine regulated transcript peptides  
CAS3 y CAS9: caspasas (3 ó 9)/ caspases (3 or 9)  
Cd137: superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral/ tumor necrosis factor receptor superfamily  
CD36: translocasa de ácidos grasos/ fatty acid translocase or cluster of differentiation 36  
CGI-58: 58ª identificación comparativa del gen/ comparative gene identification-58  
ChORE: elemento de respuesta a carbohidratos/ carbohydrate-responsive element  
ChREBP: proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos/ carbohydrate-responsive element-binding protein  
CideA: factor inductor de muerte celular por fragmentación de ADN A/ cell death-inducing DNA fragmentation factor like effector A  
Cited1: transactivador de interacción con Cbp/p300/ Cbp/p300-interacting transactivator with GLU/ASP-rich C-terminal domain-1  
CLA: ácido linoleico conjugado/ conjugated linoleic acid  
COMT: catecol-O-metiltransferasa/ catechol-O-methyltransferase  
COX-2: citocromo oxidasa o complejo IV de la cadena respiratoria/ cytochrome c oxidase or respiratory electron transport chain complex IV  
CPT-1: carnitina palmitoil transferasa-I/ carnitine palmitoyl transferase-I  
CS: citrato sintasa/ citrate synthase.  
DC: dieno conjugado  
DG: diacilglicérido/ diacylglyceride  
DHRSV: dihidro-resveratrol/ dihydro-resveratrol



## ABREVIATURAS. ABBREVIATIONS

---

DM2: diabetes mellitus tipo 2/ diabetes mellitus type 2  
Ebf: factor de transcripción temprano de células B/ early B-cell factor 1  
EC: ésteres de colesterol/ cholesterol sters  
ECV: enfermedad cardiovascular  
EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria/ European Food Safety Authority  
EM: enzima málica/ malic enzyme  
ENRICA: Estudio de Nutricion y Riesgo Cardiovascular  
EPIC: Estudio de Investigación Prospectiva Europea de Cáncer y Nutrición/ The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition study  
Eva1: antígeno de membrana epitelial 1/ myelin protein zero-like 1  
FA: fatty acids  
FADH2: flavín adenín dinucleótido/ flavin adenine dinucleotide  
FAS: ácido graso sintasa/ fatty acid synthase  
FDA: Agencia de Alimentos y Medicamentos/ Food and Drug Administration  
FGF21: factor de crecimiento fibroblástico 21/ fibroblast growth factor 21  
G3PDH: glucosa-3 fosfato deshidrogenasa/ glucose 3-phosphate dehydrogenase  
G6PDH: glucosa-6 fosfato deshidrogenasa/ glucose 6-phosphate dehydrogenase  
GH: hormona de crecimiento/ growth hormone  
Gi: proteína inhibidora de receptores G/ G receptors inhibitor protein  
GLUT1: transportador de glucosa 1/ glucose transporter type 1  
GLUT4: transportador de glucosa 4/ glucose transporter type 4  
GRAS: Generalmente Reconocidos como Seguros/ Generally Recognised As Safe  
Gs: proteína activadora de receptores G/ G receptors activator protein  
G $\alpha$ 1: proteína inhibidora de unión a GTP alpha/ inhibitory binding protein alpha GTP  
G $\alpha$ s: proteína estimuladora de unión a GTP alpha/ stimulatory binding protein alpha GTP  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrógeno/ hydrogen peroxide  
HDL: lipoproteína de alta densidad/ high density lipoprotein  
HoxC9: proteína homeobox C9/ homeobox protein C9  
HSL: lipasa sensible a hormonas/ hormone-sensitive lipase  
IARC: Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer/ International Agency for Research on Cancer  
IGF-1: factor de crecimiento insulínico tipo 1/ insulin-like growth factor-1  
IL-1 $\alpha$ : interleucina-1  $\alpha$ / interleukine-1  $\alpha$   
IL-6: interleucina-6/ interleukine-6  
ILSI: Instituto Internacional de Ciencias de la Salud en Europa/ International Life Sciences Institute in Europe  
IMC: índice de masa corporal  
IRS1: receptor de sustrato de insulina-1/ insulin receptor substrate-1  
LDL: low density lipoprotein/ lipoproteína de baja densidad  
Lhx8: lim homeobox 8  
LPH: lactasa floricina hidrolasa/ lactase-phlorizin hydrolase  
LPL: lipoproteína lipasa/ lipoprotein lipase  
LXR: receptor X hepático/ liver X receptor  
MAPA: Dirección General de Alimentación del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación  
MCD: malonil-CoA descarboxilasa/ malonyl-CoA decarboxylase  
MCSF: factor estimulante de colonias de macrófagos/ macrophage colony-stimulating factor  
Meox2: homeobox-2 mesénquimal/ mesenchime homeobox-2  
MG: monoglicéridos/ monoglyceride  
MGL: monoglicérido lipasa/ monoglyceride lipase  
MME: membrana mitocondrial externa/ external mitochondrial membrane  
MMI: membrana mitocondrial interna/ internal mitochondrial membrane  
MRP2y3: proteínas resistentes a fármacos/ multidrug resistance protein  
MSH- $\alpha$ : hormona estimuladora de melanocitos- $\alpha$ /melanocyte-stimulating hormone

## ABREVIATURAS. ABBREVIATIONS

---

Myf-5: factor miogénico 5/myogenic factor 5  
NA: noradrenalina/ noradrenaline  
NADH: nicotinamida adenina dinucleótido/ nicotinamide adenine dinucleotide  
NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato/ nicotinamide adenine dinucleotide phosphate  
NCoR: corepresor de receptor nuclear/ nuclear receptor corepressor  
NE: norepinefrina/ norepinephrine  
NEFA: non-esterified fatty acids  
NFR-1: factor de respiración nuclear- 1/ nuclear respiratory factor 1  
NPY: neuropeptido Y/ Y neuropeptide  
NTP: Programa Nacional de Toxicología/ National Toxicology Program  
OECD: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico/ Organization for Economical Co-operation and Development  
OMS: Organización Mundial de la Salud  
PC: peso corporal  
PCR: reacción en cadena de la polimerasa/ polymerase chain reaction  
PDE-3B: enzima fosfodiesterasa 3B/ phosphodiesterase 3B enzyme  
PDH: piruvato deshidrogenasa/ pyruvate dehydrogenase  
Pdk4: piruvato deshidrogenasa quinasa 4/ pyruvate dehydrogenase kinase 4  
PDRNS: Guía de Referencia para Suplementos Nutricionales/ Physician's Desk Reference for Nutritional Supplements  
PET: técnica de tomografía por emisión de positrones/ Positron Emission Tomography  
PGC-1 $\alpha$ : coactivador del peroxisoma proliferador activado del receptor gamma - 1 $\alpha$ / Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha  
PI3K: fosfatidilinositol 3-quinasa/ phosphatidilinositol 3-kinase  
PKA: protein kinase A/ proteína quinasa A  
PKT/AKT: proteína quinasa B/ protein kinase B  
POMC: pro-opiomelanocortina/ proopiomelanocortin  
PP-1: proteína fosfatasa-1/ protein phosphatase-1  
PPARs: receptor activado por proliferadores de peroxisomas/ peroxisome proliferator-activated receptors  
Prdm16: PR domain containing 16  
PUFAs: polyunsaturated fatty acids  
Q: quercetina/ quercetin  
Q3GA: metabolito glucuronado de quercetina/ quercetin glucuronidated metabolite  
Qm: quilomicrones/ kilomicros  
RBP4: proteína transportadora de retinol tipo 4/ retinol binding protein 4  
RC: restricción calórica/ caloric restriction  
RI: resistencia a la insulina/ insulin resistant  
RNA: ácido ribonucleico/ ribonucleic acid  
RSV: resveratrol  
SCD: estearoil coenzima A desaturasa/ stearyl-CoA desaturase  
SEEDO: Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad/ Spanish Society for the Study of Obesity  
SF: sulfoniltransferasas/ sulfoniltransferases  
SGLT: transportador de glucosa sodio dependiente/ glucose transporter sodium dependent  
Shox2: short sature homeobox 2  
SIRT1: sirtruína-1 deacetilasa dependiente de NAD/ NAD dependent sirtruin-1 deacetylase  
SNC: sistema servioso sentral/ central nervous system  
SNS: sistema nervioso simpático/ sympathetic nervous system  
SREBP-1: proteína de unión al elemento regulado por esteroides/ sterol regulatory element binding protein 1  
SULT/ PST: sulfotransferasa fenol/ phenol sulphotransferase

## ABREVIATURAS. ABBREVIATIONS

---

T3: triyodotironina / triyodotironine  
TAB: Tejido adiposo blanco  
TAM: Tejido adiposo marrón  
TBX15: T-box 15  
Tcf21: factor de transcripción 21/ 21transcriptor factor  
TFAM: factor de transcripción mitocodrial/ mitochondrial transcription factor A  
TG: triglicéridos/ triglycerides  
Tmem26: proteína transmembrana 26/ transmembrane protein 26  
TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral/ tumour necrosis factor alpha-like  
TTG: test de tolerancia a la glucosa/ glucose tolerance test  
TZD: tiazolindinedionas/ thiazolidinediones  
UCP1, UCP-2, UCP-3: proteína desacoplante 1-2-3/uncoupling protein 1-2-3  
UGT: 5'-difosfato-glucuronosil transferasa/5'-biphosphate-glucuronosyl transferase  
USF: factores estimuladores contracorriente/ upstream stimulatory factors  
VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad/ very low-density lipoprotein  
WAT: white adipose tissue  
WHO: World Health Organization  
Zic1: factor transcripcional tipo dedos de zinc en el cerebelo/ zinc finger of the cerebellum protein transcription factor

# LISTADO DE ARTÍCULOS. LIST OF PAPERS

---

## LISTADO DE ARTÍCULOS/ LIST OF PAPERS

Las seis publicaciones que se detallan a continuación recopilan de forma concisa el trabajo contenido en la presente Tesis Doctoral y los resultados obtenidos de ella. Por orden cronológico, los artículos mencionados son los siguientes (Manuscritos 1-6):

The six research papers listed below concisely summarize the work and results contained in this Doctoral Thesis. Chronologically, the above articles are (Manuscripts 1-6):

1. Arias N, Macarulla MT, Aguirre L, Martínez-Castaño MG, Gómez-Zorita S, Miranda J, Martínez JA, Portillo MP. *The combination of resveratrol and conjugated linoleic acid is not useful in preventing obesity*. Journal of Physiology and Biochemistry, 2011; 67(3):471-7.
2. Arias N, Miranda J, Macarulla MT, Aguirre L, Fernández-Quintela A, Andres-Lacueva C, Urpi-Sarda M, Portillo MP. *The combination of resveratrol and conjugated linoleic acid attenuates the individual effects of these molecules on triacylglycerol metabolism in adipose tissue*. European Journal of Nutrition, 2013; 53(2):575-82
3. Arias N, Macarulla MT, Aguirre L, Martínez-Castaño MG, Portillo MP. *Quercetin reduces insulin resistance without decreasing body and skeletal muscle fat accumulation*. Genes and Nutrition, 2013; 9(1):361
4. Arias N, Macarulla MT, Aguirre L, Milton I, Portillo MP. *The combination of resveratrol and quercetin enhances the individual effects of these molecules on triacylglycerol metabolism in white adipose tissue*. European Journal of Nutrition, 2015.
5. Arias N, Picó C, Macarulla MT, Oliver P, Miranda J, Palou A, Portillo MP. *A combination of resveratrol and quercetin induces browning in white adipose tissue of rats fed an obesogenic diet*. Unpublished manuscript.
6. Arias N, Macarulla MT, Aguirre L, Miranda J, Portillo MP. *Liver delipidating effect of a combination of resveratrol and quercetin in rats fed an obesogenic diet*. Journal of Physiology and Biochemistry, 2015.

Esta tesis doctoral también ha dado lugar a una patente titulada:

This thesis has also given rise to a patent entitled:

“Composiciones y usos en la activación de la termogénesis”. N/Ref.:ES2654.6. Publicada en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial, Marzo 2015.



**INTRODUCCIÓN/  
INTRODUCTION**





## INTRODUCCIÓN

### 1. OBESIDAD

#### 1.1. Definición de obesidad

El sobrepeso y la obesidad, definidos como «una acumulación anormal o excesiva de grasa que supone un riesgo para la salud», son considerados hoy en día un problema de salud mundial que afecta a adultos y niños, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo, e incluso en los subdesarrollados. La prevalencia de la obesidad alcanza tal magnitud que ha sido denominada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como la “pandemia del siglo XXI” (WHO-OMS, 2014).

#### 1.2. Etiología de la obesidad

La etiología de la obesidad resulta multifactorial, si bien podría resumirse en factores genéticos, ambientales y de estilo de vida, donde se engloban fundamentalmente los hábitos dietéticos (dietas ricas en grasas saturadas y azúcares simples) y el modelo de actividad física (sedentarismo creciente). Un desequilibrio entre la ingesta y el gasto energético desencadena sobrepeso que, si persiste en el tiempo y magnitud, puede dar lugar a obesidad.

Para comprender mejor la etiología de la obesidad se hace necesario un análisis retrospectivo del proceso evolutivo del ser humano. Brevemente, la obesidad podría haber sido considerada diez mil años atrás como un estado de protección del organismo frente a la escasez de alimentos. En otras palabras, puede decirse que la obesidad resultó de una adaptación metabólica ventajosa para el organismo ante periodos de escasez de alimentos.

Diversos investigadores consideran que las estatuillas halladas pertenecientes al periodo Paleolítico, como es la Venus de Willendorf (encontrada en la región austriaca que lleva su nombre), podrían ser reflejo de mujer obesa como símbolo de supervivencia y fertilidad en una época de subalimentación que afectaba a la zona. Dicha escultura representa a una mujer obesa con un importante desarrollo abdominal y mamario que podría guardar una relación con el desarrollo tanto del feto como del neonato en periodo de lactancia, hecho ligado a la fertilidad y, por tanto, a la supervivencia de la especie (Montero, 2001).



Con la evolución del ser humano y la revolución industrial, se atenúa el concepto de lucha por conseguir el alimento y la comodidad comienza a estar presente en casi todos los ámbitos de la vida. Con ello, el sedentarismo se instaura en la humanidad y, por tanto, el concepto de obesidad como protección se sustituye por obesidad-enfermedad.



# INTRODUCCIÓN

---

## 1.3. Epidemiología de la obesidad

El sedentarismo y los malos hábitos dietéticos han contribuido a que la prevalencia de la obesidad y el sobrepeso se hayan incrementado progresivamente durante los últimos años. En 2014, más de 1900 millones de adultos de 18 o más años tenían sobrepeso (39% de la población adulta), de los cuales, más de 600 millones (13% de la población adulta) eran obesos (WHO-OMS, 2014).

Por otro lado, cabe destacar que el sobrepeso y la obesidad son factores de riesgo de patologías asociadas, como enfermedades cardiovasculares y *diabetes mellitus*, siendo la causa del 44% de los casos mundiales de diabetes, el 23% de cardiopatía isquémica y el 7-41% de determinados cánceres. Sin embargo, las cifras más alarmantes se corresponden con datos de sobrepeso en la edad infantil, siendo este problema de salud pública considerado como uno de los más graves del siglo XXI (en 2013, más de 42 millones de menores de cinco años tenían sobrepeso). La gravedad de esta enfermedad en este colectivo radica en los problemas que pudiera suponer en el futuro, tales como un mayor riesgo de sufrir las patologías anteriormente mencionadas (WHO-OMS, 2014).

En cuanto a datos europeos, atendiendo a estudios recientes de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD, 2012), más de la mitad (52%) de la población adulta en la Unión Europea tiene sobrepeso u obesidad y las tasas varían dependiendo de los países, desde una baja, en torno al 8% en Rumanía y Suiza, a más del 25% en Hungría y Reino Unido (26%).

En España, según los resultados del Estudio de Nutrición y Riesgo Cardiovascular (ENRICA), el 39% de la población tiene sobrepeso y el 23% obesidad, siendo mayor la frecuencia de obesidad en hombres que en mujeres (excepto en las de 65 años y más) y viéndose aumentada con la edad. Por todo ello, la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO) recuerda que es imprescindible incrementar los recursos técnicos y humanos en Atención Primaria para reducir el cociente médico/paciente y lograr actuar sobre el exceso de peso y sus problemas relacionados en sus fases iniciales.

## 1.4. Tratamiento de la obesidad

Dado que la etiología de la obesidad es multifactorial, el abordaje terapéutico para esta enfermedad ha de ser multidisciplinar. Una dieta equilibrada pero energéticamente restrictiva, junto con un plan de actividad física, son los dos pilares fundamentales que constituyen la base del tratamiento de la obesidad. Sin embargo, en algunos casos, los resultados de este método de actuación no han mostrado toda la eficacia que de ellos se esperaba.

Esta situación, unida al escaso arsenal terapéutico disponible en el mercado, hace que la comunidad científica esté constantemente trabajando en la búsqueda de nuevas alternativas que, en combinación con las terapias convencionales mencionadas, sirvan de coadyuvantes eficaces para la reducción de grasa y peso corporal. Así surgen como posibles herramientas las moléculas bioactivas. Un ejemplo claro de esto son los ingredientes funcionales, que en combinación con una dieta sana y un adecuado patrón de

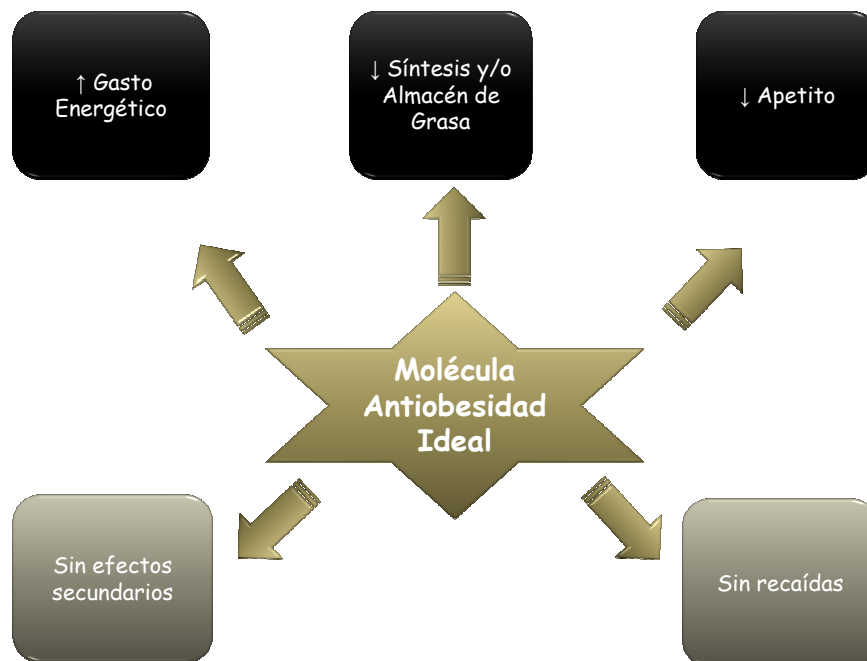
# INTRODUCCIÓN

---

actividad física, posean la capacidad de actuar eficazmente en la reducción de grasa y peso corporal.

La molécula ideal sería ser aquella capaz de actuar disminuyendo los procesos de síntesis y almacenamiento de excedentes de grasa (sin disminuir la masa magra), estimulando el gasto energético (y con ello el catabolismo de la grasa), inhibiendo el apetito, evitando recaídas, impidiendo la absorción de determinados nutrientes o controlando la ansiedad. A su vez, este ideal de molécula debería carecer de efectos adversos para la salud.

Con el fin de encontrar una molécula que dé lugar a un tratamiento adecuado y eficaz para la obesidad, se hace necesario el conocimiento profundo de los cambios que origina esta enfermedad en el organismo, así como de los tejidos afectados (tejido adiposo e hígado fundamentalmente) y procesos metabólicos involucrados.



**Figura 1.** Criterios de selección de una hipotética molécula ideal para la prevención y/o tratamiento de la obesidad.



## 2. TEJIDO ADIPOSO

### 2.1. Unidad funcional del tejido adiposo: el adipocito

La unidad básica del tejido adiposo, que constituye gran parte del mismo, es el adipocito. También forma parte del tejido adiposo el estroma vascular, formado por células sanguíneas, células madre y endoteliales, y precursores de adipocitos con distintos grados de diferenciación. Entre estos precursores encontramos fibroblastos y preadipocitos.

Los preadipocitos son células pequeñas que, tras recibir el estímulo de hormonas, citoquinas, factores de crecimiento y nutrientes, inician un proceso de maduración en el que acumulan grasa en su interior. Esto da lugar a su diferenciación morfológica y funcional hasta la conversión en adipocitos maduros. Este proceso, que se conoce como **adipogénesis**, se produce durante la etapa de crecimiento del organismo, aunque permanece también en menor medida en la fase adulta. Una vez alcanzado el estadio de adipocito maduro, estas células desarrollan, además de la capacidad de secretar hormonas y almacenar lípidos procedentes de la dieta, la de sintetizar su propia grasa, proceso conocido como **lipogénesis de novo**. Por otra parte, en determinadas situaciones de necesidad energética, como puede ser el ayuno o el incremento del gasto energético, el adipocito moviliza los depósitos de lípidos liberando ácidos grasos y glicerol a la sangre. Este proceso se conoce con el nombre de **lipolisis**. Los ácidos grasos liberados son transportados a otros tejidos donde se lleva a cabo su oxidación destinada a la producción de energía (Ráfols, 2013).

La inhibición de la adipogénesis puede parecer una estrategia terapéutica atractiva para combatir el sobrepeso y/o la obesidad. Sin embargo, existen dos razones fundamentales por las cuales esta idea podría no resultar tan eficaz como parece. En primer lugar, la adipogénesis tiene lugar fundamentalmente en la etapa de crecimiento, ya que el número de adipocitos se define fundamentalmente durante esta etapa, y este proceso de renovación de adipocitos en el adulto es lento. En segundo lugar, estudios llevados a cabo en ratones cuya adipogénesis ha sido inhibida muestran una lipodistrofia generalizada y resistencia a la insulina, tanto en músculo como en hígado, por un defecto en la señalización de la insulina en éstos órganos (Marcano *et al.*, 2006).

El proceso inverso a la adipogénesis es conocido como **apoptosis** o muerte celular programada. Los adipocitos son especialmente resistentes a la apoptosis y por ello este proceso es lento, incluso a veces inexistente. La restricción calórica lleva a una reducción de masa grasa pero no a una reducción en el número de células grasas. Sin embargo, ciertas condiciones patológicas que conllevan una pérdida de grasa, involucran pérdida de adipocitos a través de mecanismos apoptóticos.

La inducción de un proceso apoptótico, siempre y cuando no conlleve consecuencias patológicas para el organismo, podría resultar una buena estrategia para tratar la obesidad. Sin embargo, ante una situación de exceso de aporte de energía, este efecto provocaría consecuencias negativas derivadas de la necesidad de un mayor número de adipocitos para poder almacenar dicho exceso. En estas circunstancias, una disminución de

# INTRODUCCIÓN

---

células adiposas elevaría el riesgo de padecer enfermedades metabólicas debido a la acumulación ectópica de grasa en hígado y músculo esquelético.

Por todo lo anteriormente mencionado, parece que una modificación a nivel de lipogénesis, lipólisis u oxidación de grasa, entre otros muchos procesos que afectan al metabolismo lipídico, resultan de mayor interés terapéutico para combatir el sobrepeso y/o la obesidad que modificaciones en la adipogénesis o en la apoptosis.

## 2.2. Hipertrofia e Hiperplasia del tejido adiposo

Ante situaciones de balance de energía positivo se produce un almacenamiento de grasa en el tejido adiposo. El crecimiento de este tejido puede producirse por hipertrofia o por hipertrofia.

Durante la etapa de crecimiento (infancia y adolescencia), el proceso predominante es la hipertrofia. Es decir, el incremento del tejido adiposo se produce por un aumento del número de adipocitos. En el adulto, inicialmente se produce una hipertrofia del adipocito (aumento del tamaño del adipocito) para almacenar el exceso de energía, pero ante un exceso de energía prolongado en el tiempo se hace necesaria una hipertrofia para mantener la función normal del tejido adiposo. El aumento en el número de nuevos adipocitos funcionales pequeños (hipertrofia), incrementa por un lado la capacidad del tejido adiposo para almacenar el excedente energético y, por otro, para mantener un estado metabólico estable (Bays *et al.*, 2008).

El organismo adopta esta hipertrofia como mecanismo de defensa para evitar otras patologías más severas como serían las derivadas de un acúmulo de grasa en otros órganos como el hígado (lipotoxicidad). Se ha demostrado que en modelos animales que presentan una mutación genética en el gen de la leptina, como es el ratón *ob/ob*, a los cuáles a su vez, se les induce otra mutación (mediante inducción transgénica) que les hace capaces de sobre-expresar también adiponectina, presentan obesidad sin patologías asociadas. Esto es debido a que son capaces de generar más tejido adiposo para hacer frente al exceso de energía y, de este modo, muestran sensibilidad a la insulina y no acumulan grasa en hígado, sino que lo hacen a nivel subcutáneo mediante expansión del tejido adiposo (Kim *et al.*, 2007).

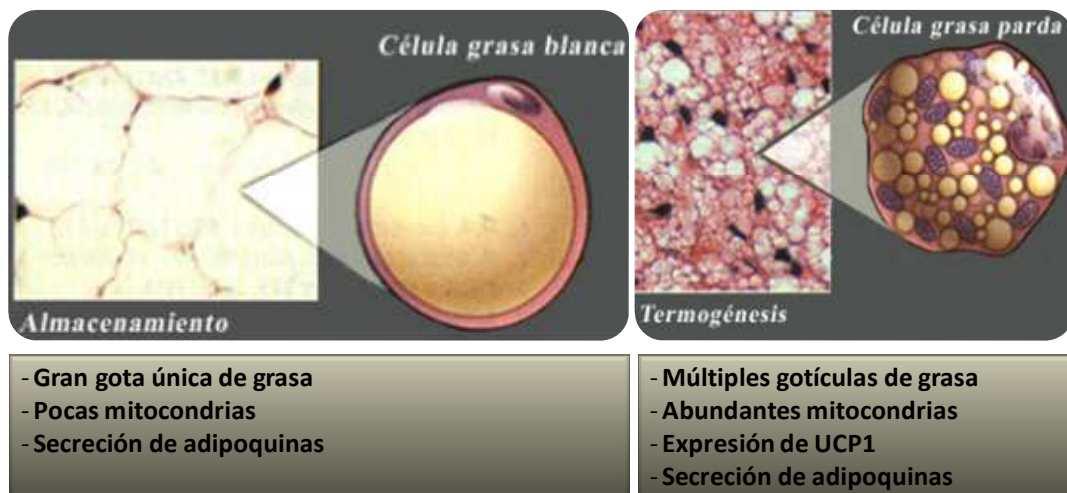
## 2.3. Clasificación, localización y función del tejido adiposo

Existen dos tipos fundamentales de tejidos adiposos atendiendo a la morfología y funcionalidad de los adipocitos que lo forman: el tejido adiposo blanco y el tejido adiposo marrón.

Según la morfología, el tejido adiposo blanco está formado por adipocitos que contienen una gran gotícula única de grasa en su citoplasma, la cual deja al núcleo en una posición excéntrica y confiere así a la célula un aspecto semiesférico y una coloración blanquecina de la cual procede su nombre. Por el contrario, el adipocito marrón consiste en una célula poliédrica formada por un núcleo, que puede ser central, y un citoplasma repleto de múltiples y pequeñas gotículas de grasa, así como un gran número de mitocondrias con

# INTRODUCCIÓN

alta densidad de crestas, que confieren la coloración marrón a este depósito graso (por su contenido en hierro, el cual forma parte de la estructura de los citocromos). No obstante, estas características del tejido adiposo marrón pueden variar atendiendo al nivel de actividad (termogénica) que esté realizando dicho tejido, pudiendo observarse también adipocitos marrones uniloculares con escasas mitocondrias ante una baja actividad. A su vez, este tejido se caracteriza por estar lobulado, innervado por terminaciones nerviosas del Sistema Nervioso Simpático (SNS) y altamente irrigado por capilares sanguíneos (Figura 2).



**Figura 2.** Características morfológicas de un adipocito blanco (izquierda) y un adipocito marrón (derecha). UCP1 (uncoupling protein 1). [Figura modificada de Spiegelman (Spiegelman, 2013)].

En cuanto a la funcionalidad de ambas células, de forma general, el tejido adiposo blanco tiene como función principal el almacenamiento de la grasa (en forma de triglicéridos) y/o la hidrólisis de la misma. A su vez, ante situaciones de sobrealimentación, se encarga de sintetizar su propia grasa a partir de hidratos de carbono y proteínas. El tejido adiposo marrón, por el contrario, tiene como función principal la producción de calor ante estímulos como el frío. Esta función termorreguladora, que cobra una gran importancia en el recién nacido (llegando a representar este tejido entre un 2 y un 5% de porcentaje del peso corporal), se produce gracias a una proteína que en la cadena respiratoria mitocondrial, desacopla la energía procedente de la oxidación de ácidos grasos disipándola en forma de calor.

El tejido adiposo se distribuye por todo el organismo. No obstante, y de forma general, podemos considerar que el tejido adiposo blanco se encuentra a nivel subcutáneo (o dérmico) y visceral (mediastínico, mesentérico, perigonadal, perirrenal y retroperitoneal), mientras que el tejido adiposo marrón, mucho más escaso, se encuentra en las regiones axilar, subescapular, interescapular, intercostal, cervical e inguinal. La distribución de este tejido varía atendiendo a la edad y los estímulos que afectan al individuo, tales como estímulos ambientales (frío, tipo de dieta...) y factores hormonales (Marcano *et al.*, 2006).

## 2.3.1. Tejido adiposo blanco (TAB)

El tejido adiposo blanco ha sido tradicionalmente considerado como un reservorio pasivo de almacenamiento de energía. A raíz del descubrimiento de la leptina (Zhang *et al.*, 1994), hormona segregada por el tejido adiposo que regula el apetito mediante una estimulación de la liberación de péptidos anorexígenos e inhibición de los orexígenos desde el hipotálamo, se ha constatado la actividad secretora de este tejido. Estas proteínas sintetizadas en el tejido adiposo son denominadas en su conjunto *adipocitoquinas*, las cuales actúan como mensajeros. Ejercen su efecto de manera local (función autocrina/paracrina) y/o en otros tejidos (función endocrina). La capacidad de este tejido de responder a estímulos nerviosos y hormonales, ha hecho que sea considerado hoy en día como órgano endocrino fundamental, con influencia directa sobre otros órganos vitales como cerebro, músculo esquelético o hígado. En la actualidad, de entre las más de 50 adipocitoquinas que se conocen y que son secretadas por este tejido cabe destacar la leptina, la adiponectina, la resistina, el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) y la interleucina 6 (IL-6) por ser de las más estudiadas hasta la fecha (Tabla 1). La secreción de estas sustancias está regulada, entre otros factores, por el ayuno, la ingesta y la obesidad.

En cuanto a los distintos tipos de depósitos grasos existentes en el organismo, el tejido adiposo subcutáneo contribuye a la regulación de la temperatura por aislamiento térmico. A su vez, es el responsable de la diferencia anatómica existente entre varones y mujeres en la distribución de la grasa. Por otro lado, el tejido adiposo visceral rellena los espacios entre los órganos y hace que éstos se mantengan en una posición adecuada, además de protegerlos frente a traumatismos (Vidal-Puig, 2009). Evidencias científicas ponen de manifiesto que el aumento del tejido adiposo visceral guarda una relación directa con patologías asociadas a la obesidad. Mediante técnicas de imagen se ha observado que el tamaño del compartimento adiposo visceral se asocia con factores de riesgo cardiovascular, aumento en los niveles de triglicéridos plasmáticos, mayores niveles de partículas LDL y menor de HDL colesterol y resistencia a la insulina e hiperinsulinemia, entre otras alteraciones hormonales. Muchos autores denominan al síndrome metabólico como “síndrome de la grasa visceral”, que resulta del sumatorio de resistencia a la insulina, hiperlipidemia, hipertensión y acumulación de grasa visceral (Kissebah *et al.*, 1982; Krotkiewski *et al.*, 1983; Kaplan, 1989; Kannel *et al.*, 1991; Tchernof *et al.*, 1996; Williams *et al.*, 1997; Rexrode *et al.*, 1998; Pérez Miguel sanz *et al.*, 2010).

# INTRODUCCIÓN

**Tabla 1.** Principales adipocitoquinas (o adipokinas) identificadas secretadas por el tejido adiposo blanco con función endocrina en obesidad.

Adipoquinas	Función	Efectos	Mecanismos
<b>Leptina</b>	Regulación del peso corporal a través del control del apetito y del gasto energético.	<p>↓ peso corporal: inhibición del apetito e incremento de la termogénesis.</p> <p>↓ Insulinemia, ↓ glucemia, ↓ lipemia, ↑ hormonas tiroideas y estimula la maduración sexual (↑ fertilidad).</p> <p><u>Obesidad:</u> ↑ leptina (resistencia a la leptina).</p>	<p>A nivel del SNC (hipotálamo): inhibición de péptidos orexígenos (NPY y AgRP) y estimulación de péptidos anorexígenos (POMC y CART).</p> <p>A nivel periférico (hígado y músculo): inhibición de lipogénesis y estimulación de oxidación de AG (fosforilación AMPK =&gt; activación =&gt; ↑ velocidad de oxidación AG).</p>
<b>Adiponectina</b>	Regulación del peso corporal mediante el aumento del gasto energético. Prevención de RI y arterioesclerosis.	<p>↓ peso corporal: ↑ del catabolismo lipídico.</p> <p>Antidiabética: ↑ sensibilidad a la insulina, ↓ glucosa.</p> <p>Antiaterogénica: normalización de lípidos plasmáticos.</p> <p>Antiinflamatoria.</p> <p><u>Obesidad:</u> ↓ adiponectina</p>	<p>Músculo: ↑ oxidación de AG, ↑ captación de glucosa, ↓ acumulación de TG, ↑ fosforilación de receptores de insulina.</p> <p>Hígado: ↓ síntesis de glucosa (↓ gluconeogénesis).</p> <p>Pared Vascul: inhibición de proliferación muscular lisa en pared arterial; ↓ expresión de macrófagos.</p>
<b>Resistina</b>	Control de la inflamación (adipocitoquina proinflamatoria). Desarrollo de RI.	<p>Obesidad asociada a la RI.</p> <p>Efectos anabólicos de la insulina atenuados.</p> <p><u>Obesidad:</u> ↑ resistina</p>	<p>Hígado: ↑ síntesis de glucosa.</p> <p>Músculo: ↓ captación de glucosa, ↓ metabolismo de AG.</p>
<b>TNF<math>\alpha</math></b> (Factor de Necrosis Tumoral- $\alpha$ )	Control de la inflamación. Regulación del sistema inmune y del balance energético.	<p>↑ inflamación que conduce a una RI.</p> <p>↑ Glucemia, ↑ Lipemia (hipertrigliceridemia), ↑ ECV, ↑ riesgo de esteatosis hepática no alcohólica.</p> <p><u>Obesidad:</u> ↑ TNF<math>\alpha</math></p>	<p>Hígado, músculo, adipocito: ↓ señalización intracelular de receptores de insulina, ↓ GLUT4 (↓ captación de glucosa), ↓ LPL.</p> <p>Hígado: ↑ síntesis receptores LDL, ↓ HDLc.</p> <p>Adipocito: ↓ adipogénesis, ↑ apoptosis.</p>
<b>IL-6</b> (Interleucina-6)	Control de la inflamación (adipocitoquina proinflamatoria). Regulación del sistema inmune y del balance energético. Desarrollo de RI.	<p>Estimula RI por ↑ AGNE (riesgo de DM2 y ECV).</p> <p>↑ glucemia,</p> <p>↓ actividad del tejido adiposo regulando el metabolismo lipídico y de la glucosa.</p> <p><u>Obesidad:</u> ↑ IL-6</p>	<p>Adipocito: ↓ LPL, ↑ lipólisis, ↑ termogénesis, ↓ adipogénesis, inhibe la esterificación de AG (↓ depósitos de TG).</p> <p>↑ angiotensinógeno → ↑ angiotensina (efecto vasoconstrictor).</p>

AG (ácidos grasos), AGNE (ácidos grasos no esterificados), AgRP (péptido relacionado con la proteína Agouti), AMPK (proteín quinasa activada por AMP), CART (péptido relacionado a la cocaína y la anfetamina), DM2 (diabetes *mellitus* tipo 2), ECV (riesgo cardiovascular), GLUT4 (transportador de glucosa 4), HDL (lipoproteína de alta densidad), LDL (lipoproteína de baja densidad), LPL (lipoproteína lipasa), NPY (neuropéptido Y), POMC (pro-opiomelanocortina), RI (resistencia a la insulina), SNC (Sistema Nervioso Central), TG (triglicéridos).

## 2.3.2. Tejido adiposo marrón (TAM)

Hasta no hace mucho tiempo, la presencia del tejido adiposo marrón sólo era considerada en los fetos, los neonatos, los mamíferos hibernantes y los pequeños roedores. Recientemente, mediante la técnica de tomografía por emisión de positrones (PET), se ha descubierto que éste persiste en el adulto humano aunque en menor medida que en el feto y el neonato, y principalmente en la región subescapular,



## INTRODUCCIÓN

---

aunque también está presente en las zonas interescapular, cervical, axilar, paravertebral, pericardial y perirenal (Cypess *et al.*, 2009; Saito *et al.*, 2009; van Marken Lichtenbelt *et al.*, 2009; Reddy *et al.*, 2014).

Recientes investigaciones en humanos sugieren una relación directa entre una menor cantidad de tejido adiposo marrón y una mayor tasa de obesidad. En estos estudios se ha observado un mayor porcentaje de activación del tejido adiposo marrón en sujetos delgados que en sujetos obesos. Por tanto, este tejido podría ser objeto de estudio para el tratamiento y prevención de sobrepeso o/y obesidad (Cypess *et al.*, 2009; van Marken Lichtenbelt *et al.*, 2009). Por ello, hoy en día, la atención que recibe el tejido adiposo marrón es bastante mayor que hace unos años.

La función principal de este tejido, conocida con el nombre de termogénesis facultativa o adaptativa, es la disipación de energía en forma de calor ante un estímulo de frío o una dieta hipercalórica (Perea, 2004-2005). En ciertas patologías, como el feocromocitoma, un tumor productor de catecolaminas (adrenalina y noradrenalina), la cantidad de tejido adiposo marrón también aumenta considerablemente por la estimulación continuada de noradrenalina (NA) (Ricquier *et al.*, 1982).

Esta función termorreguladora del tejido adiposo marrón se lleva a cabo gracias a una proteína desacoplante que recibe el nombre de *termogenina 1* o UCP1 (*uncoupling protein 1*), que se localiza en la membrana interna mitocondrial.

Por otro lado, si bien es conocida la capacidad de producción de calor por parte de este tejido, cada vez son más los estudios que demuestran los efectos secretores que éste también posee, pudiendo actuar a su vez, como órgano endocrino (Tabla 2) (Villarroya *et al.*, 2013; Hansen, 2014). Entre estos estudios resultan destacables aquellos en los que se han realizado trasplantes de tejido adiposo marrón, los cuales han puesto de manifiesto un aumento de la sensibilidad a la insulina y mayor tolerancia a la glucosa, efectos mediados a través de cambios en la función hepática y cardíaca (Gunawardana *et al.*, 2012; Stanford *et al.*, 2013). Cabe mencionar también que los factores endocrinos son liberados por el tejido adiposo marrón en respuesta su activación (o inducción de la termogénesis) y por lo tanto, a pesar de que algunas de estas sustancias también pueden ser secretadas por el TAB, el efecto producido en este caso será diferente incluso contrario. Estos factores actúan a nivel sistémico para favorecer el gasto energético y los procesos catabólicos que proporcionen sustratos necesarios para llevar a cabo la oxidación y termogénesis. Puesto que el SNC es el principal regulador de la actividad termogénica, cabe pensar que las adipocitoquinas liberadas por el TAM pueden interactuar con este sistema.

# INTRODUCCIÓN

**Tabla 2.** Principales factores endocrinos identificados por ser liberados por el tejido adiposo marrón (TAM).

Adipoquinas	Función	Efectos	Mecanismos
<b>T3</b> (Triyodotironina)	Regulación de la termogénesis y del gasto energético.	↑ Termogénesis (producción de calor). ↑ catabolismo.	TAM: conversión de la pro-hormona tiroxina (T4) en T3 gracias a la acción de la enzima yodotiroxina 5'-desyodasa (tipo 2). T3: actúa de forma sinérgica con NA sobre receptores tiroideos (TR $\alpha$ ) estimulando la termogénesis (↑ UCP1) y biogénesis mitocondrial.
<b>FGF21</b> (Factor de crecimiento de fibroblastos-21)	Regulación del metabolismo energético y de la glucosa.	Antiobesizante: ↓ acumulación de grasa. Antidiabético (tipo 2): ↓ glucemia, ↑ tolerancia a la glucosa, ↑ sensibilidad a la insulina. Revierde la RI inducida por una dieta obesogénica. ↑ marronización del TAB.	En termogénesis estimulada ↑ FGF21 que da lugar a: SNC: ↑ GLUT1, ↑ oxidación de glucosa, ↑ cetogénesis. Hígado: ↑ oxidación glucosa, ↑ gluconeogénesis, ↑ sensibilidad a la insulina. Páncreas: mejora la función de las células $\beta$ . TAB: ↑ GLUT4 (>captación de glucosa) y ↑ lipólisis vía AMPc. TAM: ↑ ARNm UCP1
<b>IGF-1</b> (Factor de crecimiento insulínico- 1)	Mimético de la insulina. Estimulación del crecimiento, diferenciación y migración celular.	↑ Termogénesis (¿?) (producción de calor). Antidiabético: ↓ glucemia, ↑ sensibilidad a la insulina.	TAM: ↑ ARNm UCP1 (bajo estimulación con frío). TAB: ↑ GLUT4 (>captación de glucosa).
<b>RBP4</b> (Proteína de unión a retinol)	Transporte de retinol (Vitamina A).	↑ Sensibilidad a la insulina en hígado. ↑ termogénesis.	Activación por NA. Transporte y liberación de retinol inducida por frío. ↑ lipólisis en TAM.
<b>IL-6</b> (Interleucina-6)	Regulación de la respuesta inmune (citoquina pro-inflamatoria) y homeostasis de la glucosa (¿?).	Fiebre (estimulación pirogénica). ↑ Sensibilidad a la insulina (¿?).	¿Mecanismo directo o a través de la inducción de la liberación de FGF21? ↑ Oxidación de AG. Mejora la función de células $\beta$ .
<b>IL-1<math>\alpha</math></b> (Interleucina-1 $\alpha$ )	Regulación de la respuesta inmune (citoquina pro-inflamatoria). Función desconocida en tejido adiposo.	Fiebre (estimulación pirogénica). ↑ de otras citoquinas pro-inflamatorias.	El frío ↑ mRNA IL-1 $\alpha$ y su unión a receptores IL-1R1 → activación de kinasas que modifican la señal insulínica.

¿? (efecto o mecanismo no descrito con exactitud hasta la fecha), AMPc (adenosín monofosfato-3',5' cíclico), GLUT1 (transportador de glucosa 1), GLUT4 (transportador de glucosa 4), NA (noradrenalina), RI (resistencia a la insulina), SNC (sistema nervioso central), T3 (triyodotironina), TAB (tejido adiposo blanco), TAM (tejido adiposo marrón), UCP1 (proteína desacoplante 1).

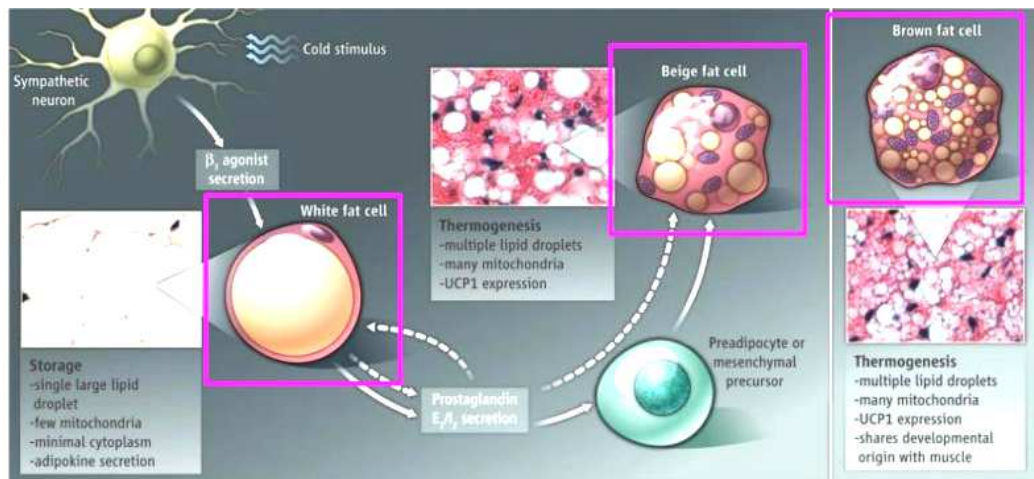
### 2.3.3. Adipocitos beige y “marronización”

Durante la última década, se ha descubierto un tercer tipo de adipocito presente en el seno de depósitos adiposos blancos, con morfología similar a la de un adipocito marrón y con capacidad de expresar la UCP1, por lo que podría cumplir funciones oxidativas propias del tejido adiposo marrón. Por sus características intermedias entre el adipocito blanco y el marrón, se le ha denominado adipocito beige o “*brite*” (de *Brown in White*) (Tabla 3). El hecho de que este tipo de adipocito haya sido

# INTRODUCCIÓN

recientemente descubierto, hace que se utilice el término adipocito marrón “clásico o constitutivo” para remarcar la diferencia con los denominados adipocitos beige o “brite”.

Como ya se ha indicado, el clásico tejido adiposo marrón, debido a su alto contenido en UCP1, es un tejido termogénico. Por el contrario, la función principal del tejido adiposo blanco es el almacén del exceso energético en forma de triglicéridos y por ello es un tejido con muy baja o nula capacidad oxidativa. Sin embargo, ante una estimulación crónica de receptores adrenérgicos o estimulación por frío, se ha observado que podría producirse un incremento de la capacidad oxidativa de este tejido asemejando su función a la del tejido adiposo marrón. Este fenómeno es conocido como “marronización del tejido adiposo blanco”, y viene acompañado de un aumento en la expresión de genes oxidativos y una inducción de la proteína UCP1 (Figura 3). Por este último motivo, una estimulación de la marronización podría resultar interesante como foco de actuación para combatir la obesidad.



**Figura 3.** Ilustración de los tres tipos de adipocitos (blanco, marrón y beige) y principales características de cada uno de ellos [Figura tomada de Spiegelman (Spiegelman, 2013)].

## ✦ Localización anatómica de los adipocitos beige

Numerosas han sido las investigaciones destinadas a definir la localización anatómica exacta de este tipo de tejido adiposo. Hasta hace no mucho, los depósitos de grasa localizados en el cuello de adultos humanos eran considerados tejido adiposo marrón (clásico) con una expresión génica característica de las células que lo forman. Sin embargo, en el año 2012, Sharp y col. (Sharp *et al.*, 2012) encontraron inesperadamente la expresión de genes selectivos de células beige en el tejido adiposo que se localiza alrededor de la nuca, tanto en humanos adultos como en neonatos. En el año 2013, Cypess y col. (Cypess *et al.*, 2013) aislaron, identificaron y analizaron con mayor precisión muestras de grasa procedente de la misma región anatómica de adultos humanos, clasificándolos en depósitos grasos superficiales y profundos. Los resultados mostraron que los depósitos grasos correspondientes a la zona superficial de la nuca presentaban un patrón de expresión génica similar al del tejido adiposo

# INTRODUCCIÓN

---

subcutáneo del ratón. Sin embargo, el patrón de expresión de la zona profunda se asemejaba más al tejido adiposo marrón de este modelo animal.

Todo ello sugiere la necesidad de un análisis más profundo acerca de la clasificación anatómica de cada tipo de tejido. El hallazgo de células beige, que fueron en su día clasificadas como marrones, nos obliga a distinguir con mayor precisión entre adipocitos marrones clásicos y adipocitos beige. Una hipótesis podría ser que el tejido que se suponía era marrón anteriormente pudiera ser tejido adiposo beige (Park *et al.*, 2014).

Por otro lado, evidencias previas sostienen la idea de que adipocitos blancos y “marrones” pueden coexistir en el mismo tejido (Himms-Hagen *et al.*, 2000; Vitali *et al.*, 2012). Ésto pone de manifiesto la posibilidad de una transdiferenciación del adipocito blanco a “marrón” a través de estímulos que normalmente regulan el desarrollo de la actividad del tejido adiposo marrón (Barbatelli *et al.*, 2010). También cabe mencionar que la aparición de estas células difiere entre roedores atendiendo a la localización del depósito. Tras un estímulo como el frío estas células aparecen normalmente en el tejido adiposo subcutáneo de la zona inguinal así como en el tejido epididimal y perigonadal, si bien en estos dos casos en menor cantidad (Seale *et al.*, 2011).

## ■ Origen y regulación de la formación de adipocitos “brite”

Las células propias del tejido adiposo marrón, adipocitos marrones, provienen de una línea celular muscular de células progenitoras denominada Myf-5 (factor miogénico 5) y por ello también son denominados “adipomiocitos”. Uno de los factores de transcripción que regula la formación de estos adipocitos marrones es el Prdm16 (*PR domain containing 16*), altamente expresado en el tejido adiposo marrón en comparación con el miocito o el adipocito blanco. Al parecer, la expresión de este factor determina la dirección de la diferenciación del precursor de adipocitos marrones y miocitos hacia adipocitos marrones.

En un principio se creyó que los adipocitos beige, cuyas características funcionales se corresponden con las del adipocito marrón, podrían tener la misma célula progenitora (positivas en Myf-5). Sin embargo, hasta la fecha, varios autores han constatado que los adipocitos beige (además de los blancos) son Myf-5 negativos, lo cual supone que, pese a compartir funcionalidad con adipocitos marrones, son células procedentes de precursores diferentes (Petrovic *et al.*, 2010; Seale *et al.*, 2011). No obstante, se ha observado que ambas son sensibles tanto a estímulos  $\beta$ -adrenergicos como el frío, bajo los cuales desarrollan cascadas transcripcionales similares en la diferenciación adipogénica (Seale *et al.*, 2011).

A día de hoy, la formación y el origen de “brites” es motivo de debate. Varias han sido las teorías propuestas acerca del origen de este tipo celular: a) las células beige surgen a través de una adipogénesis *de novo* de un subgrupo determinado de células precursoras intermedias, o b) a través de la transdiferenciación de adipocitos blancos pre-existentes. También se ha propuesto la coexistencia tanto de adipocitos marrones

## INTRODUCCIÓN

---

como blancos en ambos tejidos (TAB y TAM) que dan lugar a interconversiones reversibles adaptándose a las necesidades del organismo (c).

Estudios llevados a cabo por Petrovic y col. (Petrovic *et al.*, 2010) sostienen la idea de la existencia de una célula precursora que se diferencia en un tipo u otro de célula atendiendo a un estímulo recibido. Así, un adipocito beige no procede de una conversión de adipocito blanco ya formado sino que hay una célula intermedia que, en respuesta a un determinado estímulo, se transforma en célula beige o blanca (Figura 4).

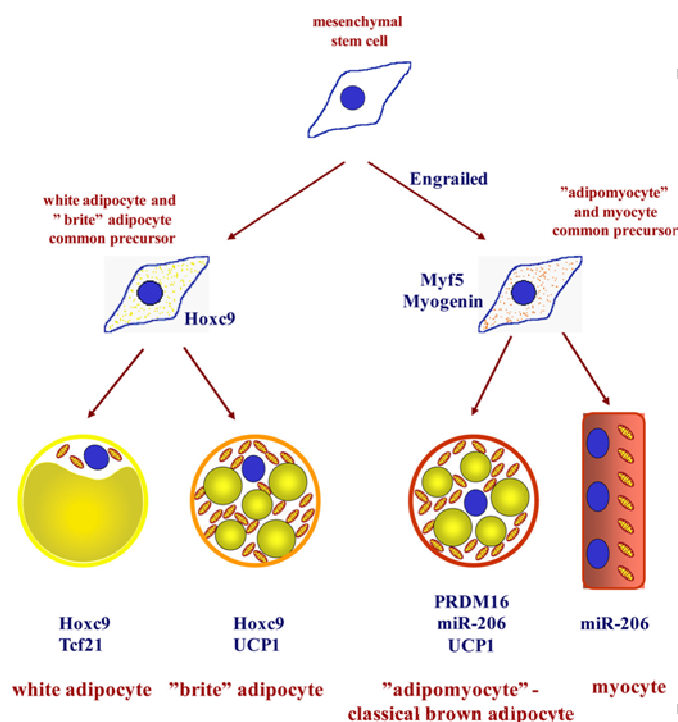
De acuerdo con esta teoría, resulta difícil explicar cómo siendo los adipocitos beige células procedentes de una línea celular diferente a los adipocitos marrones, pero común a los blancos, tienen la capacidad de expresar UCP1 bajo determinados estímulos [ $\beta$ -adrenérgicos o agonistas PPAR $\gamma$  (receptor activado por proliferadores de peroxisomas  $\gamma$ )]. Teniendo ésto en cuenta, cabe pensar en dos posibilidades: 1) la existencia de una pequeña cantidad de células marrones apenas detectables, residentes en el TAB, que por tanto expresan UCP1 y que bajo determinados estímulos pueden proliferar y diferenciarse o, 2) la existencia de un subconjunto de células diferentes de los adipocitos blancos y marrones, que contienen el gen de la UCP1 y, por ello, a pesar de un distinto origen al del adipomiocito, puedan expresar dicha proteína.

Petrovic y col. (Petrovic *et al.*, 2010) observaron la inducción de la expresión de UCP1 en cultivos primarios de tejido adiposo epididimal (considerado uno de los más blancos) tras el tratamiento con rosiglitazona, un potente agonista PPAR $\gamma$ . Sin embargo, el análisis genético mostró la ausencia de expresión de genes característicos del clásico adipocito marrón, desechándose así la teoría de la existencia de adipomiocitos infiltrados en el TAB. Esto supone además que ninguna célula en sí misma cambia sus características inherentes a no ser que haya un estímulo como es el caso, que induce determinados cambios.

La teoría de la transdiferenciación no pudo ser confirmada en este estudio, entre otros motivos, debido a que las células de los cultivos utilizados crecieron y fueron tratadas en un estadio no diferenciado, es decir, sin partir de un adipocito maduro (verdaderamente blanco) (Petrovic *et al.*, 2010).

Recientemente, Wang y col. (Wang *et al.*, 2013) han demostrado resultados similares. Estos trabajos también sugieren que la mayoría de los adipocitos beige surgen de un subgrupo de precursores contenidos en el TAB. En ese estudio, los investigadores desarrollaron un sistema de marcaje permanente para adipocitos maduros.

# INTRODUCCIÓN



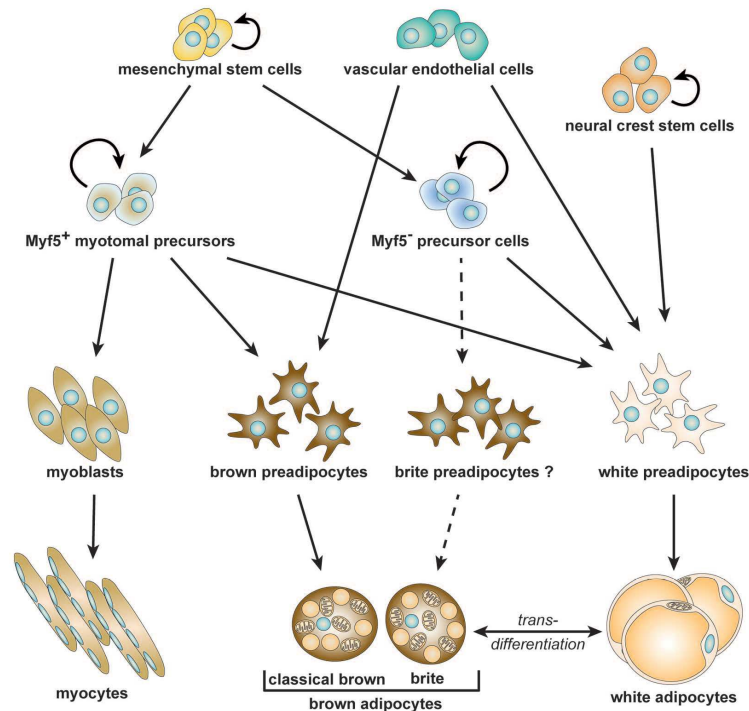
**Figura 4.** Origen y regulación de los distintos tipos de adipocitos. [Esquema tomado de Petrovic y col. (Petrovic et al., 2010)]. En este esquema se distinguen al menos tres tipos de células adiposas: el clásico adipocito marrón (adipomiocito), el adipocito beige/brite y el clásico adipocito blanco. Los adipocitos marrones comparten precursor común con los mioцитos, mientras que los adipocitos blancos y brites proceden de la misma célula precursora distinta de la anterior. HoxC9 (homeobox C9), miR-206 (micro ribonucleica cid-206), Myf-5 (factor miogénico 5), Prdm16 (dominio PR que contiene 16), Tcf21 (factor de transcripción 21), UCP1 (proteína desacoplante 1).

En otra línea de argumentación, Himms-Hagen y col. (Himms-Hagen *et al.*, 2000) observaron que cultivos celulares de adipocitos blancos maduros de rata se transformaban en beige tras ser expuestos a frío. Posteriormente, y de forma similar, Cinti (Cinti, 2009) mostró que grandes adipocitos blancos uniloculares se convierten en beige en respuesta a agonistas  $\beta$ -adrenérgicos o estímulos fríos.

De forma similar, en un estudio reciente llevado a cabo por Rosenwald y col. (Rosenwald *et al.*, 2013), en ratones sometidos a cambios de temperatura, se observó que la proliferación de adipocitos beige inducida por frío revertía a “adipocitos blancos” tras un periodo de 5 semanas de adaptación a temperatura ambiente. El análisis genético y la caracterización transcripcional demostraron una correspondencia con la expresión génica de adipocitos blancos. Por tanto, en este caso se sustenta de nuevo la hipótesis de la transdiferenciación, pero con el matiz adicional de que ésta resulta bidireccional. Esta propiedad implica la capacidad de los adipocitos de someterse a un proceso fisiológico que supone la reprogramación reversible de su genoma y permite que células diferenciadas cambien tanto de fenotipo como de función atendiendo a las

# INTRODUCCIÓN

necesidades del organismo (Figura 5) (Rosenwald *et al.*, 2014). De hecho, estos autores no consideran la necesidad de marcar una diferencia entre adipocitos “*brite*” y marrones puesto que a día de hoy no existe una diferencia entre la función desempeñada por cada una de ellas y tampoco una diferencia a nivel morfológico y molecular.



**Figura 5.** Teorías acerca del origen y la formación de adipocitos brite según Rosenwald (Rosenwald *et al.*, 2013).

La importancia del conocimiento de la procedencia de los adipocitos beige radica en que una inducción de este tipo de células (positivas a su vez en UCP1) en el tejido adiposo subcutáneo, que es muy abundante, podría ayudar a mejorar la sensibilidad a la insulina además de incrementar el gasto energético y, con ello, problemas derivados del sobrepeso y la obesidad. Sin embargo, puesto que los niveles de ARNm para la UCP1 en el tejido adiposo beige son alrededor de un 20% menor en comparación con los niveles de ARNm en el tejido adiposo marrón, el grado de actividad termogénica que pudiera tener lugar en este tipo de tejidos resulta cuestionable. No obstante, empiezan a publicarse estudios que concluyen que en el tejido adiposo inguinal de roedores hay cantidades suficientes como para mediar una termogénesis potencial y ejercer su efecto a nivel sistémico (pese a que el predominio de la termogénesis mediada por el tejido adiposo marrón continúe, en efecto, siendo predominante) (Shabalina *et al.*, 2013).

En resumen, ante la ausencia de un motivo que explique la diferencia entre células que se “transdiferencian” de adipocitos de color blanco a marrón y aquellas células que no son capaces de experimentar este proceso, la cuestión de si solo existe un tipo de célula blanca o no por ahora permanece sin ser esclarecida.

# INTRODUCCIÓN

**Tabla 3.** Diferencias entre los tres tipos de adipocitos (marrón, blanco y beige o “brite”).



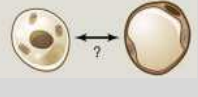
	Marrón	Blanco	Beige (“Brite”)
Localización	Interescapular, perirenal, axilar, paravertebral	Subcutáneo (inguinal), retroperitoneal, perigonadal, omental	Inmerso en el tejido adiposo blanco inguinal, ¿otros TAB?
Morfología	Multilocular (pequeñas gotículas lipídicas)	Unilocular (gran gota lipídica)	Unilocular (grande) o multilocular (múltiples pequeñas gotículas lipídicas)
			
Función	Termogénesis adaptativa	Almacenamiento de energía (TG)	Termogénesis adaptativa
Contenido mitocondrial	(+++)	(+)	Bajo estimulación (++)
Contenido en hierro	Abundante	Bajo	Abundante bajo estimulación
UCP1	(+++)	Apenas detectable	Bajo estimulación (++)
Correlación con RI	Negativa	Positiva	Negativa
Vascularización (Capilares)	Abundante	Baja	↑ bajo estímulos fríos por un ↑ de angiogénesis en TABi
α-,β-receptores adrenérgicos	β3 (+++)	β3 (++) , α2 (+)	¿β3, α2?
Efecto en obesidad	↓	↑	↓
Factores de transcripción; marcadores	PPARγ, C/EBPβ, Prdm16, PGC1α, PPAR α, BMP7, TBX15; UCP1, Cidea, Eva1, Pdk4, Ebf3, genes miogénicos (Zick1, Lhx8, Meox2)	PPARγ, C/EBPβ, C/EBPα, BMP4 ; HoxC9, Tcf21, LPL, G3PDH, Angiotensina, Resistina	Prdm16, PGC1α, C/EBPβ, PPAR α(?), TBX15(?), BMP4, BMP7; Cd137, Tmem26, Tbx1, Cited1, Cidea, Shox2; UCP1
Activadores	Frío, hormonas tiroideas, tiazolidinedionas, catecolaminas , péptido natriurético, FGF21, Bmp7, Bmp8b	Dieta obesogénica, insulina, IGF-1, MCSF, glucocorticoides, prostaglandinas	Frío, tiazolidinedionas, hormonas tiroideas (?) catecolaminas, péptido natriurético, FGF21, irisina (?)

Tabla e imágenes adaptadas de Park y col. (Park *et al.*, 2014) y de Rosen y col. (Rosen *et al.*, 2014). Abreviaturas: BMP (proteína morfogénica ósea), C/EBPβ (proteína β de unión a CCAAT), Cd137 (superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral), Cidea (factor inductor de muerte celular por fragmentación de ADN), Cited1 (transactivador de interacción con Cbp/p300), Ebf (Factor de transcripción temprano de células B), Eva1 (antígeno de membrana epitelial de tipo V 1), FGF21 (factor de crecimiento de fibroblastos 21), G3PDH (Glucosa 3 fosfato deshidrogenasa), HoxC9 (homeobox C9), IGF-1 (factor de crecimiento insulina), Lhx8 (lim homeobox 8), LPL (lipoproteína lipasa), MCSF (factor estimulante de colonias de macrófagos), Meox2 (mesénquima homeobox 2), Pdk4 (piruvato deshidrogenasa quinasa), PGC-1α (coactivador del peroxisoma proliferador activado del receptor γ- 1α), PPAR-α (receptor activado por proliferadores de peroxisomas γ), PPARγ (receptor activado por proliferadores de peroxisomas γ), Prdm16 (dominio PR que contiene 16), RI (resistencia a la insulina), Shox2 (short sature homeobox 2), TAB (tejido adiposo blanco), TABi (tejido adiposo blanco inguinal), TBX15 (T-box 15), Tcf21 (factor de transcripción 21), TG (triglicéridos), Tmem26 (proteína transmembrana 26), UCP1 (proteína desacoplante 1), Zick1 (factor transcripcional tipo dedos de zinc en el cerebelo).





# INTRODUCCIÓN

---

## 3. METABOLISMO LIPIDICO

El metabolismo lipídico es un proceso complejo integrado por: a) digestión y absorción, b) transporte, c) captación por parte de los tejidos, d) almacenamiento, e) catabolismo y/o f) síntesis. Dependiendo del tipo de tejido se dan procesos de lipogénesis *de novo*, esterificación, lipólisis,  $\beta$ -oxidación y termogénesis. Dada la amplitud de este tema, la presente introducción se centrará en aquellos procesos estudiados en esta tesis doctoral.

### 3.1 Digestión y absorción de los lípidos de la dieta

La mayor parte de los lípidos de la dieta son ingeridos en forma de triglicéridos (TG), que consisten en una molécula compacta formada por tres ácidos grasos (AG) unidos a un glicerol. Tras un primer contacto con algunas enzimas presentes en la saliva, llegan al estómago donde gracias a la agitación mecánica de éste, se mezclan con su lipasa gástrica abriéndose camino al intestino, donde se emulsionan con la bilis y sufren la digestión más relevante mediada por lipasas pancreáticas. La llegada de los TG al intestino estimula la liberación de dos hormonas, secretina y colecistoquinina, las cuales a su vez estimulan la liberación del jugo pancreático desde el páncreas y la bilis desde la vesícula biliar. El jugo pancreático es rico en lipasa pancreática (que hidroliza los TG en monoacilglicéridos y glicerol), colesterol esterasas (que hidrolizan de los ésteres de colesterol dando como productos AG y colesterol libre) y fosfolipasas (Fosfolipasa A1 y Fosfolipasa A2, que hidrolizan los AG esterificados al glicerol de los fosfolípidos produciendo AG libres y lisofosfolípidos).

De esta forma, el TG libera ácidos grasos que pueden ser absorbidos por las células intestinales para, una vez en su interior, resintetizarse a TG para su posterior transporte (Tso, 1985). Cabe destacar también la importancia de los ácidos biliares en la absorción de las moléculas lipídicas, que al ser de carácter apolar, resultan de difícil solubilización en el medio acuoso intestinal. La acción principal de las sales biliares se fundamenta en la formación de agregados denominados micelas, que poseen una parte interior apolar que permite el contacto con las grasas y una parte exterior polar que entra en contacto con la célula intestinal, pudiendo darse así la absorción a través de la membrana del enterocito .

### 3.2 Captación tisular de triglicéridos: lipoproteína lipasa (LPL)

Una vez alcanzada la mucosa intestinal, los ácidos grasos de cadena media por lo general son transportados directamente vía vena porta al hígado. Aquellos ácidos grasos cuya longitud sea superior a 14 átomos de carbono, se resintetizan en triglicéridos para ser empaquetados junto con vitaminas liposolubles y colesterol en lipoproteínas transportadoras llamadas quilomicrones (Qm).

Los Qm viajan vía linfática para ser vertidos al torrente sanguíneo, donde son sustrato de la lipoproteína lipasa (LPL) anclada al endotelio de tejidos como el adiposo, muscular entre otros. La LPL hidroliza los TG de los Qm para poder introducir los AG en ellos contenidos al interior de las células gracias al transportador CD36 (cluster de diferenciación 36). Una vez en el interior, los ácidos grasos se re-ensamblan para poder

# INTRODUCCIÓN

---

formar una molécula de TG en el caso del tejido adiposo, o son oxidados en el caso del músculo esquelético (Bensadoun, 1991). En el caso del hígado, hasta hace no mucho se creyó que la LPL apenas era expresada ya que en este órgano los AG se incorporan directamente, sin necesidad de la LPL. (Merkel, 1998). Recientemente, Pardina y col. (Pardina *et al.*, 2009) han demostrado que ante determinadas situaciones fisiológicas el hígado puede presentar actividad LPL, bien porque ésta es sintetizada (como en regeneración hepática inducida por una hepatectomía parcial) o bien porque la LPL es captada ávidamente de la circulación sanguínea (como en hipertrigliceridemias o al final de la gestación). En todas estas situaciones, parte de la LPL hepática es funcional ya que capacita al hígado para captar y metabolizar TG circulantes en forma de lipoproteínas.

## ■ Regulación de la LPL en el tejido adiposo

La actividad de la LPL se ve modificada por diversos factores como son las necesidades energéticas del individuo y el tejido donde se expresa (cerebro, corazón, pulmones, glándulas mamarias, músculo esquelético, riñón y tejido adiposo) (Bensadoun, 1991).

De este modo, en situaciones de ayuno o restricción energética hay una reducción de éste enzima en el tejido adiposo para una menor entrada de TG al tejido adiposo. Por el contrario, otros órganos como el corazón o músculo esquelético presentan una mayor actividad LPL, puesto que los AG se redirigen a órganos oxidativos para obtener energía en lugar de almacenarse (Eckel *et al.*, 1987). Durante la realización de actividad física, se produce una mayor actividad del enzima LPL en músculo esquelético con el objetivo de aportar mayor cantidad de sustrato para ser oxidado y obtener así energía (Nikkilä *et al.*, 1978). Diversas situaciones fisiopatológicas, como la obesidad y aterosclerosis, entre otras, inducen cambios en la actividad de la LPL cuya regulación se ve modificada por estas alteraciones. Otros factores, como el sexo y la composición de la dieta entre otros, también modulan la actividad de la LPL.

Los mecanismos a través de los cuales los factores mencionados previamente actúan sobre la LPL modulando su actividad en el tejido adiposo, son principalmente de tipo transcripcional y post-translacional. Recientemente se han descubierto mecanismos post-transcripcionales involucrados en la regulación de la actividad de la LPL en el tejido adiposo.

A nivel transcripcional, el principal regulador de la transcripción del gen de la LPL es el PPAR $\gamma$  (receptor activado por proliferadores de peroxisomas  $\gamma$ ). Este receptor es estimulado por la concentración de ácidos grasos (y por tanto es inhibido durante el ayuno) y lleva asociado un efecto activador de enzimas relacionados con el almacenamiento de triglicéridos, como es el caso de la LPL (Bogacka *et al.*, 2004). Otro factor de transcripción que activa la transcripción de genes LPL y que se ve reducido en el tejido adiposo durante el ayuno es el SREBP-1 (sterol regulatory element binding protein 1), si bien ésta regulación de la LPL *in vivo* sigue siendo poco clara.

El principal estímulo hormonal activador de la transcripción de la LPL es la insulina. No obstante, existen otras hormonas que intervienen en este proceso regulador como son los glucocorticoides (estimuladores en menor medida). Los estrógenos, hormonas

## INTRODUCCIÓN

---

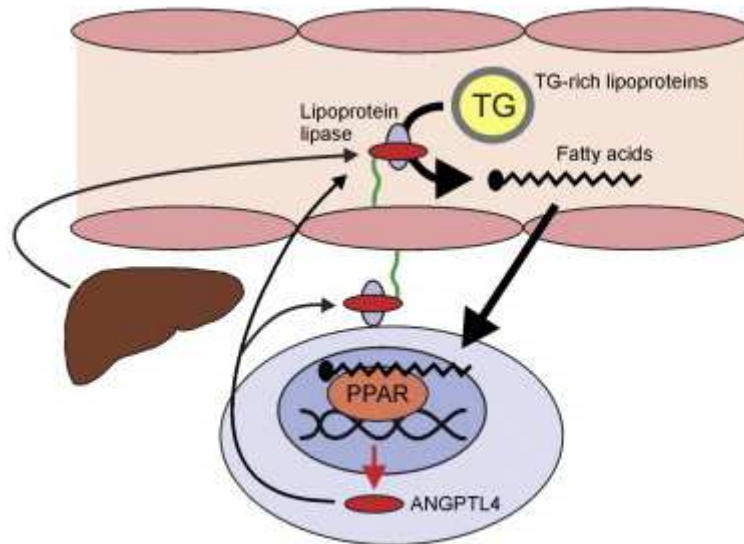
tiroideas, catecolaminas y la hormona adrenocorticotropa (ACTH) ejercen el efecto contrario inhibiendo la LPL (Ransom *et al.*, 1981; Eckel *et al.*, 1987).

Otra regulación importante para que se lleve a cabo la actividad LPL es la de tipo post-translacional. La LPL no es activa en las células parenquimatosas y por ello precisa de una glucosilación para poder ser activada antes de ser exportada a las células endoteliales (Ong *et al.*, 1989). Una vez ocurrido esto, se ancla a las cadenas de heparin-sulfato, quedando situada en la cara exterior del endotelio capilar.

En cuanto a los mecanismos de regulación post-transcripcionales, el hecho de que la LPL funcional se localice anclada al endotelio vascular, es decir, fuera de la célula, supone que no puede estar regulada por los sistemas convencionales de regulación rápida de la actividad enzimática, como son la fosfo-desfosforilación o la alostería. Por esto, siempre se ha aceptado que la LPL se regula únicamente por sistemas a medio-largo plazo (traducción, degradación intracelular, etc) (Kersten, 2014).

Sin embargo, se ha observado como los cambios producidos durante la ingesta y el ayuno tanto a nivel de ARNm como de expresión proteica de LPL son insignificantes en comparación con los cambios que se dan en su actividad enzimática (Kroupa *et al.*, 2012). De hecho, en algunas especies, las modificaciones del ARNm de la LPL y de su actividad suceden en direcciones opuestas durante el ayuno, disminuyéndose la actividad de la LPL al mismo tiempo que aumenta el ARNm de ésta (Doolittle *et al.*, 1990). Esto sugiere la existencia de una posible regulación para la LPL a nivel post-transcripcional.

Durante la última década se ha descubierto que determinadas proteínas pertenecientes a la familia de las denominadas ANGPTLs (angiopoyetin-like protein; proteínas relacionadas con angiopoyetina), proteínas sintetizadas en el hígado, podrían llevar a cabo una regulación de la LPL a nivel post-transcripcional de una forma paracrina. Parece que la función principal de este tipo de proteínas es la de inhibir la actividad de la LPL generando una forma inactiva de ésta (Lichtenstein *et al.*, 2007; Kroupa *et al.*, 2012). Sukonina y col. (Sukonina *et al.*, 2006) observaron un aumento de la proteína ANGPTL-4 durante el ayuno cuya unión a la LPL del tejido adiposo dio como resultado la inactivación transitoria de la LPL. Esta inactivación se produjo por una conversión de su forma dimerica catalíticamente activa a monómero inactiva, con disminución de la afinidad por la heparina (Figura 6).



**Figura 6.** Regulación post-transcripcional de la LPL. Inhibición de la actividad LPL mediada por ANGPTL4 (angiopietina -like protein 4) [Esquema modificado de Kersten (Kersten, 2014)].

A su vez, estudios llevados a cabo con ratones cuyo gen de ANGPTL4 ha sido deplecionado (Kroupa *et al.*, 2012) han mostrado un aumento en la actividad LPL basal sin una disminución en su actividad (en tejido adiposo) durante el ayuno. Como resultado, estos ratones han reducido notablemente los TG plasmáticos, hasta el punto de ser casi indetectables en ayunas.

Todo esto podría llegar a representar la existencia de mediadores exclusivos en el control local y hormonal de la actividad de la LPL y la absorción de ácidos grasos resultante.

### 3.3 Lipogénesis *de novo*

El almacenamiento de triglicéridos en los adipocitos puede ser el resultado de 1) la absorción y captación de AG procedentes de la dieta y su posterior esterificación a TG dentro de la célula ó 2) la biosíntesis *de novo* de AG a partir de sustratos no lipídicos. En adipocitos humanos este último proceso, también conocido como lipogénesis *de novo*, representa alrededor de un 25% de la lipogénesis en general y aunque tiene lugar especialmente en el tejido adiposo y el hígado, se ha observado que puede ser llevado a cabo en casi todos los tipos celulares (Strawford *et al.*, 2004).

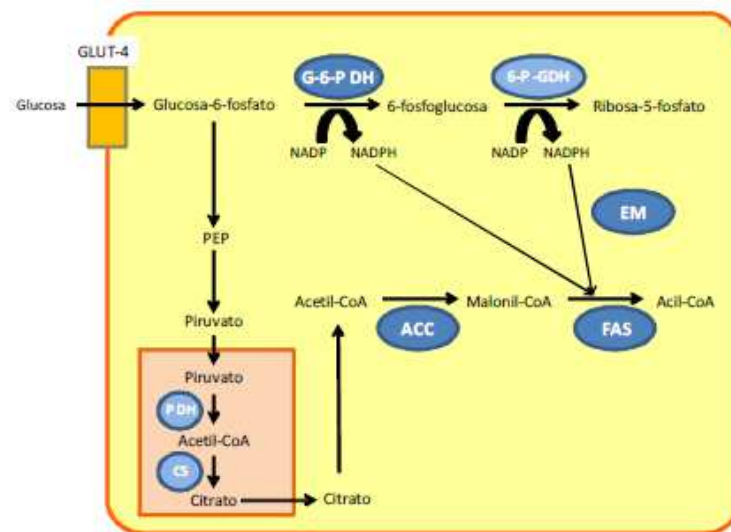
La lipogénesis es el proceso de síntesis *de novo* de ácidos grasos a partir de acetil-CoA, precursor procedente del metabolismo de la glucosa, aunque también puede provenir de la degradación de aminoácidos e incluso de ácidos grasos. Este proceso tiene lugar en el citoplasma de células presentes en casi todos los tejidos, pero especialmente en hígado y tejido adiposo blanco.

Para la *lipogénesis de novo*, además del precursor acetil-CoA, se hace necesario un sustrato con poder reductor como es el caso de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

## INTRODUCCIÓN

(NADPH), siendo estos dos los sustratos limitantes de la reacción. Dicho poder reductor proviene de reacciones bioquímicas catalizadas por los enzimas glucosa-6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH), malato deshidrogenasa o enzima málica (EM) y la NADP-isocitrato deshidrogenasa.

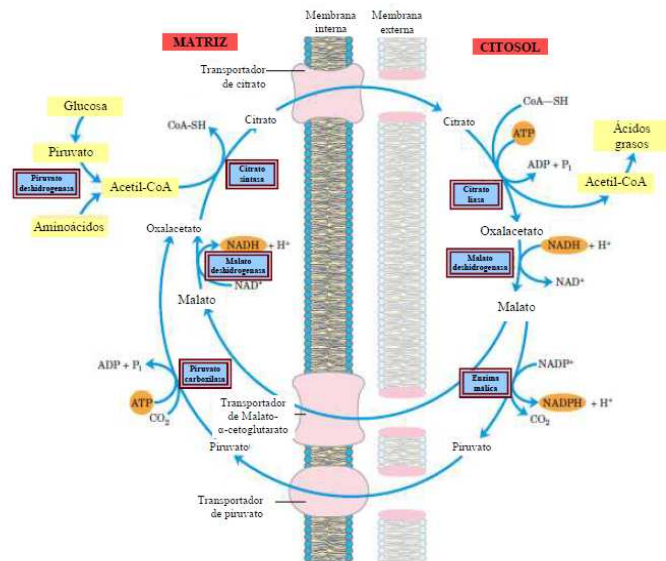
El proceso de lipogénesis comienza con la transformación del acetil-CoA a malonil-CoA gracias a la acción del enzima acetil-CoA carboxilasa (ACC) y la presencia de ATP, proceso que resulta limitante para que la lipogénesis se lleve a cabo. El malonil-CoA es el sustrato empleado por un complejo multienzimático, ácido graso sintasa (FAS; fatty acid synthase) cuya función es generar ácidos grasos de cadena larga (palmitato) en una secuencia repetitiva de reacciones con cuatro etapas, utilizando para ello poder reductor (NADPH). La actividad de este enzima, así como la actividad de la ACC, limita el proceso biosintético de ácidos grasos y de ahí la importancia de la regulación de ambas.



**Figura 7.** Esquema de la lipogénesis de novo. [Esquema tomado de Lasa (Lasa, 2010)]. ACC (acetil-CoA carboxilasa), CS (citrato sintasa), EM (enzima málica), FAS (sintasa de ácidos grasos), G6PDG (glucosa-6 fosfato deshidrogenasa) y PDH (piruvato deshidrogenasa).

Por otro lado, el acetil-CoA necesario para la síntesis de ácidos grasos se encuentra en la mitocondria mientras que la biosíntesis tiene lugar en el citosol, por lo que se hace imprescindible el uso de un mecanismo de transporte: el sistema *lanzadera de citrato*. Gracias al enzima citrato sintasa (CS), el acetil-CoA se combina con oxalacetato para formar citrato, el cual atraviesa la membrana mitocondrial y se combina con el CoA para formar nuevamente acetil-CoA y oxalacetato, reacción catalizada por la citrato liasa. Una vez que el acetil-CoA está disponible en el citosol, el oxalacetato vuelve a la mitocondria mediante la formación de malato (Nelson *et al.*, 2005).

# INTRODUCCIÓN



**Figura 8.** Esquema del funcionamiento del sistema lanzadera de citrato mitocondrial. [Esquema tomado de Miranda (Miranda, 2010) el cual ha sido modificado de Nelson y col. (Nelson y Cox, 2005)].

Algunos estudios sugieren que el almacenamiento de los AG en forma de TG en humanos depende principalmente de la liberación de los mismos desde las lipoproteínas plasmáticas por acción de la LPL, siendo así la lipogénesis *de novo* un contribuyente menor en la totalidad de las reservas de lípidos. Sin embargo, en pacientes con deficiencia de esta lipasa también se produce la acumulación de TG en el tejido adiposo (Brun *et al.*, 1989), indicando la implicación de otros mecanismos como la lipogénesis *de novo* (Schutz, 2004). A su vez, la manipulación farmacológica o genética de enzimas que participan en esta ruta ha demostrado dar lugar a profundas consecuencias metabólicas (Postic y Girard 2008), lo que sugiere que la lipogénesis *de novo* podría además actuar como mecanismo de señalización independiente de la generación de reservas de lípidos (Lodhi *et al.*, 2011).

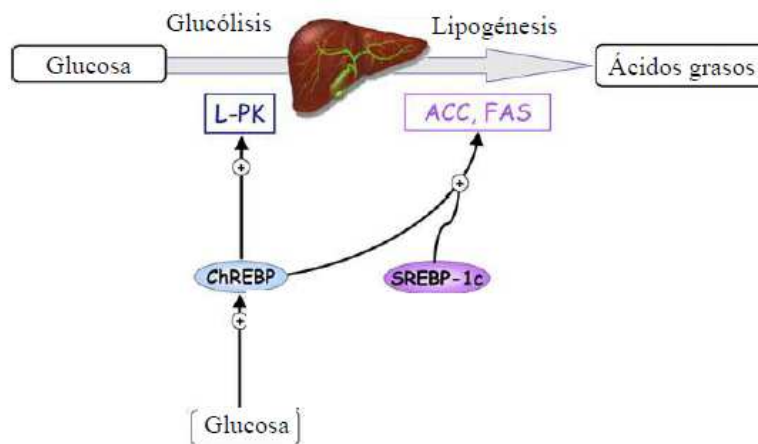
## Regulación de la lipogénesis

Las rutas metabólicas que participan en la síntesis de ácidos grasos, y en su consiguiente esterificación en TG, están bien establecidas: la ACC y la FAS son susceptibles de ser reguladas de forma aguda por mecanismos post-transcripcionales y alostéricos, pero son mayoritariamente controladas a largo plazo por modulación de su transcripción. La actividad de ACC, por ejemplo, es controlada por fosforilación/desfosforilación de la serina y mecanismos alostéricos (inhibición por ácidos grasos), mientras que la cantidad de enzimas está regulado por numerosas hormonas como la insulina o la hormona de crecimiento (GH, growth hormone) - regulación a largo plazo- (Barber *et al.*, 1997; Hardie, 1989).

Se puede afirmar que la lipogénesis es susceptible de variación por factores externos como la dieta, bien por la cantidad o bien por su composición. En este sentido, existen estudios que demuestran que la ingesta de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs, polyunsaturated fatty acids) produce una inhibición de la expresión de enzimas hepáticos lipogénicos como ACC y FAS (Mater *et al.*, 1999). Mediante la regulación de

## INTRODUCCIÓN

esta ruta, los PUFAs promueven una reorientación de los ácidos grasos desde su síntesis y almacenamiento, hacia la oxidación (Jump y Clarke, 1999). Los PUFAs inhiben la transcripción del gen SREBP (sterol regulatory element binding protein), aumentando la renovación del ARNm de SREBP-1c (Xu *et al.*, 2001) e interfiriendo en el procesamiento proteolítico de la proteína SREBP-1c (Hannah *et al.*, 2001). Además, tal y como demostraron Dentin y col. en el año 2005, existe una implicación directa del gen ChREBP (proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos) en la mediación del efecto negativo de los PUFAs sobre los enzimas glucolíticos y lipogénicos (Dentin *et al.*, 2005).



**Figura 9.** Regulación transcripcional de lipogénesis y glucólisis. [Esquema propuesto por Miranda (Miranda, 2010)]. ACC (acetil-CoA carboxilasa), ChREBP (proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos), FAS (ácido graso sintasa).

Igualmente, la lipogénesis se encuentra nutricionalmente regulada tanto por glucosa como por la señal de insulina en respuesta a la ingesta de hidratos de carbono. El factor de transcripción SREBP-1c ha sido considerado durante años el regulador principal de la acción de insulina sobre genes involucrados en la síntesis de ácidos grasos (FAS y ACC entre otros) (Moon *et al.*, 2001) y triglicéridos (Gonzalez-Baró *et al.*, 2007). No obstante, la actividad de SREBP-1c por sí solo, no es suficiente para promover la expresión de genes lipogénicos y glucolíticos en respuesta a la ingesta de hidratos de carbono (Figura 10).

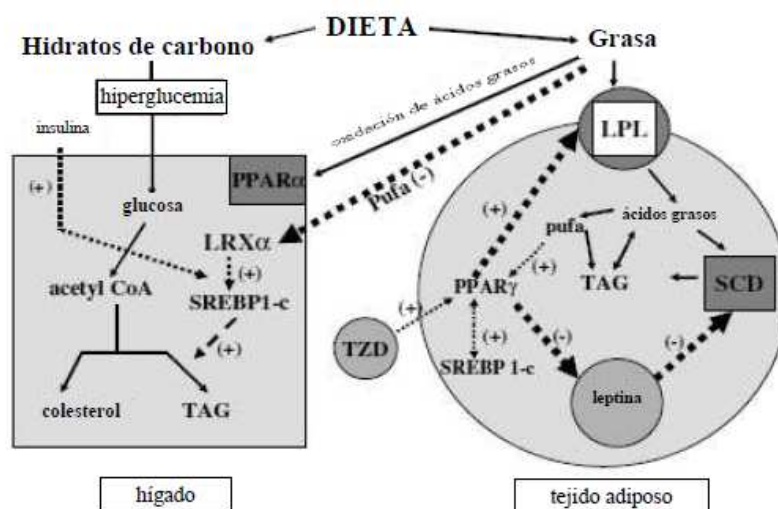
Prueba de ello es el estudio desarrollado por Liang y colaboradores en el 2002, donde la inhibición completa del gen SREBP-1c en ratones únicamente dio como resultado una reducción de la síntesis de ácidos grasos (Liang *et al.*, 2002).

El descubrimiento del factor de transcripción ChREBP abrió una nueva luz a los posibles mecanismos por los cuales la glucosa afecta a la transcripción de genes involucrados en la lipogénesis *de novo* (Uyeda y Repa, 2006). Se ha constatado que la entrada de glucosa a la células promueve la translocación de ChREBP desde el citosol hasta el núcleo, permitiendo así la translocación de ChREBP al elemento respondedor de



# INTRODUCCIÓN

hidratos de carbono (ChORE, carbohydrate-responsive element), el cual se encuentra en la regiones promotoras de genes tanto glucídicos como lipogénicos.



**Figura 10.** Papel de SREBP-1c y PPARs en la acumulación lipídica. [Esquema modificado de Jeffcoat y col. (Jeffcoat *et al.*, 2007)]. LXR (receptor X hepático), PPAR (receptor activado por proliferadores de peroxisomas), PUFA (ácidos grasos poliinsaturados), SREBP (proteínas de unión al elemento regulado por esteroides), TAG (triglicéridos), TZD (tiazolindinedionas).

Estudios *in vitro* han revelado la existencia de otros factores de transcripción, independientes a SREBP y con efecto aditivo, involucrados en la regulación de la lipogénesis por la insulina (Latasa *et al.*, 2000). Los factores estimuladores contracorriente (USF, upstream stimulatory factors), por ejemplo, son capaces de interactuar con la caja E presente en el promotor de FAS (Wang y Sul, 1997).

Tal y como se ha mencionado anteriormente, la insulina es una hormona que se encuentra directamente relacionada con variaciones en la glucosa plasmática y en la lipogénesis (Figura 9). Los efectos de esta molécula se producen por la unión de la misma a su receptor en la superficie de la célula que activa una cadena de reacciones vía tirosinquinasa mediante su fosforilación (Lane *et al.*, 1990; Nakae *et al.*, 1999).

Otra hormona con una indiscutible influencia en la ruta lipogénica, es la GH. La acción de esta hormona reduce la lipogénesis en el tejido adiposo, dando como resultado una sustancial pérdida de grasa y un aumento de la masa muscular (Etherton, 2000). Este efecto parece estar mediado tanto por la disminución de la sensibilidad a la insulina (Yin *et al.*, 1998) (es más que probable que GH interfiera en la señal de insulina a nivel post-receptor) y su consiguiente regulación a la baja de la expresión de FAS en el tejido adiposo, como por la fosforilación de los factores de transcripción Stat 5a y 5b (Teglund *et al.*, 1998). Stat 5 es una familia de proteínas que se ha relacionado con el aumento de la acumulación grasa.

# INTRODUCCIÓN

---

La leptina es otra hormona de singular importancia en la biosíntesis de ácidos grasos. Se trata de un péptido producido y secretado por los adipocitos que interactúa con el neuropeptido Y (NPY, Y neuropeptide) para modular el apetito (Houseknecht *et al.*, 1998). La producción y secreción de leptina se haya regulada por control simpático y otras hormonas (insulina, glucagónn, GH,...), pero también por la cantidad de TG almacenados en los adipocitos. Prueba de ello, es la que una alta concentración de leptina en plasma es proporcional al número de adipocitos y el contenido en triglicéridos de estos. Esta hormona también aumenta el gasto energético por aumento de la actividad termogénica de tejido adiposo marrón y de la oxidación grasa en hígado y otros tejidos (Zhou *et al.*, 1997). La leptina por tanto, puede actuar de inhibidor directo de la síntesis de triglicéridos en adipocitos, gracias a su capacidad para modular el balance energético a través de cambios en el apetito y el gasto energético.

## 3.4 Lipolisis

La lipolisis es el proceso mediante el cual los lípidos acumulados en el tejido adiposo en forma de TG son hidrolizados progresivamente en diacilglicérido (DG) y monoglicéridos (MG) para finalmente dar lugar a tres moléculas de ácidos grasos libres y una de glicerol.

El proceso lipolítico comienza con la triacilglicérido lipasa del tejido adiposo (ATGL), enzima que se encarga de romper los TG en DG y un ácido graso. La lipasa sensible a hormonas (HSL) continúa degradando los DG hasta MG y por último, la monoglicérido lipasa (MGL) hidroliza los MG en un ácido graso y glicerol, catalizando así la última etapa de esta ruta metabólica. El glicerol es liberado a sangre y los ácidos grasos pueden ser liberados a sangre (situación que se produce forma mayoritaria) o ser re-esterificados para formar de nuevo TG.

La HSL, situada en el citoplasma, fue descrita por primera vez en los años sesenta como una lipasa diferente a la LPL capaz de hidrolizar DG y con cierta afinidad, aunque menor, por los TG, MG y ésteres de colesterol (EC) y retinol (RE), y cuya acción dependía de una estimulación hormonal (Bjorntorp *et al.*, 1962; Holm, 2003).

La ATGL es una proteína localizada mayoritariamente en la superficie de la gotícula de grasa. Se expresa principalmente en el tejido adiposo blanco y marrón, aunque también puede encontrarse en otros órganos y tejidos como el músculo esquelético, corazón o testículos. Fue descrita por primera vez en el año 2004 y también es conocida como “desnutrina” o “fosfolipasa dependiente de calcio” (Jenkins *et al.*, 2004; Villena *et al.*, 2004; Zimmermann *et al.*, 2004). La ATGL es la mayor responsable del primer paso de la lipolisis, si bien puede hidrolizar también DG aunque con menor afinidad.

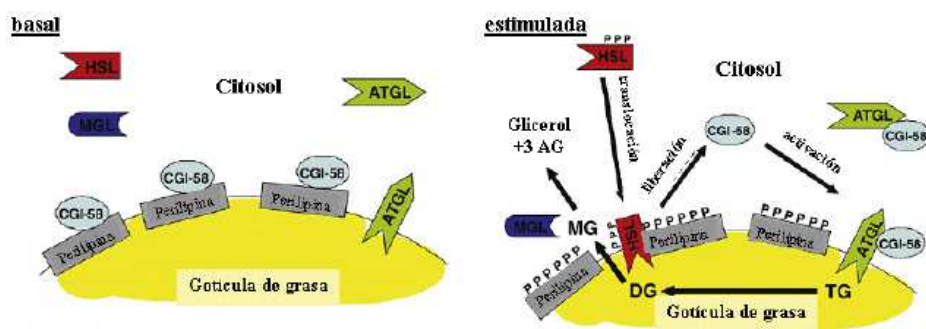
### ■ Regulación de la lipolisis

El proceso lipolítico está regulado por factores hormonales como las catecolaminas. En condiciones basales, la ATGL está ubicada en la superficie de la gotícula de grasa y, aunque se encuentra parcialmente inactiva, puede llevar a cabo la llamada lipolisis

# INTRODUCCIÓN

basal (Zimmermann *et al.*, 2004). En esta situación, la HSL se encuentra en el citoplasma, sin acceso a los TG del interior de la gotícula de grasa. En la superficie de esta gotícula también encontramos dos proteínas: la perilipina-A y la proteína activadora de ATGL, CGI-58. En situación basal, ambas se encuentran interaccionando y minimizando la interacción ATGL-CGI-58, lo cual mantiene parcialmente inactiva la ATGL. Tras la unión de catecolaminas a sus receptores  $\beta$  (estimulación  $\beta$ -adrenérgica), se produce la unión a la proteína Gs, lo que conlleva el aumento de adenosín 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC) a través de la adenilato ciclasa. Este AMPC activa la proteína quinasa A (PKA, *protein kinase A*), cuya actividad es la fosforilación de sustratos (Holm, 2003). La PKA fosforila la perilipina A, haciendo que ésta se libere de la proteína CGI-58. Tras esta liberación, la proteína CGI-58 se une a la ATGL en la superficie de la gotícula de grasa, activándola (Watt y Steinberg, 2008).

La PKA también fosforila, y por tanto activa la HSL, y promueve su traslocación desde el citosol hasta la superficie de la gotícula de grasa (Miyoshi *et al.*, 2007), donde se une a la perilipina-A que, como ya se ha indicado, también ha sido fosforilada por la PKA. De esta manera, la lipólisis es máxima por la actuación conjunta de las dos lipasas. La fosforilación de la HSL se produce en las regiones diana para la PKA, que son concretamente los residuos de serina 563, 659 y 660. La fosforilación de estos residuos conlleva la activación y traslocación de esta proteína desde el citosol hasta la superficie de la gota de grasa (Anthonsen *et al.*, 1998; Holm, 2003; Su *et al.*, 2003). Una vez fosforilada y unida a la gotícula de grasa la HSL es capaz de empezar a actuar (Figura 11).



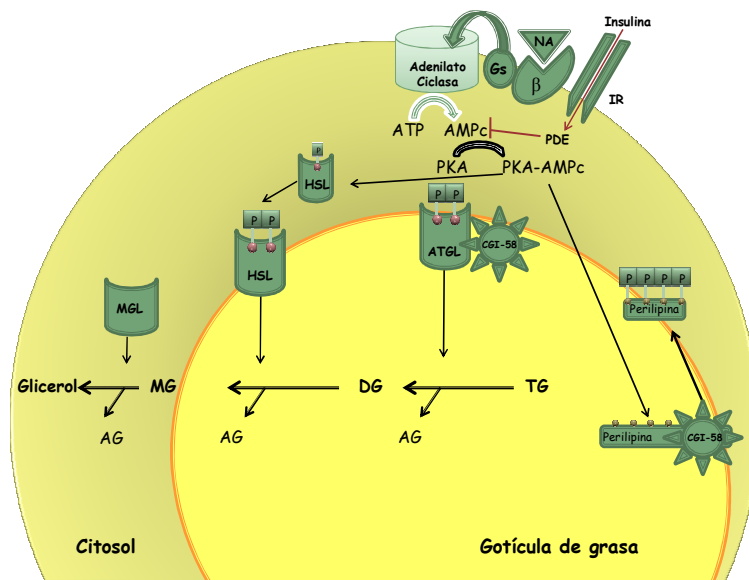
**Figura 11.** Esquema de la lipólisis en estado basal y estimulado. [Esquema de Lasa, (Lasa, 2010)]. AG (ácidos grasos), ATGL (triglicérido lipasa), CGI-58 (cofactor de ATGL), DG (diglicéridos), HSL (lipasa sensible a hormonas), MG (monoglicéridos), TG (triglicéridos).

Cuando las catecolaminas se unen a sus receptores  $\alpha_2$ , se produce la unión de la proteína Gi a la adenilato ciclasa, que reduce la concentración de AMPC e inhibe el proceso lipolítico.

La insulina es una hormona antilipolítica cuya unión a su receptor provoca la fosforilación del receptor de sustrato de insulina-1 (IRS1, *insulin receptor substrate 1*). En un siguiente paso, el fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) es fosforilado, lo cual activa la proteína quinasa B (PKT/AKT). Esto da como resultado la fosforilación del enzima

# INTRODUCCIÓN

fosfodiesterasa (PDE-3B) que degrada el AMPc hasta 5'AMP. De esta forma se produce la inhibición de las lipasas por la vía de PKA (Degerman *et al.*, 1998; Langin *et al.*, 2006). Además, la insulina también puede producir una inhibición de la lipólisis a través de una vía independiente del AMPc, que implica la fosforilación de la proteína fosfatasa-1 (PP-1, *protein phosphatase-1*), que rápidamente desfosforila y desactiva la HSL (Figura 12).



**Figura 12.** Esquema de regulación de la lipólisis. AG (ácidos grasos), AMPc (adenosina monofosfato cíclica), ATGL (triglicérido lipasa), β (receptor beta adrenérgico), CGI-58 (58ª identificación comparativa del gen), DG (diglicérido), Gs (proteína estimuladora de unión a GTP alpha), HSL (lipasa sensible a hormonas), IR (receptor de insulina), MGL (monoglicérido lipasa), NA (noradrenalina), P (fosfatos), PDE (enzima fosfodiesterasa), PKA (proteína quinasa A), TG (triglicéridos).

Entre las hormonas que estimulan la fosforilación de la PKA, y que se consideran por ello factores lipolíticos, se encuentran, además de las catecolaminas ya mencionadas, el glucagón, la hormona paratiroidea, las hormonas tiroideas (T3 y T4), la hormona estimuladora de melanocitos-α ( $\alpha$ -MSH, *melanocyte-stimulating hormone*) y la hormona adrenocorticotropa (ACTH, *adrenocorticotropic hormone*) (Thompson *et al.*, 2010).

Aunque, como ya se ha expuesto, la regulación de la HSL se produce fundamentalmente a nivel de su actividad, se cree que también puede estar sujeta a una regulación, aunque de mucha menor importancia, a nivel transcripcional. En este sentido cabe señalar que la activación del PPAR $\gamma$  estimula su transcripción en adipocitos aislados (Deng *et al.*, 2006). A diferencia de la HSL, la ATGL presenta una importante regulación hormonal a nivel transcripcional. De este modo, mientras que la insulina disminuye su expresión, los glucocorticoides la estimulan (Kershaw *et al.*, 2007). A su vez, uno de los factores de inflamación asociados a obesidad, el TNF $\alpha$ , reduce la expresión de ATGL, probablemente debido a una disminución de PPAR $\gamma$ , factor que parece primordial para la transcripción de esta lipasa (Souza *et al.*, 2002).

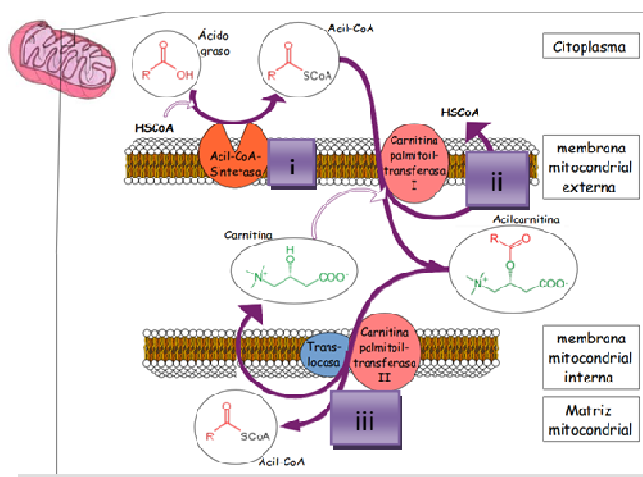
# INTRODUCCIÓN

## 3.5 $\beta$ -Oxidación de los AG

La  $\beta$ -oxidación es el principal proceso por el cual los AG son degradados para la obtención de energía en forma de ATP y poder reductor en forma de NADH y FADH<sub>2</sub> (nicotinamida adenina dinucleótido y flavín adenín dinucleótido). La  $\beta$ -oxidación tiene lugar mayoritariamente en las mitocondrias de órganos oxidativos como el hígado o músculo esquelético, y los productos se integran en varias rutas metabólicas y dan lugar a sustratos energéticos.

Los enzimas que intervienen en la oxidación de los AG en las células se localizan en la matriz mitocondrial. Los AG procedentes de la sangre penetran en el citosol de las células donde se van a oxidar, pero no pueden pasar directamente a través de las membranas mitocondriales, sino que deben sufrir tres reacciones enzimáticas previas que permitirán su transporte al interior de la mitocondria (matriz mitocondrial):

- i. En la primera reacción, se produce una **activación del ácido graso** por esterificación de éste con CoA. Esta reacción es catalizada en presencia de ATP, por la acil-CoA sintetasa localizada en la membrana externa mitocondrial que dará como producto final una molécula de acil-CoA (AG-CoA).
- ii. La segunda etapa de **transporte** al espacio intermembranal de la mitocondria tiene lugar gracias a la conjugación de los acil-CoA con un enzima transportador, carnitina *aciltransferasa-I* o *carnitina palmitoil transferasa-I* (CPT-1), que se localiza en la membrana externa mitocondrial. El proceso de entrada mediado por la CPT-1 es el paso limitante de la velocidad de la oxidación de los AG en las mitocondrias y representa el punto más importante de la regulación.
- iii. Una vez que el AG está presente en el espacio intermembranal unido a carnitina (previa escisión del CoA por la CPT-1 que lo transporta de nuevo al exterior), es transferido a la matriz mitocondrial por una reacción catalizada por el enzima CPT-2 (situada en la membrana interna mitocondrial). Gracias a la acción de una **translocasa** la carnitina es devuelta al espacio intermembranal (Figura 13).

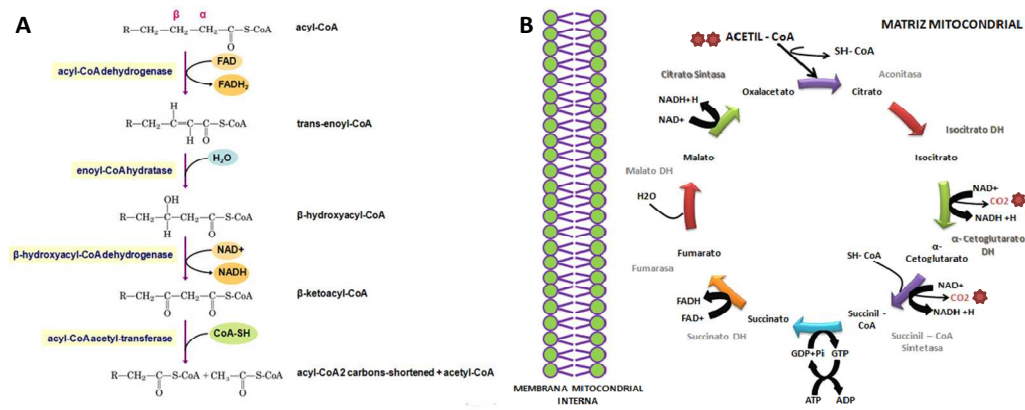


**Figura 13.** Transporte de los AG al interior de la mitocondria. Sistema lanzadera carnitina palmitoil transferasa (CPT-1). [Esquema modificado de Silva (Silva, 2002)].

# INTRODUCCIÓN

Una vez dentro de la matriz y tras su unión de nuevo a un CoA, comienza la  $\beta$ -oxidación que consiste en la degradación de éste mediante una secuencia de cuatro reacciones (oxidación por FAD- hidratación- oxidación por  $\text{NAD}^+$  y tiolísis) que se repite sucesivamente hasta la total degradación de la cadena alifática del acil-CoA. Como resultado de cada secuencia, la cadena del acil-CoA se acorta en 2 átomos de carbono y genera además  $\text{FADH}_2$  y  $\text{NADH}$ , que ingresarán posteriormente en la cadena respiratoria para la obtención de ATP, y una molécula de acetil-CoA, sustrato principal del ciclo de Krebs (Figura 14 A).

Las moléculas de acetil-CoA resultantes se incorporan al ciclo de Krebs, donde se oxidan por completo hasta  $\text{CO}_2$ . La energía liberada de la oxidación se conserva en forma de coenzimas reducidos ( $\text{NADH}$  y  $\text{FADH}_2$ ), y los intermediarios se reciclan. Esta ruta metabólica tiene lugar en la matriz mitocondrial y constituye una ruta oxidativa final común para moléculas de acetil-CoA procedentes también de aminoácidos y de la glucosa (Figura 14 B).



**Figura 14. A:** esquema de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos [esquema adaptado de Nature Education (Nature education, 2010)]. **B:** esquema del ciclo de Krebs [esquema adaptado de Arévalo (Arévalo, 2011)].

En la oxidación de los ácidos grasos insaturados, intervendrán además los enzimas epimerasa e isomerasa. En este caso particular, es importante tener en cuenta que por cada doble enlace, hay una oxidación menos, y por tanto se forma un  $\text{FADH}_2$  menos, lo cual da como resultado menor rendimiento energético.

Si bien el lugar central de la  $\beta$ -oxidación es la mitocondria, otros orgánulos como los peroxisomas contienen enzimas capaces de oxidar AG a través de una ruta similar. Puesto que los peroxisomas son compartimentos celulares presentes en animales y plantas, la oxidación de AG produce peróxido de hidrógeno, que es más tarde destruido enzimáticamente. Al igual que en la oxidación mitocondrial, los intermediarios son derivados del Co-A y el proceso consta de cuatro reacciones. La diferencia entre la  $\beta$ -oxidación en mitocondrias y peroxisomas radica en la primera reacción de este proceso. Mientras que en la mitocondria actúa la acil-CoA deshidrogenasa, en el peroxisoma participa la acil-CoA oxidasa (ACO), que introduce un doble enlace pasando los electrones directamente al  $\text{O}_2$  y produciendo peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Este compuesto

# INTRODUCCIÓN

---

oxidante y potencialmente peligroso se transforma inmediatamente en  $H_2O$  y  $O_2$  por acción de una catalasa. En los peroxisomas, la energía liberada en la primera reacción de la oxidación se disipa en forma de calor (Stryer *et al.*, 1995). Además, la oxidación que se lleva a cabo en estos orgánulos, no puede degradar por completo los ácidos grasos en unidades de acetil-CoA, por lo que serán reconducidos a la mitocondria donde finalizan su oxidación (Wanders *et al.*, 2001).

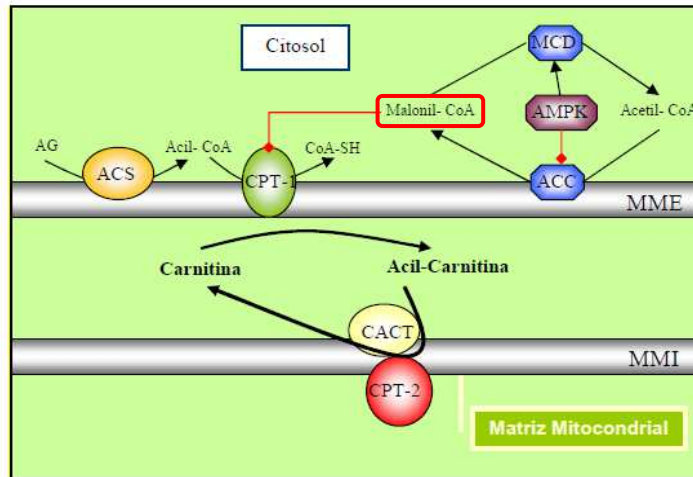
## ▣ Regulación de la $\beta$ -oxidación

En el hígado, las moléculas de acil-CoA formadas en el citoplasma pueden seguir dos caminos:  $\beta$ -oxidación en la misma mitocondria o síntesis de TG por enzimas citoplasmáticos. La vía escogida dependerá de la velocidad de transferencia de las moléculas de acil-CoA de cadena larga hacia el interior de la mitocondria. Como ya se ha mencionado, este paso limitante es catalizado por CPT-1.

El malonil-CoA, sintetizado por la ACC, es el mayor inhibidor de la CPT-1, y por tanto resulta el principal regulador de este proceso. Además, se han descrito otros mecanismos de regulación de CPT-1 independientes del malonil-CoA. Se ha sugerido, por ejemplo, que la CPT-1 puede ser regulada por fosforilación (Kerner *et al.*, 2004). En esta línea, existen estudios que proponen que la proteína quinasa 2 dependiente de  $Ca^{+2}$ /calmodulina y posiblemente la AMPK jueguen un papel central, no sólo activando la CPT-1 sino también fosforilando e inactivando la ACC, y por lo tanto, reforzando la activación de la CPT-1 mediante la bajada de los niveles de malonil-CoA (Velasco *et al.*, 1998).

En cuanto a la regulación post-transcripcional (Figura 15), la CPT-1 puede regularse tanto a nivel transcripcional como no transcripcional. En lo que respecta a la regulación transcripcional los factores de transcripción más conocidos que regulan la expresión de CPT-1, y por tanto la oxidación de AG, son los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (*peroxisome proliferator-activated receptors*; PPARs). El PPAR $\alpha$  aumenta la expresión génica de los enzimas que participan en el proceso de oxidación, como la acil-CoA deshidrogenasa, a la par que aumenta la expresión del enzima limitante CPT-1 y reprime la expresión de los genes lipogénicos. El PGC-1 $\alpha$  es un coactivador del PPAR $\alpha$  que potencia su expresión por lo que a su vez también ejerce una regulación en la expresión del gen CPT-1 (Huss *et al.*, 2004).

# INTRODUCCIÓN



**Figura 15.** Esquema de la regulación de la  $\beta$ -oxidación mediada por la concentración del malonil-CoA. [Esquema propuesto por Miranda (Miranda, 2010)]. ACC (acetil-CoA carboxilasa), ACS (acil-CoA sintetasa), AG (ácidos grasos), AMPK (proteína quinasa AMP-activada), CACT (acilcarnitina translocasa), CPT (carnitina palmitoil transferasa), MCD (malonil-CoA descarboxilasa), MME (membrana mitocondrial externa, MMI (membrana mitocondrial interna).

En cuanto a los **factores hormonales**, el glucagón induce un aumento en el ARNm de CPT-1, y la insulina antagoniza este efecto (Louet *et al.*, 2001; Huss *et al.*, 2004). En situación de restricción calórica, donde ocurre una reducción de la glucemia, se induce la secreción de glucagón, favoreciendo la oxidación de AG para la obtención de energía. A su vez, las hormonas tiroideas también inducen la transcripción del gen de CPT-1 en hígado, mediante la expresión de PGC-1 $\alpha$ , estimulando así la oxidación mitocondrial de AG (Zhang *et al.*, 2004).

## 3.6 Termogénesis

Como ya se ha mencionado previamente, la termogénesis es la capacidad de generar calor a partir de un sustrato energético ante determinados estímulos como el frío o una dieta hipercalórica. Es la función principal del TAM, si bien también es llevada a cabo en el músculo.

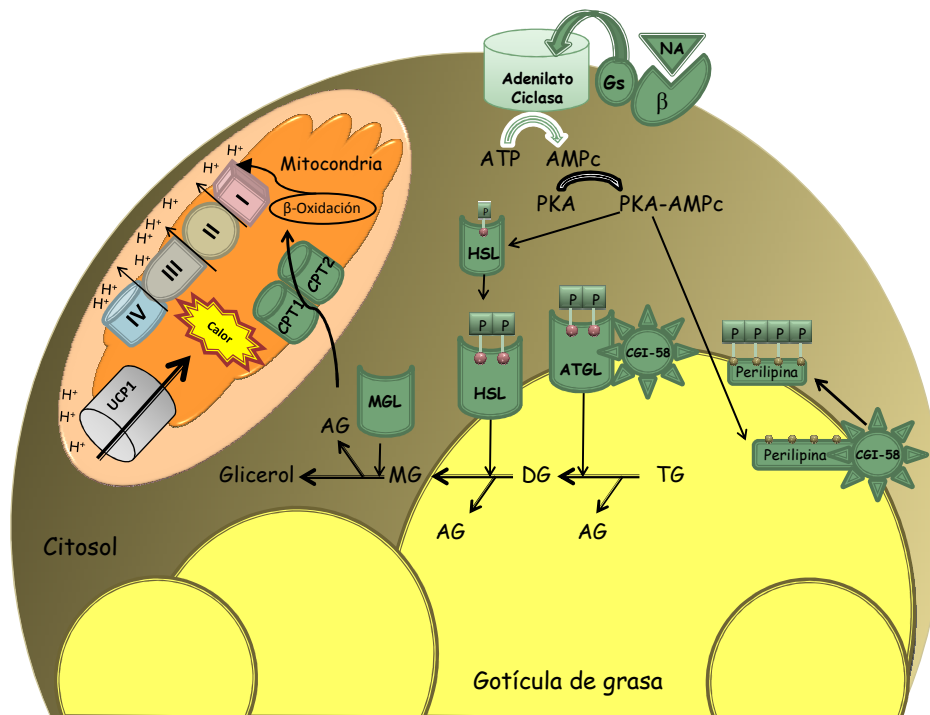
En el tejido adiposo marrón esta función termorreguladora se lleva a cabo gracias a la proteína desacoplante UCP1, localizada en la membrana interna mitocondrial y encargada, como su nombre indica, de desacoplar la energía en la cadena transportadora de electrones para disiparla en forma de calor. En el caso del músculo, son la UCP2 y la UCP3 las que llevan a cabo esta función, aunque en los años 90 se observó que este tejido también expresa algo de UCP1 (la cual era considerada específica del tejido adiposo marrón) (Nagase *et al.*, 1996). Mientras que la UCP3 se expresa principalmente en músculo esquelético, la UCP2 tiene una amplia distribución habiéndose encontrado en tejido adiposo blanco, intestino, pulmón y bazo. Sin embargo, a día de hoy, existe cierta controversia acerca de la función termogénica de estas dos proteínas.



# INTRODUCCIÓN

## ‡ Mecanismo de acción de la Termogénesis

La regulación de la termogénesis depende principalmente del Sistema Nervioso Simpático a través de la noradrenalina (NA), la cual se une a los receptores  $\beta$  del tejido adiposo marrón. La activación de la UCP1 comienza con un estímulo hormonal, bien tiroideo o de tipo insulínico, que provoca la liberación de la hormona NA desde los nervios simpáticos. Ésta interactúa con una proteína acoplada a los receptores adrenérgicos  $\beta_3$  conocida con el nombre de proteína Gs (proteína estimuladora de unión a GTP $\alpha$ ). Esta unión activa el enzima adenilato ciclasa, que cataliza la reacción de conversión de ATP en un segundo mensajero, el AMPc, e incrementa los niveles de éste. Este segundo mensajero (AMPc) activa la lipólisis y produce la liberación de ácidos grasos desde los triglicéridos activando la proteína kinasa A (PKA), efector de la señal adrenérgica. La PKA fosforila dianas específicas implicadas en la función lipolítica, en la proliferación y en la diferenciación del adipocito marrón. La actividad de la PKA está relacionada con la activación de la lipasa sensible a hormonas (HSL), que es el paso limitante del proceso de lipólisis (Carey, 1998), la inactivación de las perilipinas (proteínas asociadas a la superficie de las gotículas de grasa que evitan la acción de la ATGL sobre los triglicéridos) (Londos *et al.*, 1999) y la activación de la proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc (CREB), factor de transcripción relacionado con la expresión de la UCP1 en el TAM (Figura 16) (Nedergaard *et al.*, 2001; López, 2005).

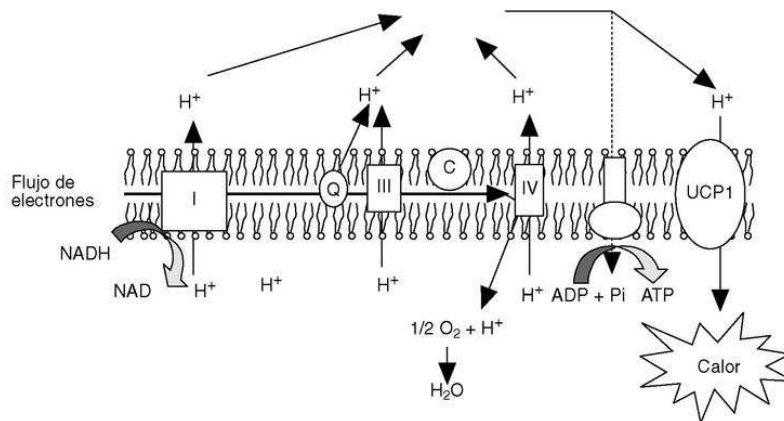


**Figura 16.** Mecanismo de activación de la termogénesis y movilización de los triglicéridos en el tejido adiposo marrón. AG (ácidos grasos), AMPc (adenosina monofosfato cíclica), ATGL (triglicérido lipasa),  $\beta$  (receptor beta adrenérgico), CGI-58 (58ª identificación comparativa del gen), DG (diglicérido), Gs (proteína estimuladora de unión a GTP alpha), HSL (lipasa sensible a hormonas), MGL (monoglicérido lipasa), NA (noradrenalina), P (fosfatos), PKA (proteína kinasa A), TG (triglicéridos).

# INTRODUCCIÓN

La noradrenalina, además de actuar sobre receptores  $\beta$ , también puede unirse a receptores  $\alpha$  ( $\alpha_{2A}$ ) activando así proteínas G inhibitorias ( $G_i$ ) que reducen la actividad de la adenilato ciclasa. Por tanto disminuyen los niveles de AMPc, y con ello la actividad PKA. Un equilibrio entre la unión a ambos receptores modulará por tanto, la actividad de la NA en el tejido adiposo marrón.

Los ácidos grasos libres son el sustrato de la termogénesis. En primer lugar, éstos son combustionados en la  $\beta$ -oxidación mitocondrial generando poder reductor en forma de NADH y  $FADH_2$ , los cuales posteriormente se dirigen a la cadena respiratoria, produciendo un gradiente de protones a lo largo de la membrana. A través de la UCP1, el flujo de protones es reconducido al interior de la membrana, desacoplando así la cadena respiratoria y reactivando la oxidación de sustratos. Este proceso lleva inherente la liberación de calor. En definitiva, y tal y como el nombre de la UCP1 indica, ésta proteína se encarga fundamentalmente de desacoplar el flujo de protones de la fosforilación oxidativa para transformar la energía en calor en lugar de en ATP (Figura 17).



**Figura 17.** Esquema del funcionamiento de la proteína UCP1 como desacoplante fisiológico de la fosforilación oxidativa respecto a la cadena respiratoria. [Esquema tomado de Villaroya (Villaroya, 2003). I, III y IV: complejos I, III y IV de la cadena respiratoria. UCP1 (proteína desacoplante 1).

## ■ Regulación de la Termogénesis

En cuanto a la regulación de la expresión génica de la UCP1, ésta es llevada a cabo por varios componentes o factores de transcripción entre los cuales cabe destacar el PGC1 $\alpha$ , el cual es un coactivador inducible por el frío y/o señales betadrenérgicas (Barbera *et al.*, 2001). La activación de este factor regula el metabolismo oxidativo incrementado de forma simultánea la función mitocondrial y la actividad transcripcional del PPAR $\gamma$ , así como en el receptor tiroideo sobre el promotor de la UCP1 (Spiegelman, 1998). La expresión de PGC-1 $\alpha$  se ve incrementada en tejidos con elevada actividad mitocondrial ante la demanda de energía, como sucede en el TAM ante un estímulo como el frío, la actividad física en el músculo y con el ayuno en hígado. El PGC-1 $\alpha$  presenta la capacidad de modular la expresión de proteínas encargadas de la biogénesis mitocondrial mediante su unión a factores de transcripción que regulan la expresión de estas proteínas.



## 4. BIOMOLÉCULAS ACTIVAS

En determinados casos, las estrategias para llevar a cabo el tratamiento de la obesidad (dieta equilibrada combinada con un patrón adecuado de actividad física) no muestran resultados tan deseables como los que de ellas se espera. Este hecho, aunado al casi inexistente tratamiento farmacológico, ha avivado el interés por la búsqueda de nuevas alternativas para combatir la obesidad. Es por ello, que en la actualidad, la comunidad científica está constantemente trabajando en la búsqueda de nuevas moléculas, que pudieran ser útiles como coadyuvantes a las estrategias anteriormente mencionadas para prevenir o tratar la obesidad.

En el campo de la nutrición, los alimentos funcionales suponen un amplio abanico de posibilidades por investigar para su utilización en la prevención y/o tratamiento de la obesidad. La definición de mayor aceptación para un alimento funcional es la emitida por la “International Life Sciences Institute in Europe” (ILSI) en el año 1999, en la cual se establece que, «un alimento puede ser funcional si se ha demostrado de manera satisfactoria que posee un efecto beneficioso sobre una o varias funciones específicas en el organismo, más allá de los efectos nutricionales habituales, siendo éste relevante para la mejoría de la salud y el bienestar y/o la reducción del riesgo de enfermar». De acuerdo con la ILSI, un alimento funcional puede ser: un alimento natural, un alimento al que se le ha agregado o eliminado un componente por alguna tecnología o biotecnología, un alimento donde la naturaleza de uno o más componentes ha sido variada, un alimento en el cual la biodisponibilidad de uno o más de sus componentes ha sido modificada o cualquier combinación de las anteriores posibilidades (Ramos *et al.*, 2008; Herrera *et al.*, 2014).

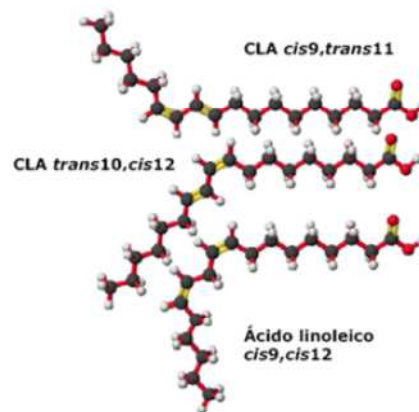
El principal objetivo que se persigue con esto, es la identificación de las interacciones beneficiosas entre un alimento determinado y una o más funciones del organismo, además de indagar en los mecanismos implicados en la interacción. Hoy en día son múltiples los estudios que indican la existencia de potenciales ventajas para la salud de componentes presentes en los alimentos de forma natural.

Los múltiples compuestos bioactivos descritos en la literatura con actividad biológica, podemos clasificarlos, a nivel general, en: péptidos biológicamente activos (obtenidos de la hidrólisis de proteínas), ácidos grasos (fundamentalmente con dobles enlaces en su estructura), compuestos fenólicos (metabolitos secundarios de las plantas), el calcio dietético (que parece ejercer un papel importante en el metabolismo lipídico) y la fibra (entendiendo como tal los carbohidratos no digeribles por el organismo y la lignina, intrínseca en las plantas intactas).

Todos estos compuestos han mostrados efectos antioxidantes, antihipertensivos o anticancerígenos, entre otros muchos. En el presente trabajo de tesis procederemos a estudiar los efectos mostrados por tres moléculas objeto de estudio, cuyo interés radica en la posibilidad de producir un efecto anti-obesidad, e incluso mejorar ciertos parámetros relacionados con enfermedades cardiovasculares y diabetes asociados a la obesidad. Estos tres compuestos son: el Ácido Linoleico Conjugado, el Resveratrol y la Quercetina.

## 4.1 Ácido Linoleico Conjugado (CLA)

El **ácido linoleico** presente mayoritariamente en diversos aceites naturales, así como en la semilla de linaza, es un ácido graso poliinsaturado de 18 átomos de carbono con dos dobles enlaces en las posiciones  $\Delta 9$  y  $\Delta 12$  (*cis*-9,*cis*-12 C18:2, n-6). Dado que se trata de un ácido graso esencial (el organismo no es capaz de sintetizarlo), ha de estar presente en la dieta. Pertenece a la familia de ácidos grasos esenciales  $\omega 6$ , necesarios para el correcto funcionamiento de nuestro organismo.



Ácido linoleico (*cis*-9, *cis*-12) e isómeros de CLA (*cis*-9, *trans*-11 y *trans*-10, *cis*-12).  
Modificada de Bauman y col., 1999.

El **ácido linoleico conjugado** (CLA, *conjugated linoleic acid*), es un término que hace referencia a un conjunto de isómeros geométricos y posicionales del ácido linoleico, con dobles enlaces conjugados y en configuración *cis* o *trans*.

El CLA fue descubierto de forma accidental en los años setenta, cuando diversos investigadores de la Universidad de Wisconsin (EEUU) estaban estudiando el posible efecto mutagénico de la carne de res. Tras la administración de un extracto de carne a ratones de experimentación, junto con la exposición de éstos a un agente mutagénico, observaron que aquéllos que habían recibido el extracto de carne mostraban una reducción del tumor de un 20%. Tras una década de investigaciones, fue en 1987 cuando el CLA fue propuesto por Ha y col. (Ha *et al.*, 1987; Liew *et al.*, 1995) como el responsable de este efecto anticarcinogénico. Desde entonces, el CLA ha sido ampliamente estudiado, no sólo por sus propiedades anticancerígenas, sino también por la capacidad que parece poseer en la mejora del riesgo cardiovascular e inflamación, así como por su capacidad de reducir la grasa corporal e incrementar la masa muscular.

### 4.1.1 Estructura e isómeros y síntesis del CLA

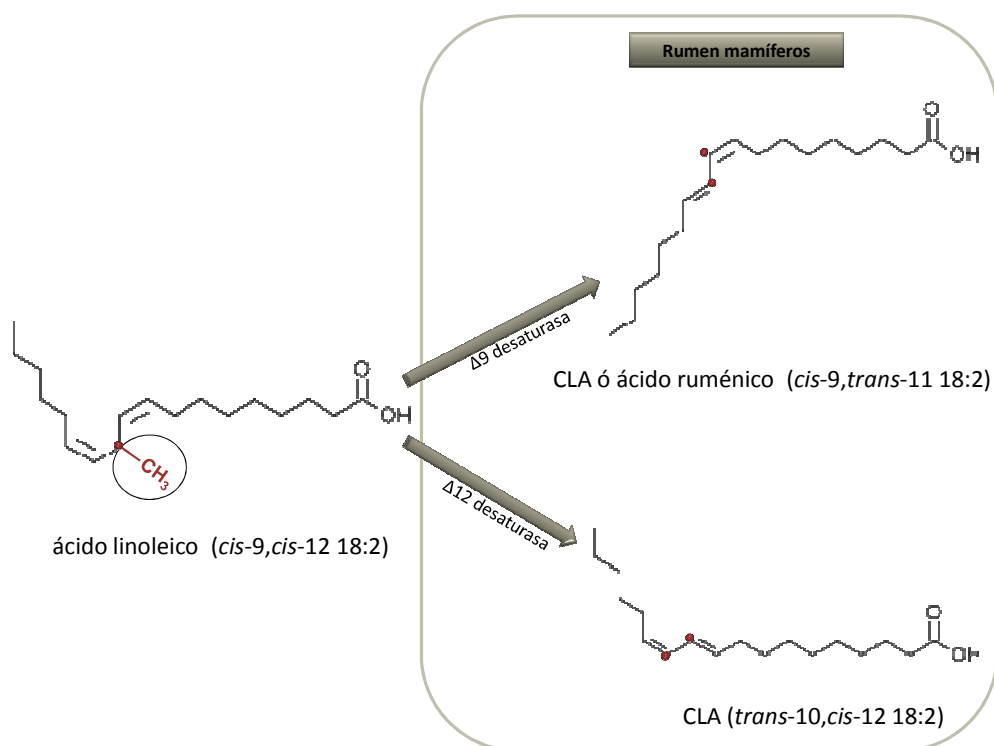
El conjunto de isómeros geométricos y posicionales conocidos como CLA, se caracterizan por tener los dobles enlaces en su posición conjugada, en lugar de tenerlos separados por un grupo metileno, como ocurre en el ácido linoleico. De esta forma, los dobles enlaces en el CLA suelen localizarse en posiciones 9 y 11, 10 y 12, 11 y 13 u 8 y 10 (Basu *et al.*, 2000).

De todos los isómeros, son dos los que han mostrado poseer un efecto beneficioso para el organismo, el *cis*-9,*trans*-11 y el *trans*-10,*cis*-12. El ácido ruménico, también conocido como ácido *cis*-9,*trans*-11 octadecadienoico, es el predominante (en más de un 75%) y se encuentra en los lácteos y la carne de rumiantes (Kramer *et al.*, 1998). Este ácido graso procede de la biohidrogenación del ácido linoleico a ácido *trans* vaccénico (*cis*-9,*trans*-11 C18:1), que tiene lugar por la acción de bacterias anaeróbicas

# INTRODUCCIÓN

como *Butyrivibrio fibrisolvens*, presentes en el rumen de rumiantes (Griinari *et al.*, 2000).

Tras su absorción, y ya en los tejidos, el ácido vaccenico puede almacenarse como tal, o convertirse en *cis-9,trans-11*, por incorporación de un doble enlace en posición 9, gracias a la acción del enzima  $\Delta 9$  desaturasa (Loor *et al.*, 2002). De forma similar, se sintetiza el otro isómero con actividad beneficiosa para el organismo, el isómero *trans-10,cis-12*. Sin embargo, en este caso, se hace necesaria una  $\Delta 12$  desaturasa no disponible en mamíferos. Por este motivo, las cantidades de este isómero presentes en los tejidos están exclusivamente determinadas por la síntesis de éste en el rumen (Pariza *et al.*, 2001) (Figura 18).



**Figura 18.** Esquema de la estructura y síntesis de CLA.

La formación de CLA también puede darse a través de la oxidación mediante radicales libres del ácido linoleico, cuando hay proteínas donadoras de hidrogeno durante el procesamiento de algunos alimentos (como la maduración y el calentamiento de los quesos y la carne, o en la hidrogenación comercial de aceites vegetales ricos en ácido linoleico) (Banni *et al.*, 1994), o mediante la síntesis química como la isomerización alcalina de aceites vegetales enriquecidos con ácido linoleico.

Como consecuencia de los efectos adversos observados en mezclas de cuatros isómeros de CLA, ricos en isómeros *trans-trans*, como el aumento de colesterol-LDL, los productores han purificado los preparados de CLA mediante manipulación de la temperatura y el tiempo de reacción, con la intención de obtener, de forma predominante los dos isómeros activos: el *cis-9,trans-11* y el *trans-10,cis-12*.

# INTRODUCCIÓN

## 4.1.2 Fuentes alimentarias de CLA

El CLA se encuentra de forma natural en los alimentos obtenidos de animales ruminantes (ganado vacuno, ovino y caprino, principalmente) y en la leche y sus derivados, donde representa el 0,65% del total de ácidos grasos (Tabla 4). Por el contrario, apenas se encuentra presente en los alimentos de origen vegetal (Stanton, 1997). Cabría mencionar que aproximadamente el 90% del CLA en los alimentos citados como fuentes primarias de CLA corresponde al isómero *cis-9,trans-11* (Larsen *et al.*, 2003). Como media, las concentraciones del CLA de la leche y sus derivados fluctúan entre 0,2 y 1,6 g/100 g de grasa, y en la carne de rumiante entre 0,3 y 0,6 mg/100 g grasa (Chin, 1992).

**Tabla 4.** Principales fuentes alimentarias con alto contenido en CLA.

Alimento	Contenido de CLA (mg/ g de grasa)	Alimento	Contenido de CLA (mg/ g de grasa)
<b>PRODUCTOS LÁCTEOS</b>		<b>PESCADOS Y MARISCOS (SIN COCINAR)</b>	
Queso Mozzarella	6,1	Gambas	0,6
Queso Cottage	5,0	Trucha	0,5
Queso Cheddar	4,9	Salmón	0,3
Queso Colby	4,5	<b>ACEITES VEGETALES</b>	
Leche homogenizada	5,5	Cártamo	0,7
Mantequilla	4,7	Canola	0,5
Nata	4,6	Girasol	0,4
Yogur entero	4,8	Oliva	0,2
Yogur descremado	1,7	Maíz	0,2
Helados	3,6		
<b>CARNES</b>		<b>AVES (SIN COCINAR)</b>	
Cordero	5,6	Pavo	2,5
Carne fresca de vacuno picada	4,3	Pollo	0,9
Vacuno: redondo	2,9		
Ternera	2,7		
Cerdo	0,6		

Información obtenida de Chin y col. (Chin *et al.*, 1992).

Un 30% del CLA contenido en la leche deriva de la producción que tiene lugar en el rumen de los animales anteriormente mencionados (Banni, 2002). La distribución de los isómeros del CLA y el contenido de éste en los alimentos están probablemente modulados por la población microbiana que se encuentra en el rumen, el cuál a su vez se encuentra condicionado por la calidad de la alimentación recibida por el animal y su

# INTRODUCCIÓN

---

contenido graso. En general, las vacas que se alimentan con suplementos de aceite de girasol, colza o soja, o que pastan libremente, tienen un mayor contenido en CLA que las que se alimentan de cereales y forraje (Kelly, 2001).

Por otro lado, el clima y la época del año también son factores influyentes. Así, está demostrado que los mayores niveles se observan entre Mayo y Septiembre, mientras que los más bajos en Marzo (MacDonald, 2000).

## 4.1.3 Ingesta media de CLA

El estudio de la ingesta de CLA en la población tiene muchas limitaciones, debido a que las bases de datos de la composición de alimentos en CLA son todavía incompletas. Los resultados de los estudios realizados hasta el momento muestran diferentes valores según el sexo, la edad, y los países de los que se disponen de datos publicados.

Los datos publicados (estimados por registro dietético), indican que la ingesta media, de adultos de ambos sexos en Estados Unidos, se sitúa en torno a los 150-200 mg/día (Ritzenthaler *et al.*, 2001), pudiéndose ver aumentada hasta 650 mg/día al consumir una dieta rica en fuentes de CLA (Park *et al.*, 1999). En Europa, en países como Alemania y Gran Bretaña, la ingesta media se sitúa en 350-430 y 400-600 mg/día respectivamente (Wahle *et al.*, 2004). En España, el estudio de la ingesta se ha realizado por dos vías. La primera son los datos del panel de consumo elaborado anualmente por la Dirección General de Alimentación del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), y la segunda, los datos de consumo alimentario recogidos de forma individual en diferentes comunidades autónomas (Estudio eVe) (Aranceta, 2000). Las dos fuentes de información coinciden en que la estimación del aporte de CLA de la dieta se sitúa en torno a 102 mg/kg peso corporal/d para el MAPA y 107 mg/kg peso corporal/d en hombres y 97,6 mg/kg peso corporal /d en mujeres en el Estudio eVe.

Debido a que las recomendaciones dietéticas aconsejan disminuir el consumo de carne roja y primar el consumo de lácteos desnatados, la presencia de CLA en la dieta actual ha disminuido. Diversas compañías ofertan suplementos dietéticos con CLA y algunos productos como Clarinol® y Tonalin® han obtenido el estatus de GRAS (Generally Recognised As Safe), de forma que se pueden usar en alimentos funcionales (Bulgarella *et al.*, 2001). Estos suplementos dietéticos proporcionan cantidades (3-4 g/d) que están muy por encima de las ingestas mencionadas anteriormente.

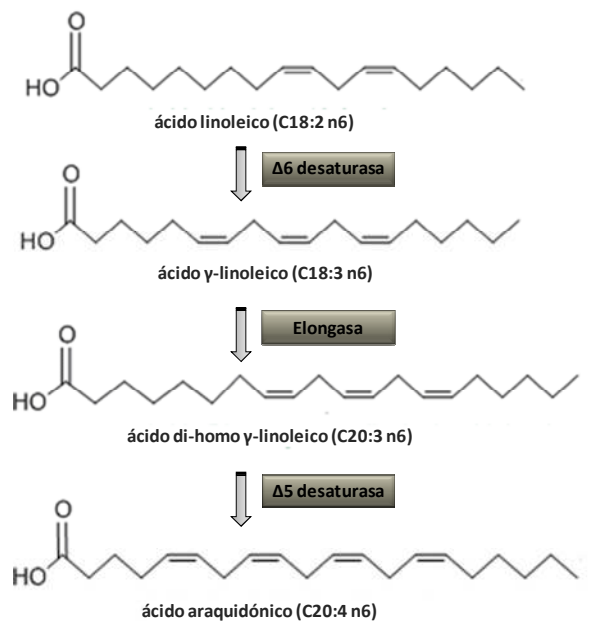
Los isómeros del CLA presentes en los preparados comerciales se encuentran como ácidos grasos libres o como triglicéridos, mientras que los provenientes de fuentes dietéticas se encuentran en su mayoría en forma de triglicéridos. Pese a las diferencias en digestión, absorción y transporte de estas dos formas que podrían influir en la actividad biológica del CLA, Ip y col. (Ip *et al.*, 1999), demostraron que los efectos del CLA no varían de manera significativa en función de que se aportaran en una u otra forma química.



# INTRODUCCIÓN

## 4.1.4 Metabolismo del CLA

Los isómeros de CLA se metabolizan en el organismo a través de distintas vías (Park *et al.*, 2005). En diversos tejidos animales, como en el tejido adiposo de humanos, se han detectado metabolitos elongados y desaturados del CLA, que mantienen la estructura química de dieno conjugado (DC). Entre ellos podemos encontrar el ácido conjugado octadecatrienoico (DC 18:3), el ácido conjugado eicosatrienoico (DC 20:3) y el ácido conjugado eicosatetraenoico (DC 20:4). Los derivados son diferentes dependiendo de la configuración de los dobles enlaces (*cis-trans*, *trans-cis* o *trans-trans*) pero el proceso metabólico resulta similar al del ácido linoleico con la diferencia estructural del dieno conjugado en el caso del CLA (Nudda *et al.*, 2005) (Figura 19).



**Figura 19.** Metabolismo del ácido linoleico.

En relación con los procesos metabólicos, es oportuno mencionar la diferencia existente entre los dos isómeros mayoritarios del CLA. El isómero *cis-9,trans-11* se metaboliza fácilmente hasta 20:4 conjugado, mientras que el *trans-10,cis-12* no es transformado de forma tan sencilla en ácido eicosatrienoico y ácido conjugado eicosatetraenoico. La resistencia a la elongación que parece presentar el DC 18:3 procedente del *trans-10,cis-12*, podría ser una de las razones que justifiquen esta diferencia (Sébédio *et al.*, 2001).

La  $\beta$ -oxidación, tanto la peroxisomal como la mitocondrial, es la principal vía de degradación de los ácidos grasos. En el caso del CLA, la oxidación mitocondrial que experimenta es inferior a la del ácido linoleico y a la del ácido palmítico, mientras que en la oxidación peroxisomal no se observan diferencias (Demizieux *et al.*, 2002). Cabe mencionar que, en los tejidos se han detectado ácidos grasos conjugados de 12, 14 y 16 átomos de carbono, que posiblemente son productos resultantes de la  $\beta$ -oxidación

## INTRODUCCIÓN

---

del CLA (Ringseis *et al.*, 2006). En cuanto a este proceso, los dos principales isómeros del CLA se comportan de forma muy dispar. Parece que, gracias al posicionamiento de sus dobles enlaces, el isómero *trans*-10,*cis*-12 se oxida de una manera más eficiente que el isómero *cis*-9,*trans*-11. Mientras que el isómero *trans*-10,*cis*-12 evita cuatro etapas enzimáticas de la  $\beta$ -oxidación potencialmente limitantes, el *cis*-9,*trans*-11 sólo evita dos (Martin *et al.*, 2002).

De igual forma que otros ácidos grasos, los isómeros del CLA pueden incorporarse a los fosfolípidos y a los triglicéridos del tejido correspondiente de los individuos que lo consumen (Sisk *et al.*, 2001). Debido a que los dobles enlaces en posición *cis* parecen aumentar las posibilidades de incorporación de un ácido graso a los fosfolípidos, existe una marcada diferencia entre la incorporación de isómeros de CLA y sus metabolitos derivados, y la del ácido linoleico y sus metabolitos. Ésto explicaría la preferencia de incorporación a fosfolípidos ( $\approx$ 50%) del ácido linoleico y sus metabolitos, y el hecho de que el CLA y sus metabolitos, con la excepción del derivado DC 20:4, muestran una mayor tendencia a incorporarse a lípidos neutros ( $\approx$ 79%), debido a su mayor número de enlaces en posición *trans* que el ácido linoleico.

No obstante, y aunque en menor medida, se ha comprobado que el CLA también se une a la fracción fosfolipídica. Así, en el año 2007 Park y col. (Park *et al.*, 2007), demostraron que los dos isómeros mayoritarios se incorporan en la misma posición de los fosfolípidos que el ácido araquidónico.

### 4.1.5 Efectos beneficiosos del CLA en obesidad y mecanismos de acción involucrados

Las primeras investigaciones acerca de las funciones biológicas del CLA y sus principales efectos sobre la salud datan del año 1980, cuando Ha y col. (Ha *et al.*, 1987) descubrieron que las mezclas de isómeros del CLA inhibían el crecimiento de células tumorales en la piel de ratones.

Este descubrimiento dió lugar a otros muchos trabajos donde se estudiaron diversos efectos del CLA, incluyendo aspectos relacionados con la pérdida de peso y grasa corporal, la ingesta dietética y energética, la composición corporal, la resistencia a la insulina, la aterosclerosis, el cáncer o el sistema inmunitario (Ha *et al.*, 1990; Miller *et al.*, 1994).

Algunos estudios como los llevados a cabo en humanos por Risérus y col. (Risérus *et al.*, 2012) mostraron un perfil plasmático inadecuado (aumento de VLDL y descenso de HDL) tras el consumo de CLA enriquecido en el isómero *trans*-10,*cis*-12, pero no con la mezcla comercial que contiene partes iguales de los dos isómeros mayoritarios. El estudio de Gaullier y col., realizado en individuos obesos, también concluyó resultados similares (Gaullier *et al.*, 2004).

Uno de los efectos más estudiados del CLA ha sido su capacidad de reducir la grasa corporal. Sin embargo, resultados que han sido prometedores en estudios con modelos animales (ratones, ratas, hámsteres y cerdos) (West *et al.*, 2000; Yamasaki *et*

## INTRODUCCIÓN

---

*al.*, 2003; Deckere *et al.*, 1999; Tischendorf *et al.*, 2002) como consecuencia del efecto reductor del tejido adiposo, no han sido tan evidentes en ensayos con humanos. Sólo alguno de estos estudios en humanos sugiere que la suplementación con CLA podría reducir la grasa corporal, siendo la reducción observada menor que la encontrada en animales y sin ningún efecto en el peso corporal (Wang y Jones, 2004).

Se han descrito diversos mecanismos mediante los cuales el CLA puede reducir la grasa corporal (Figura 20).

Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado una reducción del tamaño de los adipocitos mediada por una disminución en la expresión génica de factores de transcripción involucrados en su diferenciación, C/EBP $\alpha$  o PPAR $\gamma$ , los cuales regulan, a su vez, la expresión del transportador de glucosa GLUT4 (Ntambi, 1995; Ntambi y Young-Cheul, 2000). A su vez, se ha observado un incremento de TNF $\alpha$ , indicativo de apoptosis celular tanto en el tejido adiposo blanco como en el músculo esquelético (Tsuboyama-Kasaoka *et al.*, 2000).

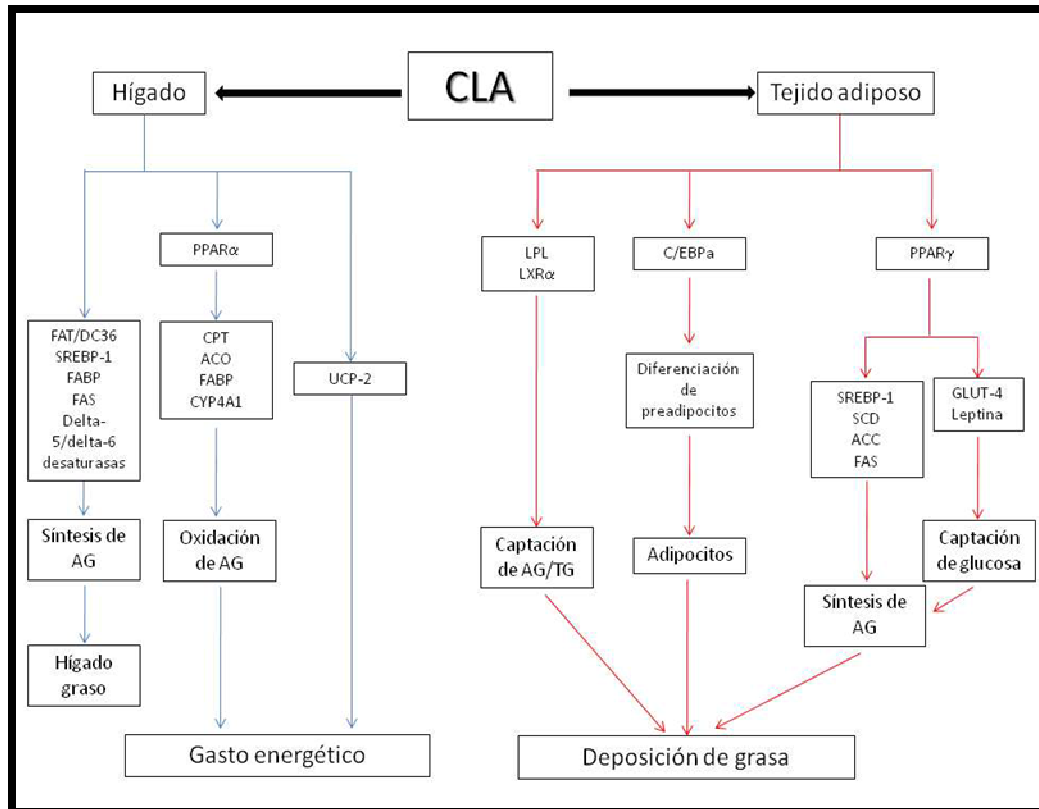
El efecto producido por el CLA que más atención ha recibido hasta el momento ha sido la inhibición de la lipogénesis *de novo* adipocitaria. Por un lado, el CLA inhibe la captación de AG procedentes de los TG del torrente sanguíneo al interior del adipocito por una inhibición del enzima encargado de este proceso, la LPL (Park *et al.*, 1997).

El CLA también inhibe la expresión de FAS y ACC, enzimas reguladores del proceso lipogénico, así como la expresión de factores de transcripción reguladores de estos enzimas, como el SREBP y PPAR $\gamma$  (Brown *et al.*, 2003; Park *et al.*, 1997; Park *et al.*, 1999).

En cuanto al proceso lipolítico, existe cierta controversia acerca de los efectos producidos por esta molécula. Algunos estudios concluyen que el CLA no modifica la lipólisis (Xu *et al.*, 2003; Simon *et al.*, 2005; Perez-Matute *et al.*, 2007), mientras que otros expresan justo lo contrario (Park *et al.*, 1997; Evans *et al.*, 2002a). Es por ello que son necesarios más estudios que ayuden a esclarecer el efecto del CLA sobre la lipólisis.

En cuanto a la  $\beta$ -oxidación de AG, el CLA promueve esta actividad tanto en hígado como en músculo esquelético (West *et al.*, 1998; Azain *et al.*, 2000; Ohnuki *et al.*, 2001), efecto mediado por un incremento en la actividad de CPT-1, enzima limitante de la oxidación mitocondrial (Evans *et al.*, 2002b; Macarulla *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2000). Por otro lado, en el caso de hígado, también incrementa la expresión de ACO, enzima limitante de la oxidación peroxisomal.

# INTRODUCCIÓN



**Figura 20.** Esquema de los mecanismos anti-obesidad propuestos para el CLA en hígado y tejido adiposo. Las flechas azules indican estimulación y las flechas rojas indican inhibición. [Esquema propuesto por Wanj y Jones (Wang y Jones, 2004)].

## 4.1.6 Efectos adversos y seguridad del CLA

Es importante señalar que el CLA puede producir determinados efectos adversos, tanto en los animales como en el ser humano. La potencial toxicidad del CLA ha sido estudiada en varios modelos animales. Así, O'Hagan y Menzel (O'Hagan *et al.*, 2003) realizaron un estudio de toxicidad crónica (90 días) en ratas, en el que una mezcla de CLA (a una dosis de 15% de la dieta) producía una hipertrofia hepática reversible y un aumento de la insulina sanguínea, sin que se produjeran cambios en la glucemia. Dosis más bajas, sin embargo, no produjeron efectos tóxicos. En este mismo estudio se realizó una batería de determinaciones de genotoxicidad *in vitro*, típicamente utilizadas en estudios de seguridad de ingredientes alimentarios, que dió como resultado una concentración sin efectos adversos para ratas macho y hembra de 2455 mg/kg/día y 2728 mg/kg/día, respectivamente.

Berven y col. realizaron un estudio clínico en humanos obesos, en el que la dosis diaria utilizada (3,4 g de CLA) durante 12 semanas resultó ser segura bajo sus condiciones experimentales (Berven y Crouch, 2000).

Las principales áreas de inquietud con respecto a la seguridad en humanos se focalizan en el metabolismo de la glucosa/insulina y la función hepática, debido a las alteraciones adversas observadas en algunos estudios animales. Se sabe que el ratón

## INTRODUCCIÓN

---

puede desarrollar resistencia a la insulina, lipodistrofia y esteatosis hepática, en función de la dosis de CLA administrada, particularmente con el isómero *trans*-10,*cis*-12 (Tsuboyama-Kasaoka *et al.*, 2000; Clement *et al.*, 2002). La gran reducción de grasa producida por el CLA en el tejido adiposo (lipodistrofia) provoca una movilización de ésta que es reconducida a otros órganos, como el hígado, como mecanismo compensatorio para ser almacenada u oxidada. Esta acumulación ectópica de grasa en tejidos oxidativos produce resistencia a la insulina.

Afortunadamente, parece que este efecto negativo sólo se da en ratones debido a que es una especie altamente reactiva al CLA. Estudios llevados a cabo en otras especies como la rata o el hámster no han puesto de manifiesto este efecto negativo (Ryder *et al.*, 2001; Houseknecht *et al.*, 1998).

No obstante, en 2010 la *European Food Safety Authority* (EFSA) puso de manifiesto que en humanos con normopeso o sobrepeso, y sin antecedentes de diabetes, la administración de una mezcla equimolecular de los isómeros *cis*-9,*trans*-11 y *trans*-10,*cis*-12 del CLA a una dosis de 3,5 g durante 6 meses no producía efectos adversos a niveles de sensibilidad a la insulina y control glucémico o función hepática. Más recientemente (Enero de 2015), y tras el último análisis realizado por el panel de expertos de la EFSA, se ha emitido un informe desfavorable acerca de la utilización de una mezcla equimolar de CLA comercializada con los nombres de Tonalín® y Clarinol®. Se ha concluido que no es posible hacer una asociación positiva beneficiosa entre los suplementos con CLA y la salud de la población consumidora de éstos, puesto que se ha constatado que su efecto reductor de la grasa corporal va acompañado de un aumento de peroxidación lipídica e inflamación.

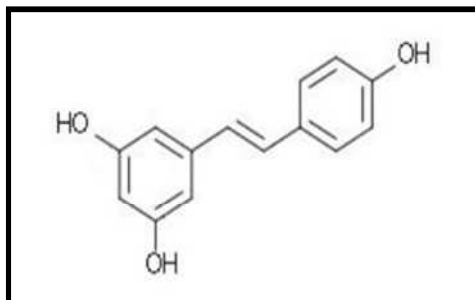
En resumen, los estudios acerca de la seguridad del consumo de CLA en humanos son todavía insuficientes, y sería necesario profundizar en esta investigación para evidenciar la ingesta segura de esta molécula.

# INTRODUCCIÓN

## 4.2 Resveratrol

El **resveratrol** (3,4',5-trihidroxiestilbeno), es un compuesto fenólico que se encuentra en la uva y las bebidas derivadas de ella (vino, mosto), en frutas tipo baya y algunos frutos secos como cacahuets y pistachos (Burns *et al.*, 2002).

Fue descrito por primera vez en diversos estudios epidemiológicos que mostraron la existencia de una correlación negativa entre el consumo de vino y la evidencia de patología cardiovascular (Wu *et al.*, 2001; Delmas *et al.*, 2005; Lekakis *et al.*, 2005).



**Trans-resveratrol**  
**3,4',5-trihidroxiestilbeno**

Hasta la fecha, existen numerosas publicaciones que describen múltiples efectos beneficiosos del resveratrol, tales como, efecto antioxidante, antiinflamatorio, antiagregante plaquetario, vasodilatador, hipolipemiante, anticarcinogénico, neuroprotector, antiosteoporótico y estrogénico (Svajger *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2012; Svajger *et al.*, 2012; Gescher *et al.*, 2013; Marchal *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2013; Kulkarni *et al.*, 2014). Más recientemente, el resveratrol ha sido estudiado como posible agente terapéutico para la prevención y posible tratamiento de la obesidad y patologías asociadas tales como la resistencia a la insulina y la diabetes. Diferentes autores han descrito diversos mecanismos de acción para este polifenol: reducción de la adipogénesis, inducción de apoptosis, inhibición de lipogénesis, incremento de lipólisis y oxidación de ácidos grasos, así como cierta actividad termogénica. Sin embargo, todos estos estudios han sido llevados a cabo en modelos animales y los efectos observados en humanos han sido escasos (Macarulla *et al.*, 2009a; Aguirre *et al.*, 2014a).

El *trans*-resveratrol fue primeramente identificado en el año 1940 en la raíz del eléboro blanco (*Veratrum Grandiflorum*) por Takaoka, quien logró su aislamiento (Takaoka, 1940). Posteriormente, en el año 1963, se aisló de raíces secas de *Polygonum Cuspidatum*, planta que previamente ya había sido utilizada en la medicina tradicional China para tratar cierta variedad de dolencias, especialmente de tipo infeccioso e inflamatorio (Nonomura *et al.*, 1963). En el año 1976, Langcake y Price descubrieron la presencia de resveratrol en la vid (*Vitis vinifera*). Estos autores observaron que el compuesto se sintetizaba de forma natural en la planta en respuesta al estrés, daños físicos, radiación ultravioleta e infecciones fúngicas (Langcake *et al.*, 1977). Más adelante, se demostró que la producción de este polifenol aumenta tanto por el estrés biótico, como por el abiótico y bajo la exposición al ozono (González-Barrio *et al.*, 2006). Por tanto, el resveratrol se asocia a un mecanismo de defensa y/o resistencia en plantas ante condiciones adversas, y es por ello que se clasifica dentro de un grupo de sustancias químicas de carácter antimicrobiano conocidas con el nombre de fitoalexinas (Abellán, 2009).

Sin embargo, el primer gran interés por este compuesto se produjo cuando en 1992, el resveratrol fue postulado como el responsable del efecto cardioprotector del vino tinto, y

# INTRODUCCIÓN

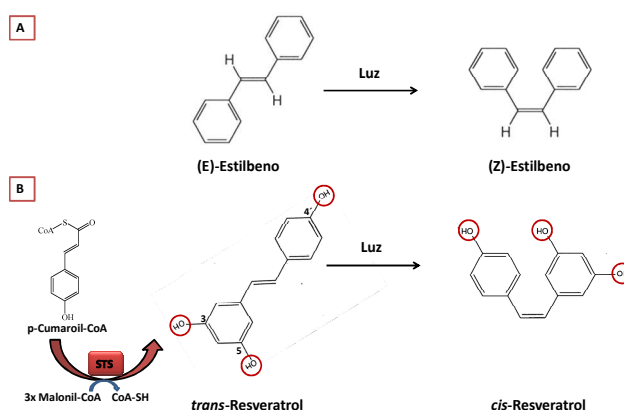
con esto, un factor importante explicativo de la conocida “Paradoja Francesa”, basada en una menor tasa de enfermedad cardiovascular entre la población francesa, a pesar de su dieta alta en grasa saturada, que podría ser justificada por su alto consumo de vino tinto (Siemann, 1992; Liu *et al.*, 2007). A partir de este momento hasta el día de hoy, numerosos han sido los estudios llevados a cabo con el resveratrol y sus efectos positivos sobre la salud.

## 4.2.1 Estructura y síntesis del resveratrol

El resveratrol pertenece al grupo de polifenoles no flavonoides que contienen una estructura base de estilbeno, compuesto por dos anillos aromáticos unidos mediante un puente vinílico que da lugar a dos formas isoméricas *trans*-1,2-difeniletileno (*E*-estilbeno) y *cis*-1,2-difeniletileno (*Z*-estilbeno), siendo la isoforma *cis* más inestable por su impedimento estérico y su menor punto de fusión. Atendiendo tanto al número y posición de hidroxilos y otros radicales que se unan al estilbeno, como la fusión de éstas entre sí, se originarán múltiples estructuras que formarán parte del grupo de estilbenoides. (Figura 21A)

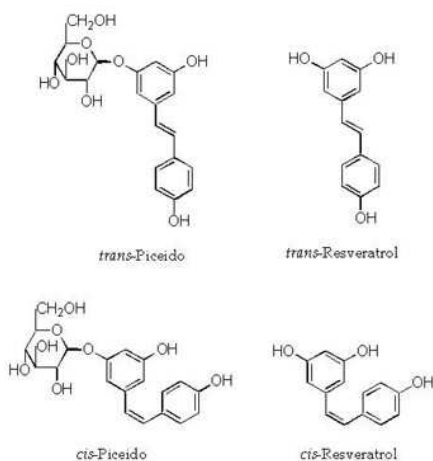
La síntesis del resveratrol se lleva a cabo por la acción del enzima estilbeno sintasa que cataliza la reacción final de una concatenación de uniones de tres moléculas de malonil-CoA a una de *p*-cumaroil-CoA. Esta síntesis da lugar a una molécula formada por la estructura básica de los estilbenos unida a tres grupos hidroxilo en las posiciones 3,4' y 5, y por ello el resveratrol recibe el nombre de 3,4',5-trihidroxiestilbeno. (Figura 21B).

El resveratrol está presente en la naturaleza tanto en la forma *cis* como *trans*. La forma *cis*, que es menos activa y más inestable, puede formarse a partir de la forma *trans* por la acción de la luz ultravioleta (Orallo, 2006; Campos-Toimil *et al.*, 2007). Por otro lado, es muy frecuente encontrar el resveratrol unido a moléculas de glucosa que forman glucósidos que reciben el nombre de piceidos y cuyos efectos también han sido estudiados (Figura 22).



**Figura 21. A.** Estructura del *trans*-1,2-difeniletileno ((*E*)-estilbeno (izquierda)) y del *cis*-1,2-difeniletileno ((*Z*)-estilbeno (derecha)). **B.** Síntesis del resveratrol (3,4',5-trihidroxiestilbeno) y estructura del *trans*-resveratrol (izquierda) y del *cis*-resveratrol (derecha).

# INTRODUCCIÓN



**Figura 22.** Estructura del *trans* y *cis*-resveratrol y sus derivados glucosilados denominados piceidos.

## 4.2.2 Fuentes alimentarias e ingesta media de resveratrol

Como ya se ha mencionado previamente, el resveratrol se encuentra presente en la naturaleza en alimentos como la uva y bebidas derivadas (vino tinto principalmente), los arándanos rojos, la soja, determinados frutos secos y el chocolate. A continuación, se detallan las fuentes alimentarias con mayor contenido en resveratrol (Tabla 5).

Tal y como puede observarse en la tabla siguiente, los alimentos con mayor contenido en resveratrol son el vino tinto, el arándano rojo, seguido del arándano europeo y la grosella, las fresas y algunos frutos secos como el pistacho. Además, mientras que en la uva por ejemplo el resveratrol se encuentra en su forma glucosilada, el vino resulta fuente principal de resveratrol libre.




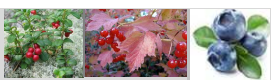
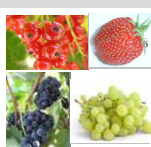



Otro factor a considerar es que no todos los vinos poseen la misma cantidad de resveratrol. La variedad de uva, la región geográfica, el tipo de suelo, el grado de maduración, las condiciones climáticas y la exposición a agentes patógenos producen una enorme variabilidad en la cantidad final de resveratrol presente en el vino. Así, se ha observado que puede haber una oscilación desde cantidades indetectables de resveratrol, hasta 15 mg/L de vino (Frémont, 2000), mientras que en el caso de la uva, la estimación ronda los 92 mg /kg de piel seca de resveratrol (Heber, 2004).

Teniendo en cuenta que el resveratrol está presente en la piel, semillas, peciolo y partes leñosas de la uva, la concentración de este polifenol también se verá modificada en función del proceso de elaboración del vino y el tipo de fermentación. Así, el contenido de resveratrol en los distintos tipos de vino sigue el siguiente orden: vino tinto > vino rosado > vino blanco, puesto que durante su elaboración, el tiempo de contacto con las partes leñosas es mayor en el vino tinto que en el blanco (Brehm *et al.*, 1999; Preisig-Müller *et al.*, 1999; Gambini *et al.*, 2013).



# INTRODUCCIÓN

**Tabla 5.** Principales fuentes alimentarias con alto contenido en resveratrol.

Grupo de alimentos	Variedad de alimento	Contenido medio de resveratrol (líquidos: mg/100 mL) (sólidos: mg/100 g PC)	Imágen del alimento
Bebidas alcohólicas: Vinos procedentes de distintas variedades de uva	Vino de variedad de uva		
	Muscadine	3,02	
	Vino tinto	0,25-0,27	
	Vino rosado	0,12	
	Vino blanco	0,01-0,04	
	Vino espumoso ( <i>Champagne</i> )	0,009	
Bebidas no alcohólicas: Zumos	Zumo de uva verde	0,005	
Cacao	Chocolate negro	0,04	
Frutos: Arándanos	Arándano rojo	3,00	
	Arándano rojo agrío o palustre	1,92	
	Arándano azul o mirtilo	0,67	
Otros/as frutos/as	Grosella roja	1,57	
	Fresa	0,35	
	Uva negra	0,15	
	Uva verde	0,02	
Frutos secos	Pistacho	0,11	
	Cacahuete	0,08	
Aceites	Crema de cacahuete	0,04	
Aderezos	Vinagre	0,005	

Valores tomados de una base de datos que detalla el contenido en polifenoles en los distintos alimentos y las fuentes bibliográficas de las cuales obtienen estos datos. (Neveu *et al.*, 2010; [www.phenolexplorer.es](http://www.phenolexplorer.es)) PC (porción comestible).

Los factores más importantes a tener en cuenta a la hora de establecer la contribución de las distintas fuentes de resveratrol a la ingesta diaria de la población son la cantidad y la frecuencia en que estos alimentos se incluyen de forma habitual en la dieta.

En un estudio llevado a cabo por Levi y col. utilizando datos de consumo recogidos durante los años 1993 a 2003 en el cantón de Vaud de Suiza, la ingesta media de resveratrol obtenida a través del consumo de uva y vino se estimó en 72,5-126,4  $\mu\text{g}/\text{día}$  y 0,1-176,8  $\mu\text{g}/\text{día}$ , para cada alimento respectivamente (Levi *et al.*, 2005).

En España, el *Estudio de Investigación Prospectiva Europea de Cáncer y Nutrición* (EPIC), realizado por Zamora-Ros y col. en 2008 (Zamora *et al.*, 2008), analizó por primera vez el consumo de resveratrol y piceidos, así como las principales fuentes dietéticas de los mismos, en la población adulta española. En cuanto al consumo de resveratrol, se concluyó que el 32% de ésta no consume habitualmente alimentos ricos

# INTRODUCCIÓN

---

en resveratrol, y de los que sí lo hacen, el vino tinto es la fuente principal de ingesta de este polifenol. A él le siguen la uva, junto con los zumos de uva, y los cacahuetes, pistachos y arándanos, que aportan unas cantidades muy inferiores (menos del 0,01% de la ingesta total). La mediana de las cantidades ingeridas de resveratrol, el cuál tan sólo supone un 21% del total de polifenoles contenidos en el vino, se estimó en un valor inferior a 31 µg/d (Zamora-Ros *et al.*, 2008), cuyas fuentes principales de ingesta fueron el vino (29 µg/d) y las uvas (0,5 µg/d).

Las discrepancias encontradas entre ambos estudios pueden ser debidas por un lado, a la base de datos utilizada para calcular la composición nutricional de los alimentos o bien a las diferencias existentes en los patrones dietéticos de cada país y/o grupo poblacional.

No obstante, dado el bajo contenido de resveratrol presente en fuentes naturales, se han diseñado determinados suplementos dietéticos (nutraceúticos) que presentan contenidos mayores de resveratrol que oscilan entre 1 y 8 g de resveratrol /gragea, comprimido o cápsula. A su vez, hoy en día y mediante el empleo de técnicas de ingeniería genética también es posible producir cantidades mayores de resveratrol, ya que el gen que codifica la resveratrol sintetasa ha sido aislado, clonado e insertado en plantas de cereal (como el trigo, arroz...), en tomates, alfalfa y tabaco (Serazetdinova *et al.*, 2005). Por otro lado, el tratamiento post-cosecha de la uva con luz UVA, provoca un estrés en la planta que hace que en respuesta a dicho daño se induzca la síntesis de resveratrol. Esta misma tecnología se está aplicando actualmente a uvas de mesa y procesos de vinificación para obtener nuevas “frutas funcionales” y vinos enriquecidos con resveratrol (Cantos *et al.*, 2000; Cantos *et al.*, 2001; Cantos *et al.*, 2002; Cantos *et al.*, 2003).

#### 4.2.3 Procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción del resveratrol

De forma general, el resveratrol administrado de forma oral es rápidamente absorbido en las microvellosidades del intestino delgado, obteniéndose un pico de concentración máximo a los treinta minutos tras la ingesta (Marier *et al.*, 2002). Se transporta principalmente unido a la albúmina y es metabolizado tanto en el propio intestino como en el hígado, dando lugar a metabolitos hidrofílicos que serán posteriormente eliminados del organismo por la orina.

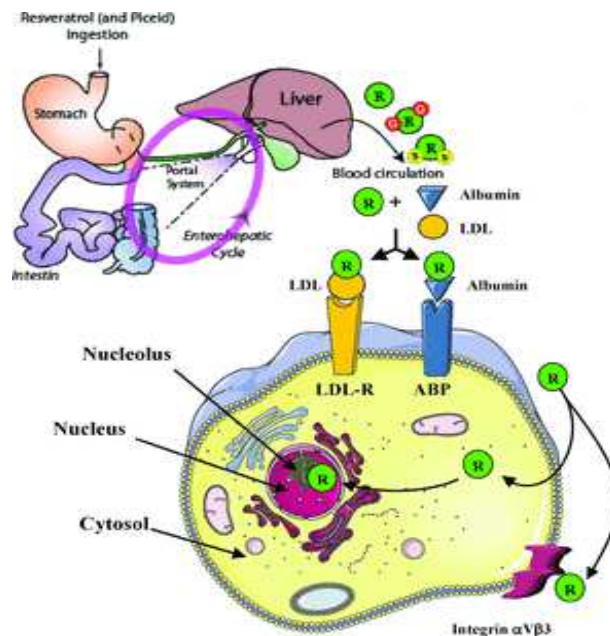
Sin embargo, pese a que la absorción del resveratrol es elevada, la actividad de éste en el organismo se ve disminuida por una baja biodisponibilidad de la molécula en su forma libre. Ésto es debido en gran parte a la rápida formación de moléculas derivadas del resveratrol o metabolitos a lo largo de todos estos procesos.

#### ▣ Absorción y transporte de resveratrol

La absorción del resveratrol es un proceso que ha sido ampliamente estudiado. Dado el carácter lipofílico del resveratrol, su absorción a nivel intestinal tiene lugar por difusión pasiva, aunque también puede formar complejos con transportadores de membranas, como las integrinas. Una vez en la sangre, el resveratrol en su forma libre

# INTRODUCCIÓN

puede ser transportado unido a la albúmina y a lipoproteínas como la LDL (lipoproteínas de baja densidad). Estos complejos pueden ser disociados en membranas celulares que dispongan de receptores para la albúmina y la LDL, dejando libre el resveratrol y permitiendo que éste penetre en las células (Figura 23). De este modo, la afinidad del resveratrol por la albúmina juega un papel importante en su distribución y biodisponibilidad (Delmas *et al.*, 2011; Gambini *et al.*, 2013).



**Figura 23.** Esquema de la absorción y transporte del resveratrol desde la circulación sanguínea a las células diana. [Esquema tomado de Delmas y col.(Delmas *et al.*, 2011)]. A (albumina), ABP (proteína de unión a la albúmina), G (glucuronado), R (resveratrol), S (sulfatado).

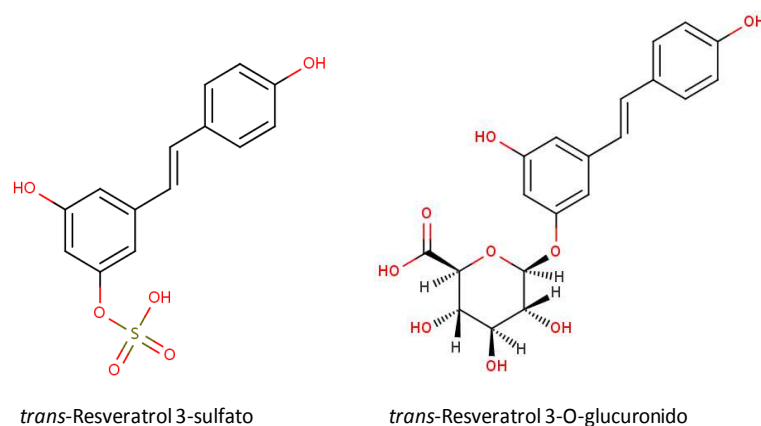
Estudios de cinética han demostrado que entre el 50 y 70% del resveratrol ingerido se absorbe rápidamente (Marier *et al.*, 2002; Walle *et al.*, 2004). Respecto a su distribución en los tejidos, cabe destacar que los principales tejidos diana de este polifenol (además de las células epiteliales del intestino) son los riñones, el hígado y los pulmones (Bertelli *et al.*, 1998). En menor cantidad se puede localizar también en el bazo, corazón, cerebro, testículos, músculo y tejido adiposo (Asensi *et al.*, 2002; Vitrac *et al.*, 2003). Además, el resveratrol se caracteriza por su capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica y poder ejercer sus efectos protectores a nivel del Sistema Nervioso Central (Wang *et al.*, 2002) (Figura 25).

## ⚔ Metabolismo del resveratrol

La formación de metabolitos de resveratrol tiene lugar tanto a nivel intestinal (dentro del enterocito) como hepático. En ellos el resveratrol es sometido a un metabolismo de Fase II mediante conjugaciones llevadas a cabo por enzimas UDP-glucuronosil-transferasas, que sintetizan glucurónidos de resveratrol como primer proceso metabólico. Se ha propuesto que, ante un aumento de niveles de resveratrol en el organismo, se producen reacciones de sulfatación mediante sulfoniltransferasas

# INTRODUCCIÓN

generándose así también conjugados de sulfato (Jannin *et al.*, 2004), y siendo por tanto los metabolitos más abundantes, el *trans*-resveratrol-3-O-glucuronido y el *trans*-resveratrol-3-sulfato (Wenzel *et al.*, 2005a; Yu *et al.*, 2012) (Figura 24). Estos metabolitos, que son los que se encuentran principalmente en plasma, han demostrado poseer su propia capacidad de inducir efectos a nivel fisiológico, si bien hay que tener en cuenta que su formación puede variar de unas especies a otras (Menet *et al.*, 2014).



**Figura 24.** Principales metabolitos del *trans*-resveratrol.

Parte de los metabolitos formados en hígado, de nuevo serán secretados al intestino vía biliar, donde se desconjugarán para ser reabsorbidos (ciclo enterohepático), o continuarán su paso hacia el colon. A su vez, la flora intestinal del colon, hidrogena un doble enlace de la estructura del resveratrol formando dihidroresveratrol, el cual también puede ser reabsorbido y metabolizado de nuevo, generando formas sulfatadas y glucuronadas. Un dato destacable es que, tras una administración oral de resveratrol, pese a que la cantidad libre en plasma y suero sea inferior al 2%, incluso llegando a ser no detectable, a las 6 horas tras su consumo aparece un pico plasmático que sugiere una recirculación entérica de los metabolitos conjugados, con la consecuente reabsorción tras una hidrólisis intestinal (Soleas *et al.*, 2001; Meng *et al.*, 2004; Walle *et al.*, 2004) (Figura 25).

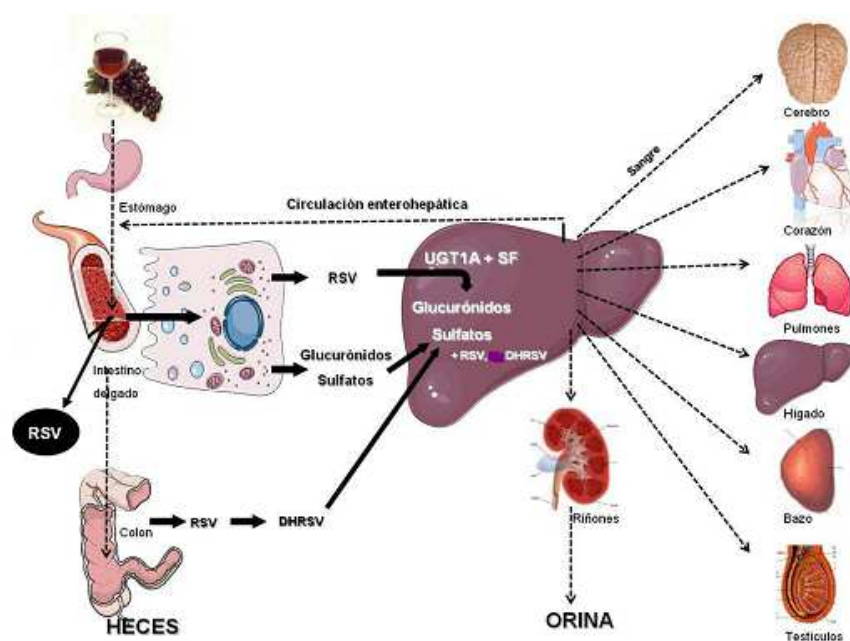
## ✦ Excreción del resveratrol

La eliminación del resveratrol, así como la de sus metabolitos, se realiza principalmente por vía urinaria (53-85%). Se han detectado diversas formas moleculares de resveratrol y sus metabolitos en orina, entre los cuales abundan en mayor medida las formas glucuronadas, seguidas de las sulfatadas y por último la forma no glucosilada.

Parte del resveratrol no metabolizado por las bacterias del colon aparece en las heces, en un rango de porcentaje que varía desde un 0.3% hasta un 38% de la ingesta dietética del humano (Walle, 2011).

# INTRODUCCIÓN

La vida media del resveratrol y de sus metabolitos en plasma oscila entre las 4 y las 8 horas en función del metabolito y de la matriz alimentaria o el vehículo en el que se transporta (Marier *et al.*, 2002; Boocock *et al.*, 2007).



**Figura 25.** Esquema de la absorción, metabolismo, distribución y excreción del resveratrol procedente de la dieta. [Esquema propuesto por Lasa (Lasa, 2010)]. DHRSV (dihidroresveratrol), R (resveratrol), SF (sulfoniltransferasas), UGT1A (UDP glucuronosil transferasa 1A).

## 4.2.4 Biodisponibilidad del resveratrol

El hecho de que tanto el resveratrol como otros polifenoles presenten una baja biodisponibilidad, ha generado y sigue generando una gran preocupación, puesto que muchos de los efectos beneficiosos para la salud observados en células pueden no ser extrapolables a modelos animales y/o humanos. No obstante, a pesar de su baja biodisponibilidad (38% tras una administración oral) (Marier *et al.*, 2002), el resveratrol ha mostrado una eficacia *in vivo* que sugiere que, pese a todo, llega a los órganos diana y ejerce unas determinadas funciones. Ésto puede deberse a una actividad intrínseca de los propios metabolitos del resveratrol que dan lugar a un efecto en las células del tejido con el que interactúan, o a la desconjugación del resveratrol mediada por la microflora bacteriana que lo convierte en molécula libre reabsorbible y disponible para las células diana. También podría suceder, que una vez alcanzadas las células correspondientes, los metabolitos se transformasen en su forma libre activa (Wenzel *et al.*, 2005a; Wenzel *et al.*, 2005b).

Varias han sido las estrategias seguidas para aumentar la biodisponibilidad del resveratrol en humanos. El incremento de la dosis ha sido examinado en algunos estudios que concluyen que dosis altas durante largos periodos de tratamiento podrían saturar el metabolismo de esta molécula, alcanzándose concentraciones mayores de resveratrol en plasma, y por tanto, en los tejidos, aunque otros estudios

# INTRODUCCIÓN

---

indican que con el tiempo puede producirse una tolerancia a la asimilación del resveratrol (Walle, 2011). Otro aspecto a tener en cuenta es que, en el hígado y tejido duodenal, otros flavonoides dietéticos, como la quercetina, podrían inhibir el metabolismo de fase II mediante una inhibición competitiva, reduciendo así la sulfatación y glucuronidación del resveratrol e incrementando por tanto su biodisponibilidad (Wenzel *et al.*, 2005b). Estudios *in vitro* han demostrado este hecho, observándose la inhibición de la formación de estos metabolitos en hepatocitos y células duodenales, inducida por la coadministración de resveratrol con quercetina. Sin embargo, los estudios *in vivo* aún no muestran resultados claros, por lo que la combinación de biomoléculas continúa siendo una estrategia que se abre camino en la investigación en este campo (De Santi *et al.*, 2000; Soleas *et al.*, 2001; Goldberg *et al.*, 2003).

## 4.2.5 Efectos beneficiosos del resveratrol en obesidad y mecanismos de acción involucrados

Como ya se ha comentado en la introducción de este apartado, la mayor parte de los efectos descritos para el resveratrol son de tipo anti-oxidante, anti-inflamatorio, estrogénico y anti-cancerígeno. Sin embargo, ya son numerosas las investigaciones que atribuyen al resveratrol una capacidad anti-obesogénica, siendo éste polifenol capaz de actuar en el tejido adiposo (entre otros tejidos) para reducir la grasa corporal.

Se ha sugerido que el resveratrol podría mimetizar la restricción calórica actuando sobre el conjunto de procesos metabólicos que la controlan. Estos procesos son regulados por Sir2, gen conocido por su capacidad de promover la longevidad en levaduras y que se caracteriza por codificar una gran familia de proteínas conocidas con el nombre de sirtrinas. Las sirtrinas regulan diversas reacciones del metabolismo lipídico por medio de desacetilaciones NAD<sup>+</sup>-dependientes de determinados factores de transcripción. De entre todas las sirtrinas descritas en mamíferos, cuya función es la regulación del metabolismo y la longevidad, cabe destacar la sirtrina 1 (SIRT1) por ser una de las más estudiadas.

Entre todos los mecanismos propuestos para explicar el efecto anti-obesidad del resveratrol existe un consenso general en cuanto a la activación que este polifenol produce sobre SIRT1 (Howitz *et al.*, 2003; Picard *et al.*, 2004; Lagouge *et al.*, 2006; Jiang, 2008; Cantó *et al.*, 2009).

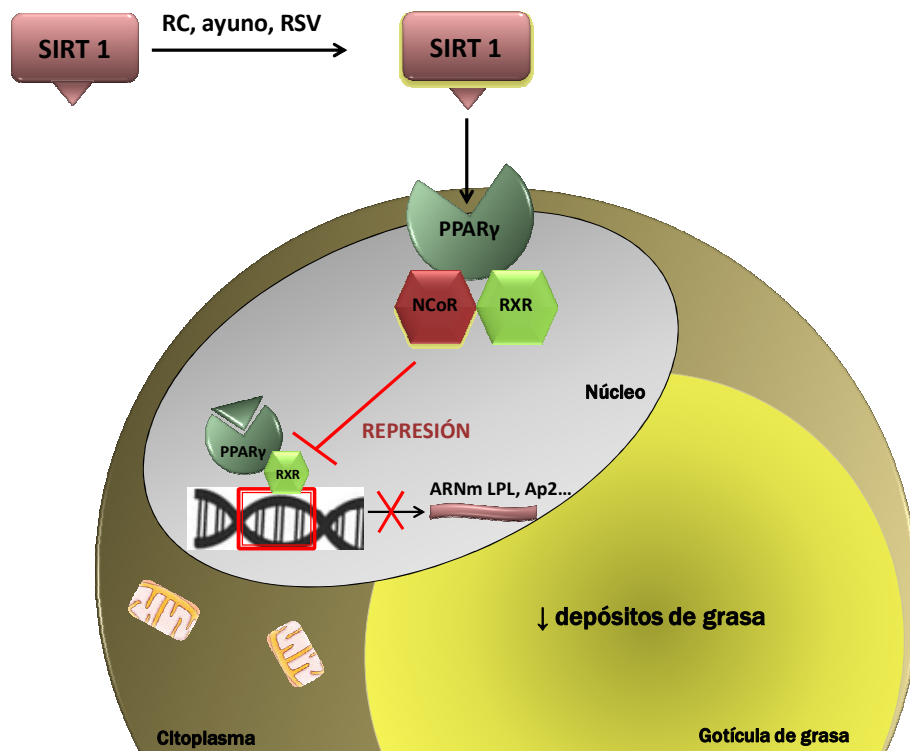
En relación al metabolismo lipídico, es bien sabido que SIRT1 ejerce su acción mediante una desacetilación (activación) del PGC-1 $\alpha$  en músculo e hígado, lo que se traduce en un incremento de la expresión de genes involucrados en la gluconeogénesis (muscular) y la glucólisis (hepática) que da lugar a una activación del catabolismo. En condiciones de restricción calórica, se ha demostrado cómo una activación de PGC-1 $\alpha$  incrementa además la biogénesis mitocondrial y la respiración en el músculo, lo que conlleva a una mayor  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos (Fernández-Marcos y Auwerx, 2011). Sin embargo, SIRT1 que también se expresa en tejido adiposo, presenta una regulación diferente en este tejido. La activación de SIRT en el adipocito se ha

# INTRODUCCIÓN

relacionado con una inhibición del factor PPAR $\gamma$  (Picard *et al.*, 2004), que da lugar a una reducción de la adipogénesis y del proceso lipogénico. SIRT1 reprime la actividad PPAR por un acoplamiento a co-represores de receptores nucleares de PPAR (NCoR). El complejo resultante formado (SIRT1-PPAR-NCoR) se une a secuencias de específicas DNA (elementos de respuesta a PPAR (PPRE)) en la región promotora para los genes diana de PPAR, tales como la aP2 o la LPL, inhibiendo así su transcripción (Figura 26).

Los efectos de la activación de SIRT1 han sido ampliamente estudiados en estudios *in vitro*. En 2004, en el estudio llevado a cabo por Picard y col. (Picard *et al.*, 2004) se observó como la sobreexpresión de SIRT1 en adipocitos 3T3-L1 conducía a una menor acumulación de la grasa. En el mismo estudio, adipocitos primarios tratados con resveratrol mostraron una mayor liberación de ácidos grasos al medio, mientras que la inhibición de SIRT1 inducida en estos adipocitos, dio lugar a una disminución en la liberación de ácidos grasos al medio a pesar de ser tratados del mismo modo con resveratrol. Esto lleva a pensar que el incremento de la movilización lipídica está mediado por una activación de esta sirtruina. El conjunto de estos hallazgos junto con la confirmación de estos mismos resultados en un estudio *in vivo*, sugiere que SIRT1 es un importante modulador del metabolismo lipídico capaz de controlar el almacenamiento y la movilización de la grasa.

Otro mecanismos propuesto recientemente por Quiang y col. (Qiang *et al.*, 2012) es la desacetilación, y por tanto inactivación, que SIRT1 ejerce sobre dos residuos concretos de PPAR $\gamma$  (Lys268 and Lys293).



**Figura 26.** Mecanismo de acción del resveratrol a través de la regulación vía SIRT1. NCoR (corepresor de receptor nuclear), RC (restricción calórica), RSV (resveratrol).

# INTRODUCCIÓN

---

## ‡ Efecto anti-obesogénico del resveratrol *in vitro*

Numerosos trabajos llevados a cabo en cultivos celulares de adipocitos han puesto de manifiesto que el tratamiento de estas células con resveratrol (en un rango de dosis comprendido entre 10 y 100  $\mu\text{M}$ ) produce una disminución en la acumulación de grasa intracelular así como una mayor liberación de ácidos grasos al medio.

Los mecanismos a través de los cuales el resveratrol disminuye la acumulación de la grasa son la reducción de la expresión de los tres principales genes reguladores de la adipogénesis y lipogénesis (C/EBP $\alpha$ , SREBP1, PPAR $\gamma$ ) así como la disminución de la expresión de genes de enzimas que participan en el proceso lipogénico (FAS, ACC, LPL) (Rayalam *et al.*, 2008b; Fischer-Posovszky *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011; Kang *et al.*, 2012; Kwon *et al.*, 2012; Lasa *et al.*, 2012a; Hu *et al.*, 2014). En cuanto a la movilización de la grasa, el tratamiento de adipocitos con resveratrol a altas concentraciones (50-100  $\mu\text{M}$ ) produce un incremento en la expresión de lipasas (ATGL y HSL) (Picard *et al.*, 2004; Szkudelska *et al.*, 2009; Lasa *et al.*, 2012b; Rosenow *et al.*, 2012; Gomez-Zorita *et al.*, 2013; Shan *et al.*, 2013). Sin embargo, los cambios inducidos por este polifenol en las lipasas resultan controvertidos, por lo que no existe un consenso general a cerca del papel que juega el resveratrol en este proceso metabólico.

Por otro lado, el resveratrol reduce la viabilidad celular de los adipocitos de forma proporcional a la dosis utilizada. Cabe señalar que este efecto apoptótico ha sido observado a dosis elevadas de este polifenol, siendo los pre-adipocitos más sensibles a dosis más bajas (40-50  $\mu\text{M}$ ) (Chen *et al.*, 2012; Pang *et al.*, 2013) en comparación a las dosis utilizadas en adipocitos maduros (100  $\mu\text{M}$ ) (Rayalam *et al.*, 2007b; Yang *et al.*, 2008).

La mayor parte de estos mecanismos parecen estar regulados por la activación que el resveratrol produce sobre SIRT1.

## ‡ Efecto anti-obesogénico del resveratrol *in vivo*

Los estudios llevados a cabo en animales de experimentación, especialmente en roedores, con dosis de resveratrol que varían desde 10-200 mg/kg peso corporal/día, han demostrado de forma general que el resveratrol es capaz de disminuir la grasa corporal.

Los mecanismos de acción a través de los cuales actúa la mencionada molécula son tanto la inhibición de la expresión como la inhibición de la actividad de enzimas lipogénicos (FAS y ACC) y de enzimas que intervienen en la captación de ácidos grasos al interior del adipocito (LPL). Estos cambios inducidos por el tratamiento con resveratrol han sido observados a nivel transcripcional y postranscripcional (Aguirre *et al.*, 2014). En cuanto a la movilización lipídica observada *in vivo*, no existe una concordancia con los resultados obtenidos *in vitro*. En estudios previos en nuestro laboratorio observamos que tratamientos de entre 15 y 30 mg/kg peso corporal/día durante 4-6 semanas en ratas Zucker (Gómez-Zorita *et al.*, 2012) y Sprague Dawley (Alberdi *et al.*, 2011) producían un incremento en el ARNm del enzima lipolítico HSL,



## INTRODUCCIÓN

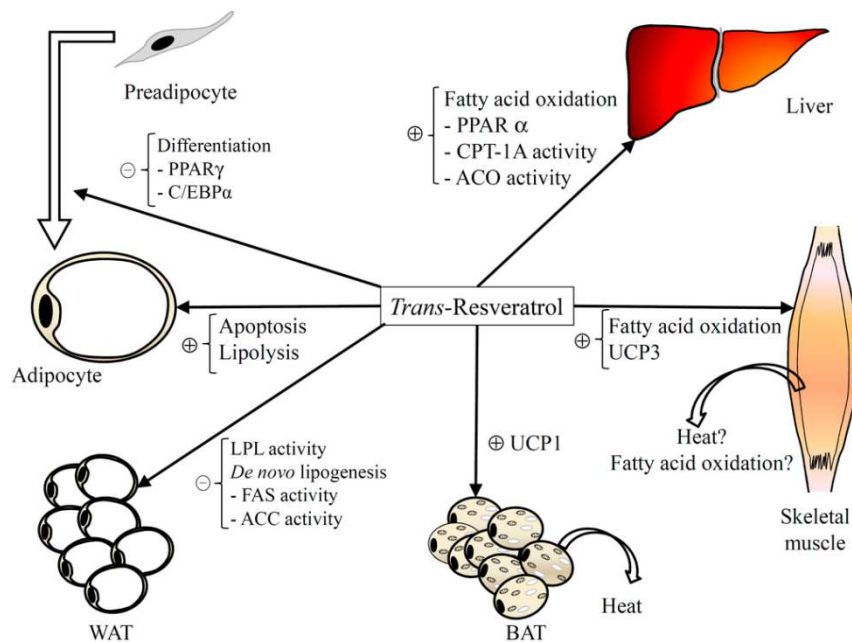
---

sin cambio alguno en la ATGL (diferencia con estudios *in vitro*). A su vez, no todos los estudios publicados parecen encontrar cambios en esta ruta metabólica. Si bien las diferencias observadas entre los distintos estudios pueden ser explicadas por diferencias tanto en las dosis, como en el modelo animal utilizado o el tipo y duración del tratamiento, al igual que estudios *in vitro*, tampoco parece haber un consenso en cuanto a los efectos del resveratrol sobre las lipasas en experimentos *in vivo*.

Por otro lado Lagouge y col. observaron que ratones alimentados con una dieta hipergrasa reducían tanto del peso corporal como el peso de sus tejidos adiposos tras el tratamiento con resveratrol (200-400 mg/kg peso corporal/día, durante 15 semanas). Estos ratones presentaron un menor tamaño de adipocitos blancos y un incremento de la expresión de genes relacionados con la termogénesis (UCP1) en tejido adiposo marrón, y con la  $\beta$ -oxidación en músculo (PPAR $\alpha$  y PGC1 $\alpha$ ). Estos cambios fueron producidos, al menos en parte por un incremento de la biogénesis mitocondrial (Lagouge *et al.*, 2006). En esta misma línea, Baur y col. (Baur *et al.*, 2006a) obtuvieron efectos similares mediados por una activación de SIRT1 que indujo un incremento de PGC-1 $\alpha$ , dando lugar a una mayor mitocondriogénesis en hígado. Por tanto, también se puede concluir que el resveratrol actúa disminuyendo la grasa corporal a través de un incremento de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos y aumentando el gasto energético a través de la termogénesis e incremento de la biogénesis mitocondrial (Figura 27).

En esta misma línea, estudios recientes en nuestro laboratorio (Alberdi *et al.*, 2013b), llevados a cabo en ratas Sprague alimentadas con una dieta obesogénica suplementada con 30 mg/kg peso corporal/día de resveratrol durante 6 semanas, también mostraron un aumento en la expresión génica de UCP1 en el tejido adiposo marrón (UCP1). Esta activación fue acompañada de una sobreexpresión de SIRT1, PGC-1 $\alpha$  y TFAM. Ésto sugiere que SIRT1 podría inducir un incremento en la biogénesis mitocondrial mediada por una activación de PGC-1 $\alpha$ , que estimula a su vez un factor de transcripción mitocondrial (TFAM). A su vez, Andrade y col., quienes observaron un incremento tanto en la expresión de SIRT1 como de UCP1 en el tejido adiposo marrón de ratones tratados con 1000 mg/kg peso corporal/día de resveratrol durante 8 semanas, también detectaron una sobreexpresión del gen BMP-7 en este mismo tejido (Andrade *et al.*, 2014). Este gen ha sido identificado como un activador de promotores de la adipogénesis de adipocitos marrones, incluyendo la activación de co-reguladores transcripcionales tempranos de ésta como son el Prdm16 y el PGC1 $\alpha$ , además de inducir la expresión de genes característicos de la función termogénica (UCP1). A su vez, se ha relacionado un incremento de este gen con un aumento de la biogénesis mitocondrial mediada por la activación de AMPK.

# INTRODUCCIÓN



**Figura 27.** Esquema de mecanismos de acción a través de los cuales el resveratrol ejerce su efecto reductor de la grasa en el organismo. [Esquema propuesto por Aguirre y col. (Aguirre *et al.*, 2014a)].

## ⚡ Efecto anti-obesogénico del resveratrol en humanos

Hasta la fecha, resultan escasos los ensayos clínicos llevados a cabo con resveratrol con el objetivo de tratar o prevenir el sobrepeso y/o la obesidad. Timmers y col. (Timmers *et al.*, 2011) realizaron un ensayo con 11 pacientes obesos sanos a los que se les dio un suplemento de 150 mg/día de resveratrol durante un mes. Se observó una mejoría en parámetros como el contenido graso del hígado y transaminasas, valores de glucemia, niveles de triglicéridos y marcadores inflamatorios. El análisis de biopsias musculares mostró una sobreexpresión de AMPK, SIRT-1 y PGC1- $\alpha$ , resultados que están de acuerdo con los observados en modelos animales.

Por el contrario, en una intervención realizada en mujeres post-menopausicas no obesas que recibieron un suplemento de 75 mg/día de resveratrol durante 3 meses (Yoshino *et al.*, 2012), no se observó ningún cambio ni en la fosforilación de AMPK ni en los niveles de SIRT1 en el músculo esquelético. Cabe mencionar aquí, que la dosis utilizada en el ensayo de Timmers fue el doble que la utilizada en este experimento y, por otro lado, el resveratrol podría ejercer cierto efecto anti-obesogénico en pacientes con sobrepeso pero no en pacientes sanos.

Con respecto a la reducción del peso corporal que el resveratrol parece inducir en modelos animales, por ahora, no se conoce ningún estudio en humanos donde se haya

# INTRODUCCIÓN

---

producido este efecto (Timmers *et al.*, 2011; Bhatt *et al.*, 2012; Crandall *et al.*, 2012; Yoshino *et al.*, 2012; Movahed *et al.*, 2013; Poulsen *et al.*, 2013), si bien parece que el resveratrol podría mejorar el índice glucémico de pacientes obesos que han formado parte de alguno de estos ensayos (Timmers *et al.*, 2011, Crandall *et al.*, 2012). Cabe mencionar las grandes diferencias existentes entre los diseños experimentales para animales y para humanos como la duración de los tratamientos, mayores en animales, el tipo de dieta (normalmente obesogénica y muy controlada para animales) y el factor más importante, el metabolismo del resveratrol, el cual varía de una especie a otra.

## 4.2.6 Efectos adversos y seguridad del resveratrol

Crandall y col. evaluaron la seguridad del resveratrol durante 1 mes en 10 participantes de edad avanzada ( $\geq 65$  años) con intolerancia a la glucosa. Les fueron suministradas dosis de resveratrol de 1 a 2 g/día que produjeron una mejora de la sensibilidad a la insulina y la estabilización de la glucemia tras las comidas, sin aumento en la incidencia de efectos adversos en comparación con el placebo (Crandall *et al.*, 2012). Aunque los resultados de este estudio sugieren que el resveratrol es bien tolerado en los adultos mayores, la interpretación de los datos se vio limitada por el tamaño relativamente pequeño de la muestra y la corta duración del estudio.

En un reciente estudio llevado a cabo por Anton SD y col. se evaluó la seguridad del resveratrol administrado durante 3 meses. En este caso, 32 adultos sanos pero con sobrepeso, mayores de 65 de edad, recibieron suplementos diarios de resveratrol. La mitad de los sujetos recibió una dosis de 300 mg/día y la otra mitad una dosis de 1000 mg/día. Al igual que en estudios anteriores, ningún parámetro relacionado con la seguridad de estos suplementos fue alterado, si bien los sujetos tratados con la dosis de 1000 mg/día presentaron molestias gastrointestinales (Anton *et al.*, 2014).

Con respecto al análisis de los efectos del resveratrol a largo plazo, Tome-Carneiro y col. realizaron dos estudios a largo plazo, de un año de duración total (2012 y 2013), en pacientes con enfermedad coronaria estable. Durante los 6 primeros meses se les administró diariamente un compuesto derivado de la uva suplementado con 8 mg de resveratrol. En el segundo semestre, se aumentó al doble la dosis proporcionada (16 mg/día). El resultado de este estudio mostró una buena tolerancia al tratamiento con resveratrol (Tomé-Carneiro *et al.*, 2012; Tomé-Carneiro *et al.*, 2013).

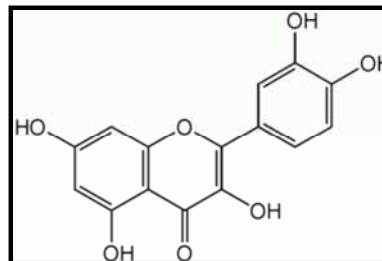
Estudios toxicológicos han confirmado que el resveratrol es bien tolerado y que no presenta efectos adversos. Únicamente son dos los estudios en los cuales se han descrito molestias de tipo abdominal cuando se administra a dosis elevadas (2500–5000 g/día) (Brown *et al.*, 2010; Cottart *et al.*, 2014).

Finalmente cabe señalar que la FDA (Agencia de Alimentos y Medicamentos) sostiene que el consumo de resveratrol no produce efectos tóxicos. No obstante, a pesar de que parece clara la seguridad de este compuesto, se hacen necesarios más estudios en distintos grupos poblacionales, especialmente en aquellos que padecen alto riesgo de enfermedades crónicas susceptibles de ser tratadas con este polifenol.

# INTRODUCCIÓN

## 4.3 Quercetina

Desde hace más de un siglo, los flavonoides son conocidos como los pigmentos que dan color a las plantas y que protegen su organismo del daño producido por agentes oxidantes como la radiación ultravioleta, sustancias ambientales, químicas, etc. Pertenecen a un gran grupo de compuestos polifenólicos derivados del ácido hidroxibenzoico, que están ampliamente distribuidos en todos los alimentos de origen vegetal.



**Quercetina**  
**3,3',4', 5,7-pentahidroxi flavona**

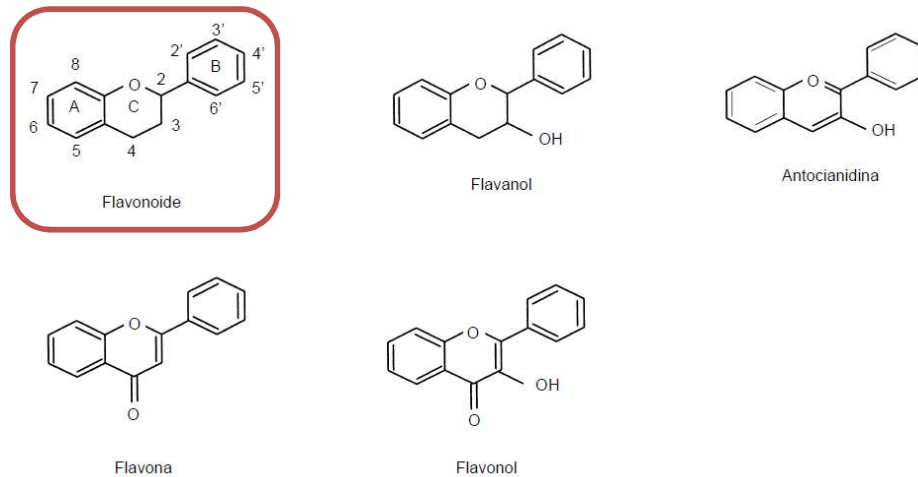
La quercetina, junto con el kaempferol, son los representantes principales de este grupo, dada la ubicuidad de éstos en los alimentos y el alto porcentaje de consumo que suponen frente al resto.

Los flavonoides tienen una larga historia en la utilización para la medicina tradicional en muchas culturas, sin embargo, éstos no fueron descubiertos hasta 1930. El premio Nobel Szent-György aisló por primera vez una sustancia de la cáscara del limón, la citrina, que regulaba la permeabilidad de los capilares y prolongaba así la vida de animales de experimentación. En un principio, a esta sustancia se le denominó vitamina P (por mejorar la permeabilidad) (Singleton, 1981). Sin embargo, el hecho de que los flavonoides fueran vitaminas no pudo ser confirmado, y ambas denominaciones se desestimaron posteriormente (Martino, 2000; Martínez-Flórez S., 2002). Durante la década de los 90, el interés por los flavonoides comenzó a incrementarse dada la correlación negativa observada entre el consumo de una dieta rica en flavonoides y un menor riesgo de enfermedad cardiovascular, así como una menor incidencia de cáncer. Desde entonces, ya han sido identificadas más de 5000 variedades de flavonoides.

### 4.3.1 Estructura y síntesis de la quercetina

Los flavonoides se clasifican atendiendo a su estructura química en: flavonas, flavonoles, antocianinas, flavanoles, flavanonas e isoflavonas. Dicha estructura está caracterizada por contener un número variable de grupos hidroxilo fenólicos, que son los responsables de su actividad antioxidante por su capacidad de reaccionar con especies reactivas. El esqueleto común para todos los flavonoides consiste en una estructura de difenilpirano, formada por dos anillos fenilo (A y B) unidos a través de un tercer anillo C (pirano). En función de pequeñas variaciones este último anillo, así como diversas uniones a grupos hidroxilo, los flavonoides se clasifican en (Figura 28):

- **Antocianidinas:** con un grupo -OH en posición 3 y un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C.
- **Flavonas:** con un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carentes del grupo hidroxilo en posición C3.
- **Flavanoles:** con un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
- **Flavonoles:** con un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en posición 3 del anillo C.



**Figura 28:** Estructura básica de los flavonoides y clasificación. [Adaptación del esquema propuesto por Martínez-Flórez (Martínez-Flórez S., 2002)].

De entre los distintos grupos de flavonoides mencionados y atendiendo a su estructura química, la quercetina se clasifica dentro del subgrupo de flavonoles. Se caracteriza por poseer cinco grupos hidroxilos que le otorgan la nomenclatura química de 3,3',4',5,7-pentahidroxiflavona. Su síntesis sigue la misma ruta que para la síntesis del RSV, partiendo del mismo precursor (p-Cumaroil-CoA) pero finalmente sintetizada gracias a la acción de diversos enzimas, como la chalcona sintasa y la flavonol sintasa, responsables de la primera y última etapa de la síntesis de esta molécula.

De todos los flavonoides, la quercetina es uno de los más abundantes de la dieta representando aproximadamente alrededor de un 60-75% del total de flavonoles consumidos (Hertog *et al.*, 1996).










#### 4.3.2 Fuentes alimentarias e ingesta media de quercetina

En los alimentos, la quercetina se puede encontrar en forma de aglicona, de glicósido o incluso en ambas formas. La estructura mayoritaria en la que se presenta es unida a un azúcar, es decir, forma de glicósido, y de este modo presenta una absorción del 52% del total ingerido.

En la tabla 6 se muestran los alimentos donde la quercetina ha sido identificada en mayor proporción. Dichos datos han sido obtenidos de una base de datos existente para polifenoles que estima el contenido medio de cada polifenol presente en los alimentos atendiendo a los estudios realizados hasta la fecha (Neveu *et al.*, 2010) (Tabla 6).

# INTRODUCCIÓN

**Tabla 6.** Principales fuentes alimentarias con alto contenido en quercetina.

Grupo de alimentos	Variedad de alimento	Contenido medio de quercetina (líquidos: mg/100 mL) (sólidos: mg/100 g PC)	Imagen del alimento
Cacao	Chocolate	25,0	
Bebidas alcohólicas	Vino tinto	0,83	
	Vino blanco	0,04	
	Vino espumoso ( <i>Champagne</i> )	0,009	
	Cerveza	0,007	
Bebidas no alcohólicas: Zumos de frutas	Zumo de naranja	1,06	
	Zumo de pomelo	0,63	
	Zumo de manzana	0,34	
	Zumo de granada	0,25	
	Zumo de arándano rojo	0,10	
	Té negro	0,09	
Frutos: Arándanos	Bayas de saúco	42,00	
	Arándano azul o mirtilo	1,27	
	Arándano rojo	0,51	
Otros/as frutos/as	Manzana	0,13	
	Frambuesa	0,02	
Frutos secos	Almendras y pistachos	0,02	
Hortalizas	Cebolla chalota (cruda)	2,0	
	Cebolla roja (cruda)	1,29	
	Cebolla amarilla (cruda)	0,28	
	Cebolla blanca (cruda)	0,03	
	Tomate (cruda)	0,004	
Cereales	Harina de trigo integral	0,11	
	Harina de trigo refinada	0,08	
Condimentos	Orégano (mexicano)	42,0	
	Alcaparra	32,8	
	Clavo	28,4	

Valores tomados de una base de datos que detalla el contenido en polifenoles en los distintos alimentos y las fuentes bibliográficas de las cuales obtienen estos datos (Neveu *et al.*, 2010; [www.phenolexplorer.es](http://www.phenolexplorer.es)). PC (porción comestible).

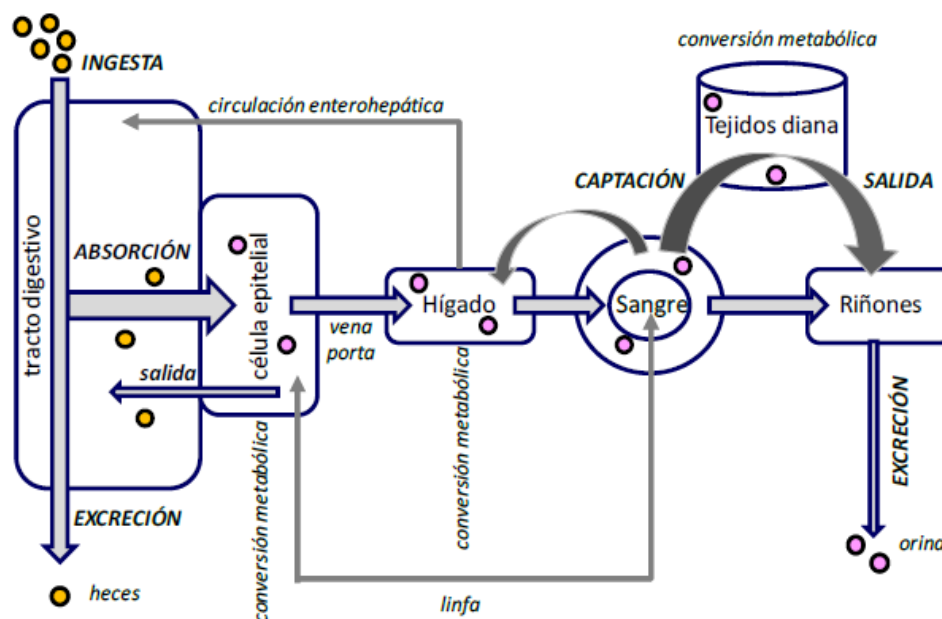
No obstante, tanto para la quercetina como para el resto de polifenoles, hay que tener en cuenta que el contenido de éstos en aquellos vegetales en los que se encuentran, varía en gran proporción atendiendo a diversos factores como la localización en el vegetal (generalmente la quercetina está presente en mayor concentración en las partes externas), la época del año en la que se desarrolla la planta (los vegetales con mayor cantidad de flavonoides se corresponden con los de la temporada de verano), la cantidad de luz y el clima del lugar donde se cultiva la planta. La producción de flavonoides se encuentra estrechamente relacionada con la respuesta a la exposición a la luz, por lo que en los países con más horas de sol las plantas tienen mayor contenido. También influye la temperatura (los climas cálidos favorecen la síntesis de quercetina), el grado de madurez del fruto (a mayor madurez mayor contenido), el proceso de preparación y procesado del alimento (el hecho de cocinar estas plantas puede reducir el contenido en flavonoides como consecuencia del cambio de temperatura) (Skibola *et al.*, 2000; Vicente-Vicente, 2013).

Tal y como ha podido constatarse a través de numerosos estudios de investigación, el consumo de cebolla conduce a niveles más altos de quercetina que otras fuentes alimenticias (Dávalos *et al.*, 2006), porque los glucósidos existentes en ellas tienen mayor biodisponibilidad que las formas agliconas (Hollman *et al.*, 1995).

De la ingesta total de flavonoides estimada en humanos, aproximadamente el 65% se corresponde con la quercetina y sus glicosidos, siendo la fuente principal de obtención la cebolla, seguida de la col rizada y el puerro (Aguirre *et al.*, 2011). La ingesta diaria de quercetina ha sido estimada en 5-40 mg/d (Hertog *et al.*, 1995), si bien estas cantidades pueden verse incrementadas a 200-500 mg/d en individuos con alto consumo de frutas y verduras ricas en flavonoles (Harwood *et al.*, 2007).

### 4.3.3 Procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción de quercetina

Gracias a la masticación y la salivación se consigue extraer la quercetina de las fuentes vegetales ingeridas. Una parte se absorbe a nivel intestinal, se distribuye a los tejidos, y se metaboliza por procesos de glicosilación, glucuronidación, sulfatación y metilación. Finalmente, la quercetina (fundamentalmente sus metabolitos) es eliminada del organismo a través de las heces y la orina. Aquellos factores que regulen estos procesos serán mediadores importantes de su biodisponibilidad (Figura 29).



**Figura 29:** Absorción, distribución, metabolismo y excreción de la quercetina. ● quercetina aglicona y sus glicósidos. ● metabolitos de quercetina. [Esquema adaptado por Gallardo (Gallardo, 2012) del propuesto por Terao y col. (Terao *et al.*, 2011)].

Con todo, es bien conocida la baja biodisponibilidad que presenta la quercetina. Como resultado de su baja absorción y rápido metabolismo, la concentración de quercetina proveniente de la dieta está presente en plasma a concentraciones mínimas en el rango de nanomolar (<100 nM).

# INTRODUCCIÓN

---

En humanos se ha estimado que la vida media de la quercetina oscila entre las 11 y 28 horas. También se ha observado que tras la administración de dosis repetidas los metabolitos de quercetina presentan una eliminación más lenta (Graefe *et al.*, 2001; Boots *et al.*, 2008).

## ▣ Absorción de Quercetina

La mayor parte de los flavonoides se encuentran en forma glicosilada en los alimentos, y como tal, se absorben mejor que sus formas agliconas. No obstante, su absorción no es muy elevada (10-50%) (Hollman *et al.*, 1999b; Day *et al.*, 2003).

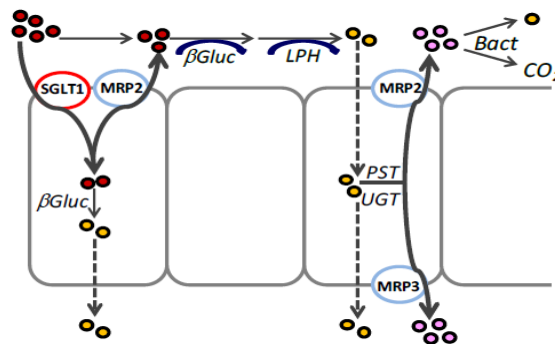
En el estudio de Hollman y col. (Hollman *et al.*, 1999b), 9 pacientes con ileostomía recibieron una dieta con quercetina procedente de cebolla frita (alto contenido en glucósidos de quercetina; dosis equivalente a 89 mg de quercetina), 100 mg de rutinósido de quercetina puro (principal glucósido de en el té) ó 100 mg en forma aglicona. La ingestión de quercetina aglicona presentó un 24% de absorción. La absorción de quercetina procedente del rutinósido fue de un 15%, y la de la cebolla del 52%. Ésto sugiere que los glucósidos procedentes de una fuente natural podrían incrementar la absorción de quercetina. Estudios adicionales llevados a cabo por el mismo grupo en individuos sanos reconfirmaron este hallazgo).

Por otro lado, De Vries y col. (de Vries *et al.*, 1998) realizaron un estudio en 15 individuos sanos a los cuales se les administró té negro y cebolla frita. La absorción de quercetina del té fue la mitad que la de la cebolla, sugiriendo que la fuente dietética de quercetina también es un importante factor a tener en cuenta. En este mismo contexto, pero tomando como referencia el mismo alimento como fuente de quercetina, cabe destacar que la ingesta de la piel (rica en formas agliconas) de cebollas chalotas genera una concentración plasmática de quercetina mayor que la ingesta de la carne (rica en glucósidos) de la misma (Wiczowski *et al.*, 2008).

El proceso de absorción de la quercetina (principalmente en formas glicosilada) comienza con su entrada en el enterocito a través del transportador SGLT (transportador de glucosa sodio dependiente) situado en la membrana apical (Gee *et al.*, 2000). Antes de pasar a sangre se desglicosila gracias a la acción de un enzima  $\beta$ -glucosidasa llamada Lactasa Floricina Hidrolasa (LPH; Lactase-phlorizin hydrolase). Como consecuencia, la quercetina es absorbida con facilidad por difusión pasiva en la membrana latero-basal (Németh *et al.*, 2003).

Por otro lado, también puede suceder que una vez que los glucósidos de quercetina penetran en la membrana apical del enterocito, éstos sean inicialmente expulsados por transportadores apicales relacionados con la resistencia a fármacos (MRP2y3; multidrug resistance protein) (Walle *et al.*, 2003). Posteriormente, se hidrolizan por  $\beta$ -Glucosidasas y/ó LPH presentes en la superficie celular del enterocito y finalmente se absorben por difusión pasiva (Walle *et al.*, 2000) (Figura 30).





**Figura 30.** Absorción, transporte y metabolismo de la quercetina procedente de la dieta en el lumen y en el interior de los enterocitos del tracto digestivo. [Esquema adaptado por Gallardo (Gallardo, 2012) de Walle y col. (Walle, 2004)]. ■ Quercetina aglicona y correspondientes glicósidos de la dieta. ■ Quercetina aglicona. ■ Metabolitos glucuronados y/o sulfatados de quercetina. Transportadores de membrana: SGLT1 (transportador de glucosa sodio-dependiente) y MRP2/3 (proteínas apicales 2 y 3 asociadas con la resistencia a múltiples fármacos); Bact (bacterias de la microbiota intestinal),  $\beta$ Gluc ( $\beta$ -glucosidasa), LPH (enzima sulfotransferasa fenol), UGT (uridina 5'-difosfato-glucuronosiltransferasa).

## ‡ Distribución-Transporte de Quercetina

Una vez en la circulación sanguínea, el transporte tanto de la quercetina como de sus metabolitos, se realiza mediante la unión a proteínas plasmáticas, predominantemente la albúmina. De este modo son transportados hacia diferentes órganos y tejidos, donde sufren transformaciones (metabolismo de Fase II), se acumulan y ejercen o no una acción determinada, o bien se eliminan directamente (Day *et al.*, 2000).

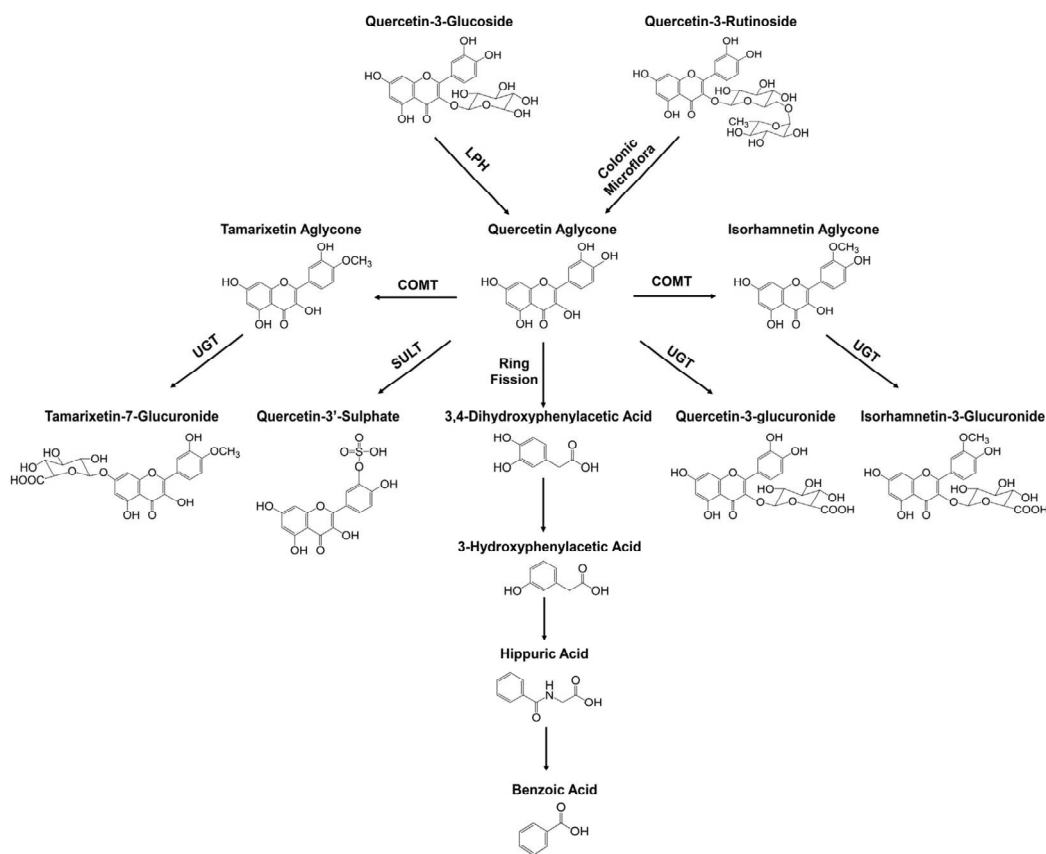
En determinadas ocasiones se ha propuesto que incluso los propios metabolitos de la quercetina pueden actuar como transportadores de ésta. En un estudio llevado a cabo por Galindo y col. en el que se realizó una perfusión a través del lecho vascular del mesenterio de rata, tanto de quercetina como de su metabolito glucuronado (Q3GA), se observó que mientras la forma aglicona era rápidamente metabolizada, la desaparición de la glucuronada era más lenta y daba lugar a la aparición de quercetina tanto en el líquido perfundido como en el propio tejido. Esto sugiere, que los metabolitos glucuronados de quercetina podrían incluso actuar como transportadores de la quercetina en plasma liberándola en los tejidos tras una desconjugación, además de poseer un efecto propio (Gallardo, 2012).

Alguno de los metabolitos mencionados son transportados de nuevo al tracto digestivo donde se reabsorben, entrando en un ciclo enterohepático que incrementa la vida media de quercetina en la circulación sanguínea (Aherne *et al.*, 2002).

# INTRODUCCIÓN

## Metabolismo de Quercetina

No se ha descrito un metabolismo de Fase I para la quercetina, si bien éste podría suponerse dado que estructuralmente resulta similar a otros compuestos como la apigenina, en cuyo metabolismo está involucrado el citocromo P450 (enzima principal en las reacciones de Fase I). Por el contrario, sí se han observado formas glucuronadas, sulfatadas y metiladas de quercetina, tras el tratamiento de células intestinales con la forma aglicona, lo que sugiere un metabolismo de Fase II a nivel intestinal, además del ya conocido posterior metabolismo hepático. Los enzimas implicados en este proceso de metabolismo de fase II son: UGT (5'-difosfato-glucuronosiltransferasa) encargada de la glucuronidación, SULT o PST (sulfotransferasa fenol) cuya actividad de sulfatación se da mayoritariamente en hígado y COMT (Catecol-O-metiltransferasa) encargada de la metilación y formadora por tanto de la isorhamnetina (metabolito que supone de un 20 a un 40% de la quercetina absorbida) (Day *et al.*, 2001) (Figura 31).



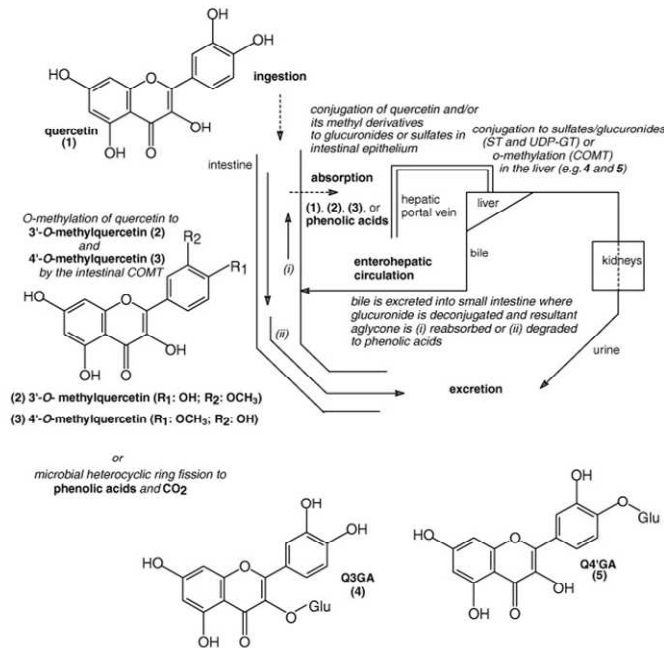
**Figura 31.** Representación de las biotransformaciones de la quercetina. [Esquema tomado de una adaptación de Guo y col. (Guo *et al.*, 2015)]. COMT (catechol-O-methyl transferase), LPH (lactase phlorizin hydrolase), SULT (sulfotransferase), UGT (uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferase)

## Eliminación de la Quercetina

La quercetina es eliminada a través de las heces (vía biliar) y la orina (Fase III del metabolismo) (Mullen *et al.*, 2008). La bilis reconduce los metabolitos de quercetina desde el hígado al intestino (circulación entero-hepática) donde son desconjugados

# INTRODUCCIÓN

para ser reabsorbidos de nuevo (en forma de aglicona) o bien son degradados por la microbiota para ser posteriormente eliminados en heces (Figura 32).



**Figura 32.** Representación esquemática de la absorción, metabolismo y excreción de quercetina en mamíferos. [Esquema adaptado por Harwood y col. (Harwood *et al.*, 2007) de Day y col. (Day *et al.*, 1999)].

El proceso final de degradación se produce por una fisión del anillo pirano. Previo a esto, sucede una desconjugación de la quercetina que da lugar a ácidos fenólicos y CO<sub>2</sub> (Mullen *et al.*, 2008), productos de desecho que serán eliminados del organismo. A pesar de que este mecanismo no esté aún bien definido *in vivo*, se sostiene que es mediado por una degradación microbiana (Harwood *et al.*, 2007). La microflora del colon y riñón expresan β-glucuronidasas que llevan a cabo la desglucuronización de glucuronidos de quercetina antes de la formación de ácidos fenólicos y CO<sub>2</sub>, y su posterior eliminación (Aura *et al.*, 2002; Bieger *et al.*, 2008). El CO<sub>2</sub> será eliminado a través de la respiración mientras que los subproductos son eliminados en heces y orina en menor proporción (Harwood *et al.*, 2007).

En un estudio llevado a cabo por Walle y col., se administró la quercetina marcada con carbono 14 (<sup>14</sup>C). La excreción de ésta se observó a través del CO<sub>2</sub> expirado (producto de desecho generado durante la reacción de degradación microbiana de la quercetina) que supuso desde un 23 a un 81% de la dosis administrada, remarcando la importancia de la flora intestinal en la eliminación de este flavonoide (Walle *et al.*, 2001). Si comparamos este dato con el porcentaje de eliminación por vía urinaria (2.5±1.2%), obtenido a través de la media de 97 estudios de biodisponibilidad analizados por Manach y col. (Manach *et al.*, 2005), resulta llamativa la importancia que cobra la ruta de detoxificación por vía biliar-fecal.

# INTRODUCCIÓN

---

## 4.3.4 Biodisponibilidad de la quercetina

La biodisponibilidad de la quercetina, es decir, fracción de ésta que administrada vía oral es absorbida y está disponible para generar una actividad fisiológica en el organismo o ser almacenada, ha sido estimada en humanos en un 44,8%. Este dato se cuantificó gracias a la administración de quercetina, en su forma aglicona, solubilizada en etanol y radiactivamente marcada. No obstante, hay que tener en cuenta que este dato puede resultar una sobreestimación puesto que hasta la fecha es imposible realizar una cuantificación tan exacta que abarque y por tanto tenga en cuenta todos los factores afectan a la biodisponibilidad de este flavonoide. Un buen ejemplo de esto es el etanol que suele utilizarse en investigación como vehículo para la administración de la quercetina, el cual favorece la absorción de ésta y por tanto su biodisponibilidad. Por otro lado, tampoco se tiene en cuenta la cantidad de quercetina que es oxidada en el proceso metabólico que ésta sufre durante su paso por el organismo. A su vez, cabe mencionar la observación de pequeñas diferencias en la biodisponibilidad de quercetina, las cuales han sido relacionadas con factores internos de un individuo como el género, la edad y la integridad de la barrera intestinal.

Otros factores como la matriz que contiene quercetina (la quercetina administrada en la dieta presenta una menor biodisponibilidad) y la variabilidad interindividual, consecuencia de las diferencias existentes en la actividad de enzimas que intervienen tanto en la absorción ( $\beta$ -glucosidasas) como en el metabolismo (UGT, SULT y COMT) y la excreción de este compuesto, también influyen en la biodisponibilidad de este flavonoide (Guo *et al.*, 2015).

## 4.3.5 Efectos beneficiosos de la quercetina en obesidad y mecanismos de acción involucrados

La quercetina ha sido estudiada por sus múltiples efectos beneficiosos sobre la salud, tanto en animales de experimentación como en humanos. Entre todos ellos, cabe destacar la capacidad de esta molécula de reducir el riesgo cardiovascular, disminuyendo la presión arterial, el colesterol total e incrementando el HDL colesterol. También es bien conocido su poder antioxidante, capaz de neutralizar radicales libres y proteger frente a especies reactivas de oxígeno. En la última década, este flavonoide ha sido ampliamente estudiado como molécula antidibética por su capacidad de reducir los niveles de insulina en el organismo. En cuanto a la obesidad, si bien los estudios que datan de la quercetina como molécula antiobesizante son menores, los resultados obtenidos han mostrado cierto interés.

### ✦ Efecto anti-obesogénico de la quercetina *in vitro*

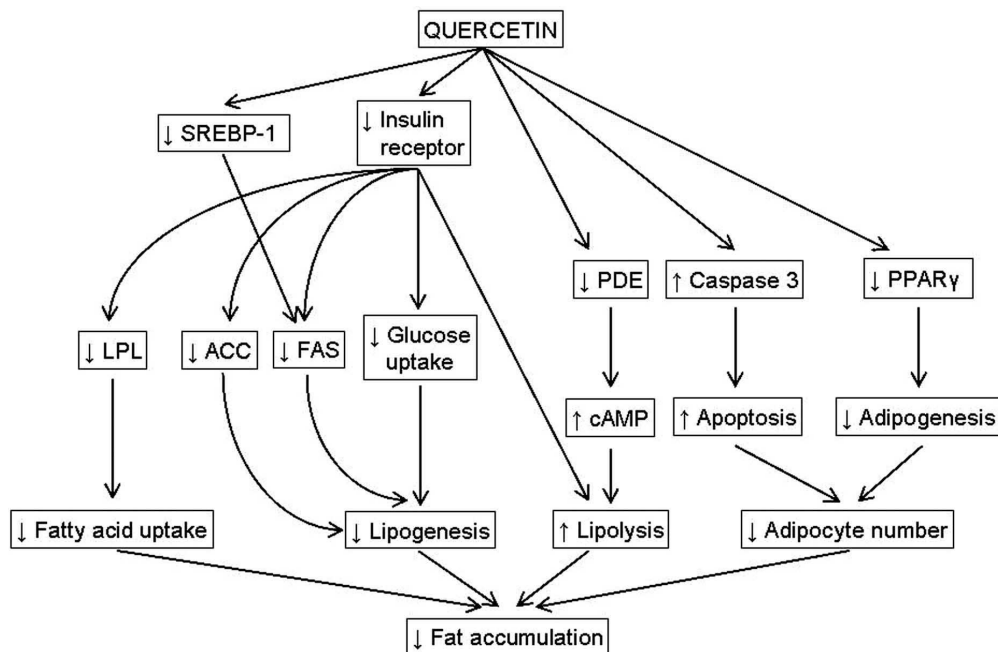
En cuanto al efecto antiobesizante de este polifenol, los primeros estudios realizados fueron llevados a cabo en cultivos celulares de adipocitos 3T3-L1. En ellos se observó cómo su incubación con quercetina conllevaba una reducción en el contenido de triglicéridos intracelulares. De forma indirecta, como consecuencia del efecto inhibitorio que la quercetina presenta sobre la insulina, también se ha constatado que este polifenol produce una inhibición de la lipogénesis (vía insulina). Esta inhibición

# INTRODUCCIÓN

también puede darse por una acción directa de la quercetina sobre la expresión de genes que controlan esta ruta metabólica.

Por tanto, los efectos reductores de grasa ejercidos por la quercetina han sido descritos como consecuencia de una inhibición de la lipogénesis (Ahn *et al.*, 2008b) además de una inhibición de la actividad LPL (que se traduce en una menor captación de AG al interior del adipocito) (Motoyashiki *et al.*, 1996). A su vez, parece que esta molécula también puede producir una movilización lipídica mediada por un incremento dosis-dependiente de la lipólisis (Kuppusamy *et al.*, 1992) además de inhibir la adipogénesis y estimular la apoptosis.

En cuanto a los mecanismos de acción a través de los cuales la quercetina ejerce su efecto reductor de grasa en cultivos de adipocitos, la inhibición de la lipogénesis parece estar mediada por una menor expresión de SREBP-1 y de FAS y un incremento de la fosforilación (inactivación) del enzima ACC (Ahn *et al.*, 2008b). En cuanto a la activación de la lipólisis, la quercetina podría competir con el AMPc por el mismo sitio de unión en la fosfodiesterasa (PDE) del adipocito, enzima que degrada el AMPc hasta 5'AMP, incrementando por tanto la concentración intracelular de AMPc, encargado de activar la proteína kinasa A (PKA) que es responsable de la fosforilación y por tanto activación de la HSL (Kuppusamy *et al.*, 1992). También se ha observado que este flavonoide puede reducir el número de adipocitos por una disminución en la expresión del CEBP- $\beta$  y PPAR $\gamma$  (Kuppusamy *et al.*, 1992; Ahn *et al.*, 2008b), lo que conlleva a una inhibición de la adipogénesis. Por último algunos trabajos han observado además, una activación de las caspasas (CAS3 y CAS9), proteínas que juegan un rol importante en el proceso apoptótico (Hsu *et al.*, 2006; Ahn *et al.*, 2008b) (Figura 33).



**Figura 33.** Mecanismos de acción a través de los cuales la quercetina ejerce su efecto reductor de la grasa en el adipocito.

# INTRODUCCIÓN

---

## ▄ Efecto anti-obesogénico de la quercetina *in vivo*

El primer estudio llevado a cabo en animales fue el realizado por Stewart y col. en el cual, ratones C57BL/6J que recibieron un suplemento de 1000 mg/kg peso corporal/día de quercetina, aumentaron su gasto energético a las 3 semanas de tratamiento. Sin embargo, este efecto desapareció a las 8 semanas de suplementación, probablemente por una adaptación metabólica al efecto producido por este compuesto (Stewart *et al.*, 2008). En otro estudio de 10 semanas llevado a cabo por Rivera y col. en rata Zucker, la administración crónica de 10 mg/kg peso corporal/día de quercetina condujo a una disminución del peso corporal final (Rivera *et al.*, 2008). A su vez, se observó una mejora de la dislipidemia, hipertensión e hiperinsulinemia. En ambos estudios, las dosis más altas probadas y tratamientos más prolongados dieron lugar a un efecto antiinflamatorio adicional.

Otros autores también han puesto de manifiesto que el tratamiento con diversas dosis de quercetina produce una reducción de la grasa corporal. Un ejemplo de esto es el estudio llevado a cabo por Liang y col. (Liang *et al.*, 2009), en el cual ratones alimentados durante la gestación con una dieta obesogénica suplementada con 66 mg/kg peso corporal/día de quercetina revertían la grasa corporal y otras patologías asociadas a la dieta. Kobori y col. (Kobori *et al.*, 2011), además de una disminución de peso corporal y de grasa visceral, observaron una reducción de la grasa hepática y una mejora de parámetros séricos relacionados con el síndrome metabólico (hiperglucemia, hiperinsulinemia y dislipemia) tras la administración de 150 mg/kg peso corporal/d de quercetina en ratones C57BL/6J durante 20 semanas. En esta misma línea, en un estudio reciente llevado a cabo por Hoek- van den Hil y col. (Hoek- van den Hil *et al.*, 2014) de 12 semanas de duración, la quercetina también redujo el incremento del peso corporal de ratones inducido por una dieta obesogénica además de la grasa hepática y los parámetros séricos lipídicos.

Sin embargo, no todos los estudios publicados han encontrado efectos positivos de la quercetina sobre el peso y la grasa corporal. En un experimento llevado a cabo con ratones db / db tratados con quercetina (100 mg / kg de peso corporal / día) durante 7 semanas, se produjo una reducción plasmática de glucosa sin cambios en el peso corporal (Kim *et al.*, 2011). En otro experimento realizado en rata Wistar cuya dieta obesogénica fue suplementada con 25 mg/ kg de quercetina peso corporal / día, tampoco se vieron cambios en el peso corporal (Wein *et al.*, 2010). Pese a que estas discrepancias podrían explicarse por múltiples factores involucrados en los distintos diseños experimentales, a día de hoy no se conoce con certeza qué combinación de estos factores (dosis de quercetina, % de grasa de la dieta, duración del tratamiento...) resulta óptima para que la quercetina de lugar a un claro efecto antiobesizante.

A día de hoy poco se conoce acerca de los mecanismos de acción de la quercetina en el efecto reductor de la grasa en los depósitos adiposos. Sin embargo, algunos de los autores previamente mencionados han propuesto los siguientes mecanismos a nivel hepático. La quercetina disminuye la expresión de PPAR $\gamma$  y CD36 así como de SREBP-1c y FAS (Kobori *et al.*, 2011). Puesto que el PPAR $\gamma$  es un factor de transcripción que

regula la expresión de genes involucrados en la adipogénesis, puede deducirse que la quercetina produce una inhibición de éste proceso (mecanismo que también ha sido observado en el tejido adiposo de estudios *in vivo* (Wein *et al.*, 2010)). A su vez, una menor expresión de SREBP-1c así como el gen de la FAS dan lugar a una menor lipogénesis *de novo* (Kobori *et al.*, 2011). Como consecuencia de esto la concentración plasmática de TG procedentes del hígado estaría disminuida y con ello la disponibilidad de estos para ser captados por el tejido adiposo. Hoek-van den Hil y col. (Hoek-van den Hil *et al.*, 2014) justificaron el efecto delipidante hepático con una regulación de la quercetina sobre la acción del citocromo P<sub>450</sub>.

## ✦ Efecto anti-obesogénico de la quercetina en humanos

En cuantos a los estudios acerca del efecto antiobesizante de la quercetina llevados a cabo en humanos, éstos resultan escasos y la mayor parte están en fase de experimentación clínica. El primer estudio que se publicó mostró que el estado nutricional de sujetos con un IMC comprendido entre 25 y 35 kg/m<sup>2</sup>, que recibieron un suplemento de 150 mg/día de quercetina durante 6 semanas se mantuvo sin cambios (peso corporal, perímetro de cintura, masa grasa y masa libre de grasa) (Egert *et al.*, 2010). Sin embargo, dicho suplemento disminuyó la presión sistólica y el colesterol-LDL dando lugar a un beneficio cardiovascular.

Otros estudios han demostrado como suplementos de este flavonoide (1000 mg/día, durante 2 semanas) podrían estar relacionados con un incremento en la biogénesis mitocondrial gracias al aumento tanto de la expresión de genes reguladores de este proceso (SIRT-1, PGC1- $\alpha$ , COX-2 y CS) como de DNA mitocondrial (Nieman *et al.*, 2010).

No obstante, son necesarios más trabajos de investigación para dilucidar si los efectos observados con el tratamiento de quercetina en animales son extrapolables o no a humanos.

### 4.3.6 Efectos adversos y seguridad de la quercetina

Estudios *in vitro* llevados a cabo en la década de los 70 con pruebas estándar de toxicidad pusieron de manifiesto efectos genotóxicos y mutagénicos. Sin embargo, estos efectos *in vitro* no fueron confirmados por estudios *in vivo* en modelos animales, en los que la molécula no produjo ninguna alteración (Harwood *et al.*, 2007).

En 1992, un estudio de 2 años de duración realizado por el NTP (Programa Nacional de Toxicología) (NTP, 1992), utilizó la suplementación con dosis muy elevadas de quercetina en ratas macho, 2 g/kg peso corporal/día (correspondiente a una dosis de 23 g para un individuo de 70 kg, calculada por la fórmula de Reagan-Shaw y col. (Reagan-Shaw *et al.*, 2008). Los resultados mostraron nefropatía crónica grave, hiperplasia y neoplasia del epitelio tubular renal. A dosis más bajas, de 50 a 500 mg/kg peso corporal/ día (correspondiente a una dosis de 0,6 a 6 g para un individuo de 70

## INTRODUCCIÓN

---

kg, calculada por la fórmula de Reagan-Shaw, no se observaron efectos adversos significativos.

En 1999, la IARC (Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer), tras la no observación de efectos adversos para la salud humana, concluyó que la quercetina no era clasificable como carcinogénico para humanos (IARC, 1999; Okamoto, 2005).

Más recientemente, tras el análisis exhaustivo de estudios llevados a cabo tanto en animales como humanos que recibieron suplementos de quercetina, la FDA (FDA, 2010), declaró el estatus GRAS (generalmente reconocidos como seguros) a la quercetina por la ausencia de síntomas adversos o efectos fisiológicos nocivos (Harwood *et al.*, 2007; Utesch *et al.*, 2008; Knab *et al.*, 2011).

En Noviembre de 2013, la AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición) estableció, en su décimo octavo informe, la cantidad máxima diaria segura de quercetina en 300 mg, con la advertencia “no recomendado en mujeres embarazadas” (debido a la falta de estudios toxicológicos). Dicha propuesta se basó en la existencia de una autorización previa en Italia del año 2012 para su uso en complementos alimenticios (AESAN, 2012).

No obstante, en otros países se considera seguro el uso de cantidades mayores de quercetina, como es el caso de Estados Unidos. En el “Vademecum” estadounidense PDRNS (Physician’s Desk Reference for Nutritional Supplements, 2001), se estima que la dosis diaria de quercetina en los suplementos alimenticios puede establecerse entre 200-1200 mg (PDRNS, 2001; Vicente-Vicente L, 2013).





**OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICOS/  
AIM AND SPECIFIC OBJECTIVES**

---



# OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICOS

---

## OBJETIVO GENERAL

El **objetivo general** de esta tesis doctoral fue determinar si la administración conjunta de moléculas biológicamente activas resulta más eficaz que la administración de cada una de ellas por separado en la reducción de la acumulación de grasa corporal en un modelo animal de rata Wistar alimentada con una dieta obesogénica (rica en grasa saturada y sacarosa).

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Los **objetivos específicos** fueron los siguientes:

Experimento 1: Estudio del efecto de una combinación de resveratrol y ácido linoleico conjugado (CLA) sobre la acumulación de grasa corporal en ratas alimentadas con una dieta obesogénica.

- 1) Evaluar de forma comparativa el efecto producido por la administración conjunta de resveratrol y CLA (RSV+CLA) con el producido por cada compuesto de forma individual, para determinar si la combinación de ambas moléculas resulta o no más eficaz en la prevención de la acumulación de grasa corporal (**Manuscrito 1**).
- 2) Estudiar algunos de los mecanismos de acción involucrados en los efectos producidos por el resveratrol, el CLA y especialmente por su combinación (RSV+CLA) en el tejido adiposo blanco (**Manuscrito 2**).

Experimento 2: Estudio del efecto de la quercetina sobre la acumulación de grasa corporal y el control glucémico en ratas alimentadas con una dieta obesogénica.

- 3) Determinar el efecto de la quercetina sobre la acumulación de grasa corporal y el control glucémico y los mecanismos de acción a través de los cuáles este flavonoide ejerce su acción en el tejido adiposo blanco (**Manuscrito 3**).
- 4) Analizar la posible implicación de la oxidación de ácidos grasos a nivel muscular en el efecto de la quercetina sobre el control glucémico (**Manuscrito 3**).

Experimento 3: Estudio del efecto de una combinación de resveratrol y quercetina sobre la acumulación de grasa corporal en ratas alimentadas con una dieta obesogénica.

- 5) Evaluar de forma comparativa el efecto producido por la administración conjunta de resveratrol y quercetina (RSV+Q) con el producido por cada compuesto de forma individual, para determinar si la combinación de ambas moléculas resulta o no más eficaz en la prevención de la acumulación de grasa corporal (**Manuscrito 4**).
- 6) Estudiar algunos de los mecanismos de acción involucrados en los efectos producidos por el resveratrol, la quercetina y especialmente por su combinación (RSV+Q) en el tejido adiposo blanco (**Manuscrito 4**).
- 7) Analizar el posible efecto de marronización del tejido adiposo blanco producido por el resveratrol, la quercetina y la combinación (RSV+Q), e identificar determinados marcadores de este proceso (**Manuscrito 5 y patente**).

## OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICOS

---

- 8) Analizar el efecto producido por el resveratrol y la quercetina administrados de forma individual y especialmente por la combinación de ambos polifenoles (RSV+Q) en la esteatosis hepática y los posibles mecanismos involucrados (**Manuscrito 6**).

Experimento 4: Estudio del efecto de una combinación de resveratrol y quercetina en el proceso de marronización en cultivos primarios de adipocitos procedentes de tejido adiposo inguinal de ratones NMRI.

- 9) Analizar el efecto producido por la combinación RSV+Q y por cada compuesto administrado de forma individual en la expresión de genes involucrados en la termogénesis en cultivos primarios de adipocitos.

# AIM AND OBJECTIVES

---

## AIM

The **aim** of the present PhD thesis was to determine whether the administration of combinations of biologically active molecules are more effective in body fat reduction in an animal model of Wistar rats fed an obesogenic diet (high fat and high sucrose) than each compound administered separately.

## SPECIFIC OBJECTIVES

The **specific objectives** of this experimental work were:

EXPERIMENT 1: To study the effects of a combination of resveratrol and conjugated linoleic acid (CLA) on body fat accumulation in rats fed an obesogenic diet.

- 1) To compare the effects of a combination of resveratrol and CLA with those mediated by each compound administered individually in order to determine whether the combination of both molecules is more effective or not in preventing body fat accumulation (**Manuscript 1**).
- 2) To identify the mechanisms which may be responsible for the effect mediated by resveratrol, CLA and especially by their combination, in white adipose tissue (**Manuscript 2**).

EXPERIMENT 2: Study of the effects of quercetin on body fat accumulation and glycaemic control in rats fed an obesogenic diet.

- 3) To determine the effects of quercetin on body fat accumulation and glycaemic control as well as the mechanism of action underlying these effects in white adipose tissue (**Manuscript 3**).
- 4) To analyze the effect of quercetin in muscle fatty acids oxidation and its possible involvement on glycemic control (**Manuscript 3**).

EXPERIMENT 3: Study of the effect of a combination of resveratrol and quercetin on body fat accumulation in rats fed an obesogenic diet.

- 5) To compare the effects of a combination of resveratrol and quercetin with those mediated by each compound administered individually in order to determine whether the combination of both molecules is or is not more effective in preventing body fat accumulation (**Manuscript 4**).
- 6) To identify the mechanisms which may be responsible for the effect mediated by resveratrol, quercetin and especially by their combination in white adipose tissue (**Manuscript 4**).
- 7) To analyze the possible white adipose tissue browning effect produced by resveratrol, quercetin and the combination of both polyphenols, as well as to identify specific markers of this process (**Manuscript 5 and patent**).

## AIM AND OBJECTIVES

---

- 8) To analyze the effects produced by resveratrol, quercetin and the combination of both polyphenols in hepatic steatosis as well as the mechanisms of action underlying this effect (**Manuscript 6**).

EXPERIMENT 4: Study of the effects of a combination of resveratrol and quercetin on the browning process of white adipocytes in primary cultures from inguinal adipose tissue of NMRI mice.

- 9) To analyze the effects of a combination of resveratrol and quercetin in the expression of some genes involved in thermogenic process in primary cultures of mice adipocytes.

**DISEÑO EXPERIMENTAL/  
EXPERIMENTAL DESIGN**

---





## DISEÑO EXPERIMENTAL

**EXPERIMENTO 1:** Estudio del efecto de una combinación de resveratrol y ácido linoleico conjugado (CLA) sobre la acumulación de grasa corporal en ratas alimentadas con una dieta obesogénica.

Para llevar a cabo el Experimento 1, se emplearon 36 ratas macho Wistar de 6 semanas de edad y un peso inicial de  $180 \pm 2$  g. Los roedores fueron estabulados individualmente en jaulas metabólicas de policarbonato (Techniplast Gazzada, Buguggiate, Italia) en una sala con control de temperatura ( $22 \pm 2$  °C) y de luz. Se estableció un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas, iniciándose el periodo de luz a las 21:00 horas. Tras un periodo de aclimatación de 6 días se dio comienzo al tratamiento. La estabulación de los animales fue llevada a cabo en la Facultad de Farmacia de la Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibertsitatea de acuerdo con el protocolo (CEBA CUEID / 30/2010) aprobado por el Comité de Ética de Experimentación Animal (CEEAA) de la universidad.

Los animales se distribuyeron en los siguientes cuatro grupos de experimentación (Figura 34):

- Grupo control (grupo C; n=9)
- Grupo resveratrol (grupo RSV; n=9): tratado con *trans*-resveratrol a una dosis de 30 mg/kg de peso corporal/día
- Grupo ácido linoleico conjugado (grupo CLA; n=9): tratado con CLA a una dosis de 0,5 g de del isómero *trans*-10,*cis*-12 /100 g de dieta (0,5%) equivalente a una dosis aproximada de éste de 530 mg/kg peso corporal/d.
- Grupo combinación de resveratrol y ácido linoleico conjugado (grupo RSV+CLA; n=9): tratado con dosis 30 mg/kg peso corporal/d de *trans*-resveratrol y 0,5% de *trans*-10,*cis*-12 CLA respectivamente.

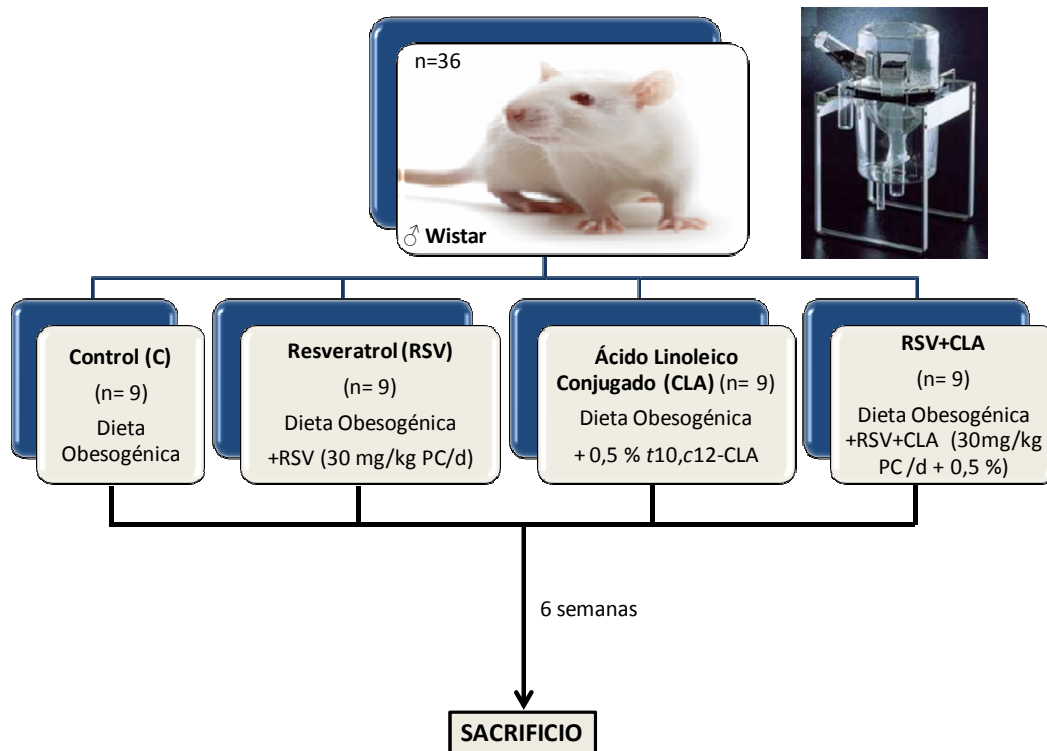
Todos los animales fueron alimentados durante un periodo de 6 semanas con una dieta comercial obesogénica rica en grasa y sacarosa (Harlan Ibérica, TD.06415) cuya composición es la siguiente: 245 g/kg de caseína, 3,5 g/kg de L-cisteína, 85 g/kg de almidón de maíz, 115 g/kg de maltodextrina, 200 g/kg de sacarosa, 195 g/kg de manteca de cerdo, 30 g/kg de aceite de soja, 58 g/kg de celulosa, 43 g/kg mezcla mineral, 3,4 g/kg de calcio fosfato dibásico, 19 g/kg de mezcla vitamínica y 3 g/kg de colina bitartrato. Los animales tuvieron libre acceso al alimento y al agua, y se realizó una medida diaria de la ingesta de la dieta y del peso corporal.

El *trans*-resveratrol (96.6% de pureza) fue incorporado diariamente en la superficie de la dieta, disuelto en etanol absoluto, al comienzo del periodo de oscuridad. Se escogió este momento para hacer coincidir la administración con el comienzo de la fase de actividad de los roedores y, por tanto, intentar que la ingesta fuera casi inmediata, evitando así al máximo la degradación por fotosensibilidad de la forma activa del resveratrol (isómero *trans*).

Para llevar a cabo el tratamiento con CLA en los grupos CLA y RSV+CLA, se utilizó una mezcla comercial de los dos isómeros de ésta molécula (Clarinol®; Lipid Nutrition, Wormerveer, Holanda), que contiene una mezcla equimolecular de las dos isoformas principales del CLA:

## DISEÑO EXPERIMENTAL

*trans*-10,*cis*-12 (molécula biológicamente activa en cuanto a la reducción de la grasa corporal) y *cis*-9,*trans*-11. Dicha mezcla fue añadida a la dieta en una cantidad de 1 g de Clarinol® por cada 100 g de dieta, con el fin de asegurar que el isómero *trans*-10,*cis*-12 se encontrase al 0,5%. Atendiendo al peso medio de los animales y su ingesta media la cantidad administrada del isómero activo *trans*-10,*cis*-12 se corresponde con una dosis aproximada de 530 mg/kg peso corporal/d.



**Figura 34.** Diseño del experimento 1. RSV (resveratrol), CLA (ácido linoleico conjugado), PC (peso corporal).

En la semana previa al sacrificio (semana 5 de tratamiento), y tras un periodo de ayuno de 12 horas, se realizó el test de tolerancia a la glucosa (TTG). Para ello, y tras determinar la glucemia basal, se inyectó glucosa por vía intraperitoneal (2 g/kg de peso corporal) y se hicieron medidas de glucemia a los 30-60-90 y 120 minutos, utilizando para ello la sangre procedente de una vena de la cola del animal. El Área Bajo la Curva (AUC) fue posteriormente calculada mediante el método trapezoidal.

Tras 6 semanas de tratamiento, y después de un periodo de ayuno de 12 horas, los animales fueron sacrificados bajo anestesia con Hidrato de Cloral. Tras comprobar la ausencia de reflejo palpebral de los animales, el sacrificio se llevó a cabo mediante exanguinación cardíaca. La sangre obtenida fue centrifugada (1000xg durante 10 min a 4°C) para la posterior obtención del suero. Los tejidos adiposos de diferentes localizaciones anatómicas [subcutáneo (SC), perirrenal (PR), epididimal (EPI), mesentérico (MS) e interescapular (iBAT)], así como el hígado y los músculos gastrocnemios fueron diseccionados, pesados e inmediatamente congelados en nitrógeno líquido para su posterior análisis. Tanto los tejidos como el suero obtenido, fueron almacenados a -80°C hasta el momento de ser analizados.

## DISEÑO EXPERIMENTAL

---

El resto de determinaciones llevadas a cabo, cuyos protocolos se detallan con precisión en los manuscritos correspondientes, fueron las siguientes:

- Bioquímica sérica: triglicéridos, colesterol total, HDL-colesterol, glucosa, insulina, fructosamina y TNF- $\alpha$ . Para ello se emplearon kits comerciales enzimáticos y basados en técnicas ELISA.
- Calcio intracelular: determinado en células adiposas procedentes del tejido adiposo perirrenal mediante fluorimetría y empleando un kit comercial.
- Actividades enzimáticas en tejido adiposo blanco perirrenal: enzimas implicados en la lipogénesis (FAS) y en la captación de ácidos grasos procedentes de triglicéridos circulantes (HR-LPL). Éstas se determinaron por espectrofotometría y fluorimetría respectivamente.
- Expresión génica de ARNm de enzimas y factores de transcripción implicados en el metabolismo lipídico del tejido adiposo perirrenal: ATGL, HSL y SIRT1 mediante la técnica de RT-PCR a Tiempo Real.
- Expresión proteica de enzimas involucrados en la lipogénesis: ACC total y su forma fosforilada-inactiva mediante la técnica de western blot.
- Cuantificación de los isómeros del CLA en el tejido adiposo perirrenal mediante cromatografía de gases.
- Análisis de los metabolitos del resveratrol presentes en el tejido adiposo perirrenal mediante cromatografía de gases. Este estudio fue llevado a cabo en el departamento de Nutrición y Ciencias de los Alimentos de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona (XaRTA,INSA) .

**EXPERIMENTO 2:** Estudio del efecto de la quercetina sobre la acumulación de grasa corporal y el control glucémico en ratas alimentadas con una dieta obesogénica.

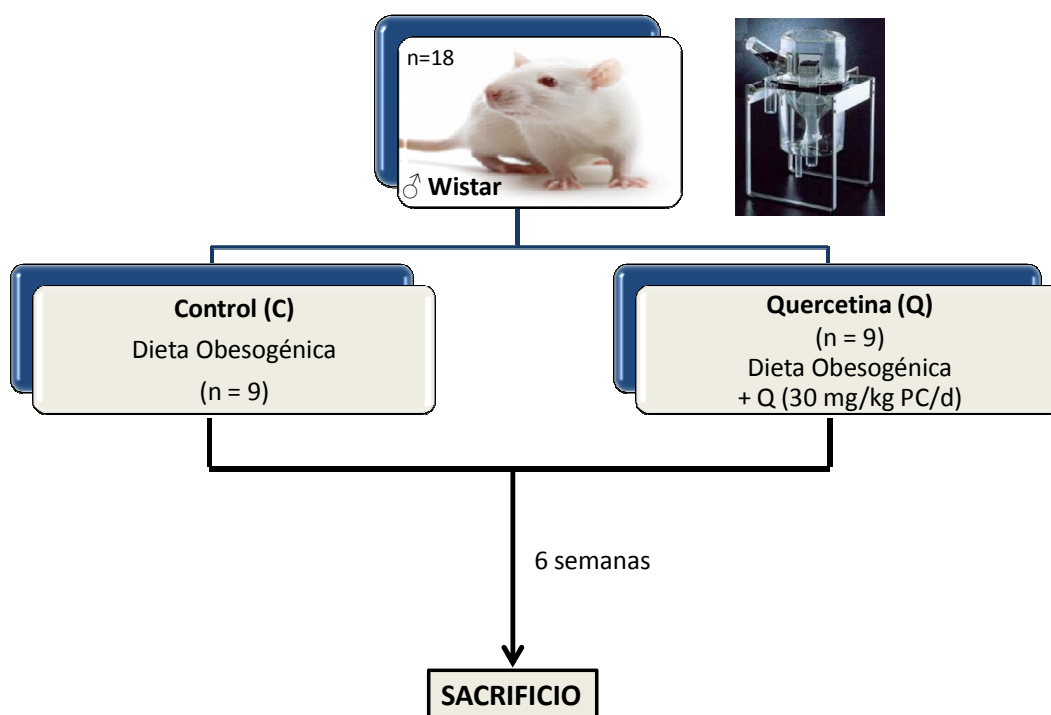
Para llevar a cabo el Experimento 2, se emplearon 18 ratas macho Wistar de 6 semanas de edad y  $180 \pm 2$  g de peso inicial. El protocolo de tratamiento y la estabulación de los animales fue el mismo que para el experimento 1.

Los animales se distribuyeron en los dos siguientes grupos de experimentación (Figura 35):

- Grupo control (grupo C; n=9)
- Grupo quercetina (grupo Q; n=9): tratado con quercetina a una dosis de 30 mg/kg de peso corporal/día

Todos los animales fueron alimentados con la misma dieta obesogénica (hipergrasa e hipersacarosa) mencionada en el experimento anterior (Harlan Ibérica, TD.06415). Del mismo modo, los animales tuvieron libre acceso al alimento y al agua en todo momento, realizándose una medida diaria de la ingesta de la dieta y del peso corporal.

La quercetina (98% de pureza) fue diariamente administrada en la superficie de la dieta, disuelta en etanol absoluto. Transcurridas 5 semanas de tratamiento se realizó el TTG y una semana más tarde, se procedió al sacrificio y procesamiento de los tejidos y sangre de la misma forma indicada para el experimento 1.



**Figura 35.** Diseño del experimento 2. Q (quercetina), PC (peso corporal).

El resto de determinaciones llevadas a cabo, cuyos protocolos se detallan en los manuscritos correspondientes, fueron las siguientes:

- Bioquímica sérica: Glucosa, insulina, fructosamina, triglicéridos y ácidos grasos libres. Para ello se emplearon kits comerciales enzimáticos y basados en técnicas ELISA.
- Actividades enzimáticas en tejido adiposo blanco perirrenal: enzimas implicados en la lipogénesis (G6PDH, EM y FAS) y en la captación de ácidos grasos procedentes de triglicéridos circulantes (LPL). Éstas se determinaron por espectrofotometría y fluorimetría respectivamente.
- Expresión proteica de enzimas involucrados en la lipogénesis en tejido adiposo perirrenal: ACC y su forma fosforilada-inactiva mediante la técnica de western blot.
- Actividades enzimáticas de los enzimas oxidativos en músculo: CPT-1b y CS, mediante técnicas espectrofotométricas.
- Expresión génica de ARNm de enzimas y factores de transcripción implicados en vías oxidativas musculares: PGC1- $\alpha$ , PPAR- $\alpha$ , ACO, CPT-1b, CD36, TFAM, COX-2 y UCP3, mediante la técnica de RT-PCR a Tiempo Real.

## DISEÑO EXPERIMENTAL

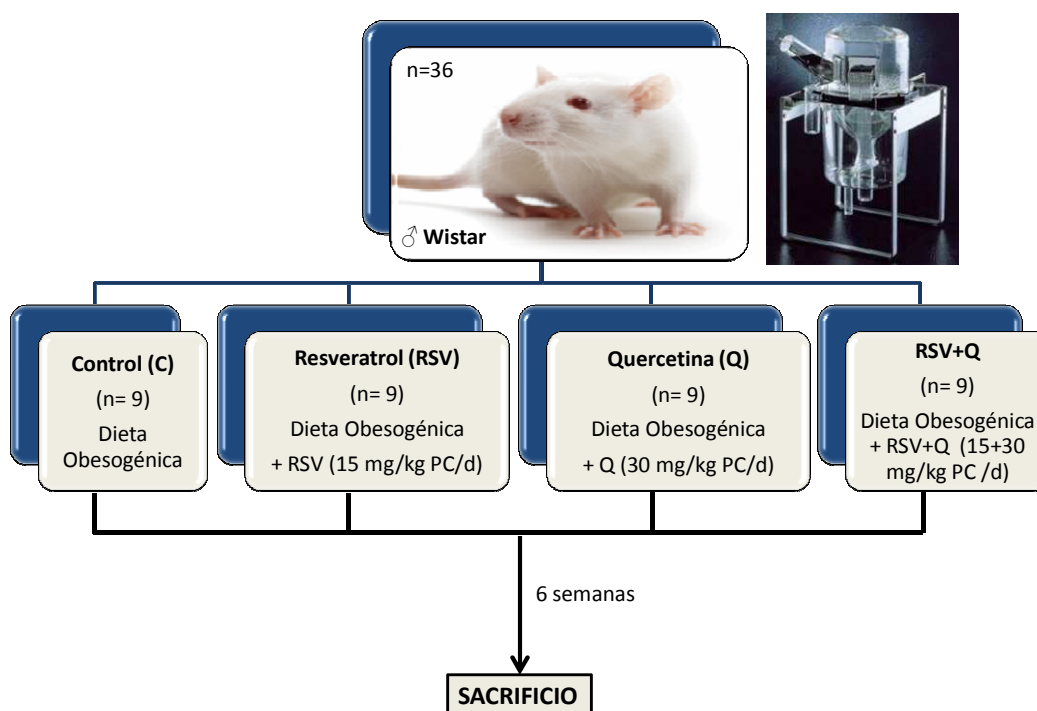
**EXPERIMENTO 3:** Estudio del efecto de una combinación de resveratrol y quercetina sobre la acumulación de grasa corporal en ratas alimentadas con una dieta obesogénica.

Se emplearon 36 ratas macho Wistar de 6 semanas de edad y un peso inicial de  $180 \pm 2$  g. El experimento se realizó bajo las mismas condiciones indicadas para los experimentos 1 y 2. Del mismo modo, los animales se asignaron a cuatro grupos de experimentación (Figura 36):

- Grupo control (grupo C; n=9)
- Grupo resveratrol (grupo RSV; n=9): tratado con resveratrol a una dosis de 15 mg/kg de peso corporal/día
- Grupo quercetina (grupo Q; n=9): tratado con quercetina a una dosis de 30 mg/kg de peso corporal/d
- Grupo combinación de resveratrol y quercetina (grupo RSV+Q; n=9): tratado con dosis 15 mg/kg peso corporal /d + 30 mg/kg peso corporal /d de resveratrol y quercetina, respectivamente.

Todos los animales fueron alimentados con la misma dieta obesogénica y el tratamiento con polifenoles fue llevado a cabo siguiendo los procedimientos descritos anteriormente para cada polifenol.

En este experimento la dieta utilizada fue de Open Source (D12451M) cuya composición es: 233 g/kg de caseína, 3,5 g/kg de L-cisteína, 84,8 g/kg de almidón de maíz, 116,6 g/kg de maltodextrina, 201,4 g/kg de sacarosa, 206,9 g/kg de manteca de cerdo, 29,1 g/kg de aceite de soja, 58,3 g/kg de celulosa, 11,7 g/kg mezcla mineral, 15,2 g/kg de calcio fosfato dibasico, 11,7 g/kg de mezcla vitamínica y 2,3 g/kg de colina bitartrato. Del mismo modo, los animales tuvieron libre acceso al alimento y al agua en todo momento, realizándose una medida diaria de la ingesta de la dieta y del peso corporal.



**Figura 36.** Diseño del experimento 3. RSV (resveratrol), Q (quercetina), PC (peso corporal).

## DISEÑO EXPERIMENTAL

---

Tras 6 semanas de tratamiento, y después de un periodo de ayuno de 12 horas, los animales fueron sacrificados bajo anestesia con Hidrato de Cloral. Durante el sacrificio de los animales, esta vez, además de realizar la recogida de sangre y tejidos tal y como se ha indicado previamente, se procesaron parte de los tejidos para ser posteriormente analizados morfológica e inmuno-histoquímicamente. Para llevar a cabo este procesamiento de muestras, aproximadamente 1 cm<sup>3</sup> de cada tejido adiposo blanco (EPI, PR, MS y SC) fue, en primer lugar fijado en una disolución de *p*-formaldehído al 4%. Transcurridas 24 horas los tejidos fueron lavados con tampón fosfato 0,1 M (pH 7,4) para proceder a continuación a una deshidratación gradual en etanol.

El resto de determinaciones llevadas a cabo, cuyos protocolos se detallan con precisión en los manuscritos correspondientes, fueron las siguientes:

- Bioquímica sérica: triglicéridos, colesterol total, HDL-colesterol, ácidos grasos libres, transaminasas (AST y ALT), glucosa, insulina y fructosamina. Para ello se emplearon kits comerciales enzimáticos y basados en técnicas ELISA.
- Actividades enzimáticas en tejido adiposo blanco perirrenal: enzimas implicados en la lipogénesis (FAS) y en la captación de ácidos grasos procedentes de triglicéridos circulantes (LPL). Éstas se determinaron por espectrofotometría y fluorimetría, respectivamente.
- Expresión proteica de los enzimas implicados en el proceso lipogénico (ACC) y lipolítico (HSL y ATGL) en tejido adiposo blanco perirrenal, y proteína desacoplante 1 (UCP1) en tejido adiposo marrón. Estas expresiones fueron determinadas mediante la técnica de wesern blot.
- Niveles expresión de ARNm de enzimas y marcadores implicados en el proceso de marronización del tejido adiposo blanco (Hocx9, Cidea, Prdm16, CPT-1b y UCP1). Algunos de estos genes también fueron determinados en el tejido adiposo marrón (Prdm16, UCP1, Cidea). Estas determinaciones fueron llevadas a cabo mediante la técnica de RT-PCR a Tiempo Real.
- Análisis morfológico e inmunohistoquímico de todos los tejidos adiposos blancos: mediante técnicas de tinción (Hematoxilina-Eosina) y la utilización de anticuerpos.
- Composición hepática: triglicéridos y colesterol medidos sobre una extracción previa del contenido total de lípidos hepáticos mediante el método de Folch y con el consecuente análisis de éstos mediante la utilización de kits comerciales enzimáticos y basados en técnicas ELISA.
- Actividades enzimáticas en hígado: enzimas implicados en la lipogénesis (FAS y ACC-total y fosforilada o inactiva), en la oxidación de ácidos grasos (CPT-1a) y enzimas relacionados con la densidad y número de mitocondrias (CS). Estas actividades se determinaron por espectrofotometría y en el caso de la ACC, mediante el análisis de la expresión proteica por western blot.
- Niveles expresión de ARNm en hígado de factores de regulación y marcadores del proceso de mitocondriogénesis: PPAR- $\alpha$ , TFAM and NFR-1. Estas determinaciones fueron llevadas a cabo mediante la técnica de RT-PCR a Tiempo Real.

## DISEÑO EXPERIMENTAL

---

**EXPERIMENTO 4:** Estudio del efecto de una combinación de resveratrol y quercetina en el proceso de marronización en cultivos primarios de adipocitos procedentes de tejido adiposo inguinal de ratones NMRI.

Para llevar a cabo este estudio, se realizó un total de 18 experimentos. En primer lugar, se ejecutaron 9 experimentos preliminares con el objetivo de determinar la dosis máxima no tóxica para las células de cada polifenol y la duración del tratamiento (agudo o crónico). Una vez fijados estos dos factores (dosis máxima no tóxica de cada polifenol, 3  $\mu$ M y tipo de tratamiento agudo, de 24 horas), se realizaron otros 4 experimentos para establecer las posibles dosis óptimas de la combinación de RSV+Q. Una vez determinada estas dosis (2+2  $\mu$ M de resveratrol y quercetina respectivamente durante un tratamiento de 24h), se realizaron 5 repeticiones del mismo diseño experimental para obtener resultados concluyentes.

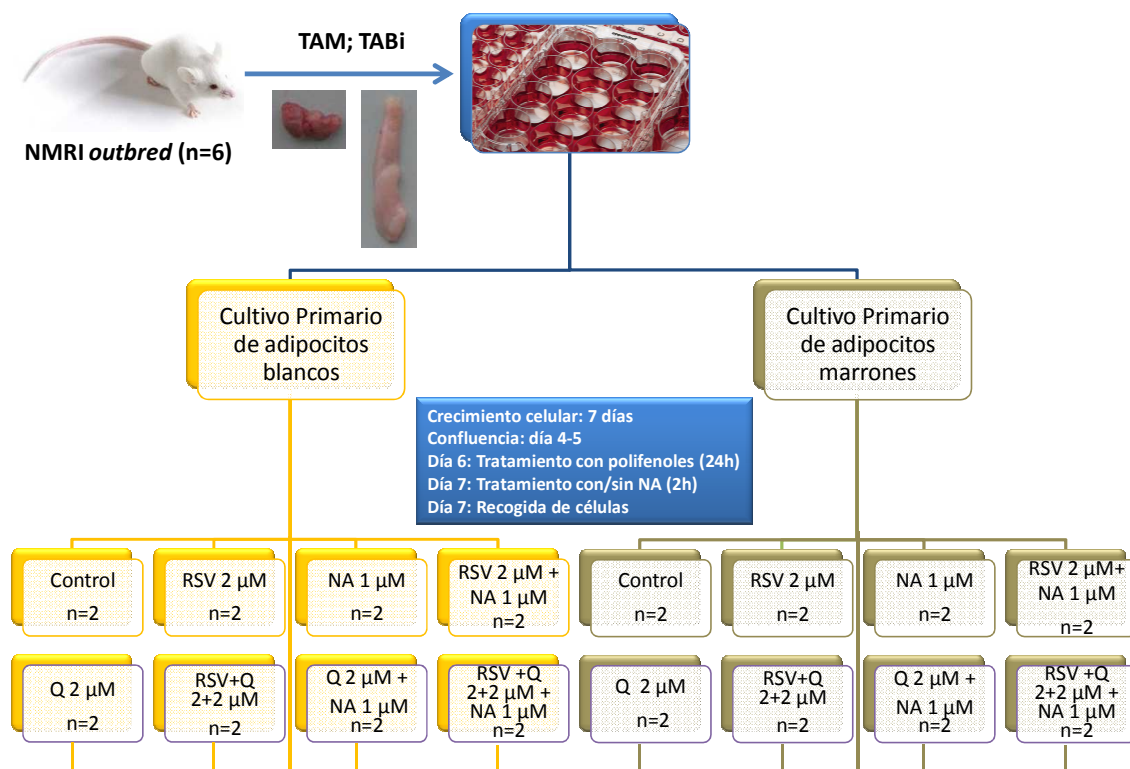
Para cada uno de estos experimentos se utilizaron 6 ratones NMRI *outbred* de 3-4 semanas de edad (18-20 g de peso corporal), previamente estabulados en jaulas que contenían de 4-6 ratones/jaula, en una sala con control de temperatura ( $22 \pm 2$  °C) y luz. Los animales fueron sacrificados bajo anestesia en cámaras de dióxido de carbono, realizando una posterior dislocación cervical. El tejido adiposo marrón de las zonas interescapular, axilar y cervical, así como el tejido adiposo blanco de la zona inguinal, fue diseccionado en condiciones de esterilidad utilizando DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) como medio de preservación de los tejidos hasta la obtención de células.

Se utilizaron placas de 12 pocillos (por cada ratón se obtienen células para 2,5 pocillos), donde las células obtenidas fueron incubadas en un medio con DMEM suplementado con un 10% de suero de ternera, insulina (4 nM), HEPES (10 mM), glutamina (4 mM), penicilina (50 UI), estreptomycin (50  $\mu$ g) y ascorbato de sodio (25  $\mu$ g/mL). A lo largo de 7 días, las células fueron preservadas durante su crecimiento en una incubadora a 37°C con un 8% de CO<sub>2</sub> atmosférico, realizándose cambios del medio cada dos días (días 0-1-3-5).

Todas las células fueron tratadas con resveratrol (2  $\mu$ M), quercetina (2  $\mu$ M) y RSV+Q (2+2  $\mu$ M) el día 6 de crecimiento y durante 24 horas. Adicionalmente, la mitad de las células fueron tratadas durante 2 horas en el día 7 (previa recogida de células) con noradrenalina (NA) 1  $\mu$ M. Tras estas dos horas de incubación con NA, se recogieron las células y se extrajo el ARNm con Trizol para la posterior cuantificación de la expresión del ARNm (UCP1, HOXC9 y Cidea) por RT-PCR a Tiempo Real (Figura 37).



## DISEÑO EXPERIMENTAL



**Figura 37.** Diseño del experimento 4. TAM (tejido adiposo marrón), TABi (tejido adiposo blanco inguinal), RSV (resveratrol), Q (quercetina), NA (noradrenalina).

Este último experimento, se llevó a cabo en el Wenner-Gren Institute de la Universidad de Estocolmo, en el grupo de investigación dirigido por la catedrática Barbara Cannon y el Catedrático Jan Nedergaard, donde la doctoranda realizó una estancia gracias a una ayuda para tal fin concedida por el Gobierno Vasco que ha permitido optar a un doctorado internacional.

# EXPERIMENTAL DESIGN

---

## EXPERIMENTAL DESIGN

**EXPERIMENT 1:** Study of the effects of a combination of resveratrol and conjugated linoleic acid (CLA) on body fat accumulation in rats fed an obesogenic diet.

To perform this first experiment, 36 male Wistar rats ( $180 \pm 2$  g body weight and 6 weeks old) were individually housed in polycarbonate metabolic cages (Techniplast Gazzada, Buguggiate, Italia) in a temperature controlled room ( $22 \pm 2$  °C) and with 12-12h light-dark cycles. After 6 days adaptation period on their arrival at the animal housing, the experiment began. Animal housing was carried out according to the protocol adopted by the Ethics Committee for Animal Experimentation (CEBA CUEID / 30/2010) of the University of The Basque Country.

The animals were randomly divided into four experimental groups (Figure 1):

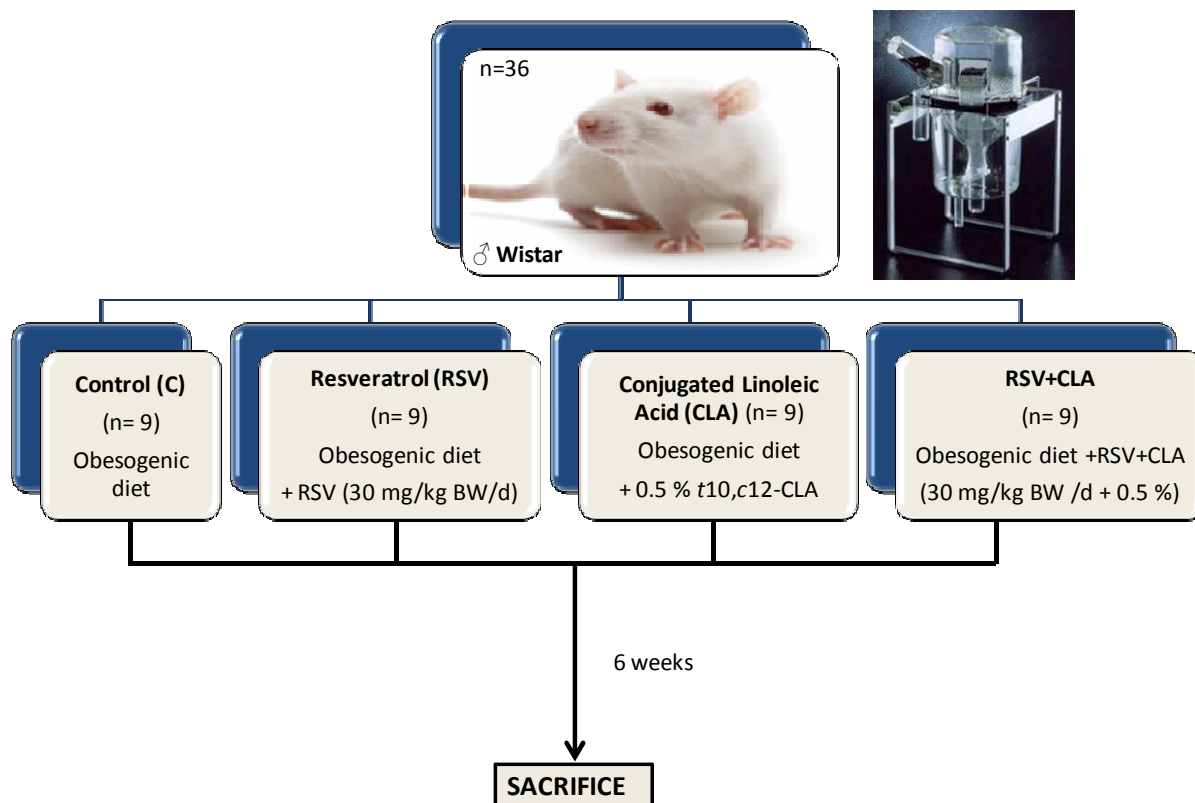
- Control group (C; n = 9)
- Resveratrol group (RSV; n = 9): treated with 30 mg/kg body weight/d of *trans*-resveratrol
- Conjugated linoleic acid group (CLA; n = 9): treated with 0.5 g/100 g diet of *trans*-10,*cis*-12 CLA isomer (0.5%)
- Combination of resveratrol and conjugated linoleic acid group (RSV+CLA; n = 9): treated with 30 mg/kg body weight/d and 0.5% of *trans*-resveratrol and *trans*-10,*cis*-12 CLA respectively

All animals were fed an obesogenic commercial diet high fat and high sucrose (Harlan Ibérica, TD.06415) for six weeks. The diet consisting of: 245 g/kg casein, 3.5 g/kg L-cysteine, 85 g/kg corn starch, 115 g/kg maltodextrin, 200 g/kg sucrose, 195 g/kg lard, 30 g/kg soybean oil, 58 g/kg cellulose, 43 g/kg mineral mix, 3.4 g/kg biphasic calcium phosphate, 19 g/kg vitamin mix and 3 g/kg choline bitartrate. The animals were given free access to food and water and body weight and food intake were measured daily.

*Trans*-resveratrol (96.6% purity) was incorporated onto the diet surface daily, dissolved in absolute ethanol and at the beginning of the dark period. The time of the administration was chosen in order to match *trans* isomer administration with the beginning of the rodent activity phase, and so ensure an immediate intake thus avoiding the photosensitivity degradation of this polyphenol.

Regarding CLA treatment, a commercial equimolar mixture of two CLA isomers, *trans*-10,*cis*-12 (biologically active molecule reducing body fat) and *cis*-9,*trans*-11, was used (Clarinol<sup>®</sup>, Lipid Nutrition, Wormerveer, Netherlands). 1 g of Clarinol<sup>®</sup> per 100 g diet was added in order to ensure a dose of 0,5% of the active isomer *trans*-10,*cis*-12. Considering animal's body weight as well as the intake averages, the administered dose of the active isomer *trans*-10,*cis*-12 corresponds approximately to 530 mg/kg body weight/d.

## EXPERIMENTAL DESIGN



**Figure 34.** First experiment design. RSV (resveratrol), CLA (conjugated linoleic acid), BW (body weight).

One week before the sacrifice (5<sup>th</sup> treatment week) and after 12 hours fasting period, glucose tolerance test (TTG) was performed. After basal glucose determination, 2 g/kg body weight of glucose was intraperitoneally injected in order to take blood glucose measurements at 30-60-90 and 120 minutes, using the blood from the tail vein. The Area Under the Curve (AUC) was then calculated using the trapezoidal method.

After 6 weeks treatment period, and 12 hours fasting period, animals were sacrificed under anesthesia with chloral hydrate. After confirming the absence of eyelash reflex of the animals, sacrifice was performed by cardiac exsanguination. For serum collection the blood obtained was centrifuged (1000xg for 10 min at 4 °C). The fat depots from different anatomical localizations [subcutaneous (SC), perirenal (PR), epididymal (EPI), mesenteric (MS) and interscapular (IBAT)] as well as liver and gastrocnemius muscles were dissected, weighed and immediately frozen in liquid nitrogen for later analysis. Both the tissues and the serum obtained were stored at -80 °C until analysis.

## EXPERIMENTAL DESIGN

---

Other determinations were carried out. Their protocols, which are described in the corresponding manuscripts, were the following:

- Serum parameters: triglycerides, total cholesterol, HDL-cholesterol, glucose, insulin, fructosamine and TNF- $\alpha$  were measured by using commercial kits and ELISA-based techniques.
- Intracellular Calcium: was determined in adipose cells from perirenal adipose tissue by using a commercial kit and fluorimetry.
- Enzyme activities: FAS, an enzyme involved in lipogenesis, and LPL, involved in the uptake of fatty acids from circulating triglycerides, were measured by spectrophotometry and fluorimetry respectively in perirenal white adipose tissue.
- Protein expression: total ACC and its phosphorylated (inactive) form, a rate limiting enzyme involved in lipogenesis process, was measured by Western blotting in perirenal adipose tissue.
- mRNA expression: ATGL, HSL and SIRT1, enzymes involved in lipolysis and regulating lipid metabolism, were measured by RT-PCR Real Time in perirenal adipose tissue.
- CLA isomers were quantified using gas chromatography in perirenal adipose tissue.
- Resveratrol metabolites were quantified using gas chromatography in perirenal adipose tissue. This study was conducted in the Department of Nutrition and Food Science, in the Faculty of Pharmacy of the University of Barcelona (XaRTA, INSA).

**EXPERIMENT 2:** Study of the effects of quercetin on body fat accumulation and glycaemic control in rats fed an obesogenic diet.

To perform this second experiment, 18 male Wistar rats ( $180 \pm 2$  g body weight and 6 weeks old) were housed and treated following the same experimental design as that proposed in the previous study.

The animals were randomly divided into two experimental groups (Figure 2):

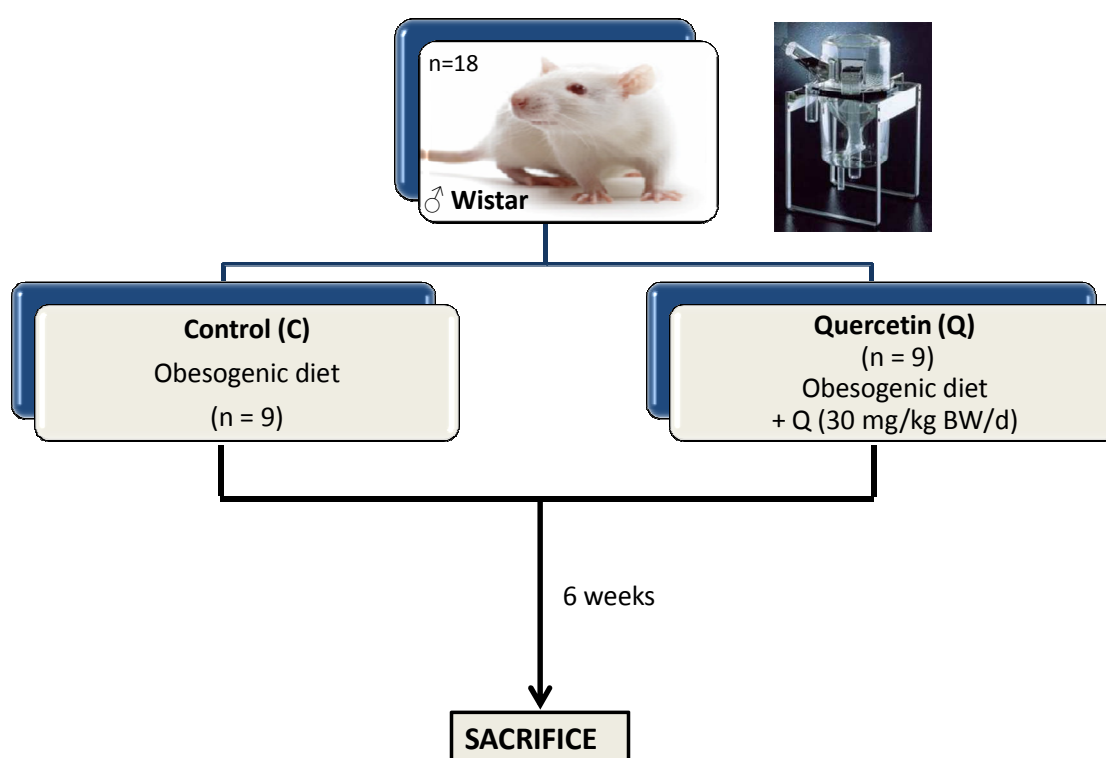
- Control group (C; n = 9)
- Quercetin group (Q; n = 9): treated with 30 mg/kg body weight/d of quercetin.

All animals were fed the same obesogenic diet (high fat and high sucrose) mentioned in the previous experiment (Harlan Ibérica, TD.06415) and also given free access to food and water. Body weight and food intake were measured daily.

As in the first experiment, quercetin (98% purity) was incorporated onto the diet surface daily, dissolved in absolute ethanol and at the beginning of the dark period. After 5 weeks of treatment the GTT was performed and sacrifice was carried out one week later. Serum and tissue collection was performed in the same manner as described for experiment 1.

## EXPERIMENTAL DESIGN

---



**Figure 35.** Second experiment design. Q (quercetin), BW (body weight).

The following determinations, whose protocols are described in the corresponding manuscripts, were carried out:

- Serum parameters: triglycerides, free fatty acids, glucose, insulin and fructosamine were measured by using commercial kits and ELISA-based techniques.
- Enzyme activities: G6PDH, ME and FAS, enzymes involved in lipogenesis, and LPL, involved in the uptake of fatty acids from circulating triglycerides, were measured by spectrophotometry and fluorimetry respectively in perirenal white adipose tissue.
- Protein expression: total ACC and its phosphorylated (inactive) form, a rate limiting enzyme involved in lipogenesis, was measured by Western Blotting in perirenal adipose tissue.
- Enzyme activities: CPT-1b and CS, two oxidative enzymes, were measured by spectrophotometry in muscle.
- mRNA expression: PGC1- $\alpha$ , PPAR- $\alpha$ , ACO, CPT-1b, CD36, TFAM, COX-2 and UCP3, transcription factors and enzymes involved in muscle oxidative pathways, were measured by RT-PCR Real Time in gastrocnemius muscle.

## EXPERIMENTAL DESIGN

**EXPERIMENT 3:** Effect of a combination of resveratrol and quercetin on body fat accumulation in rats fed an obesogenic diet.

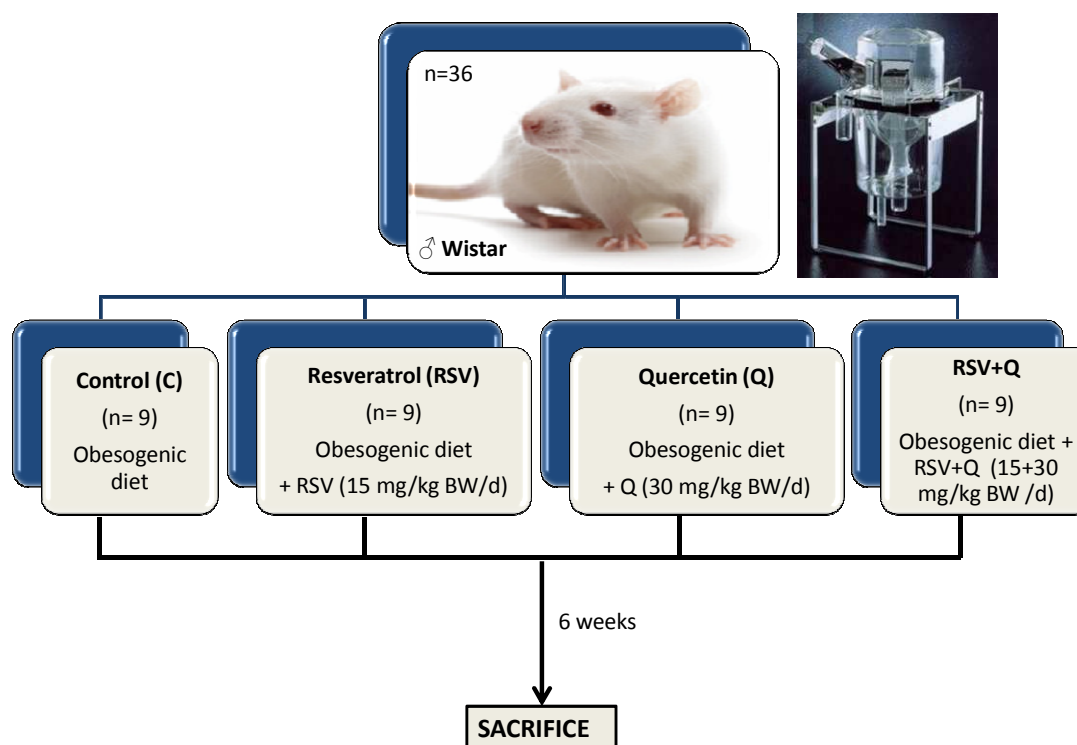
To perform this third experiment, 36 male Wistar rats ( $180 \pm 2$  g body weight and 6 weeks old) were housed and treated following the same experimental design as that proposed in the previous studies.

The animals were randomly divided into four experimental groups (Figure 3):

- Control group (C; n = 9)
- Resveratrol group (RSV; n = 9): treated with 15 mg/kg body weight/d of resveratrol
- Quercetin group (Q; n = 9): treated with 30 mg/kg body weight/d of quercetin
- Combination of resveratrol and quercetin group (RSV+Q; n=9): treated with 15 and 30 mg/kg body weight/d of resveratrol and quercetin respectively.

All animals were fed the same diet and obesogenic and polyphenol treatments were carried out following the procedures described above for each molecule.

In this experiment the diet used was Open Source (D 12451M). The diet consisted of: 233 g/kg casein, 3.5 g/kg L-cysteine, 84.8 g/kg corn starch, 116.6 g/kg maltodextrin, 201.4 g/kg sucrose, 206.9 g/kg lard, 29.1 g/kg soybean oil, 58.3 g/kg cellulose, 11.7 g/kg mineral mix, 15.2 g/kg biphasic calcium phosphate, 11.7 g/kg vitamin mix and 2.3 g/kg choline bitartrate. Similarly, the animals had free access to food and water and body weight and food intake were measured daily.



**Figure 36.** Third experiment design. RSV (resveratrol), Q (quercetin), BW (body weight).

## EXPERIMENTAL DESIGN

---

After 6 weeks of treatment, animal sacrifice and serum and tissue collections were carried out as previously described in the first two experiments. However, for the present experiment part of the tissues were processed differently for morphological and immuno-histochemical analysis. For the purposes of this sampling process about 1 cm<sup>3</sup> of each white adipose tissue (EPI, PR, SC and MS) was first fixed in *p*-phormaldeide (4%) solution. After 24 hours, the tissues were washed with buffer phosphate 0.1 M (pH 7.4) and then gradual dehydration with ethanol was performed.

The determinations, whose protocols are described in the corresponding manuscripts, which were carried out were these:

- Serum parameters: triglycerides, total-cholesterol, HDL-cholesterol, free fatty acids, transaminases (AST and ALT), glucose, insulin and fructosamine were measured by using commercial kits and ELISA-based techniques.
- Enzyme activities: FAS, an enzyme involve in lipogenesis, and LPL, involved in the uptake of fatty acids from circulating triglycerides, were measured by spectrophotometry and fluorimetry respectively in perirenal white adipose tissue.
- Protein expression: total ACC and its phosphorylated (inactive) form, a rate limiting enzyme involved in lipogenesis, ATGL and HSL, the two main lipases, and UCP1, the main thermogenic protein which mostly generates heat in brown adipocytes, were measured by Western Blotting in perirenal adipose tissue. UCP1 protein expression was also measured in interscapular brown adipose tissue.
- mRNA expression: Hoxc9, Cidea, PRDM16, CPT-1b and UCP1, genes markers of the browning process of white adipose tissue, were measured by RT-PCR Real Time in perirenal adipose tissue. Some of these genes were also determined in brown adipose tissue (UCP1 and PRDM16).
- Morphological and immunohistochemical analysis of all white adipose depots were carried out using staining techniques (with hematoxylin-eosin) and UCP1 staining antibody.
- Hepatic composition: triglycerides and cholesterol were measured extracting first hepatic total lipids by Folch technique and analyzing the content using commercial kits and ELISA-based techniques.
- Hepatic enzyme activities: FAS, total-ACC and its phosphorylated form (inactive), CPT-1a, a fatty acid oxidation enzyme, and CS, a mitochondrial density marker, were measured by spectrophotometry in liver.
- Hepatic mRNA expressions: PPAR- $\alpha$ , TFAM and NFR-1, three genes involved in the control of mitochondriogenesis were measured by RT-PCR Real Time in liver.

## EXPERIMENTAL DESIGN

---

**EXPERIMENT 4:** Effects of a combination of resveratrol and quercetin on the browning process of white adipocytes in primary cultures from inguinal adipose tissue of NMRI mice.

To carry out this fourth experiment, a total of 18 *in vitro* experiments were performed. First, 9 preliminary experiments were conducted with the aim of determining the maximum non toxic dose for cells treated with each polyphenol and also to determine the treatment length (acute or chronic). Once these two factors were set (maximum non toxic dose of each polyphenol set at 3  $\mu\text{M}$  and acute treatment of 24 hours), four other experiments were performed to set the optimal doses of resveratrol and quercetin to be combined. Once determined (2+2  $\mu\text{M}$  of resveratrol and quercetin, respectively, for a 24h treatment), 5 repetitions of the same experimental design were performed to obtain conclusive results.

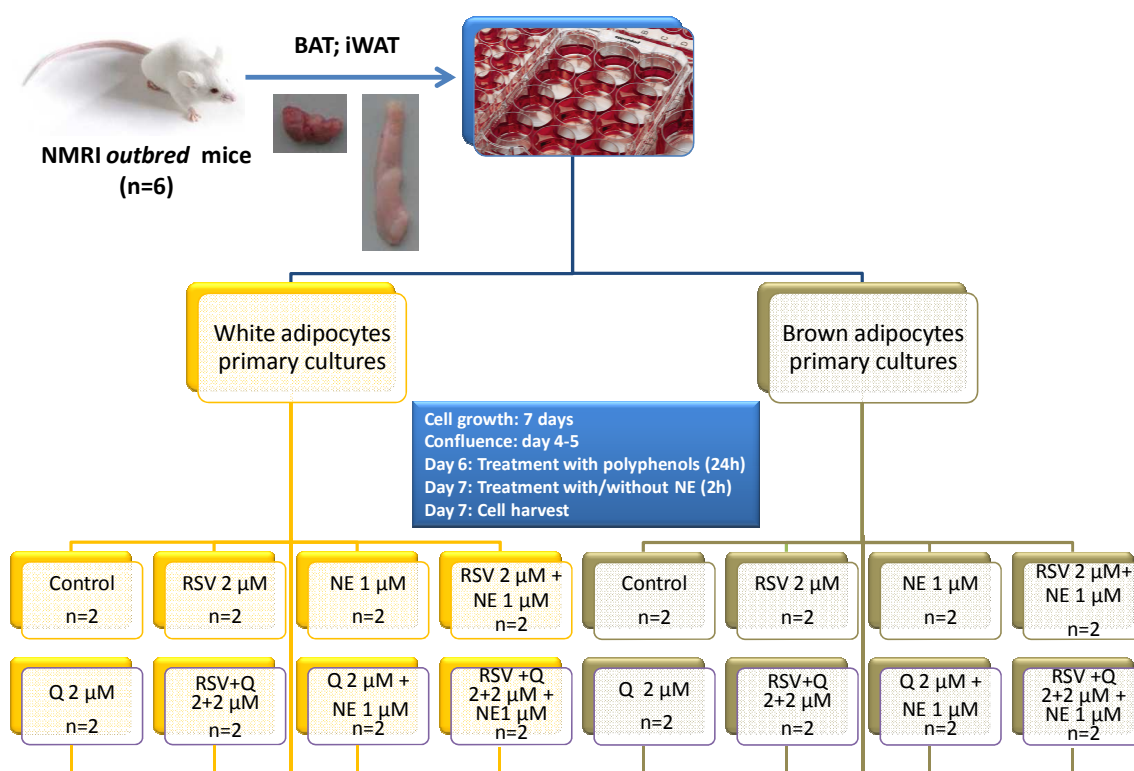
For each of these experiments 6 *outbred* NMRI mice 3-4 weeks old (18-20 g body weight) were used, having been previously housed in cages containing 4-6 mice/cage in a temperature ( $22 \pm 2$  °C) and light controlled room. The animals were sacrificed in chambers under carbon dioxide anesthesia. A subsequent cervical dislocation was carried out. Brown adipose tissues from interscapular, axillar and cervical anatomical locations as well as the inguinal white adipose tissue were dissected under sterile conditions using DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) to preserve the integrity of the cells.

12 well plates were used (for each mouse 2.5 wells of cells are obtained) for cell growth. These were incubated in a medium containing DMEM supplemented with 10% calf serum, insulin (4 nM), HEPES (10 mM), glutamin (4 mM), penicilin (50 IU) and streptomycin (50  $\mu\text{g}$ ) and sodium ascorbate (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Cells were preserved for 7 growth days in an incubator at 37 °C and 8% of  $\text{CO}_2$  atmosphere. Medium changes were done every two days (days 0-1-3-5).

All cells were treated with resveratrol (2  $\mu\text{M}$ ), quercetin (2  $\mu\text{M}$ ) and with the combination RSV+Q (2+2  $\mu\text{M}$ ) on the 6<sup>th</sup> day of growing and over the final 24 hours. In addition, half of the cells were treated for 2 hours on day 7 (before cell harvesting) with norepinephrine (NE) 1  $\mu\text{M}$ . After two hours of incubation with NE, the cells were harvested and mRNA was extracted with Trizol for the subsequent quantification of the UCP1, CideA and HoxC9 gene expressions by RT-PCR Real Time (Figure 4).



## EXPERIMENTAL DESIGN



**Figure 37.** Fourth experiment design. BAT (brown adipose tissue), iWAT (inguinal white adipose tissue), RSV (resveratrol), Q (quercetin), NE (norepinephrine).

This last experiment was conducted in the Wenner-Gren Institute department of Stockholm University, Sweden, in the research group led by Professor Barbara Cannon and Professor Jan Nedergaard.

Both for the development of this Doctoral Thesis and also for the period spent in Stockholm the PhD students were granted a fellowship from the Basque Government. This included financing for going abroad and obtaining an international PhD.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN/  
RESULTS AND DISCUSSION**

---



**Manuscrito 1 - Manuscript 1**

Arias N, Macarulla MT, Aguirre L, Martínez-Castaño MG, Gómez-Zorita S, Miranda J,  
Martínez JA, Portillo MP

***La combinación de resveratrol y ácido linoleico conjugado no resulta útil para prevenir la  
obesidad***

***The combination of resveratrol and conjugated linoleic acid is not useful in preventing  
obesity.***

J. Physiol. Biochem. (2011). 67 8(3), 471-477



## RESULTS AND DISCUSSION

---

### ABSTRACT

*Introduction:* Scientific research is constantly looking for new molecules to use as functional ingredients to combat obesity.

*Purpose:* The aim of the present study was to analyse whether resveratrol and conjugated linoleic acid (CLA) together could reduce body fat more efficiently than their administration separately.

*Material and Methods:* Thirty six male Wistar rats were randomly divided into four groups: controls rats (C), rats treated with resveratrol (RSV), rats treated with CLA (CLA) and rats treated with a combination of resveratrol and CLA (RSV+CLA). All rats were fed on an obesogenic diet. In RSV and RSV+CLA groups the rats received 30 mg resveratrol/kg body weight/d. In CLA and RSV+CLA groups an equimolecular mixture of *trans*-10,*cis*-12 and *cis*-9,*trans*-11 was added to the diet to reach 0.5% of the active isomer *trans*-10,*cis*-12. After 6 weeks of treatment, white adipose tissue from different anatomical locations was dissected and weighed. Serum triacylglycerols, total and HDL-cholesterols, glucose, insulin, fructosamine and TNF- $\alpha$  were measured. A glucose tolerance test was also performed.

*Results:* Separately resveratrol and CLA significantly reduced body fat but did not do so when combined: 20% in the RSV group, 18% in CLA group but 7% in the RSV+CLA group. Resveratrol reduced serum triacylglycerols. No differences were found among groups in serum cholesterol. Resveratrol, as well as the combination RSV+CLA, improved glycaemic control.

*Conclusion:* These results demonstrate that the combination RSV+CLA reduces the effectiveness of each compound on body fat lowering action, but it maintains the positive effect of resveratrol on glycaemic control. Consequently, this combination has no usefulness in obesity prevention.

**Key words:** Resveratrol, conjugated linoleic acid, body fat, insulin resistance, rat

# RESULTS AND DISCUSSION

---

## INTRODUCTION

Obesity is a growing problem worldwide that is reaching epidemic proportions and is associated with an increased mortality risk [1, 10, 33]. Scientific research is constantly looking for new molecules that could be used as dietary functional ingredients in the fight against overweight and obesity.

Conjugated linoleic acid (CLA) has been one of the most widely studied molecules in recent years. In particular, the isomer *trans*-10,*cis*-12 has been shown to be very effective as a body-fat lowering molecule in rodents [7, 8, 14]. However, its efficiency is rather reduced in humans [13, 19, 26]. Several mechanisms of action have been described to explain the reduction in body fat accumulation induced by CLA. Reduced fatty acid uptake from adipose tissue via lipoprotein-lipase and increased fatty acid oxidation in liver and skeletal muscle, as well as reduced pre-adipocyte proliferation and increased apoptosis, are among those most generally demonstrated [35].

Most recently, resveratrol (*trans*-3,5,4'-trihydroxystilbene), a phytoalexin polyphenolic compound which occurs naturally in various plants, has been suggested as a bioactive molecule which is capable of modifying lipid metabolism and preventing body fat accumulation [2, 5, 12, 15, 25]. This compound has been tested in rodents but not in humans. Although little is known concerning the mechanism underlying these effects so far, some authors have shown that resveratrol can bring about reduced adipocyte proliferation, increased apoptosis, decreased lipogenesis and increased lipolysis in adipose tissue [4, 22, 24, 28], and increased fatty acid oxidation in liver and skeletal muscle [2, 5, 12].

There might be other appropriate approaches, as well as monotherapies, which address obesity prevention and/or treatment by simultaneously targeting several pathways with combinations of natural products in order to achieve additive or synergistic effects. The effects of several combinations, such as ajoene+CLA, resveratrol+genistein, have been reported [24, 37].

Following this line of research, and taking into account that the mechanisms of action that justify the effects of resveratrol and CLA are in some cases similar and in other cases different, additive and synergic effects may be expected. Thus, the aim of the present study was to analyse whether a combination of both molecules might reduce fat more efficiently than the administration of both molecules separately.

## MATERIAL AND METHODS

### *Animals, diets and experimental design.*

The experiment was conducted with thirty six male Wistar rats purchased from Harlan Ibérica (Barcelona, Spain), and took place in accordance with the institution's guide for the care and use of laboratory animals (CUEID CEBA/30/2010). The rats were individually housed in polycarbonate metabolic cages (Techniplast Gazzada, Gugugiate, Italy) and placed in an air-conditioned room (22 ± 2°C) with a 12-h day-night rhythm (light on at 21.00). After a 6-day adaptation period, the animals were fed with a commercial obesogenic diet (4.6 kcal/g) supplied by Harlan Ibérica (ref. TD.06415) for 6 weeks. The diet consisted of 245 g/kg casein, 3.5 g/kg L-cystine, 85 g/kg corn starch, 115 g/kg maltodextrin, 200 g/kg sucrose, 195 g/kg lard,

## RESULTS AND DISCUSSION

---

30 g/kg soybean oil, 58 g/kg cellulose, 43 g/kg mineral mix, 3.4 g/kg calcium phosphate dibasic, 19 g/kg vitamin mix and 3 g/kg choline bitartrate. All animals had free access to food and water. Food intake and body weight were measured daily.

For this study rats were randomly divided into four groups (n = 9): controls rats (C), rats treated with resveratrol, rats treated with CLA (CLA) and rats treated with a combination of resveratrol and CLA (RSV+CLA). In groups RSV and RSV+CLA resveratrol was added to the diet, as previously described [15], in amounts that assured that each animal ingested a dose of 30 mg dose resveratrol/kg body weight/d. In groups CLA and RSV+CLA an equimolecular mixture of *trans*-10,*cis*-12 and *cis*-9,*trans*-11 (Clarinol®; Lipid Nutrition, Wormerveer, The Netherlands) was added to the diet to reach 0.5% of the active isomer *trans*-10,*cis*-12. These doses were used because previous studies from our laboratory have found them to be effective in preventing body fat accumulation induced by obesogenic diets [15, 18, 20].

### *Tissue removal and serum sampling.*

At the end of the experimental period blood samples were collected under anaesthesia (chloral hydrate) by cardiac puncture. White adipose tissue from different anatomical locations (EP: epididymal, PR: perirenal, MS: mesenteric and SC: subcutaneous) were dissected, weighed and immediately frozen. Serum was obtained from blood samples after centrifugation (1000 g for 10 min at 4°C). All samples were stored at -80°C until analysis.

### *Serum analysis.*

Commercial kits were used to measure serum parameters: triacylglycerols (Spinreact, Sant Esteve de Bas, Spain), total cholesterol (BioSystems, Barcelona, Spain), HDL-cholesterol (BioSystems, Barcelona, Spain), glucose (BioSystems, Barcelona, Spain), insulin (EZRMI 13K, Linco, St. Charles, MO, USA), fructosamine (Spinreact, Sant Esteve de Bas, Spain) and TNF- $\alpha$  (Invitrogen, Camarillo, Ca, USA).

The Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance (HOMA-IR) was extrapolated to rats because it is a valuable clinical parameter that shows in man a strong relationship with euglycaemic-hyperinsulinemic clamp [17]. It was calculated from insulin and glucose values using Matthews' formula:

$$\text{HOMA-IR} = [\text{Fasting glucose (mmol/L)} \times \text{fasting insulin (mU/L)}] / 22.5$$

### *Glucose tolerance test.*

One week before the sacrifice, rats were deprived of food, but not of water 12 h before the start of the experiment. Glucose load was injected intraperitoneally at the dose of 2 g/kg body weight. Blood glucose was determined at 0, 30, 60 and 120 min from the tail vein. The Area Under the Curve (AUC) was calculated by a trapezoidal method [31].

### *Statistical analysis.*

Results are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Statistical analysis was performed using SPSS 17.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). Repeated measures ANOVA was applied to analyse body weight gain time course and one-way ANOVA followed by Newman Keuls *post*



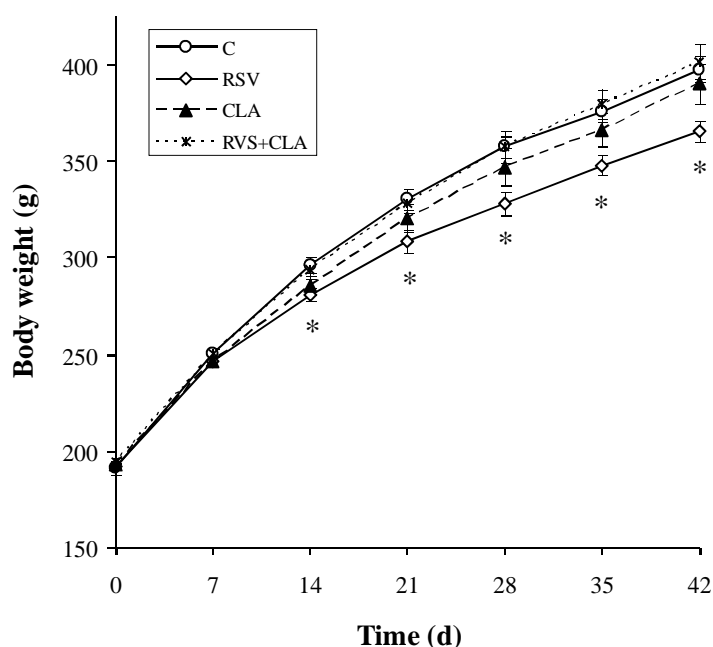
## RESULTS AND DISCUSSION

*hoc* test was used for the remaining parameters. Significance was assessed at the  $P < 0.05$  level.

### RESULTS

*Food intake, body weight, and adipose tissue weights.*

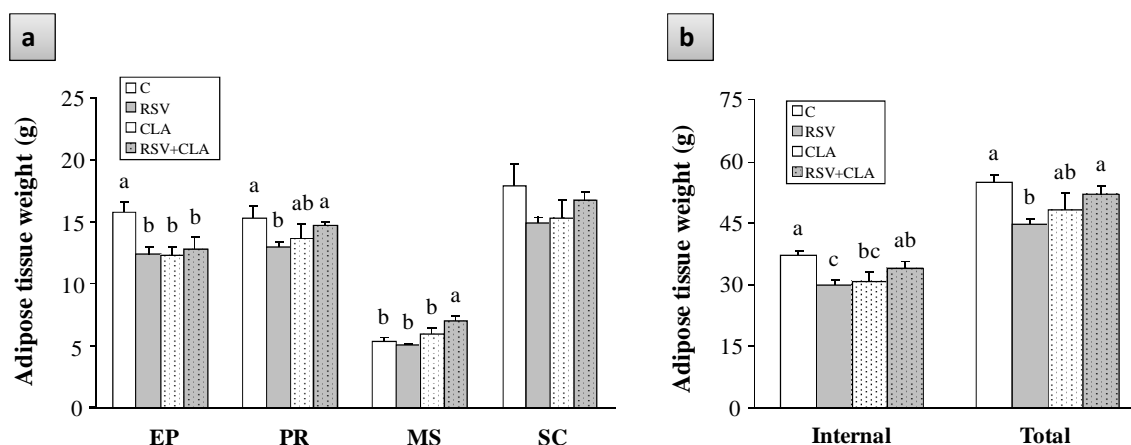
Rats treated with resveratrol showed a significantly lower final body weight than the controls ( $P < 0.01$ ). This difference reached statistical significance on day 14. By contrast, no differences were found between control rats and those treated with either CLA or the combination RSV+CLA (Figure 1). No significant differences were found among groups in terms of food intake ( $17.4 \pm 0.4$  g/d in control group,  $16.3 \pm 0.6$  g/d in RSV group,  $16.2 \pm 0.5$  g/d in CLA group, and  $17.0 \pm 0.4$  g/d in RSV+CLA group).



**Figure 1.** Body weight evolution throughout the 6 weeks of treatment in rats from the experimental groups ( $n = 9$ ). Values are means  $\pm$  SEM. \*Significant differences between RSV group and the control group ( $P < 0.05$ ).

We measured the weights of EP, PR, MS and SC adipose depots. Using these data, internal (EP+PR+MS) and total (EP+PR+MS+SC) depots weights were calculated. In rats treated with resveratrol EP, PR, internal depots and total depots weights were significantly decreased. The reduction in total depots was 20%. With regard to rats treated with CLA, EP, internal depots weights and total depots were significantly decreased too. In this case the reduction in total depots was 18%. Finally, in rats treated with the combination RSV+CLA only epididymal adipose tissue was significantly reduced. The reduction in total depots (7%) did not reach statistical significance. By contrast, mesenteric adipose tissue was significantly greater ( $P < 0.01$ ) than it was in the other three experimental groups (Figures 2a and 2b).

## RESULTS AND DISCUSSION



**Figure 2.** White adipose tissue weights in the experimental groups ( $n = 9$ ). Values are means  $\pm$  SEM. Values not sharing a common letter are significantly different ( $P < 0.05$ ).

### *Serum parameters and glucose tolerance test.*

With regard to serum lipids resveratrol, but not CLA or the combination RSV+CLA, significantly reduced triacylglycerols ( $P < 0.05$ ). No significant differences were found among experimental groups in total cholesterol, HDL-cholesterol and non-HDL-cholesterol (Table 1).

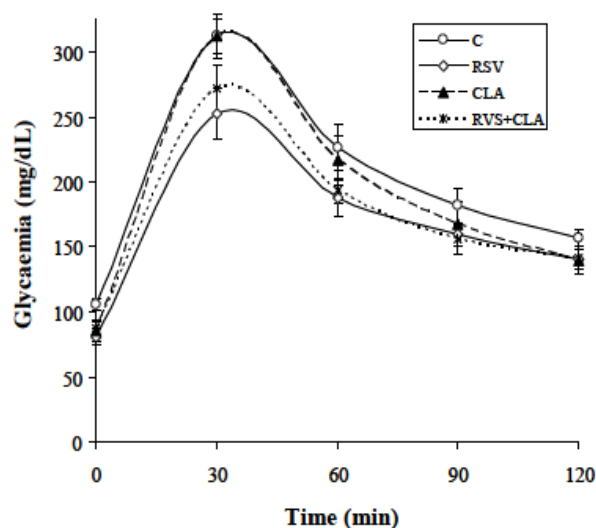
**Table 1.** Serum parameters of rats fed on the experimental diets for 6 weeks.

	C	RSV	CLA	RSV+CLA
Triacylglycerols (mmol/L)	0.73 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	0.54 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	0.71 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	0.79 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>
Total cholesterol (mmol/L)	1.42 $\pm$ 0.09	1.35 $\pm$ 0.02	1.57 $\pm$ 0.10	1.48 $\pm$ 0.09
HDL-cholesterol (mmol/L)	1.07 $\pm$ 0.05	1.11 $\pm$ 0.04	1.12 $\pm$ 0.04	1.12 $\pm$ 0.04
Non-HDL-cholesterol (mmol/L)	0.35 $\pm$ 0.07	0.24 $\pm$ 0.04	0.40 $\pm$ 0.03	0.44 $\pm$ 0.05
Glucose (mmol/L)	5.80 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>	4.42 $\pm$ 0.53 <sup>b</sup>	4.55 $\pm$ 0.31 <sup>b</sup>	5.09 $\pm$ 0.36 <sup>ab</sup>
Insulin (mU/L)	36.8 $\pm$ 7.4 <sup>a</sup>	16.6 $\pm$ 4.0 <sup>b</sup>	34.7 $\pm$ 9.8 <sup>a</sup>	18.0 $\pm$ 1.7 <sup>b</sup>
HOMA-IR	9.5 $\pm$ 1.9 <sup>a</sup>	2.8 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>	6.6 $\pm$ 2.2 <sup>ab</sup>	3.9 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>
Fructosamine ( $\mu$ mol/L)	346 $\pm$ 12 <sup>a</sup>	306 $\pm$ 10 <sup>b</sup>	324 $\pm$ 9 <sup>ab</sup>	317 $\pm$ 6 <sup>b</sup>
TNF- $\alpha$ (ng/L)	29.9 $\pm$ 1.1	29.9 $\pm$ 1.2	30.7 $\pm$ 0.9	32.7 $\pm$ 1.5

Values are means  $\pm$  SEM ( $n = 9$ ). Values in the same row with different subscript are significantly different at  $P < 0.05$  as determined by Newman-Keuls test.

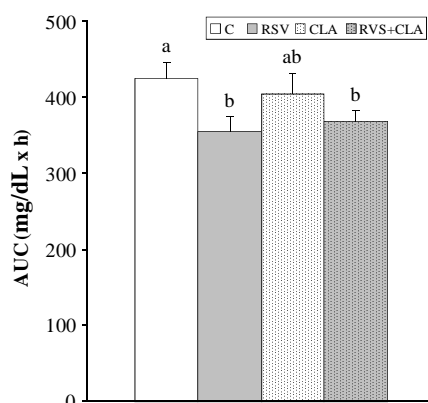
As far as glycaemic control is concerned, resveratrol showed a positive effect because glucose, fructosamine and insulin levels were significantly reduced, and consequently HOMA-IR was decreased. By contrast, no change in HOMA-IR values was induced by CLA. When both molecules were combined, the reduction in insulin resistance induced by resveratrol was maintained, as shown by decreased HOMA-IR values, although the reduction in fasting glucose levels did not reach the level of statistical significance (Figure 3).

## RESULTS AND DISCUSSION



**Figure 3.** Glycaemic response in glucose tolerance test in the experimental groups (n = 9). Values are means  $\pm$  SEM.

Concerning glucose tolerance test, although no significant differences were found in glycaemic values for each experimental time among groups, in the case of RSV and RSV+CLA groups the AUC was significantly decreased (Figures 4).



**Figure 4.** Area Under the Curve (AUC) of glucose tolerance test in the experimental groups (n = 9). Values are means  $\pm$  SEM. Values not sharing a common letter are significantly different (P < 0.05).

Finally, serum TNF- $\alpha$  levels were assessed as a marker of inflammatory status. No significant differences were found among experimental groups (Table 1).

# RESULTS AND DISCUSSION

---

## DISCUSSION

The results here reported show that resveratrol induced a reduction in body weight in rats fed an obesogenic diet (high-fat, high-sucrose), which was not due to reduced food intake. This effect was accounted for, at least in part, by a significant decrease in adipose depot size. Epididymal and perirenal were the most sensitive depots. These results confirm our previous results obtained in another strain of rats (Sprague-Dawley) also treated with resveratrol at a dose of 30 mg/kg body weight/day [15], and are in good accordance with other reported studies carried out in mice [12] or obese Zucker rats [25].

CLA also induced a significant reduction in adipose tissue size, without changes in body weight. In this case epididymal depot was the most sensitive. As in the case of resveratrol, these results confirm our previous results [18, 19], and are in good accordance with the vast literature reporting the effects of CLA on body fat accumulation in rodents [14]. The fact that body weight remained unchanged despite a reduction in body fat may be due to the well-known anabolic effect of the *cis-9,trans-11* CLA isomer [7, 16], present in the CLA mixture.

It can be observed that the efficiencies of resveratrol and CLA are quite similar, at the doses used in the present study, because no differences were found between rats treated with these compounds when the size of adipose tissues from different anatomical locations was analysed. In fact, the reduction in total fat pads was 20% in RSV group and 18% in CLA group.

Taking into account that some of the mechanisms of action of resveratrol and CLA can be complementary and other acts through the same metabolic pathways, additive or even synergic effects could be expected when they are administered together. Thus, we believed that the administration of a combination of resveratrol and CLA could lead to a greater reduction of body fat accumulation than the administration of each one separately. However, this was not the case. Surprisingly, rats treated with the RSV+CLA combination did not show a greater decrease in body fat than rats from RSV and CLA groups. Indeed, adipose tissue mass was less reduced (7%) than when resveratrol and CLA were administered separately. It should be emphasized furthermore that mesenteric adipose tissue was significantly increased (+29%) in RSV+CLA group when compared with the control group. This means that the administration of these two molecules together reduces their anti-obesity properties.

As far as we know this combination has not been tested under *in vivo* conditions. However, Kennedy *et al.* [11] published a study carried out in human adipocytes. Their results are in good accordance with those reported in the present study. *In vitro*, resveratrol attenuated the delipidation induced by the *trans-10,cis-12* CLA isomer. In order to explain this effect, they proposed several explanations. On one hand, resveratrol blocks *trans-10,cis-12* CLA-mediated a) increase in intracellular calcium concentration and b) suppression of PPAR $\gamma$  activity, and on the other hand *trans-10,cis-12* CLA decreases ARNm levels of SIRT1, a protein deacetylase that plays a crucial role in resveratrol effects [3, 9].

Controversial results have been published concerning the hypolipemic effects of CLA [7]. Thus, in the present study we analysed the effects of the combination RSV+CLA on serum lipids. When total cholesterol, HDL-cholesterol and non-HDL-cholesterol were analysed, no differences were found among the four experimental groups. This means that the

## RESULTS AND DISCUSSION

---

administration of these molecules, either alone or in combination, did not affect serum lipid levels, at least under our experimental conditions, except in the case of RSV group, which exhibited lower triacylglycerol values.

The effects of CLA on glucose homeostasis have created a great concern. It has been reported that CLA, and more specifically the *trans*-10,*cis*-12 isomer, induces insulin resistance [7, 34]. Nevertheless, this effect has been mainly observed in mice [23]. Meanwhile it has been suggested that resveratrol improves insulin action [27, 28-30]. Thus, it could be hypothesized that by administering both molecules the negative effect of CLA could be abolished. In the present study these effects were not observed. First of all, CLA did not induce insulin resistance, as demonstrated by HOMA-IR and glucose tolerance test values, probably because the experimental model used was the rat. The literature shows that rats are less sensitive to the effects of CLA than mice [7]. By contrast, as expected animals treated with resveratrol showed improved insulin function when compared with the controls.

With regard to animals in RSV+CLA group, it is important to bear in mind that they showed a significant increase in mesenteric adipose tissue, the main responsible for insulin resistance induction in fattening [32]. Nevertheless, the expected impaired insulin function was not observed in these animals. What is more, these animals showed improved glycaemic control. The positive effect of resveratrol was maintained in the combination RSV+CLA.

Obesity is considered to be a chronic low inflammatory state and is characterized by an intensified infiltration of macrophages. Adipocytes and infiltrating macrophages produce some proinflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$  and IL-6 that lead to this situation [6, 36]. In the present study serum levels of TNF- $\alpha$  were analysed in order to determine the effects of resveratrol, CLA and their combination on the inflammatory process. No significant differences were found among the four experimental groups, suggesting that the analysed molecules had neither a positive or negative effect on inflammation. It has been reported that RSV attenuates the inflammation induced by the *trans*-10,*cis*-12 CLA isomer in human adipocytes [11]. In the present study the CLA mixture did not induce inflammation and so resveratrol was not able to show this effect. In fact, Palsamy *et al.* [21] showed that while resveratrol reduced TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 levels in adipose tissue from diabetic rats showing an inflammatory status, it did not modify these parameters in normal rats.

Taken together, our results demonstrate that the combination of resveratrol and CLA reduces the effectiveness of each compound on body fat lowering action, but it maintains the positive effect of resveratrol on glycaemic control. As a result, it can be proposed that this combination is not useful for obesity prevention.

### *Acknowledgements*

This study was supported by grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2008-01005-ALI), Instituto de Salud Carlos III (RETIC PREDIMED) and Gobierno Vasco (GIC 07/120-IT-265-07). Resveratrol was a generous gift from Monteloeder (Elche, Alicante, Spain) and CLA from Lipid Nutrition (Wormerveer, The Netherlands). N. Arias is a recipient of a doctoral fellowship from the Gobierno Vasco.

## RESULTS AND DISCUSSION

---

### REFERENCES

- [1] Adams KF, Schatzkin A, Harris TB, Kipnis V, Mouw T, Ballard-Barbash R, Hollenbeck A, Leitzmann MF (2006) Overweight, obesity, and mortality in a large prospective cohort of persons 50 to 71 years old. *N Engl J Med* 355:763-778
- [2] Ahn J, Cho I, Kim S, Kwon D, Ha T (2008) Dietary resveratrol alters lipid metabolism-related gene expression of mice on an atherogenic diet. *J Hepatol* 49:1019-1028
- [3] Alcaín FJ, Villalba JM (2009) Sirtuins activators. *Expert Opin Ther Pat* 19:403-414
- [4] Bai L, Pang WJ, Yang YJ, Yang GS (2008) Modulation of Sirt1 by resveratrol and nicotinamide alters proliferation and differentiation of pig preadipocytes. *Mol Cell Biochem* 307:129-140
- [5] Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta EG, Le Couteur D, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, de Cabo R, Sinclair DA (2006) Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 444:337-342
- [6] Berg AH, Scherer PE (2005) Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ Res* 96:939-949
- [7] Bhattacharya A, Banu J, Rahman M, Causey J, Fernandes G (2006) Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease. *J Nutr Biochem* 17:789-810
- [8] Churrua I, Fernández-Quintela A, Portillo MP (2009) Conjugated linoleic acid isomers: differences in metabolism and biological effects. *Biofactors* 35:105-111
- [9] Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B, Sinclair DA (2003) Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 425:191-196
- [10] James PT, Rigby N, Leach R; International Obesity Task Force (2004) The obesity epidemic, metabolic syndrome and future prevention strategies. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 11:3-8
- [11] Kennedy A, Overman A, Lapoint K, Hopkins R, West T, Chuang CC, Martínez K, McIntosh M. (2009) Conjugated linoleic acid-mediated inflammation and insulin in human adipocytes are attenuated by resveratrol. *J Lipid Res* 50:225-232
- [12] Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P, Elliott P, Geny B, Laakso M, Puigserver P, Auwerx J (2006) Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell* 127:1109-1122
- [13] Larsen TM, Toubro S, Astrup A (2003) Efficacy and safety of dietary supplements containing CLA for the treatment of obesity: evidence from animal and human studies. *J Lipid Res* 44:2234-2241
- [14] Li JJ, Huang CJ, Xie D (2008) Anti-obesity effects of conjugated linoleic acid, docosahexaenoic acid, and eicosapentaenoic acid. *Mol Nutr Food Res* 52:631-645
- [15] Macarulla MT, Alberdi G, Gómez S, Tueros I, Bald C, Rodríguez VM, Martínez JA, Portillo MP (2009) Effects of different doses of resveratrol on body fat and serum parameters in rats fed a hypercaloric diet. *J Physiol Biochem* 65:369-376
- [16] Martin JC, Valeille K (2002) Conjugated linoleic acids: all the same or to everyone its own function? *Reprod Nutr Dev* 42:525-536

## RESULTS AND DISCUSSION

---

- [17] Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC (1985) Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28: 412-419.
- [18] Miranda J, Fernández-Quintela A, Macarulla MT, Churruga I, García C, Rodríguez VM, Simón E, Portillo MP (2009) A comparison between CLNA and CLA effects on body fat, serum parameters and liver composition. *J Physiol Biochem* 65:25-32
- [19] Navarro V, Fernández-Quintela A, Churruga I, Portillo MP (2006) The body-fat lowering effect of conjugated linoleic acid: a comparison between animal and human studies. *J Physiol Biochem* 62:137-147
- [20] Navarro V, Zabala A, Macarulla MT, Fernández-Quintela A, Rodríguez VM, Simón E, Portillo MP (2003) Effects of conjugated linoleic acid on body fat accumulation and serum lipids in hamsters fed an atherogenic diet. *J Physiol Biochem* 59:193-199
- [21] Palsamy P, Sivakumar S, Subramanian S (2010) Resveratrol attenuates hyperglycemia-mediated oxidative stress, proinflammatory cytokines and protects hepatocytes ultrastructure in streptozotocin-nicotinamide-induced experimental diabetic rats. *Chem Biol Interact* 186:200-210
- [22] Picard F, Kurtev M, Chung N, Topark-Ngarm A, Senawong T, Machado De Oliveira R, Leid M, McBurney MW, Guarente L (2004) Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature* 429:771-776
- [23] Poirier H, Niot I, Clément L, Guerre-Millo M, Besnard P (2005) Development of conjugated linoleic acid (CLA)-mediated lipotrophic syndrome in the mouse. *Biochimie* 87:73-79
- [24] Rayalam S, Della-Fera MA, Yang JY, Park HJ, Ambati S, Baile CA (2007) Resveratrol potentiates genistein's antiadipogenic and proapoptotic effects in 3T3-L1 adipocytes. *J Nutr* 137:2668-2673
- [25] Rivera L, Morón R, Zarzuelo A, Galisteo M (2009) Long-term resveratrol administration reduces metabolic disturbances and lowers blood pressure in obese Zucker rats. *Biochem Pharmacol* 77:1053-1063
- [26] Salas-Salvadó J, Márquez-Sandoval F, Bulló M (2006) Conjugated linoleic acid intake in humans: a systematic review focusing on its effect on body composition, glucose, and lipid metabolism. *Crit Rev Food Sci Nutr* 46:479-488
- [27] Sharma S, Misra CS, Arumugam S, Roy S, Shah V, Davis JA, Shirumalla RK, Ray A (2011, in press) Antidiabetic activity of resveratrol, a known SIRT1 activator in a genetic model for type-2 diabetes. *Phytother Res*. Doi:10.1002/ptr.3221
- [28] Szkudelska K, Nogowski L, Szkudelski T (2009) Resveratrol, a naturally occurring diphenolic compound, affects lipogenesis, lipolysis and the antilipolytic action of insulin in isolated rat adipocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 113:17-24
- [29] Szkudelska K, Szkudelski T (2010) Resveratrol, obesity and diabetes. *Eur J Pharmacol* 635:1-8
- [30] Szkudelski T (2008) The insulin-suppressive effect of resveratrol- an in vitro and in vivo phenomenon. *Life Sci* 82:430-435
- [31] Tai MM (1994) A mathematical model for the determination of total area under glucose tolerance and other metabolic curves. *Diabetes Care* 17:152-154.
- [32] Tchernof A (2007) Visceral adipocytes and the metabolic syndrome. *Nutr Rev* 65:S24-S29

## RESULTS AND DISCUSSION

---

- [33] Tresaco B, Bueno G, Moreno LA, Garagorri JM, Bueno M (2003) Insulin resistance and impaired glucose tolerance in obese children and adolescents. *J Physiol Biochem* 59:217-223
- [34] Tricon S, Burdge GC, Willimas CM, Calder PC, Yaqoob, P (2005) The effects of conjugated linoleic acid on human health-related outcomes. *Proc Nutr Soc* 64:171-182
- [35] Wang YW, Jones PJ (2004) Conjugated linoleic acid and obesity control: efficacy and mechanisms. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28:941-955
- [36] Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AWJr (2003) Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112:1796-1808
- [37] Yang JY, Della-Fera MA, Hausman DB, Baile CA (2007) Enhancement of ajoene-induced apoptosis by conjugated linoleic acid in 3T3-L1 adipocytes. *Apoptosis* 12:1117-1128





## Manuscrito 2 - Manuscript 2

Arias N, Miranda J, Macarulla MT, Aguirre L, Fernández-Quintela A, Andrés-Lacueva C, Urpissarda M, Portillo MP

***La combinación de resveratrol y ácido linoleico conjugado disminuye los efectos individuales ejercidos por estas dos moléculas en el metabolismo de triglicéridos del tejido adiposo.***

***The combination of resveratrol and conjugated linoleic acid attenuates the individual effects of these molecules on triacylglycerol metabolism in adipose tissue***

Eur. J. Nutr., (2013) 53 (2): 575-582



## RESULTS AND DISCUSSION

---

### ABSTRACT

*Introduction:* The combination resveratrol+conjugated linoleic acid (RSV+CLA) did not show the body-fat lowering effect exhibited by these molecules when administered separately.

*Purpose:* This study aimed to find metabolic explanations for this situation in an experimental model of diet-induced obesity.

*Methods:* Thirty six male Wistar rats were divided into four groups: rats treated with saline (C), resveratrol (RSV), conjugated linoleic acid (CLA) or a combination of these molecules (RSV+CLA).

*Results:* Rats treated with RSV+CLA did not show the reduction in heparin-releasable lipoprotein lipase (HR-LPL) and fatty acid synthase (FAS) activities observed in RSV group or the increased hormone sensitive lipase (HSL) expression found in RSV and CLA groups. These animals showed reduced sirtruin 1 (SIRT1) expression and CLA isomer amounts in adipose tissue. Finally, intracellular  $Ca^{2+}$  concentration was increased.

*Conclusion:* The attenuation of the effects induced in adipose tissue triacylglycerol metabolism by resveratrol and CLA separately, such as the decrease in lipogenesis and fatty acid uptake, and the increase in lipolysis, contributes to explain the lack of body-fat lowering effect of the combination RSV+CLA.

**Key words:** resveratrol, conjugated linoleic acid, combination, adipose tissue, lipogenesis, lipases

# RESULTS AND DISCUSSION

---

## INTRODUCTION

The prevalence of obesity in western societies has increased dramatically in recent years. As a result, scientific research is constantly looking for new molecules that could be used as dietary functional ingredients in the fight against this disease. In recent years a great deal of research has focussed on conjugated linoleic acid (CLA) due to the body fat-lowering effect of the *trans*-10,*cis*-12 isomer, which is very strong in rodents but rather mild in humans [1-5]. Reduced fatty acid uptake from adipose tissue via lipoprotein-lipase and increased fatty acid oxidation in liver and skeletal muscle, as well as reduced pre-adipocyte proliferation and increased apoptosis, are among the mechanisms of action described to explain CLA-induced body fat reduction [2]. The effects on *de novo* lipogenesis are controversial [6-10].

More recently, the preventive effect of resveratrol (RSV) on body fat accumulation has been demonstrated in rodents [11-17] and humans [18]. It seems that this polyphenol reduces adipocyte proliferation, increases apoptosis, decreases lipogenesis and increases lipolysis in adipocytes or adipose tissue [19-24], and increases mitochondriogenesis and thus fatty acid oxidation in liver and skeletal muscle [11-13].

In this field of research, the combination of various active molecules appears to be an interesting tool due to potential additive and synergistic effects among them. The effects of some of these combinations have been reported, namely, ajoene+CLA, resveratrol+genistein, resveratrol+genistein+quercetin, vitamin D+genistein, xanthohumol+guggulsterone, genistein+guggulsterone, vitamin D+guggulsterone and leucine+resveratrol [20, 25-30].

Taking into account that RSV and CLA reduce body fat through mechanisms of action which are either similar or complementary, administering a combination of RSV+CLA could be expected to produce a greater reduction in body fat accumulation than would occur administering each molecule separately. Moreover, another additional interest of this combination is that some of the potential deleterious effects of CLA, such as induction of insulin resistance [31, 32], could be prevented by resveratrol, which has been reported to ameliorate glycaemic control [33, 34]. However, when we designed an experiment to test this hypothesis, rats treated with the combination RSV+CLA surprisingly did not show a significantly reduced amount of body fat [35]. In the light of these results, the aim of the present study was to find metabolic reasons which might explain this surprising situation in this precise cohort of animals.

## MATERIAL AND METHODS

### *Animals, diets and experimental design*

The experiment was conducted with thirty six male Wistar rats purchased from Harlan Ibérica (Barcelona, Spain), and took place with the approval of the Ethical Committee of the University of the Basque Country (document reference CUEID CEBA/30/2010), which follows the European regulations (European Convention- Strasburg 1986, Directive 2003/65/EC and Recommendation 2007/526/EC). The rats were individually housed in polycarbonate metabolic cages (Techniplast Gazzada, Guguggiate, Italy) and placed in an air-conditioned room (22 ± 2°C) with a 12-h day-night rhythm (light on at 21.00). After a 6-day adaptation period, the animals were fed with a commercial obesogenic diet (4.6 kcal/g) supplied by Harlan Ibérica

## RESULTS AND DISCUSSION

---

(ref. TD.06415) for 6 weeks. The diet consisted of 245 g/kg casein, 3.5 g/kg L-cystine, 85 g/kg corn starch, 115 g/kg maltodextrin, 200 g/kg sucrose, 195 g/kg lard, 30 g/kg soybean oil, 58 g/kg cellulose, 43 g/kg mineral mix, 3.4 g/kg calcium phosphate dibasic, 19 g/kg vitamin mix and 3 g/kg choline bitartrate. All animals had free access to food and water.

For this study rats were randomly divided into four groups (n = 9): control rats (C), rats treated with resveratrol (RSV), rats treated with conjugated linoleic acid (CLA) and rats treated with a combination of resveratrol and conjugated linoleic acid (RSV+CLA). In groups RSV and RSV+CLA resveratrol was added to the diet, as previously described [36], in amounts that assured that each animal ingested a dose of 30 mg resveratrol/kg body weight/d. Resveratrol was supplied by Monteloeder (Elche, Spain). In groups CLA and RSV+CLA an equimolecular mixture of *trans*-10,*cis*-12 and *cis*-9,*trans*-11 (Clarinol®; Lipid Nutrition, Wormerveer, The Netherlands) was added to the diet to reach 0.5% of the active isomer *trans*-10,*cis*-12. These doses were chosen because in previous studies from our laboratory we have found them to be effective in preventing body fat accumulation induced by obesogenic diets [14, 37, 38].

### *Tissue removal and serum sampling*

At the end of the experimental period white adipose tissue from different anatomical locations (epididymal, perirenal, mesenteric and subcutaneous) was dissected, weighed, immediately frozen and stored at -80°C until analysis. All determinations were carried out in perirenal adipose tissue.

### *Enzyme activities*

For heparin-releasable lipoprotein lipase (HR-LPL) activity determination, 250 mg of adipose tissue were incubated in 750 µL of 10 mM HEPES buffer containing 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 250 mM sucrose and 2 g heparin/L at 37°C for 30 min. Enzyme activity was assessed following the method described by Del Prado *et al.* [39], with modifications [38]. HR-LPL activities were calculated by subtracting non-LPL lipolytic activity in the presence of NaCl from the total lipolytic activity, determined without NaCl, and expressed as nmol oleate released per minute per gram of tissue.

For fatty acid synthase (FAS) enzyme analysis, 0.5 g of adipose tissue was homogenized in 2.5 mL of buffer (pH 7.6) containing 150 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM *N*-acetyl-cysteine and 0.5 mM dithiothreitol. After centrifugation at 100 000 *g* for 40 min at 4°C, the supernatant fraction was used for quantification of enzyme activity. FAS activity was measured by spectrophotometry as previously described [40], and the activity was expressed as nmol NADPH consumed per minute per mg of protein.

### *Extraction and analysis of RNA and quantification by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)*

Total RNA was isolated from 100 mg of adipose tissue using Trizol (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), according to the manufacturer's instructions. RNA samples were then treated with DNA-free kit (Ambion, Applied Biosystems, Austin, Texas, USA) to remove any contamination with genomic DNA. The yield and quality of the RNA were assessed by

## RESULTS AND DISCUSSION

---

measuring absorbance at 260, 270, 280 and 310 nm and by electrophoresis on 1.3% agarose gels. 1.5 µg of total RNA of each sample was reverse-transcribed to first-strand complementary DNA (cDNA) using iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Hercules, California, USA).

Relative adipose triglyceride lipase (ATGL), hormone sensitive lipase (HSL) and sirtuin1 (SIRT1) ARNm levels were quantified using Real-time PCR with an iCycler™ - MyiQ™ Real time PCR Detection System (BioRad). β-actin ARNm levels were similarly measured and served as the reference gene.

Relative quantification of ATGL and β-actin gene ARNm abundance, using SYBR-Green real-time RT-PCR technology (Applied Biosystems, California, USA), was performed as described previously [16].

Quantification of HSL, SIRT1 and β-actin by Taqman Real Time PCR: in the case of β-actin and SIRT1, 1 µL of each cDNA was added to PCR reagent mixture, Premix Ex Taq™ (Takara, Madison, Wisconsin, USA), with the sense (600 nM β-actin SIRT1 and 900 nM) and antisense primers (600 nM β-actin and 900 nM SIRT1) and probe (0.5 µM β-actin and 10 µM). Specific primers were designed and synthesized commercially (Eurogentec, Liège, Belgium) and the sequences were as follows:

β-actin: 5'- TCT ATG AGG GCT ACG CTC TCC -3' (forward)  
5'- CAC GCT CGG TCA GGA TCT TC -3' (reverse)  
5'- FAM- CCT GCG TCT GGA CCT GGC TGG C -TAMRA-3' (probe)

SIRT1: 5'- GAC GAC GAG GGC GAG GAG -3' (forward)  
5'- ACA GGA GGT TGT CTC GGT AGC-3' (reverse)  
5'- FAM- CTG CCG CCG CCG CTG CCG -TAMRA-3' (probe)

For HSL ARNm levels 2 µL of each cDNA was added to PCR reagent mixture, TaqMan® Universal PCR Master Mix, (Applied Biosystems), with 20X TaqMan® Gene Expression Assay Mix containing specific primers and probes (Rn 00563444; Applied Biosystems).

The PCR parameters were as follows: 40 cycles of denaturation at 95°C for 5 seconds for β-actin and SIRT1 and 15 seconds for HSL and combined annealing and extension at 60°C for 30 seconds for β-actin and SIRT1 and 60 seconds for HSL.

ARNm levels were normalized to the values of β-actin and the results expressed as fold changes of threshold cycle (Ct) value relative to controls using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method Livak and Schmittgen [41].

### *Quantification of intracellular calcium in adipose tissue*

Adipocyte isolation was obtained from adipose tissue by collagenase digestion (1 mg/ml; 37°C) in Krebs-Ringer bicarbonate buffer (154 mM NaCl, 154 mM KCl, 155 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1100 mM

## RESULTS AND DISCUSSION

---

CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O, 155 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 155 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O), containing bovine serum albumin (3.5 g/100 mL) and 5 mM glucose at pH 7.4, under continuous vigorous shaking (90 cycles/min).

Adipocytes were filtered through nylon mesh and washed three times with the same incubation buffer (KRBA) to eliminate the stroma-vascular fraction and collagenase. [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in adipocytes from adipose tissue was measured using Screen Quest™ Fluo-8 Medium Removal Calcium Assay Kit (Bioquest). The fluorescence intensity at Ex/Em =490/525 was measured by a fluorometer (Fluoroskan Ascent CF, Thermo Labsystems).

### *Quantification of resveratrol metabolites in adipose tissue*

Resveratrol metabolite analyses in perirenal adipose tissues were performed using UPLC-MS/MS tandem mass spectrometry after a solid-phase extraction as previously described in detail elsewhere [42, 43]. For quantification purposes, control tissues were used to prepare calibration curves since no resveratrol or its metabolites were detected.

### *Quantification of CLA in adipose tissue*

Frozen samples (0.3 g) of adipose tissue were weighed, kept at 0°C in an ice bath, and homogenized in chloroform: methanol 2:1 (v/v). Trionadecanoin was added as internal standard at the beginning of this process. After drying under nitrogen, the sample was dissolved in 1 mL of chloroform.

500 µL of sodium methoxide in methanol (0.5 M) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) were added to lipid extracts to prepare fatty acid methyl esters (FAMES). FAMES were solved in 500 µL of heptane containing 50 ppm of butylated hydroxytoluene as stabilizer, and were transferred to gas GC vials and analyzed with a Hewlett Packard HP6890 gas chromatograph (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) equipped with a flame ionization detector (FID). The analytical column was a fused silica capillary SP-2380 column (100 m x 0.25 mm i.d., 0.20 µm film thickness) from Supelco (Bellafonte, PA, USA). The oven temperature was initially programmed at 150°C (hold 4 min) and raised to 220°C at a 4°C/min rate (hold 25 min). Injection (1 µL) was run in split (100:1) mode. Helium was the carrier gas at constant flow (1 mL/min) and make-up gas for the FID. The injector was maintained at 200°C and detector at 250°C. FAMES were identified by comparison of retention times with standards (Sigma, St. Louis, MO, USA). Pure CLA isomers were purchased from Matreya (Matreya Inc., Pleasant GAP, PA, USA).

### *Statistical analysis*

Results are presented as mean ± SEM. Statistical analysis was performed using SPSS 17.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). Comparisons among experimental groups were carried out by using one-way ANOVA followed by Newman Keuls *post hoc* test. Student's *t*-test was used for comparisons between CLA and RSV+CLA groups in the case of adipose tissue CLA isomer amounts. For resveratrol metabolites analysis data were skewed (Kolmogorov and Levene tests) and their natural logarithm did not normalize the data; consequently comparisons between RSV and RSV+CLA groups were performed using the nonparametric Mann-Whitney test. In all cases significance was assessed at the *P* < 0.05 level.



# RESULTS AND DISCUSSION

## RESULTS

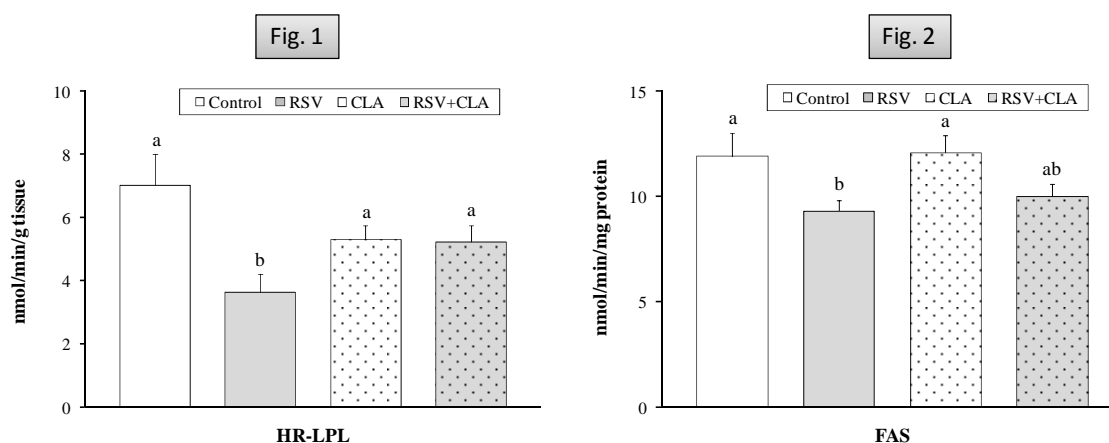
### Adipose tissue weight

As previously reported [35], rats treated with RSV and CLA showed a significant reduction in the sum of adipose tissues dissected in the present study, epididymal, perirenal, mesenteric and subcutaneous (-20% and -18% respectively). Surprisingly, rats treated with the combination RSV+CLA showed a small reduction in this parameter, that was not statistically significant (-7%;  $P=0.19$ ). This change was not associated to a reduction in food intake.

The effect on perirenal adipose tissue, the depot chosen for analytical determinations in the present study, was fairly similar to that observed in the sum of adipose tissues dissected: -15%, -11% and -4% in RSV, CLA and RSV+CLA groups, respectively.

### Enzyme activities

Rats from RSV group showed a significant decrease in HR-LPL and FAS activities when compared with control rats ( $P<0.05$ ). By contrast, enzyme activities in rats from CLA and RSV+CLA groups remained unchanged (Figures 1 and 2).

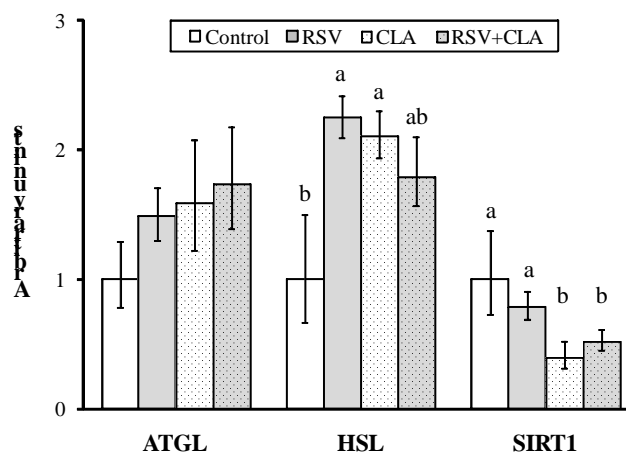


**Figures 1 and 2.** HR-LPL activity (Fig. 1) and FAS activity (Fig. 2) in perirenal adipose tissue of rats from the experimental groups ( $n = 9$ ). Values are means  $\pm$  SEM. Bars not sharing a common letter are significantly different ( $P < 0.05$ ).

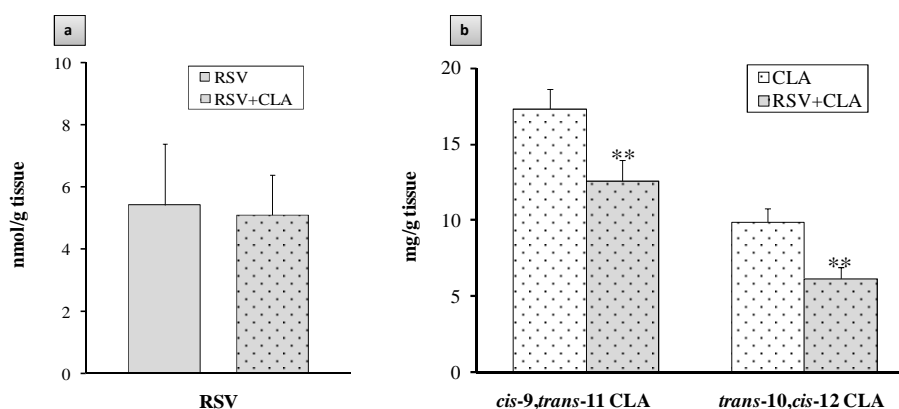
### Gene expression

Figure 3 shows gene expression of ATGL, HSL and SIRT1. No significant change was induced by experimental treatments in ATGL. HSL expression was significantly increased in RSV and CLA groups ( $P<0.05$ ). In rats from RSV+CLA group the increase in this parameter did not reach statistical significance. SIRT1 expression was not modified by resveratrol, but it was down-regulated in CLA and RSV+CLA groups ( $P<0.05$ ).

## RESULTS AND DISCUSSION



**Figure 3.** Gene expression of ATGL, HSL and SIRT1 in perirenal adipose tissue of rats from the experimental groups (n = 9). Values are means  $\pm$  SEM. Bars not sharing a common letter are significantly different ( $P < 0.05$ ).



**Figure 4.** Amounts of resveratrol metabolites (a) and CLA isomers (b) in perirenal adipose tissue of rats from the experimental groups (n = 9). Values are means  $\pm$  SEM. \*\* $P < 0.01$ .

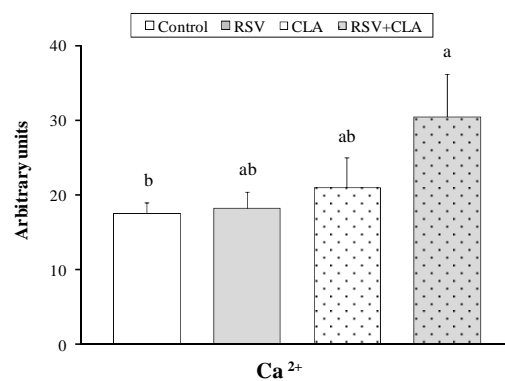
### *Resveratrol and conjugated linoleic acid amounts in adipose tissue*

As far as resveratrol amounts are concerned, resveratrol metabolites but not their parent compound, were detected in adipose tissue. No significant differences in the total amount of metabolites was found between RSV and RSV+CLA groups ( $P > 0.05$ ) (Figure 4A). The amounts of CLA isomers in CLA and RSV+CLA groups are shown in Figure 4B. *Cis-9,trans-11* CLA was reduced by 37% ( $P < 0.01$ ) and *trans-10,cis-12* CLA was reduced by 42% ( $P < 0.01$ ) in RSV+CLA group when compared with CLA group.

### *Intracellular calcium concentration in adipose tissue*

Finally, intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations were analyzed in the four experimental groups and a significant increase was observed in RSV+CLA group ( $P < 0.05$ ) (Figure 5).

## RESULTS AND DISCUSSION



**Figure 5** Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in perirenal adipose tissue of rats from the experimental groups ( $n = 9$ ). Values are means  $\pm$  SEM. Bars not sharing a common letter are significantly different ( $P < 0.05$ ).

### DISCUSSION

As explained in the introduction, taking into account that some of the mechanisms of action underlying RSV and CLA effects are similar or complementary, additive or even synergic effects could be expected when these two molecules are administered together. However, in our experiment a significant reduction in body fat was not observed when the combination RSV+CLA was administered to rats. Apparently, the combination of these two active biomolecules abolishes the body-fat lowering effect of each molecule alone.

In order to find an explanation for this surprising result we analyzed the activity of several enzymes: HR-LPL, the enzyme that allows adipose tissue to uptake fatty acids from triacylglycerols circulating in very-low-density lipoproteins or chylomicrons, and FAS, an enzyme which plays a crucial role in *de novo* lipogenesis. These two enzymes have been reported to be modified either by RSV or CLA. Resveratrol decreased FAS and HR-LPL activities, suggesting that this polyphenol reduced *de novo* lipogenesis, as well as the uptake of fatty acids from circulating triacylglycerols, two metabolic pathways involved in the control of triacylglycerol accumulation in adipose tissue. In a previous study from our laboratory, not performed in Wistar but instead in Sprague-Dawley rats, we also found these effects [16]. The changes observed in these enzymes justify, at least in part, the reduction in adipose tissue mass induced by RSV.

CLA did not modify FAS activity, as previously observed by other authors [6, 9], and induced a reduction in HR-LPL (-28%) that did not reach statistical significance. In a previous study from our laboratory we observed greater reductions in adipose tissue size and significant reductions in HR-LPL activity in hamsters treated with CLA [40]. Also, Xu et al. [44] observed a significant reduction in both HR-LPL and intracellular LPL activities in adipose tissue from mice. However, Faulconnier et al. [9] did not find significant decreases in the activity of this enzyme induced by CLA in epididymal adipose tissue from rats. In order to understand these differences it is important to point out that the sensitivity to the action of CLA on adipose tissue among rodents follows this order: mouse>hamster>rat [45].

## RESULTS AND DISCUSSION

---

When we analyzed the effects of the combination RSV+CLA on these enzymes no changes were observed. The lack of significant changes in enzyme activities paralleled the lack of change in adipose tissue size.

The activity of lipases is usually measured by the quantification of glycerol released after adipocyte incubation. This measurement cannot be evaluated in frozen tissues. Thus, in order to obtain data concerning the influence of the experimental treatments on the lipolytic process, gene expression of the two main lipases, ATGL and HSL, was measured. No significant differences were observed in ATGL expression among the experimental groups. By contrast, HSL expression was increased in RSV and CLA groups, suggesting that increased lipolysis could be involved in the reduction of body fat induced by these molecules. However, no change was observed in RSV+CLA group. The lack of change in the expression of this enzyme, together with the lack of change in FAS and HR-LPL activities, could have contributed to the almost absent body fat-lowering effect of the RSV+CLA combination.

In view of these results, the issue to be addressed was to establish the reasons which could justify why the individual effects of resveratrol and CLA on enzymes involved in adipose tissue triacylglycerol metabolism was abolished when these two active molecules were administered together. A limitation of this study is that we do not have available samples of feces to determine whether the presence of both molecules in the gut at the same time reduces their absorption. Nevertheless, we did analyze the amounts of resveratrol and CLA isomers in adipose tissue samples.

Resveratrol metabolites, but not the parent compound, were detected in adipose tissue. Taking into account that rats were fasted overnight, the results are to be expected because other authors have shown that after its administration, free resveratrol is either absent or present only as trace amounts in plasma and tissues and that resveratrol metabolite concentrations are much higher than the concentrations of the parent compound [42, 46, 47]. No change was observed in the total amount of resveratrol metabolites between RSV groups. This result suggests that the amount of resveratrol which reached adipose tissue was similar in RSV and RSV+CLA groups.

With regard to CLA isomers, we observed reductions of 37% in *cis*-9,*trans*-11 and 42% in *trans*-10,*cis*-12 in RSV+CLA group when compared with CLA group. Thus, the amount of CLA which reached adipose tissue was lower when it was administered with resveratrol than when it was administered alone. This could be probably due to reduced intestinal absorption and/or enhanced oxidation in view of the increase in CPT-1a activity induced by RSV. This reduced amount could explain, at least in part, the absence of these effects which are clearly observed when the amount of conjugated linoleic acid isomers in the tissue is higher, such as the increased expression of HSL.

Apart from the reduced amounts of CLA isomers found in adipose tissue from rats treated with the combination RSV+CLA, we also investigated other potential explanations underlying the lack of adipose tissue reduction observed in these animals. Kennedy et al.[48] carried out an *in vitro* experiment in primary human adipocytes devoted to determine the extent to which resveratrol prevented some of the side effects (inflammation, insulin resistance, cellular stress) associated with CLA supplementation. In this study the authors observed that resveratrol

## RESULTS AND DISCUSSION

---

attenuated adipocyte delipidation induced by the *trans*-10,*cis*-12 CLA isomer. In order to explain this effect they proposed that RSV blocked *trans*-10,*cis*-12 CLA-mediated increase in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. Bearing this in mind, we measured intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in adipose tissue from all the experimental groups. We did not find the same results as Kennedy et al. [48] because, under our *in vivo* experimental conditions, CLA did not induce any change in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. By contrast, a significant increase in this parameter was observed in rats treated with the combination RSV+CLA. Considering that increased intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in adipocytes leads to increased lipogenesis [49, 50], it can be argued that the decrease in FAS activity induced by RSV in RSV+CLA group could have been compensated by the increase in the activity of this enzyme associated to increased intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. Thus, finally no change was observed in FAS activity in this experimental group.

It has been reported that intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  also regulates LPL activity. More specifically,  $\text{Ca}^{2+}$  converts LPL inactive monomers into active LPL dimers [51]. Thus, in the present study, similarly to that observed in FAS activity, compensation between the activation of LPL induced by the increased intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration and the reduction in LPL activity induced by RSV could take place in rats from RSV+CLA group, thus leading to the lack of effect on the activity of this enzyme.

SIRT1 is a deacetylase which plays an important role in lipid metabolism. In this context, it has been reported that SIRT1 activation decreases FASN expression and consequently FAS activity [52]. The activation of this deacetylase seems to be an important mechanism through which resveratrol produces its beneficial effects [53]. Taking all these reports into account, it may be suggested that the activation of SIRT1 without change in its gene expression in the present study was probably on the basis of the decrease in FAS activity observed in RSV group. In RSV+CLA group this activation would probably also take place due to the presence of RSV in the diet. But, considering that in this group SIRT1 was down-regulated due to the presence of CLA in the diet, it can be hypothesized that the final balance of these two effects was the lack of effect on FAS activity.

In conclusion, despite the positive individual actions of resveratrol and conjugated linoleic acid on body fat accumulation, the combination of both molecules is not useful as an anti-obesity tool in an experimental model of diet-induced obesity. The attenuation by each molecule of the effect induced by the other in adipose tissue triacylglycerol metabolism, such as the decrease in lipogenesis and fatty acid uptake from circulating triacylglycerols, and the increase in lipolysis, contributes to explain this phenomenon.

## RESULTS AND DISCUSSION

---

### REFERENCES

- [1] Bhattacharya A, Banu J, Rahman M, Causey J, Fernandes G (2006) Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease. *J Nutr Biochem* 17: 789-810
- [2] Wang YW, Jones PJ (2004) Conjugated linoleic acid and obesity control: efficacy and mechanisms. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28: 941-955
- [3] Larsen TM, Toubro S, Astrup A (2003) Efficacy and safety of dietary supplements containing CLA for the treatment of obesity: evidence from animal and human studies. *J Lipid Res* 44: 2234-2241
- [4] Navarro V, Miranda J, Churrua I, Fernández-Quintela A, Rodríguez V, Portillo M (2006) Effects of trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid on body fat and serum lipids in young and adult hamsters. *J Physiol Biochem* 62: 81-87
- [5] Salas-Salvado J, Marquez-Sandoval F, Bullo M (2006) Conjugated linoleic acid intake in humans: a systematic review focusing on its effect on body composition, glucose, and lipid metabolism. *Crit Rev Food Sci Nutr* 46: 479-488
- [6] Azain MJ, Hausman DB, Sisk MB, Flatt WP, Jewell DE (2000) Dietary conjugated linoleic acid reduces rat adipose tissue cell size rather than cell number. *J Nutr* 130: 1548-1554
- [7] Tsuboyama-Kasaoka N, Takahashi M, Tanemura K, et al. (2000) Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose tissue by apoptosis and develops lipodystrophy in mice. *Diabetes* 49: 1534-1542
- [8] Clement L, Poirier H, Niot I, et al. (2002) Dietary trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid induces hyperinsulinemia and fatty liver in the mouse. *J Lipid Res* 43: 1400-1409
- [9] Faulconnier Y, Arnal MA, Patureau Mirand P, Chardigny JM, Chilliard Y (2004) Isomers of conjugated linoleic acid decrease plasma lipids and stimulate adipose tissue lipogenesis without changing adipose weight in post-prandial adult sedentary or trained Wistar rat. *J Nutr Biochem* 15: 741-748
- [10] Kang K, Miyazaki M, Ntambi JM, Pariza MW (2004) Evidence that the anti-obesity effect of conjugated linoleic acid is independent of effects on stearoyl-CoA desaturase1 expression and enzyme activity. *Biochem Biophys Res Commun* 315: 532-537
- [11] Baur JA, Pearson KJ, Price NL, et al. (2006) Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 444: 337-342
- [12] Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, et al. (2006) Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell* 127: 1109-1122
- [13] Ahn J, Cho I, Kim S, Kwon D, Ha T (2008) Dietary resveratrol alters lipid metabolism-related gene expression of mice on an atherogenic diet. *J Hepatol* 49: 1019-1028
- [14] Macarulla MT, Alberdi G, Gómez S, et al. (2009) Effects of different doses of resveratrol on body fat and serum parameters in rats fed a hypercaloric diet. *J Physiol Biochem* 65: 369-376
- [15] Rivera L, Morón R, Zarzuelo A, Galisteo M (2009) Long-term resveratrol administration reduces metabolic disturbances and lowers blood pressure in obese Zucker rats. *Biochem Pharmacol* 77: 1053-1063
- [16] Alberdi G, Rodríguez VM, Miranda J, et al. (2011) Changes in white adipose tissue metabolism induced by resveratrol in rats. *Nutr Metab (Lond)* 8: 29

## RESULTS AND DISCUSSION

---

- [17] Cho SJ, Jung UJ, Choi MS (2012) Differential effects of low-dose resveratrol on adiposity and hepatic steatosis in diet-induced obese mice. *Br J Nutr* 108: 2166-2175
- [18] Timmers S, Konings E, Bilet L, et al. (2011) Calorie restriction-like effects of 30 days of resveratrol supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans. *Cell Metab* 14: 612-622
- [19] Picard F, Kurtev M, Chung N, et al. (2004) Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature* 429: 771-776
- [20] Rayalam S, Della-Fera MA, Yang JY, Park HJ, Ambati S, Baile CA (2007) Resveratrol potentiates genistein's antiadipogenic and proapoptotic effects in 3T3-L1 adipocytes. *J Nutr* 137: 2668-2673
- [21] Bai L, Pang WJ, Yang YJ, Yang GS (2008) Modulation of Sirt1 by resveratrol and nicotinamide alters proliferation and differentiation of pig preadipocytes. *Mol Cell Biochem* 307: 129-140
- [22] Szkudelska K, Nogowski L, Szkudelski T (2009) Resveratrol, a naturally occurring diphenolic compound, affects lipogenesis, lipolysis and the antilipolytic action of insulin in isolated rat adipocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 113: 17-24
- [23] Fischer-Posovszky P, Kukulus V, Tews D, et al. (2010) Resveratrol regulates human adipocyte number and function in a Sirt1-dependent manner. *Am J Clin Nutr* 92: 5-15
- [24] Chen S, Li Z, Li W, Shan Z, Zhu W (2011) Resveratrol inhibits cell differentiation in 3T3-L1 adipocytes via activation of AMPK. *Can J Physiol Pharmacol* 89: 793-799
- [25] Yang JY, Della-Fera MA, Rayalam S, Ambati S, Baile CA (2007) Enhanced pro-apoptotic and anti-adipogenic effects of genistein plus guggulsterone in 3T3-L1 adipocytes. *Biofactors* 30: 159-169
- [26] Rayalam S, Della-Fera MA, Ambati S, Boyan B, Baile CA (2007) Enhanced effects of guggulsterone plus 1,25(OH)2D3 on 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 364: 450-456
- [27] Park HJ, Yang JY, Ambati S, et al. (2008) Combined effects of genistein, quercetin, and resveratrol in human and 3T3-L1 adipocytes. *J Med Food* 11: 773-783
- [28] Rayalam S, Della-Fera MA, Ambati S, Yang JY, Park HJ, Baile CA (2008) Enhanced effects of 1,25(OH)(2)D(3) plus genistein on adipogenesis and apoptosis in 3T3-L1 adipocytes. *Obesity (Silver Spring)* 16: 539-546
- [29] Rayalam S, Yang JY, Della-Fera MA, Park HJ, Ambati S, Baile CA (2009) Anti-obesity effects of xanthohumol plus guggulsterone in 3T3-L1 adipocytes. *J Med Food* 12: 846-853
- [30] Bruckbauer A, Zemel MB, Thorpe T, et al. (2012) Synergistic effects of leucine and resveratrol on insulin sensitivity and fat metabolism in adipocytes and mice. *Nutr Metab (Lond)* 9: 77
- [31] Brown J, McIntosh M (2003) Conjugated linoleic acid in humans: regulation of adiposity and insulin sensitivity. *J Nutr* 133: 3041-3046
- [32] Taylor CG, Zahradka P (2004) Dietary conjugated linoleic acid and insulin sensitivity and resistance in rodent models. *Am J Clin Nutr* 79: 1164S-1168S
- [33] Szkudelska K, Szkudelski T (2010) Resveratrol, obesity and diabetes. *Eur J Pharmacol* 635: 1-8
- [34] Szkudelski T, Szkudelska K (2011) Anti-diabetic effects of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci* 1215: 34-39

## RESULTS AND DISCUSSION

---

- [35] Arias N, Macarulla MT, Aguirre L, et al. (2011) The combination of resveratrol and conjugated linoleic acid is not useful in preventing obesity. *J Physiol Biochem* 67: 471-477
- [36] Macarulla MT, Alberdi G, Gómez S, et al. (2009) Effects of different doses of resveratrol on body fat and serum parameters in rats fed a hypercaloric diet. *J Physiol Biochem* 65: 369-376
- [37] Navarro V, Zabala A, Macarulla MT, et al. (2003) Effects of conjugated linoleic acid on body fat accumulation and serum lipids in hamsters fed an atherogenic diet. *J Physiol Biochem* 59: 193-199
- [38] Miranda J, Fernández-Quintela A, Macarulla MT, et al. (2009) A comparison between CLNA and CLA effects on body fat, serum parameters and liver composition. *J Physiol Biochem* 65: 25-32
- [39] Del Prado M, Hernandez-Montes H, Villalpando S (1994) Characterization of a fluorometric method for lipoprotein lipase. *Arch Med Res* 25: 331-335
- [40] Zabala A, Fernandez-Quintela A, Macarulla MT, et al. (2006) Effects of conjugated linoleic acid on skeletal muscle triacylglycerol metabolism in hamsters. *Nutrition* 22: 528-533
- [41] Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408
- [42] Andres-Lacueva C, Macarulla MT, Rotches-Ribalta M, et al. (2012) Distribution of resveratrol metabolites in liver, adipose tissue, and skeletal muscle in rats fed different doses of this polyphenol. *J Agric Food Chem* 60: 4833-4840
- [43] Rotches-Ribalta M, Urpi-Sarda M, Llorach R, et al. (2012) Gut and microbial resveratrol metabolite profiling after moderate long-term consumption of red wine versus dealcoholized red wine in humans by an optimized ultra-high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry method. *J Chromatogr A* 1265: 105-113
- [44] Xu X, Storkson J, Kim S, Sugimoto K, Park Y, Pariza MW (2003) Short-term intake of conjugated linoleic acid inhibits lipoprotein lipase and glucose metabolism but does not enhance lipolysis in mouse adipose tissue. *J Nutr* 133: 663-667
- [45] Kim MR, Park Y, Albright KJ, Pariza MW (2002) Differential responses of hamsters and rats fed high-fat or low-fat diets supplemented with conjugated linoleic acid. *Nutrition research (New York, NY)* 22: 715-722
- [46] Maier-Salamon A, Hagenauer B, Reznicek G, Szekeres T, Thalhammer T, Jäger W (2008) Metabolism and disposition of resveratrol in the isolated perfused rat liver: role of Mrp2 in the biliary excretion of glucuronides. *J Pharm Sci* 97: 1615-1628
- [47] Walle T (2011) Bioavailability of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci* 1215: 9-15
- [48] Kennedy A, Overman A, Lapoint K, et al. (2009) Conjugated linoleic acid-mediated inflammation and insulin resistance in human adipocytes are attenuated by resveratrol. *J Lipid Res* 50: 225-232
- [49] Kim JH, Mynatt RL, Moore JW, Woychik RP, Moustaid N, Zemel MB (1996) The effects of calcium channel blockade on agouti-induced obesity. *FASEB J* 10: 1646-1652
- [50] Boon N, Hul GB, Stegen JH, et al. (2007) An intervention study of the effects of calcium intake on faecal fat excretion, energy metabolism and adipose tissue mRNA expression of lipid-metabolism related proteins. *Int J Obes (Lond)* 31: 1704-1712
- [51] Zhang L, Lookene A, Wu G, Olivecrona G (2005) Calcium triggers folding of lipoprotein lipase into active dimers. *J Biol Chem* 280: 42580-42591



## RESULTS AND DISCUSSION

---

- [52] Ponugoti B, Kim DH, Xiao Z, et al. (2010) SIRT1 deacetylates and inhibits SREBP-1C activity in regulation of hepatic lipid metabolism. *J Biol Chem* 285: 33959-33970
- [53] Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, et al. (2003) Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 425: 191-196

**Manuscrito 3 - Manuscript 3.**

***La quercetina reduce la resistencia a la insulina sin modificar la acumulación de grasa en el tejido adiposo y muscular.***

***Quercetin can reduce insulin resistance without decreasing adipose tissue and skeletal muscle fat accumulation***

Arias N, Macarulla MT, Aguirre L, Martínez-Castaño MG, Portillo MP

Genes Nutr., (2013) 9(1): 36



## RESULTS AND DISCUSSION

---

### ABSTRACT

*Introduction:* Quercetin exhibits a wide range of biological functions.

*Purpose:* The first aim of the present work was to analyze the effects of quercetin on fat accumulation in adipose tissue and glycaemic control in rats. Any potential involvement of muscle fatty acid oxidation in its effect on glycaemic control was also assessed.

*Material and methods:* Animals were fed a high-fat high-sucrose diet either supplemented with quercetin (30 mg/kg body weight/d), or not supplemented, for 6 weeks. One week before sacrifice a glucose tolerance test was carried out. Muscle triacylglycerol content, serum glucose, insulin, fructosamine and free fatty acids were measured, and HOMA-IR was calculated. The activities of lipogenic enzymes and lipoprotein-lipase in adipose tissue, carnitine palmitoyl transferase-1b (CPT-1b) and citrate synthase in skeletal muscle, and the expression of several genes, ACO, CD36, CPT-1b, PPAR- $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$ , UCP3, TFAM and COX-2 in skeletal muscle were analyzed.

*Results:* Quercetin caused no significant reduction in body weight or adipose tissue sizes. However, fructosamine, basal glucose and insulin, and consequently HOMA-IR, were significantly reduced by quercetin. No changes were observed in the activity of lipogenic enzymes and lipoprotein-lipase. Muscle triacylglycerol content was similar in both experimental groups. The expression of ACO, CD36, CPT-1b, PPAR- $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$ , UCP3, TFAM and COX-2 remained unchanged.

*Conclusion:* It can be concluded that quercetin is more effective as an anti-diabetic than as an anti-obesity biomolecule. The improvement in insulin resistance induced by this flavonoid is not mediated by a delipidating effect in skeletal muscle.

**Key words:** Quercetin, glycaemic control, fat accumulation adipose tissue, muscle, fatty acid oxidation, rat

# RESULTS AND DISCUSSION

---

## INTRODUCTION

Obesity is a major health problem in the industrialized world, which has reached epidemic proportions globally. Its high prevalence is a result of changes in lifestyle, decreased physical activity and socioeconomic development, among other factors. Moreover, obesity is a complex multi-factorial, chronic disease which is considered to be a risk factor for the genesis or development of various diseases which include hypertension, type 2 diabetes, coronary heart disease and respiratory complications [1, 2]. In this context, scientific research is constantly seeking to identify for new molecules that could be used as dietary functional ingredients in the fight against this disease and its co-morbidities. Among them, flavonoids represent a group of molecules of increasing interest.

Flavonoids belong to a group of natural substances which have a variable phenolic structure and are found in fruit, vegetables, tea and wine. These natural foods were known for their beneficial effects on health long before flavonoids were isolated as the effective compounds. Flavonoids have a basic chemical structure of diphenylpropanes (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) and are most often found attached to sugar (glycosides), but they can also be aglycones. Quercetin, which is found in abundance in onions, broccoli, tomatoes, apples and berries is the most abundant flavonoid [3].

It has been reported that quercetin exhibits a wide range of biological functions, including antioxidant, anticarcinogenic and anti-inflammatory activities [4-7]. More recently, beneficial effects on blood pressure and heart disease have been described [7-9]. With regard to obesity, very little work has been carried out to date. As far as glycaemic control is concerned, quercetin has been reported to improve diabetic status in animal models of either type 1 or type 2 diabetes [10].

The first aim of the present work was to gain more insight into the effects of quercetin on fat accumulation in adipose tissue and on glycaemic control in rats fed an obesogenic diet, in order to establish if this molecule can be useful in the prevention of obesity and insulin resistance related to it. A second aim was to determine the potential involvement of muscle fatty acid oxidation in the effect of quercetin on glycaemic control.

## MATERIAL AND METHODS

### *Diets and experimental design for the in vivo study*

The study was conducted with eighteen 6 week-old male Wistar rats purchased from Harlan Ibérica (Barcelona, Spain), and took place in accordance with the institution's guide for the care and use of laboratory animals (CUEID CEBA/30/2010).

Rats were individually housed in polycarbonate metabolic cages (Techniplast Gazzada, Gugugiate, Italy) and placed in an air-conditioned room (22 ± 2°C) with a 12-h day-night rhythm. After a 6-day adaptation period, rats were randomly distributed in two groups (n=9 per group): a control group and a quercetin group. Both groups were fed a commercial high-fat, high-sucrose diet (Harlan Ibérica; ref. TD.06415) for 6 weeks. This diet was high in fat (225 g/kg) and sucrose (200 g/kg), and was either supplemented with quercetin (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA) or not supplemented. For dietary supplementation, quercetin was added to

## RESULTS AND DISCUSSION

---

the diet daily in amounts that assured a dose of 30 mg/kg body weight/d (equivalent approximately to 0.045% of quercetin in the diet). All animals had free access to food and water. Body weight and food intake were recorded on a daily basis.

At the end of the experimental period, animals were exsanguinated by cardiac puncture under anaesthesia (chloral hydrate). Adipose tissue from different anatomical locations (epididymal, perirenal, mesenteric and subcutaneous), and gastrocnemius muscles were dissected, weighted, immediately frozen and stored at -80°C for further analysis.

### *Glucose tolerance test*

One week before sacrifice, all rats were deprived of food, though not of water, 12 h before starting the experiment. Blood samples were obtained from the tail vein for the determination of basal glucose and insulin levels. Glucose load was injected intraperitoneally at the dose of 2 g/kg body weight, and glycaemia was determined from the tail vein after 30, 60, 90 and 120 minutes. The Area Under the Curve (AUC) was calculated by trapezoidal method [11].

### *Serum analysis*

Serum was obtained from blood samples after centrifugation (1,000 g for 10 min at 4°C). Commercial kits were employed to measure serum parameters: glucose (BioSystems, Barcelona, Spain), insulin (Linco, St. Charles, MO, USA), fructosamine (Spinreact, Sant Esteve de Bas, Spain) and free fatty acids (Roche, Penzberg, Germany).

The Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance (HOMA-IR) was calculated from basal insulin and glucose values using Matthews' formula [12]:

$$\text{HOMA-IR} = [\text{Fasting glucose (mmol/L)} \times \text{fasting insulin (mU/L)}] / 22.5$$

### *Lipoprotein lipase and lipogenic activities in white adipose tissue*

For heparin-releasable lipoprotein lipase (HR-LPL) activity determination, 400 mg of epididymal adipose tissue were incubated in 400 µL of KRP (Krebs-Ringer-Phosphate) buffer, containing 2 µg/mL of heparine, at 37°C during 45 min. Aliquots of this medium were incubated for 5 min at 37°C with 1 mg dibutyl fluorescein, 5 mL ethyleneglycol monoethyl ether, 3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> with 2.5 M NaCl, or not, and then the reaction was stopped in ice. Finally, fluorescence was measured. HR-LPL activity was calculated by subtracting non-LPL lipolytic activity in the presence of NaCl from the total lipolytic activity, determined without NaCl, and was expressed as nmol fluorescein released per minute per gram of tissue.

For lipogenic enzyme analysis purposes, 1 g of epididymal adipose tissue was homogenized in 3.0 mL of buffer (pH 7.6) containing 150 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM *N*-acetyl-cysteine and 0.5 mM dithiothreitol. After centrifugation at 100,000 g for 40 min at 4°C, the supernatant fraction was used for quantification of enzyme activities. Fatty acid synthase (FAS), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) and malic enzyme (ME) activities were measured as previously described [13]. Enzyme activities were expressed as follows: nmol NADPH consumed per minute per g of tissue for FAS, and nmol NADPH produced per minute per g of tissue for G6PDH and ME.

## RESULTS AND DISCUSSION

---

Acetyl CoA carboxylase (ACC) activity was measured by using the ratio phosphorylated ACC/total ACC. The amounts of both ACC-phosphorylated and total ACC were measured by western blot. To this end, 100 mg of epididymal adipose tissue was homogenated in 500  $\mu$ L of cellular PBS (pH 7.4), containing nuclease inhibitors, 100 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and 100 mM iodoacetamide. Homogenates were centrifuged at 500 g for 10 min at 4°C. Protein concentrations in homogenates were measured by using Bradford method [14] using bovine serum albumin as standard.

Immunoblot analyses were performed using 10  $\mu$ g epididymal adipose tissue extracts separated by electrophoresis in a 10% SDS-polyacrylamide gel and transferred to PVDF membranes. The membranes were then blocked with 5% caseine PBS-Tween buffer for 2 hours at room temperature. Subsequently, they were blotted with the appropriate antibodies overnight at 4°C. ACC levels were detected via specific antibodies for total ACC (1:1000), phosphorylated-ACC (1:1000) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) and  $\beta$ -actin (1:5000) (Sigma, St. Louis, MO, USA). Afterwards, polyclonal mouse anti- $\beta$ -actin and rabbit anti-ACC antibody (1:5000) (Sigma, St. Louis, MO, USA) were incubated for 2 hours at room temperature. First, total ACC was measured, and then phosphorylated-ACC was determined by stripping and reprobing the blot. The bound antibodies were visualized by an ECL system (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA) and quantified by a ChemiDoc MP imaging system (Biorad, Hercules, Ca, USA).  $\beta$ -actin was used as a loading control to normalize the results.

### *Triacylglycerols content in skeletal muscle*

Total lipids were extracted from muscle samples according to Folch method [15]. Lipid extract was dissolved in isopropanol. Triacylglycerol content was measured using a commercial kit (Spinreact, Sant Esteve de Bas, Spain).

### *Carnitine palmitoyltransferase-1b activity in skeletal muscle*

The activity of carnitine palmitoyltransferase-1b (CPT-1b) was assessed in the mitochondrial/peroxisomal fraction. Tissue samples (1.5 g) were homogenized in 4.5 ml of buffer pH 7.4 containing 0.25 mol/L sucrose, 1 mmol/L EDTA and 10 mmol/L Tris-HCl. Homogenates were centrifuged (700 g for 10 min at 4°C) and the supernatant fluid was again centrifuged (12,000 g for 15 min at 4°C). Pellets were resuspended in 70 mmol/L sucrose, 220 mmol/L mannitol, 1 mmol/L EDTA, 2 mmol/L HEPES buffer, pH 7.4. CPT-1b activity was assayed by using the Bieber method [16]. The pellet protein content was determined by the Bradford method [14]. CPT-1b activity was expressed as nmol CoA formed per minute per mg protein.

### *Citrate synthase activity in skeletal muscle*

Citrate synthase (CS) activity was determined spectrophotometrically following the Srere method [17], by measuring the appearance of free CoA. Briefly, muscle samples were homogenated in 10 vol (wt/vol) of 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0), and diluted by a factor of 200 in this buffer. Homogenates were incubated for 5 minutes at 30°C with 0.1 M Tris-HCl buffer containing 0.1 mM DTNB, 0.25% Triton X-100, 0.5 mM oxalacetate and 0.31 mM acetyl CoA,

## RESULTS AND DISCUSSION

---

and readings were taken at 412 nm. CS activity was expressed as nmol CoA formed per minute per mg of protein.

### *Extraction and analysis of RNA and semiquantification by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)*

Total RNA was isolated from 100 mg of muscle using Trizol (Invitrogen, Carlsbad, Ca, USA), according to the manufacturer's instructions. RNA samples were then treated with DNA-free kit (Applied Biosystems, Austin, TX, USA) to remove any contamination with genomic DNA. The yield and quality of the RNA were assessed by measuring absorbance at 260, 270, 280 and 310 nm. 1.5 µg of total RNA of each sample was reverse-transcribed to first-strand complementary DNA (cDNA) using iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Acyl-coenzyme A oxidase (ACO), carnitine palmitoyl transferase-1b (CPT-1b), peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-α (PGC-1α), peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR-α), cluster of differentiation 36 (CD36), transcription factor A; mitochondrial (TFAM), cyclooxygenase-2 (COX-2), uncoupling protein 3 (UCP<sub>3</sub>) genes were quantified, as well as 18S which served as the reference gene.

A 9.5 µL aliquot of each diluted cDNA sample was used for polymerase chain reaction amplification in a 25 µL reaction volume. The cDNA samples were amplified on an iCycler-MyiQ Real Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) in the presence of SYBRGreen master mix (Applied Biosystems, Austin, TX, USA) and a 300 nM concentration of each of the sense and antisense primers. Specific primers were synthesized commercially (Integrated DNA Technologies, Leuven Belgium), and the sequences are as described in Table 1. The PCR parameters were as follows: initial 2 minutes at 50°C, denaturation at 95°C for 10 minutes followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 seconds, annealing at 60°C for 30 seconds and extension at 60°C for 30 seconds. In the case of PGC-1α and CD36 the annealing temperature was 63.9°C and 66.4°C respectively.

Gene expression analysis was performed using the Comparative threshold cycle (Ct) method. Amplification of 18S sequence was performed in parallel and was used to normalize values obtained for target genes. The results were expressed as fold changes of threshold cycle (Ct) value relative to controls using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method [18].



## RESULTS AND DISCUSSION

**Table 1.** Primers for PCR amplifications of each gene studied.

Primers	Sense primer	Antisense primer
ACO	5'-TC TCT GTG GTT GCT GTG GAG TCA-3'	5'-TC GGA TGC TTC CTT CTC CAA GGT-3'
CPT-1b	5'-CAA ACA TCA CTG CCC AAG CTT-3'	5'-GGC CGC ACA GAA TCC AAG T-3'
PGC-1 $\alpha$	5'-CA AAG CTG AAG CCC TCT TGC-3'	5'-GTT TAG TCT TCC TTT CCT CGT GTC C-3'
PPAR- $\alpha$	5'-GCT ACT TCG AGT CCC CTT GAG-3'	5'-CCA GCG TCG CTT CAG TTC C-3'
CD36	5'-GGT GTG CTC AAC AGC CTT ATC-3'	5'-TTA TGG CAA CCT TGC TTA TG-3'
TFAM	5'-CAC GAG CCC TGG AGT ACC C-3'	5'-CCA CAT TCC CCG GAA CAG C-3'
COX-2	5'-AAC AAT TCT CCC AGC TGT CAT TC-3'	5'-AGT CAA AGC ATA GGT CTT CAT AGT C-3'
UCP <sub>3</sub>	5'-TAC ACC TCC TGA CCT TGG CTA G-3'	5'-CTG TTG TGG GAG GCA CTT CTG-3'
18S	5'-GTG GGC CTG CGG CTT AAT-3'	5'-GCC AGA GTC TCG TTC GTT ATC-3'

ACO acyl-coenzyme A oxidase, CPT-1b carnitine palmitoyl transferase-1b, PGC-1 $\alpha$  peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- $\alpha$ , PPAR- $\alpha$  peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ , CD36 cluster of differentiation 36, TFAM transcription factor A mitochondrial, COX-2 mitochondrial electron transport chain's complex-2, UCP3 uncoupling protein 3.

### *Statistical analysis*

Results are presented as mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using SPSS 17.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). Normal distribution of data was confirmed by Shapiro-Wilks test. Therefore, data were analyzed by Student's *t* test. Significance was assessed at the  $P < 0.05$  level.

## RESULTS

### *Food intake, food efficiency, body weight and tissue weights*

No significant differences were found between experimental groups in terms of food intake (g/d) ( $17.4 \pm 0.4$  in the control group vs  $16.7 \pm 0.3$  in the quercetin-treated group), or of final body weight (g) ( $393 \pm 8$  in the control group vs  $385 \pm 3$  and in the quercetin-treated group). Consequently, food efficiency calculated as increment of body weight/food intake remained unchanged (g/g) ( $0.28 \pm 0.01$  in the control group vs  $0.27 \pm 0.01$  in the quercetin-treated group).

With regard to fat accumulation in adipose tissue, the sum of epididymal, perirenal, mesenteric and subcutaneous adipose depots represented a 9.1% reduction in the quercetin-treated group ( $55.8 \text{ g} \pm 2.8 \text{ g}$  in the control group vs  $50.7 \text{ g} \pm 1.5 \text{ g}$  in the quercetin-treated group), although this difference did not reach statistical significance. Moreover, no significant differences were found in gastrocnemius muscle weights (g) ( $2.56 \pm 0.13$  in the control group vs  $2.43 \pm 0.10$  in the quercetin-treated group).

### *Serum parameters and glucose tolerance test*

Basal glucose and insulin were significantly reduced ( $P < 0.01$ ) by quercetin. Consequently, HOMA-IR, an indirect index of insulin resistance, was also diminished ( $P < 0.01$ ). Moreover,

## RESULTS AND DISCUSSION

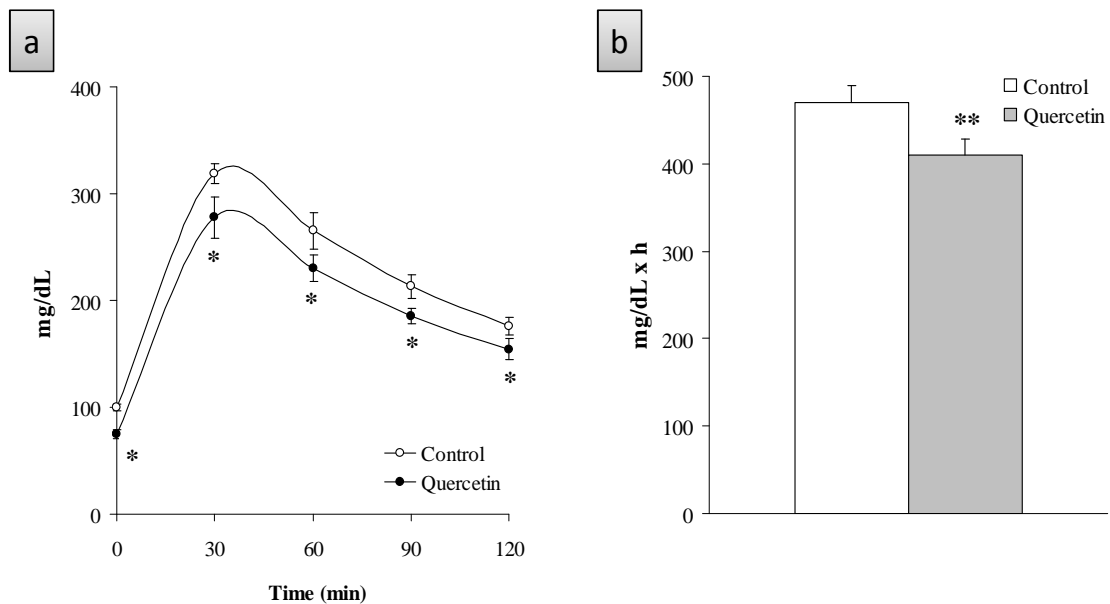
fructosamine concentration (an indicator of the average blood glucose concentration over a short-medium period) was significantly reduced by the addition of quercetin to the diet ( $P < 0.01$ ). However, no significant differences were found in free fatty acid concentrations (Table 2).

**Table 2.** Serum parameters of rats from control and quercetin-treated groups.

	Control	Quercetin	<i>P</i>
Glucose (mmol/L)	5.53 ± 0.40	4.09 ± 0.16	< 0.01
Insulin (mU/L)	37 ± 7	12 ± 2	< 0.01
HOMA-IR	9.5 ± 1.9	2.2 ± 0.3	< 0.01
Fructosamine (mmol/L)	346 ± 12	279 ± 6	< 0.01
Free fatty acids (mmol/L)	1.20 ± 0.19	1.45 ± 0.26	NS

Values are means ± SEM (n = 9). Differences between groups were determined Student's *t* test. Statistical significance was set-up at the  $P < 0.05$  level. NS, not significant.

In the glucose tolerance test, rats treated with quercetin showed significantly lower blood glucose values than control rats. Consequently, AUC in quercetin group was significantly reduced (- 13%,  $P < 0.01$ ) (Figures 1a and 1b).



**Figure 1.** Glycaemic response in glucose tolerance test (a) and Area Under the Curve (AUC) of glucose tolerance test (b) of rats from control and quercetin-treated groups (n=9 per group). Values are means ± SEM. Differences between groups were determined by Student's *t* test. Statistical significance was set-up at the  $P < 0.05$  level. \* $P < 0.05$ .

## RESULTS AND DISCUSSION

### *Enzyme activities in adipose tissue*

Quercetin treatment did not modify the activity of lipogenic enzymes (G6PDH, ME and FAS) and HR-LPL in adipose tissue (Table 3). The phosphorylated-ACC/total ACC protein ratio remained unchanged ( $2.37 \pm 0.41$  in the control group vs  $1.55 \pm 0.41$  in the quercetin-treated group), indicating that ACC activity was not modified by quercetin.

**Table 3.** Enzyme activities in adipose tissue and skeletal muscle of rats from Control and Quercetin-treated groups.

	Control	Quercetin	P
<i>Adipose tissue</i>			
G6PDH (nmol/min/g tissue)	84.5 ± 18.0	62.6 ± 9.9	NS
ME (nmol/min/g tissue)	55.6 ± 5.7	56.9 ± 6.3	NS
FAS (nmol/min/g tissue)	12.1 ± 1.2	10.5 ± 1.5	NS
HR-LPL (nmol/min/g tissue)	7.0 ± 0.9	8.4 ± 0.9	NS
<i>Skeletal muscle</i>			
CPT-1b (nmol/min/mg protein)	3.7 ± 1.0	4.7 ± 1.4	NS
CS (nmol/min/mg protein)	34.6 ± 5.4	42.7 ± 5.5	NS

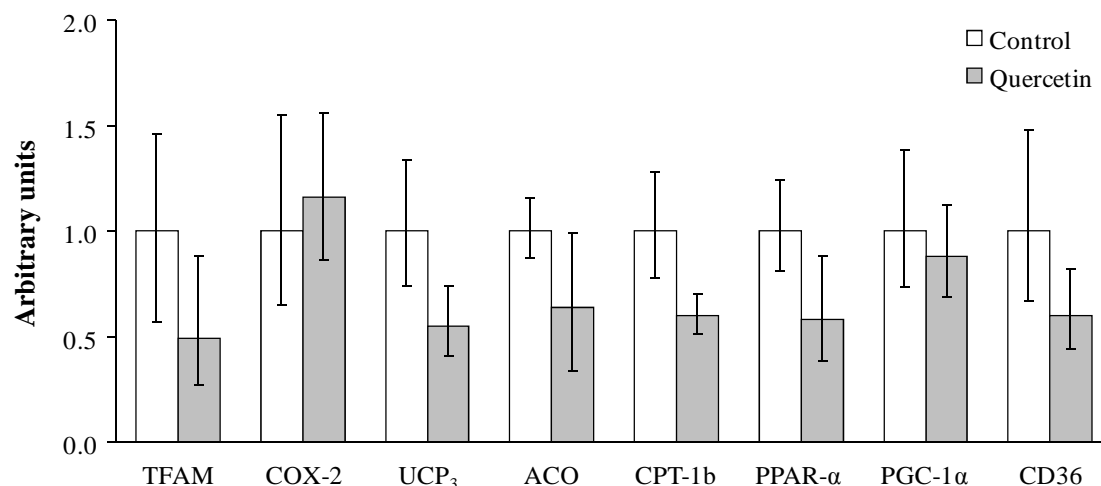
Values are means ± SEM (n = 9). Differences between groups were determined by Student's t test. Statistical significance was set-up at the P <0.05 level. NS, not significant. G6PDH glucose-6-phosphate dehydrogenase, ME malic enzyme, FAS fatty acid synthase, HR-LPL heparin-releasable lipoprotein lipase, CPT-1b carnitine palmitoyl transferase-1b, CS citrate synthase.

### *Skeletal muscle determinations*

No significant differences were found in triacylglycerol content (mg/g) ( $11.3 \pm 1.8$  in the control group vs  $8.6 \pm 0.8$  in the quercetin-treated group). The amount of this lipid species in skeletal muscle depends to a great extent on fatty acid oxidation. Thus, the gene expression (Table 4) and the activity of CPT-1b, a rate-limiting enzyme for this metabolic pathway, and citrate synthase activity, a marker of mitochondrial density [19] were assessed, and no significant differences were found between groups (Table 3).

Skeletal muscle was also used to measure the expression of CD36, a fatty acid transporter, as well as that of genes related to fatty acid oxidation, such as CPT-1b, ACO, PPAR- $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$  and UCP<sub>3</sub>. Finally, the expression of genes known as markers of mitochondria number, such as TFAM and COX-2, was analyzed. No effect on the expression of all these genes was observed (Figure 2).

## RESULTS AND DISCUSSION



**Figure 2.** Gen expressions in skeletal muscle of rats from control and quercetin-treated groups (n=9 per group). Results are expressed as fold changes of threshold cycle (Ct) value relative to controls. Values are means  $\pm$  positive and negative errors. Differences between groups were determined by Student's *t* test. Statistical significance was set-up at the  $P < 0.05$  level. No significant difference was found between both experimental groups. TFAM transcription factor A mitochondrial, COX-2 mitochondrial electron transport chain's complex-2, UCP<sub>3</sub> uncoupling protein 3, ACO acyl-coenzyme A oxidase, CPT-1b: carnitine palmitoyl transferase-1b, PPAR- $\alpha$  peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$  peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- $\alpha$ , CD36 cluster of differentiation 36.

### DISCUSSION

Evidence supporting the health benefits of polyphenols has been increasing over the course of the past few years. In the field of obesity and related metabolic alterations, some of these polyphenols have shown a clear anti-obesity action in animal models. One of the most frequently studied molecules is Resveratrol, which belongs to the group of stilbenes [20-26]. With regard to flavonoids, and more specifically to quercetin, little is known of any potential role in obesity prevention or treatment.

*In vitro* studies have demonstrated that quercetin reduces triacylglycerol accumulation in cultured adipocytes [27-29]. Data obtained in these studies are interesting and promising, but it is essential not to forget that important limitations exist in extrapolating these results to the *in vivo* situation. With regard to *in vivo* studies, some of these analyzed the effect of quercetin on body weight although body fat was not measured [30, 31]. A small number of studies have analyzed the effect of this flavonoid on body fat. Sterwart *et al.* [32] found no changes in adiposity among mice fed on a high-fat diet supplemented with 0.8% of quercetin (which led to a dose of approximately 1g/kg body weight/d) for 3 or 8 weeks. By contrast, Kobori *et al.* [33] observed a significant decrease in visceral fat (-15.5%) in mice fed a western diet supplemented with 0.05% quercetin for 20 weeks. More recently, Jung *et al* [7] have found a significant reduction in epididymal adipose tissue in mice fed a diet supplemented with 0.025% for 9 weeks. With regard to experiments performed in rats, no changes in adipose tissue weight were observed in animals fed a high-fat diet supplemented with 0.03% (25 mg diet/kg

## RESULTS AND DISCUSSION

---

of body weight/day) for 4 weeks [34]. By contrast, quercetin attenuated abdominal obesity (-37%) in animals fed on a high-fat diet supplemented with 0.08% quercetin for 8 weeks [35].

As indicated in the previous paragraph, reported data from studies carried out in mice have been obtained by using a wide range of quercetin doses (0.025-0.8% in the diet). Significant reductions in body fat have been observed in this range even with the lowest dose of 0.025%. This suggests that high doses are not needed for this flavonoid to show anti-obesity effects. Another important factor to be considered is the length of the treatment period needed to cause a significant effect. Among the reported studies, those with experimental periods of 9 and 20 weeks reported significant reductions in body fat, and those with shorter experimental periods (3-8 weeks) did not. Thus, it can be hypothesized that quercetin may need at least 9 weeks to be effective as an anti-obesity molecule in mice. When data obtained in rats are analyzed, it can be observed that a dose of 0.03% was effective in mice whilst ineffective in rats [34]. This can support the hypothesis that short experimental periods are not enough for quercetin to reduce body fat because in that study rats were treated for 4 weeks. Nevertheless, the possibility of a varying species-dependent threshold dose cannot be discarded.

In the present study, quercetin reduced by 9.1% the fat accumulated in the four fat pads dissected and weighed (epididymal+perirenal+mesenteric+subcutaneous), but this reduction did not reach statistical significance. Taking into account the hypothesis provided in the previous paragraph, based on the results reported in the literature, the lack of a significant change could be attributable to the length of the experimental period. In this context, it is important to point out that in previous studies from this laboratory using exactly the same experimental design as the present study (polyphenol dose, treatment period length, diet, animals model), resveratrol induced a significant reduction in adipose tissue sizes [36], indicating that important differences exist in the potential anti-obesity action of polyphenols.

In order to gain more insight into the effect of quercetin on adipose tissue triacylglycerol metabolism the activities of lipogenic enzymes (G6PDH, ME, FAS, ACC) and HR-LPL were analysed. No changes were observed in any enzyme activity, which indicates that neither *de novo* lipogenesis, nor the lipid uptake from circulating lipoproteins were affected by this flavonoid.

Taken together, these data do not lend support to an anti-obesity action of quercetin under the experimental conditions of dose and over the experimental period described here. When considering this conclusion it is important to underline that the dose used in the present study (30 mg/kg/d), which is very similar to those used in other studies carried out in rodents, was equivalent to 4.86 mg/kg body weight/d in humans (340.5 mg for a person of 70 kg), calculated by using the formula reported by Reagan-Shaw et al [37], which is in the 200-400 mg/d range of average human consumption [38].

It is well known that a high-fat high-sucrose diet leads not only to increased body fat accumulation, but also to insulin resistance [39]. In the present study quercetin improved glycaemic control, as shown by the HOMA-IR index, which in rats yields a good estimate of whole body insulin sensitivity [40], glucose tolerance test and serum fructosamine

## RESULTS AND DISCUSSION

---

concentrations. This would appear to be a direct effect, independent of the fat accumulated in adipose tissues, since a significant reduction in this parameter was not observed. On the other hand, as previously mentioned, data in the literature suggests that treatment periods of less than 9 weeks duration are insufficient for quercetin to reduce fat but, according to the results presented in the present study, they allow this flavonoid to improve insulin action. This lends support to the hypothesis that the effect of quercetin on insulin action is independent of, and previous to, the effect on fat accumulation.

The present results are in good accordance with other published studies carried out in animal models showing insulin resistance or type 2 diabetes [30, 31, 34, 41]. Nevertheless, there is no general agreement concerning the effect of quercetin on glycaemic control. For example, Stewart et al. [32], whose experiment induced insulin resistance in rats by feeding animals on a high-fat diet, observed that quercetin, at a dose of 0.8% in the diet, exacerbated diet-induced insulin resistance at 3 weeks.

The authors of those studies which found positive effects of quercetin on glycaemic control proposed several mechanisms to explain the beneficial effect of this polyphenol: a) the anti-oxidative protective action on the pancreatic islets [41-43] b) the increase in adiponectin circulating concentration [34], c) the inhibition of small intestine glucosidase activity [31], d) the reduction in the intestinal glucose absorption mediated by GLUT2 [44], e) the increase of glucokinase activity [45] and f) the increase in GLUT4 transporters in skeletal muscle [46-48].

Recently, Shen et al. [47] have proposed a new mechanism to explain the improvement in insulin resistance induced by pentamethylquercetin. These authors have shown that this flavonoid increases the expression of genes involved in fatty acid oxidation, such as PPAR- $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$ , CPT-1b and ACO, in C2C12 myotubes.

Skeletal muscle, the major peripheral tissue in which insulin-responsive glucose uptake and utilization take place, is one of the tissues negatively affected by insulin resistance. One of the proposed factors involved in the impairment of insulin function is increased skeletal muscle lipid deposition [49]. Under overfeeding conditions which lead to obesity, such as those of the present study, the influx of fatty acids to skeletal muscle is increased. This causes increased intramyocellular concentration of triacylglycerols, and leads to insulin resistance by perturbing insulin signalling pathways [50].

The mechanism of action proposed by Shen et al. [47] has not been demonstrated under *in vivo* conditions. Thus, in this context, the potential involvement of increased fatty acid oxidation in skeletal muscle in the reduction of insulin resistance induced by quercetin was assessed in the present study. Quercetin did not modify the expression of genes related to fatty acid oxidation, such as the transcription factor PPAR- $\alpha$ , its co-activator PGC-1 $\alpha$  and two key enzymes CPT-1b and ACO regulated by PPAR- $\alpha$ . A similar situation was found when the expression of genes considered as markers of mitochondria number, such as TFAM and COX-2, was assessed. Finally, the expression UCP<sub>3</sub>, an uncoupling protein related to fatty acid oxidation [51] and CD36, a fatty acid transporter, remained unchanged after quercetin treatment. In good accordance with these data, quercetin did not modify the activity of CPT-1b and CS, a marker of mitochondrial density [19], and did not show a delipidating effect in

## RESULTS AND DISCUSSION

---

skeletal muscle. These results demonstrate that the increase in fatty acid oxidation reported under *in vitro* conditions in C2C12 myotubes did not take place in an animal model of insulin resistance, at least under the experimental conditions described here.

In conclusion, the present results suggest that quercetin seems to be more effective as an anti-diabetic than as an anti-obesity biomolecule, and that the improvement in insulin resistance induced by this flavonoid is not mediated by a delipidating effect in skeletal muscle.

### *Aknowledgements*

This study was supported by grants from the Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2011-27406-ALI), Instituto de Salud Carlos III (CIBERobn), Government of the Basque Country (IT-512-13) and University of the Basque Country (UPV/EHU) (ELDUNANOTEK, UFI11/32). N. Arias is a recipient of a doctoral fellowship from the Government of the Basque Country (UPV/EHU).

## RESULTS AND DISCUSSION

---

### REFERENCES

- [1] Barness LA (2007) Obesity in children. *Fetal Pediatr Pathol.* 26(2): p. 75-85.
- [2] Kopelman PG (2000) Obesity as a medical problem. *Nature.* 404(6778): p. 635-43.
- [3] Somers SM and Johannot L (2008) Dietary flavonoid sources in Australian adults. *Nutr Cancer.* 60(4): p. 442-9.
- [4] Bischoff SC (2008) Quercetin: potentials in the prevention and therapy of disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 11(6): p. 733-40.
- [5] Zhang R, Yao Y, Wang Y, Ren G. (2011) Antidiabetic activity of isoquercetin in diabetic KK - Ay mice. *Nutr Metab (Lond).* 8: p. 85.
- [6] Chirumbolo S (2010) The role of quercetin, flavonols and flavones in modulating inflammatory cell function. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 9(4): p. 263-85.
- [7] Jung CH, Cho I, Ahn J, Jeon TI, Ha TY (2013) Quercetin reduces high-fat diet-induced fat accumulation in the liver by regulating lipid metabolism genes. *Phytother Res.* 27(1): p. 139-43.
- [8] Perez-Vizcaino F, Duarte J, Jimenez R, Santos-Buelga C, Osuna A (2009) Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin. *Pharmacol Rep.* 61(1): p. 67-75.
- [9] Han JJ, Hao J, Kim CH, Hong JS, Ahn HY, Lee YS (2009) Quercetin prevents cardiac hypertrophy induced by pressure overload in rats. *J Vet Med Sci.* 71(6): p. 737-43.
- [10] Aguirre L, Arias N, Macarulla MT, Gracia A., Portillo MP. (2011) Beneficial effects of quercetin on obesity and diabetes. *The Open Nutraceuticals Journal.* p. 189-198.
- [11] Tai MM (1994) A mathematical model for the determination of total area under glucose tolerance and other metabolic curves. *Diabetes Care.* 17(2): p. 152-4.
- [12] Matthews DR, Hosker J, Rudenski As, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC (1985) Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 28(7): p. 412-9.
- [13] Zabala A, Churrua I, Fernández-Quintela A, Rodriguez V, Macarulla MT, Martínez J, Portillo MP (2006) trans-10,cis-12 Conjugated linoleic acid inhibits lipoprotein lipase but increases the activity of lipogenic enzymes in adipose tissue from hamsters fed an atherogenic diet. *Br J Nutr.* 95(6): p. 1112-9.
- [14] Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: p. 248-54.
- [15] Folch J, Lees M and Sloane Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem FIELD Full Journal Title: The Journal of biological chemistry.* 226(1): p. 497-509.
- [16] Bieber LL, Abraham T and Helmrath T (1972) A rapid spectrophotometric assay for carnitine palmitoyltransferase. *Anal Biochem.* 50(2): p. 509-18.
- [17] Srere PA. (1969) Citrate synthase. *Methods Enzymol.* p. 3-11.
- [18] Livak KJ and Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 25(4): p. 402-8.



## RESULTS AND DISCUSSION

---

- [19] Pajuelo D, Fernández-iglesias A, Díaz S, Quesada H, Arola-Arnal A, Bladé C, Salvadó J, Arola L (2011) Improvement of mitochondrial function in muscle of genetically obese rats after chronic supplementation with proanthocyanidins. *J Agric Food Chem.* 59(15): p. 8491-8.
- [20] Ahn J, Cho I, Kim S, Kwon D, Ha T (2008) Dietary resveratrol alters lipid metabolism-related gene expression of mice on an atherogenic diet. *J Hepatol.* 49(6): p. 1019-28.
- [21] Baile CA, Yang JY, Rayalam S, Hartzell DL, Lai CY, Andersen C, Della-Ferra MA (2011) Effect of resveratrol on fat mobilization. *Ann N Y Acad Sci.* 1215: p. 40-7.
- [22] Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta EG, Le Couteur D, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, de Cabo R, Sinclair DA (2006) Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature.* 444(7117): p. 337-42.
- [23] Dal-Pan A, Blanc S, and Aujard F (2010) Resveratrol suppresses body mass gain in a seasonal non-human primate model of obesity. *BMC Physiol.* 10: p. 11.
- [24] Macarulla MT, Alberdi G, Gomez S, Tueros I, Bald C, Rodriguez VM, Martinez JA, Portillo MP (2009) Effects of different doses of resveratrol on body fat and serum parameters in rats fed a hypercaloric diet. *J Physiol Biochem.* 65(4): p. 369-76.
- [25] Rivera L, Moron R, Zarzuelo A, Galisteo M (2009) Long-term resveratrol administration reduces metabolic disturbances and lowers blood pressure in obese Zucker rats. *Biochem Pharmacol.* 77(6): p. 1053-63.
- [26] Szkudelska K, Nogowski L and Szkudelski T (2009) Resveratrol, a naturally occurring diphenolic compound, affects lipogenesis, lipolysis and the antilipolytic action of insulin in isolated rat adipocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 113(1-2): p. 17-24.
- [27] Kuppasamy UR and Das NP (1992) Effects of flavonoids on cyclic AMP phosphodiesterase and lipid mobilization in rat adipocytes. *Biochem Pharmacol* 44(7): p. 1307-15.
- [28] Hsu CL and Yen GC (2006) Induction of cell apoptosis in 3T3-L1 pre-adipocytes by flavonoids is associated with their antioxidant activity. *Mol Nutr Food Res.* 50(11): p. 1072-9.
- [29] Ahn J, Lee H, Kim S, Park J, Ha T (2008) The anti-obesity effect of quercetin is mediated by the AMPK and MAPK signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun.* 373(4): p. 545-9.
- [30] 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(9): p. 2081-7.
- [31] Kim JH, Kang MJ, Choi HN, Jeong SM, Lee YM, Kim JI (2011) Quercetin attenuates fasting and postprandial hyperglycemia in animal models of diabetes mellitus. *Nutr Res Pract.* 5(2): p. 107-11.
- [32] Stewart LK., Soileau JL., Ribnicky D., Wang ZQ., Raskin I., Poulev A., Majewski M., Cefalu WT., Gettys TW. (2008) Quercetin transiently increases energy expenditure but persistently decreases circulating markers of inflammation in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. *Metabolism.* 57(7 Suppl 1): p. S39-46.
- [33] Kobori M, Masumoto S, Akimoto Y, Oike H (2011) Chronic dietary intake of quercetin alleviates hepatic fat accumulation associated with consumption of a Western-style diet in C57/BL6J mice. *Mol Nutr Food Res.* 55(4): p. 530-40.

## RESULTS AND DISCUSSION

---

- [34] Wein S, Behm N, Petersen RK, Kristiansen K, Wolfram S (2010) Quercetin enhances adiponectin secretion by a PPAR-gamma independent mechanism. *Eur J Pharm Sci.* 41(1): p. 16-22.
- [35] Panchal SK, Poudyal H, and Brown L (2012) Quercetin ameliorates cardiovascular, hepatic, and metabolic changes in diet-induced metabolic syndrome in rats. *J Nutr.* 142(6): p. 1026-32.
- [36] Alberdi G, Rodriguez VM, Miranda J, Macarulla MT, Arias N, Andres-Lacueva C, Portillo MP (2011) Changes in white adipose tissue metabolism induced by resveratrol in rats. *Nutr Metab (Lond).* 8(1): p. 29.
- [37] Reagan-Shaw S, Nihal M and Ahmad N (2008) Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J.* 22(3): p. 659-61.
- [38] Manach C, Morand C, Crespy V, Demigne C, Texier O, Regeat F, Remesy C (1998) Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. *FEBS Lett.* 426(3): p. 331-6.
- [39] Hegarty BD, Furler SM, Ye J, Cooney GJ, Kraegen EW (2003) The role of intramuscular lipid in insulin resistance. *Acta Physiol Scand.* 178(4): p. 373-83.
- [40] Cacho J, Sevillano J, de Castro J, Herrera E, Ramos MP (2008) Validation of simple indexes to assess insulin sensitivity during pregnancy in Wistar and Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 295(5): p. E1269-76.
- [41] Jeong SM, Kang MJ, Choi HN, Kim JH, Kim JI (2012) Quercetin ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia and improves antioxidant status in type 2 diabetic db/db mice. *Nutr Res Pract.* 6(3): p. 201-7.
- [42] Coskun O, Kanter M, Korkmaz A, Oter S (2005) Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas. *Pharmacol Res.* 51(2): p. 117-23.
- [43] Babujanathanam R, Kavitha P, and Pandian MR (2010) Quercitrin, a bioflavonoid improves glucose homeostasis in streptozotocin-induced diabetic tissues by altering glycolytic and gluconeogenic enzymes. *Fundam Clin Pharmacol.* 24(3): p. 357-64.
- [44] Kwon O, Eck P, Chen S, Corpe CP, Lee JH, Kruhlak M, Levine M (2007) Inhibition of the intestinal glucose transporter GLUT2 by flavonoids. *FASEB J.* 21(2): p. 366-77.
- [45] Vessal M, Hemmati M and Vasei M (2003) Antidiabetic effects of quercetin in streptozocin-induced diabetic rats. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 135C(3): p. 357-64.
- [46] Jung JY, Lim Y, Moon MS, Kim JY, Kwon O (2011) Onion peel extracts ameliorate hyperglycemia and insulin resistance in high fat diet/streptozotocin-induced diabetic rats. *Nutr Metab (Lond).* 8(1): p. 18.
- [47] Shen JZ, Ma LN, Han Y, Liu JX, Yang WQ, Chen L, Liu Y, Hu Y, Jin MW (2012) Pentamethylquercetin generates beneficial effects in monosodium glutamate-induced obese mice and C2C12 myotubes by activating AMP-activated protein kinase. *Diabetologia.* 55(6): p. 1836-46.
- [48] Anhe GF, Okamoto MM, Kinote A, Sollon C, Lellis-Santos C, Anhe FF, Lima GA, Hirabara SM, Velloso LA, Bordin S, Machado UF (2012) Quercetin decreases inflammatory response and increases insulin action in skeletal muscle of ob/ob mice and in L6 myotubes. *Eur J Pharmacol.* 689(1-3): p. 285-93.

## RESULTS AND DISCUSSION

---

- [49] Hulver MW and Dohm GL (2004) The molecular mechanism linking muscle fat accumulation to insulin resistance. *Proc Nutr Soc.* 63(2): p. 375-80.
- [50] Eckardt K, Taube A and Eckel J (2011) Obesity-associated insulin resistance in skeletal muscle: role of lipid accumulation and physical inactivity. *Rev Endocr Metab Disord.* 12(3): p. 163-72.
- [51] Senese R, Valli V, Moreno M, Lombardi A, Busiello RA, Cioffi F, Silvestri E, Goglia F, Lanni A, de Lange P (2011) Uncoupling protein 3 expression levels influence insulin sensitivity, fatty acid oxidation, and related signaling pathways. *Pflugers Arch.* 461(1): p. 153-64.

**Manuscrito 4 - Manuscript 4**

Arias N, Macarulla MT, Aguirre L, Milton I, Portillo MP

***La combinación de resveratrol y quercetina mejora de forma sinérgica el efecto individual de cada una de las moléculas en el metabolismo de triglicéridos del tejido adiposo***

***The combination of resveratrol and quercetin enhances the individual effects of these molecules on triacylglycerol metabolism in adipose tissue***

Eur. J. Nutrition, 201



## RESULTS AND DISCUSSION

---

### ABSTRACT

*Purpose:* The aim of this study was to analyze whether the combination of resveratrol and quercetin showed additive or synergic effects on body fat accumulation and triacylglycerol metabolism in adipose tissue from rats fed an obesogenic diet.

*Material and methods:* Rats were divided into four dietary groups: a control group and three groups each treated with either resveratrol (15 mg/kg/day; RSV), quercetin (30 mg/kg/day; Q), or both (15 mg resveratrol/kg/day and 30 mg quercetin/ kg/day; RSV + Q) for 6 weeks. White adipose tissues from several anatomical locations were dissected. Serum parameters were analyzed by using commercial kits. The activities of fatty acid synthase and heparin-releasable lipoprotein lipase (HR-LPL) were measured using spectrophotometric and fluorimetric methods, and protein expression of acetyl-CoA carboxylase (ACC), adipose tissue triglyceride mlipase (ATGL), and hormone-sensitive lipase (HSL) by western blot.

*Results:* The administration of either resveratrol or quercetin separately did not induce significant reductions in adipose tissue weights. By contrast, the combination of both molecules led to a significant reduction in all the fat depots analyzed. The percentage of reduction in each tissue was greater than the calculated additive effect. HR-LPL activity was reduced in RSV and RSV + Q groups. The activity of HSL was not modified. By contrast, ACC was inhibited and ATGL increased only by the combination of both polyphenols.

*Conclusion:* The results obtained demonstrate a synergistic effect between resveratrol and quercetin and suggest that when these molecules are combined, a great number of metabolic pathways involved in adipose tissue triacylglycerol accumulation are affected.

**Keywords:** Resveratrol, quercetin, obesity, white adipose tissue, rat

# RESULTS AND DISCUSSION

---

## INTRODUCTION

The prevalence of obesity in Western societies has increased dramatically in the recent years [1–3]. As a result, scientific research is constantly looking for new biomolecules which occur naturally in foodstuffs and plants and which can be effective in the prevention or treatment of this disease. In this context, considerable attention has been paid to polyphenols, and beneficial effects have been found. A general consensus concerning the body fat-lowering effect of resveratrol in mice and rats exists [4, 5]. Several studies have also shown this effect in primates [6, 7]. As far as quercetin is concerned, although controversial results have been reported, several authors have found decreases in body fat after quercetin treatment in mice and rats [8, 9]. No data for primates are available. In human beings, a small number of studies have been reported to date.

Yoshino et al. [10] observed no changes in body fat in nonobese, postmenopausal women treated with resveratrol at a dose of 75 mg/day, for 12 weeks. The lack of effects may be due to the fact that subjects were not obese. No changes in body fat were also found by Crandall et al. [11] in adults aged 65 years and older, with a mean body mass index of  $29 \pm 5$  kg/m<sup>2</sup>, treated with 1, 1.5 or 2 g/day resveratrol for 4 weeks, and by Poulsen et al. [12] in healthy obese subjects treated with resveratrol, at a dose of 500 mg/day, for 4 weeks. In these cases, the lack of effect could be due to the short treatment period. Finally, there is a study conducted in overweight–obese subjects treated with resveratrol at a dose of 3,000 mg/day for 8 weeks in which no changes in total adipose tissue were observed [13]. In this case, it is important to point out that the dose of resveratrol used was very high. There are data in the literature showing that low doses of resveratrol are sometimes more effective than higher doses [14, 15]. By contrast, Timmers et al. [16] found a reduction in adipocyte size in subjects treated with resveratrol at a dose of 150 mg/day for 30 days. In summary, the reported studies do not allow a clear conclusion concerning the effects of resveratrol in humans to be reached, and further studies are needed in this field of research. No clinical studies have been addressed to assess the anti-obesity effect of quercetin.

In the vast majority of the studies reported, these molecules have been investigated as monotherapies. However, the use of combinations of natural products to achieve additive or synergistic effects might be an interesting approach. As far as polyphenols and obesity are concerned, few studies have investigated the effects of combinations of these biomolecules, and the results reported have been obtained in cultured cells. Thus, Yang et al. [17] showed that resveratrol and quercetin caused an enhanced increase in apoptosis in mature adipocytes compared with the predicted additive response. Also in maturing pre-adipocytes, they observed that the combination of these molecules caused an enhanced inhibition of adipogenesis, compared with the predicted additive response. The same group reported similar results by combining quercetin, resveratrol, and mgenistein [18, 19]. Herranz-López et al. [20] observed that the effect on adipogenesis of a standardized *Hibiscus sabdariffa* extract, rich in several polyphenols, was higher than the sum of its parts.

These studies provide interesting and promising results, which should be checked under in vivo conditions. It is important to remember that the potential interactions in absorption and

## RESULTS AND DISCUSSION

---

metabolism among biomolecules cannot be analyzed in cultured cells. Furthermore, the doses used in in vitro studies are frequently far higher than the concentrations of these biomolecules found in blood and tissues in in vivo studies, and this makes it difficult to extrapolate results.

The aim of the present study was to analyze whether the combination of resveratrol, a stilbene abundant in red wine, grapes, berries, and nuts [21], and quercetin, a flavonoid found in abundance in onions, broccoli, tomatoes, apples, and berries [22], might show additive or synergic effects on body fat accumulation and triacylglycerol metabolism in adipose tissue of rats fed an obesogenic diet.

### MATERIALS AND METHODS

#### *Animals, diets, and experimental design*

The experiment was conducted with thirty-six male 6-week-old Wistar rats purchased from Harlan Ibérica (Barcelona, Spain) and took place in accordance with the institution's guide for the care and use of laboratory animals (CUEID CEBA/30/2010). Rats were individually housed in polycarbonate metabolic cages (Techniplast Gazzada, Buguggiate, Italy) and placed in an air-conditioned room ( $22 \pm 2$  °C) with a 12-h light–dark cycle. After a 6-day adaptation period, rats were randomly divided into four dietary groups of nine animals each: a control group (C), a group treated with 15 mg resveratrol/kg body weight/ day (RSV), a group treated with 30 mg quercetin/kg body weight/day (Q), and a group treated with both 15 mg resveratrol/ kg body weight/day and 30 mg quercetin/kg body weight/day (RSV + Q).

All animals were fed a commercial obesogenic diet (OpenSource Diets Inc., Ref. D12451M), which provided 4.73 kcal/g, for 6 weeks. The composition of this diet was as follows: 233 g/kg of casein, 3.5 g/kg of l-cysteine, 85 g/ kg of cornstarch, 117 g/kg of maltodextrin, 201 g/kg of sucrose, 207 g/kg of lard, 29 g/kg of soy oil, 58 g/kg of cellulose, 12 g/kg of a mineral mixture, 15 g/kg de dibasic phosphate calcium, 12 g/kg of a vitamin mixture, and 2 g/ kg of choline bitartrate. Resveratrol was supplied by Monteloeder (Elche, Spain) and quercetin by Sigma (St. Louis, MO, USA). Resveratrol, quercetin, and the combination of both polyphenols were added to the diet as previously reported [23] in order to ensure the above-mentioned doses. Briefly, taking into account that the rats started eating as soon as the daily diet was replaced, the polyphenol solutions were added to the surface of the diet contained in food boxes in the metabolic cages. All animals had free access to food and water. Food intake and body weight were measured daily.

At the end of the experimental period, animals were killed under anesthesia (chloral hydrate) by cardiac exsanguinations after a 12-h fasting period. White adipose tissue from four anatomical locations (perirenal, epididymal, mesenteric, and subcutaneous) was dissected, weighed, and immediately frozen in liquid nitrogen. For serum collection, blood was allowed to clot at 4 °C before centrifugation (1,000 g for 10 min, at 4 °C). All samples were stored at –80 °C until analysis.



## RESULTS AND DISCUSSION

---

### *Serum parameters*

Commercial kits were used for serum parameter assessment: triacylglycerols (Ref. 1001313 Spinreact, Barcelona, Spain), total cholesterol (Ref. 11505 Biosystem Barcelona, Spain), HDL cholesterol (Ref. 1001095 Spinreact, Barcelona, Spain), free fatty acids (Ref. 11383175001 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), and glucose (Ref. 11503 Biosystem, Barcelona, Spain).

### *Lipoprotein lipase and fatty acid synthase activities*

For heparin-releasable lipoprotein lipase (HR-LPL) activity determination, 500 mg of perirenal adipose tissue were incubated (37 °C, 45 min) in 400 µL of Krebs–Ringerphosphate buffer, which contains 100 mL of NaCl 0.15 M, 4 mL of KCl 0.15 M, 3 mL of CaCl<sub>2</sub> 0.10 M, 1 mL of MgSO<sub>4</sub> 0.15 M, 21 mL of phosphate buffer 50 mM, and 0.26 mg of heparin sodium (pH 7.4). Then, enzyme activity was assessed following the method described by Del Prado et al. [24], with minor modifications [25]. Briefly, samples (100 µL) of incubation medium were incubated (5 min, 37 °C) with a buffer containing dibutyril fluorescein (10 µg/mL), with or without NaCl (2.5 M). Fluorescence was measured, and HR-LPL activity was calculated by subtracting non-LPL lipolytic activity in the presence of NaCl from the total lipolytic activity, determined without NaCl. Results were expressed as nmol oleate released per minute per gram of tissue.

For fatty acid synthase (FAS) activity assay, 1 g of adipose tissue was homogenized in 5 mL of a buffer (pH 7.6) containing 150 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM *N*-acetylcysteine and 0.5 mM dithiothreitol. After centrifuging at 100,000 *g* for 40 min at 4 °C, the supernatant fraction was used for quantification of enzyme activity. FAS activity was measured as previously described [26], from the rate of malonyl-CoA-dependent NADPH oxidation. Briefly, homogenate samples were incubated (5 min, 37 °C) in a buffer containing NADPH (150 µM) and malonyl-CoA (70 µM). NADPH was measured spectrophotometry by reading absorbance at 340 nm, and results were expressed as nmol of NADPH consumed per minute per milligram of protein.

### *Western blot of acetyl-CoA carboxylase, adipose triglyceride lipase, and hormone-sensitive lipase*

For acetyl-CoA carboxylase (ACC), adipose triglyceride lipase (ATGL), and hormone-sensitive lipase (HSL) activity assessment, 100 mg of each perirenal adipose tissue samples were homogenated in 500 µL of cellular PBS (pH 7.4), containing protease inhibitors (100 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and 100 mM iodoacetamide). Homogenates were centrifuged at 500 *g* for 10 min at 4 °C. Protein concentrations in homogenates were measured by Bradford method [27] using bovine serum albumin as standard.

Immunoblot analyses were performed using 20 µg of perirenal extracts separated by electrophoresis in 10 % (for ACC) and 7.5 % (for lipases) SDS–polyacrylamide gel and transferred to PVDF membranes. The membranes were then blocked with 5 % casein PBS-Tween buffer for 2 h at room temperature. Subsequently, they were blotted with the appropriate antibodies overnight at 4 °C. Protein levels were detected via specific antibody for ATGL (Santa Cruz Biotech, CA, USA), HSL, pHSL, ACC and pACC (Cell Signaling) (1:1,000), and polyclonal mouse β-actin antibody (1:5,000) (Sigma, St. Louis, MO, USA). Afterward, polyclonal

## RESULTS AND DISCUSSION

anti-goat for ATGL, anti-rabbit for ACC, pACC, HSL and HSL phosphorylated in Ser660, and anti-mouse for  $\beta$ -actin (Sigma, St. Louis, MO, USA) antibodies (1:5,000) were incubated for 2 h at room temperature, and ATGL, HSL, and ACC were measured. After antibody stripping, the membranes were blocked and then incubated with a pHSL, pACC, and  $\beta$ -actin and measured again. The bound antibodies were visualized by an ECL system (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA) and quantified by a ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Specific bands were identified by using a standard loading buffer (Precision Plus protein standards dual color; Ref. 161-0374 Bio-Rad), and  $\beta$ -actin was used to normalize the results.

### Statistical analysis

Results are presented as mean  $\pm$  standard error of the means. Statistical analysis was performed using SPSS 20.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA). Normal distribution of data was confirmed by Shapiro–Wilks test, and then, they were analyzed by using one-way ANOVA followed by Newman Keuls post hoc test. Statistical significance was set up at the  $P < 0.05$  level.

## RESULTS

### Food intake, final body weight, white adipose tissue weights, and serum parameters

Rats treated with the combination of resveratrol and quercetin showed significantly reduced values of final body weight when compared to rats in the control group. However, no significant changes were observed in rats treated with resveratrol or quercetin alone. No statistical differences in food intake were found among experimental groups (Table 1).

**Table 1.** Final body weight, food intake and adipose tissue weights of rats fed on the experimental diets for 6 weeks.

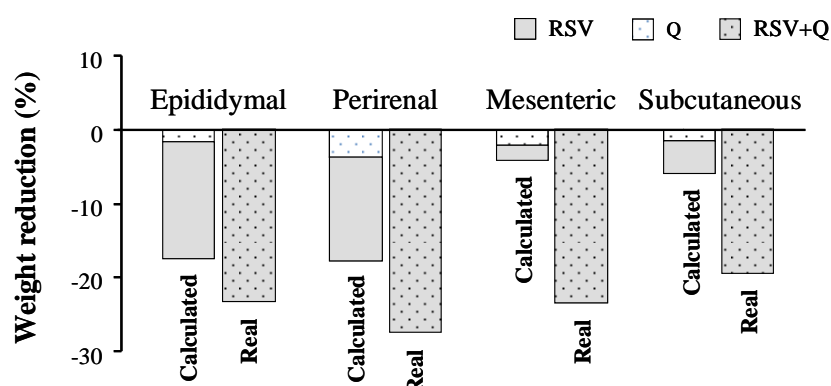
	C	RSV	Q	RSV+Q
Final body weight (g)	381 $\pm$ 4 <sup>a</sup>	377 $\pm$ 7 <sup>ab</sup>	368 $\pm$ 5 <sup>ab</sup>	353 $\pm$ 10 <sup>b</sup>
Food intake (g)	704 $\pm$ 8	706 $\pm$ 12	686 $\pm$ 13	670 $\pm$ 22
Adipose tissue weights (g)				
Epididymal	12.0 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	10.1 $\pm$ 0.8 <sup>ab</sup>	11.8 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	9.2 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>
Perirenal	13.5 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>	11.6 $\pm$ 0.3 <sup>ab</sup>	13.0 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	9.8 $\pm$ 0.9 <sup>b</sup>
Mesenteric	4.7 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	4.6 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	4.6 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	3.6 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>
Subcutaneous	13.4 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	12.8 $\pm$ 1.0 <sup>ab</sup>	13.6 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	10.8 $\pm$ 0.8 <sup>b</sup>

Values are means  $\pm$  SEM (n = 9). Values in the same row with different superscript are significantly different at  $P < 0.05$ . In all comparisons with significant differences  $P$  value was  $< 0.05$ , with the exception of the comparison between C and RSV+Q groups for mesenteric adipose tissue weight ( $P < 0.01$ ).

The administration of resveratrol and quercetin separately did not induce significant reductions in adipose tissue weights. By contrast, the combination of both molecules led to a significant reduction in all the fat depots analyzed (Table 1). We calculated the mean percentage of reduction induced by each polyphenol when administered separately, relative to mean values of corresponding fat depot mass in the control group. Then, we calculated the

## RESULTS AND DISCUSSION

theoretical additive effect of the RSV+ Q combination by adding these mean values (calculated values), and we analyzed whether they were similar to or lower than the real reductions (real values) observed in the present study in RSV + Q group. The real percentage of reduction in each tissue was greater than the calculated additive effect (Fig. 1).



**Figure 1.** Calculated additive reductions (Calculated) and real reductions (Real) in white adipose tissue weights from rats treated with resveratrol (RSV), quercetin (Q) or the combination RSV+Q for 6 weeks (n = 9). Bars on the left side represent the sum of the effects induced by resveratrol (RSV) and quercetin (Q) when administered separately (Calculated). Bars on the right side represent the mean values of the real effect observed in rats treated with the combination of both polyphenols (RSV+Q) (Real).

As far as serum parameters are concerned, resveratrol as well as the combination of resveratrol and quercetin, but not quercetin on its own, reduced serum triacylglycerol concentration. Glucose and free fatty acids were reduced in the three experimental groups treated with polyphenols. No changes were observed in total cholesterol, HDL cholesterol, or non-HDL cholesterol (Table 2).

**Table 2.** Serum parameters of rats fed on the experimental diets for 6 weeks.

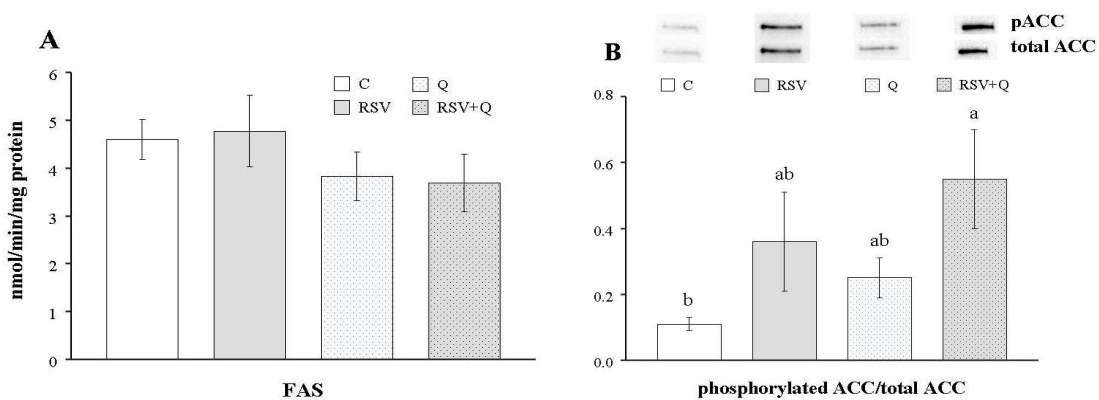
	C	RSV	Q	RSV+Q
Triacylglycerols (mg/dL)	53.4 ± 1.5 <sup>a</sup>	35.8 ± 0.7 <sup>b</sup>	42.7 ± 2.5 <sup>ab</sup>	30.6 ± 3.0 <sup>b</sup>
Cholesterol (mg/dL)				
Total	81.6 ± 7.1	78.0 ± 5.9	88.6 ± 6.3	85.3 ± 5.7
HDL	42.2 ± 3.1	45.0 ± 2.1	49.3 ± 3.3	45.6 ± 1.7
Non-HDL	39.2 ± 3.4	32.9 ± 3.7	39.3 ± 3.3	39.5 ± 3.6
Glucose (mg/dL)	119 ± 3 <sup>a</sup>	104 ± 4 <sup>b</sup>	107 ± 3 <sup>b</sup>	108 ± 5 <sup>b</sup>
Free fatty acids (mmol/L)	0.51 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.28 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.35 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.31 ± 0.03 <sup>b</sup>

Values are means ± SEM (n = 9). Values in the same row with different superscript are significantly different at  $P < 0.05$ .  $P$  values for significant comparisons are as follows: triacylglycerols (C vs RSV and C vs RSV+Q  $P < 0.01$ ), glucose ( $P < 0.05$  for all comparisons), and free fatty acids ( $P < 0.001$  for all comparisons).

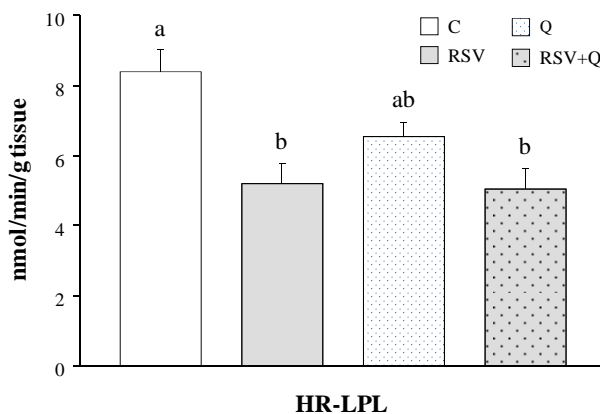
## RESULTS AND DISCUSSION

### Lipogenic and LPL activities

Concerning lipogenic enzymes, no significant differences were found among groups in FAS activity (Fig. 2a). With regard to ACC, its phosphorylation leads to its inactivation; thus, phosphorylated ACC/total ACC protein ratio is an index of ACC activity. This index was increased in the three treated groups, but this increase only reached statistical significance in the RSV + Q group, meaning that this enzyme was significantly inhibited only in this group (Fig. 2b). HR-LPL activity was significantly reduced in rats treated either with resveratrol or with the resveratrol + quercetin, combination, when compared with the control group. However, the activity of this enzyme remained unchanged in rats treated with quercetin (Fig. 3).



**Figure 2.** FAS activity (A) and phosphorylated ACC/total ACC protein expression ratio (B) in adipose tissue from rats treated with resveratrol (RSV), quercetin (Q) or the combination RSV+Q for 6 weeks. Values are means  $\pm$  SEM (n = 9). Values not sharing a common letter are significantly different ( $P < 0.05$ ). FAS, Fatty acid synthase; ACC, Acetyl-CoA carboxylase.

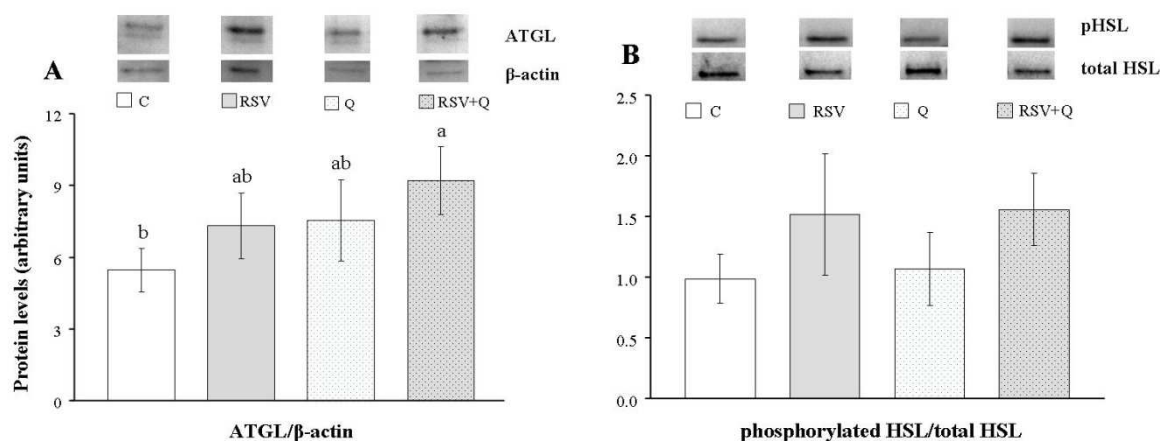


**Figure 3.** HR-LPL activity in adipose tissue from rats treated with resveratrol (RSV), quercetin (Q) or the combination RSV+Q for 6 weeks. Values are means  $\pm$  SEM (n = 9). Values not sharing a common letter are significantly different ( $P < 0.05$ ). HR-LPL, heparin-releasable lipoprotein lipase.

## RESULTS AND DISCUSSION

### ATGL and HSL western blot analysis

Protein expression of ATGL was not modified by resveratrol and quercetin when administered individually. Interestingly, the combination of both polyphenols induced a significant increase in this parameter (Fig. 4a). As far as HSL is concerned, no significant differences were observed in Ser660 phosphorylated HSL/total HSL ratio among experimental groups (Fig. 4b).



**Figure 4.** ATGL protein expression (A) and phosphorylated HSL/total HSL protein expression ratio (B) in adipose tissue from rats treated with resveratrol (RSV), quercetin (Q) or the combination RSV+Q for 6 weeks. Values are means  $\pm$  SEM (n = 9). Values not sharing a common letter are significantly different ( $P < 0.05$ ). ATGL, triglyceride lipase; HSL, hormone sensitive lipase; Ser, serine.

### DISCUSSION

The combination of active biomolecules can be an interesting tool to prevent or ameliorate several diseases, such as obesity, due to potential additive or synergistic effects. Nevertheless, not all combinations are finally effective in in vivo models, as is the case for resveratrol + phenelzine [28] and resveratrol + conjugated linoleic acid [29, 30]. As far as we know, this is the first study devoted to analyzing the effects of a combination of resveratrol and quercetin on body fat accumulation and triacylglycerol metabolism in an in vivo model.

Resveratrol and quercetin were selected because both of them have been reported to reduce body fat accumulation in animal models [8, 9, 15, 26, 31–35]. In the present study, we chose treatment doses of 15 mg/kg body weight/day for resveratrol and 30 mg/kg body weight/day for quercetin. In a previous study from our laboratory, we observed that resveratrol, when administered for 6 weeks at a dose of 6 mg/kg/day to rats fed an obesogenic diet, had no effect on body fat accumulation. By contrast, a dose of 30 mg/kg/day induced a significant reduction in this parameter, and a dose of 60 mg/kg/day did not increase the effect of 30 mg/kg/day, meaning that a “plateau” was reached [23]. Taking this into account, we decided

## RESULTS AND DISCUSSION

---

to choose an intermediate dose in the range 6–30 mg/kg/day, to avoid being near the “plateau,” because this situation might mask any increase in effects. In the case of quercetin, in another earlier study from our laboratory we observed that the sum of epididymal, perirenal, mesenteric, and subcutaneous adipose depots was reduced (–9.1 %) in rats fed an obesogenic diet and treated with 30 mg/kg/day of this polyphenol for 6 weeks, but this reduction did not reach statistical significance [36].

It is important to emphasize that the doses of resveratrol and quercetin used in the present study, which are very similar to those used in other studies carried out in rodents, were equivalent to 170 mg of resveratrol/kg body weight/day and 340 mg of quercetin/kg body weight/day in humans, for a 70 kg body weight subject [37]. These doses are in the range of those used in reported and ongoing human intervention studies [38–40]. The dose of resveratrol is higher than the amount of this polyphenol usually present in the diet (0.5 mg/day in Mediterranean diets), and thus, nutraceuticals or functional foods are needed to achieve it. By contrast, the dose of quercetin is in the range of average human consumption (200–400 mg/day).

When the weight of adipose tissue from different anatomical locations was measured, we observed that rats treated with resveratrol or quercetin did not show significant reductions compared with the controls. By contrast, in rats treated with the combination of these two polyphenols, all the analyzed fat pads were significantly decreased. When the theoretical additive effects were calculated, it was observed that these values were far lower than real values found in RSV + Q group, meaning that a synergistic effect was induced by the combination of these biomolecules. These results are in line with those reported for cultured adipocytes by other authors, who observed significant effects on adipocyte delipidation, adipogenesis, and apoptosis when ineffective doses of several polyphenols (resveratrol, quercetin, and genistein) were combined [8, 17, 19, 41].

Diets rich in fat and sucrose induce not only increased body fat accumulation, but also increased serum concentrations of glucose and lipids [42]. Polyphenols have been reported to prevent these alterations [36, 43–45]. In the present study, no synergistic effects were observed in the beneficial effects induced by resveratrol and quercetin in serum parameters.

In order to gain more insight into the mechanisms underlying this synergistic effect of resveratrol and quercetin on body fat accumulation, the main metabolic processes involved in white adipose tissue triacylglycerol metabolism were assessed in perirenal adipose tissue. As far as *de novo* lipogenesis is concerned, the activity of FAS was not affected by polyphenol treatments. At the doses used in the present study, resveratrol and quercetin, individually, did not modify the phosphorylated ACC/total ACC protein ratio; however, in combination, they induced an increase in this parameter, meaning that ACC was inhibited. Taking into account that ACC is the rate-limiting enzyme in *de novo* lipogenesis [46], it can be proposed that inhibition of this metabolic pathway is one of the mechanisms that could explain the ability of RSV + Q combination to reduce adipose tissue size.

Another important metabolic pathway involved in triacylglycerol accumulation in adipocytes is the uptake from circulating triacylglycerols, which is mediated by LPL. When the activity of HR-LPL (the active form of this enzyme which is placed in adipose tissue endothelium) was

## RESULTS AND DISCUSSION

---

measured, a significant reduction was observed in rats treated with resveratrol alone or the combination of the two polyphenols, but not with quercetin alone. Thus, this effect does not help to explain the synergy between resveratrol and quercetin.

Triacylglycerol amount accumulated in adipocytes also depends on lipid mobilization. ATGL and HSL are the main lipases involved in this metabolic process [47, 48]. In the present study, protein expression of ATGL was significantly increased by the combination of both polyphenols, but not by these molecules administered separately. By contrast, the ratio Ser660 phosphorylated HSL/total HSL, an indicator of HSL activity, was not modified by polyphenol treatments. The hydrolysis of diacylglycerols by HSL occurs at a rate 10- to 30-fold higher than the hydrolysis of triacylglycerols by ATGL, which is the initiating and ratelimiting step in lipolysis [49, 50]. Moreover, it has been reported that overexpression of ATGL enhances lipolysis [51]. Taking all that into account, it may be proposed that increased lipolysis in RSV + Q group, but not in RSV and Q groups, could be another mechanism justifying the synergism in lowering lipid accumulation in fat depots.

Taken together, the results obtained suggest that when resveratrol and quercetin are combined, a great number of metabolic pathways involved in adipose tissue triacylglycerol accumulation are affected. As a consequence, the combination of both polyphenols is more effective in reducing adipose depots than these molecules administered separately.

In conclusion, our findings demonstrate a synergistic effect between resveratrol and quercetin. The enhanced body fat-lowering effect resulting from the combination of resveratrol and quercetin suggest that this could be a useful tool for obesity prevention or treatment. Nevertheless, these results should be further confirmed in humans.

### *Acknowledgments*

This study was supported by grants from the Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2011-27406-ALI), Instituto de Salud Carlos III (Ciberobn), Government of the Basque Country (IT-572-13), and University of the Basque Country (UPV/ EHU) (ELDUNANOTEK UFI11/32). N. Arias is a recipient of a doctoral fellowship from the Basque Country Government. Resveratrol was a generous gift from Monteloeder (Elche, Alicante, Spain).

## RESULTS AND DISCUSSION

---

### REFERENCES

- [1] Kelly T, Yang W, Chen CS, Reynolds K, He J (2008) Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *Int J Obes (Lond)* 32:1431–1437
- [2] van Strien T, Koenders PG (2012) How do life style factors relate to general health and overweight? *Appetite* 58:265–270
- [3] van Vliet-Ostaptchouk JV, Snieder H, Lagou V (2012) Gene–lifestyle interactions in obesity. *Curr Nutr Rep* 1:184–196
- [4] Szkudelska K, Szkudelski T (2010) Resveratrol, obesity and diabetes. *Eur J Pharmacol* 635:1–8
- [5] Aguirre L, Fernández-Quintela A, Arias N, Portillo MP (2014) Resveratrol: anti-obesity mechanisms of action. *Molecules* 19:18632–18655
- [6] Dal-Pan A, Blanc S, Aujard F (2010) Resveratrol suppresses body mass gain in a seasonal non-human primate model of obesity. *BMC Physiol* 10:11
- [7] Jimenez-Gomez Y, Mattison JA, Pearson KJ et al (2013) Resveratrol improves adipose insulin signaling and reduces the inflammatory response in adipose tissue of rhesus monkeys on high-fat, high-sugar diet. *Cell Metab* 18:533–545
- [8] Panchal SK, Poudyal H, Brown L (2012) Quercetin ameliorates cardiovascular, hepatic, and metabolic changes in diet-induced metabolic syndrome in rats. *J Nutr* 142:1026–1032
- [9] Jung CH, Cho I, Ahn J, Jeon TI, Ha TY (2013) Quercetin reduces high-fat diet-induced fat accumulation in the liver by regulating lipid metabolism genes. *Phytother Res* 27:139–143
- [10] Yoshino J, Conte C, Fontana L et al (2012) Resveratrol supplementation does not improve metabolic function in nonobese women with normal glucose tolerance. *Cell Metab* 16:658–664
- [11] Crandall JP, Oram V, Trandafirescu G et al (2012) Pilot study of resveratrol in older adults with impaired glucose tolerance. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 67:1307–1312
- [12] Poulsen MM, Vestergaard PF, Clasen BF et al (2013) High-dose resveratrol supplementation in obese men: an investigator-initiated, randomized, placebo-controlled clinical trial of substrate metabolism, insulin sensitivity, and body composition. *Diabetes* 62:1186–1195
- [13] Chachay VS, Macdonald GA, Martin JH et al (2014) Resveratrol does not benefit patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 12(2092–2103):e2096
- [14] Cho SJ, Jung UJ, Choi MS (2012) Differential effects of lowdose resveratrol on adiposity and hepatic steatosis in diet-induced obese mice. *Br J Nutr* 108:2166–2175
- [15] Gómez-Zorita S, Fernández-Quintela A, Macarulla MT et al (2012) Resveratrol attenuates steatosis in obese Zucker rats by decreasing fatty acid availability and reducing oxidative stress. *Br J Nutr* 107:202–210
- [16] Timmers S, Konings E, Bilet L et al (2011) Calorie restrictionlike effects of 30 days of resveratrol supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans. *Cell Metab* 14:612–622
- [17] Yang JY, Della-Fera MA, Rayalam S et al (2008) Enhanced inhibition of adipogenesis and induction of apoptosis in 3T3-L1 adipocytes with combinations of resveratrol and quercetin. *Life Sci* 82:1032–1039



## RESULTS AND DISCUSSION

---

- [18] Rayalam S, Della-Fera MA, Yang JY, Park HJ, Ambati S, Baile CA (2007) Resveratrol potentiates genistein's antiadipogenic and proapoptotic effects in 3T3-L1 adipocytes. *J Nutr* 137:2668–2673
- [19] Park HJ, Yang JY, Ambati S et al (2008) Combined effects of genistein, quercetin, and resveratrol in human and 3T3-L1 adipocytes. *J Med Food* 11:773–783
- [20] Herranz-López M, Fernández-Arroyo S, Pérez-Sánchez A et al (2012) Synergism of plant-derived polyphenols in adipogenesis: perspectives and implications. *Phytomedicine* 19:253–261
- [21] Langcake P, Pryce RJ (1976) The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiol Plant Pathol* 9:77–86
- [22] Somerset SM, Johannot L (2008) Dietary flavonoid sources in Australian adults. *Nutr Cancer* 60:442–449
- [23] Macarulla MT, Alberdi G, Gómez S et al (2009) Effects of different doses of resveratrol on body fat and serum parameters in rats fed a hypercaloric diet. *J Physiol Biochem* 65:369–376
- [24] Del Prado M, Hernandez-Montes H, Villalpando S (1994) Characterization of a fluorometric method for lipoprotein lipase. *Arch Med Res* 25:331–335
- [25] Miranda J, Churrua I, Fernández-Quintela A et al (2009) Weak effect of trans-10,cis-12-conjugated linoleic acid on body fat accumulation in adult hamsters. *Br J Nutr* 102:1583–1589
- [26] Alberdi G, Rodríguez VM, Miranda J et al (2011) Changes in white adipose tissue metabolism induced by resveratrol in rats. *Nutr Metab (Lond)* 8:29
- [27] Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- [28] Carpené C, Gomez-Zorita S, Gupta R et al (2014) Combination of low dose of the anti-adipogenic agents resveratrol and phenelzine in drinking water is not sufficient to prevent obesity in veryhigh- fat diet-fed mice. *Eur J Nutr* 53:1625–1635
- [29] Arias N, Macarulla MT, Aguirre L et al (2011) The combination of resveratrol and conjugated linoleic acid is not useful in preventing obesity. *J Physiol Biochem* 67:471–477
- [30] Arias N, Miranda J, Macarulla MT et al (2014) The combination of resveratrol and conjugated linoleic acid attenuates the individual effects of these molecules on triacylglycerol metabolism in adipose tissue. *Eur J Nutr* 53:575–582
- [31] Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z et al (2006) Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell* 127:1109–1122
- [32] Rivera L, Morón R, Sánchez M, Zarzuelo A, Galisteo M (2008) Quercetin ameliorates metabolic syndrome and improves the inflammatory status in obese Zucker rats. *Obesity (Silver Spring)* 16:2081–2087
- [33] Shang J, Chen LL, Xiao FX, Sun H, Ding HC, Xiao H (2008) Resveratrol improves non-alcoholic fatty liver disease by activating AMP-activated protein kinase. *Acta Pharmacol Sin* 29:698–706

## RESULTS AND DISCUSSION

---

- [34] Kim S, Jin Y, Choi Y, Park T (2011) Resveratrol exerts anti-obesity effects via mechanisms involving down-regulation of adipogenic and inflammatory processes in mice. *Biochem Pharmacol* 81:1343–1351
- [35] Kobori M, Masumoto S, Akimoto Y, Oike H (2011) Chronic dietary intake of quercetin alleviates hepatic fat accumulation associated with consumption of a Western-style diet in C57/BL6J mice. *Mol Nutr Food Res* 55:530–540
- [36] Arias N, Macarulla MT, Aguirre L, Martínez-Castaño MG, Portillo MP (2014) Quercetin can reduce insulin resistance without decreasing adipose tissue and skeletal muscle fat accumulation. *Genes Nutr* 9:361
- [37] Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N (2008) Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J* 22:659–661
- [38] Timmers S, Auwerx J, Schrauwen P (2012) The journey of resveratrol from yeast to human. *Aging (Albany NY)* 4:146- 158
- [39] de Ligt M, Timmers S, Schrauwen P (2014) Resveratrol and obesity: Can resveratrol relieve metabolic disturbances? *Biochim Biophys Acta* (in press)
- [40] National Institutes of Health (NIH) in USA. [ClinicalTrials.gov](http://ClinicalTrials.gov)
- [41] Rayalam S, Della-Fera MA, Ambati S, Boyan B, Baile CA (2007) Enhanced effects of guggulsterone plus 1,25(OH)2D3 on 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 364:450–456
- [42] Panchal SK, Brown L (2011) Rodent models for metabolic syndrome research. *J Biomed Biotechnol* 2011:351982
- [43] Babacanoglu C, Yildirim N, Sadi G, Pektas MB, Akar F (2013) Resveratrol prevents high-fructose corn syrup-induced vascular insulin resistance and dysfunction in rats. *Food Chem Toxicol* 60:160–167
- [44] Vang O, Ahmad N, Baile CA et al (2011) What is new for an old molecule? Systematic review and recommendations on the use of resveratrol. *PLoS ONE* 6:e19881
- [45] Wang S, Moustaid-Moussa N, Chen L et al (2014) Novel insights, of dietary polyphenols and obesity. *J Nutr Biochem* 25:1–18
- [46] Lane MD, Moss J, Polakis SE (1974) Acetyl coenzyme A carboxylase. *Curr Top Cell Regul* 8:139–195
- [47] Miyoshi H, Perfield JW, Obin MS, Greenberg AS (2008) Adipose triglyceride lipase regulates basal lipolysis and lipid droplet size in adipocytes. *J Cell Biochem* 105:1430–1436
- [48] Watt M, Steinberg G (2008) Regulation and function of triacylglycerol lipases in cellular metabolism. *Biochem J* 414:313–325
- [49] Haemmerle G, Lass A, Zimmermann R et al (2006) Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase. *Science* 312:734–737
- [50] Duncan RE, Ahmadian M, Jaworski K, Sarkadi-Nagy E, Sul HS (2007) Regulation of lipolysis in adipocytes. *Annu Rev Nutr* 27:79–101
- [51] Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G et al (2004) Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* 306:1383–1386



**Manuscrito 5 - Manuscript 5**

Arias N, Catalina P, Macarulla MT, Oliver P, Miranda J, Palou A, Portillo MP

***La combinación de resveratrol y quercetina produce una marronización del tejido adiposo blanco en ratas alimentadas con una dieta obesogénica***

***A combination of resveratrol and quercetin induces browning in white adipose tissue of rats fed an obesogenic diet***



## RESULTS AND DISCUSSION

---

### ABSTRACT

*Introduction:* A new process called “browning”, which consists in the appearance of disseminated brown like adipocytes in white adipose tissue (WAT), has been recently described.

*Purpose:* To analyze whether resveratrol, quercetin, or a combination of both polyphenols, were able to induce white adipose tissue (WAT) browning in rats fed an obesogenic diet.

*Methods and results:* Rats were divided into four groups: control rats and rats treated with resveratrol (15 mg resveratrol/kg body weight/d; RSV group), quercetin (30 mg quercetin/kg body weight/d; Q group) or both polyphenols (RSV+Q group). Final body weight and WAT weights were only significantly reduced in rats from RSV+Q group.

*Results:* In perirenal WAT of control, RSV and Q groups, the vast majority of cells showed the appearance of white unilocular adipocytes. In RSV+Q group, numerous multilocular adipocytes with positive immunostaining for UCP1 were found. Moreover, UCP1 was detected by western blot in the samples that were positive in the immunostaining. These results suggest the brown remodelling of this fat depot. This group also showed increased mRNA levels of *Hox9* and *Cidea* compared to controls. Interscapular brown adipose tissue (iBAT) weight remained unchanged. In this depot, *Cidea* mRNA expression was increased in RSV group and UCP1 protein expression in RSV and RSV+Q groups.

*Conclusions:* In conclusion, the present results show that a combination of resveratrol and quercetin seems to display a brown-like remodelling effect in WAT, which may contribute to the reduction of body fat accretion induced by an obesogenic diet. Further studies are needed in order to gain more insight concerning the effects on polyphenols on this process.

**Key words:** browning, quercetin, resveratrol, uncoupling protein-1

# RESULTS AND DISCUSSION

---

## INTRODUCTION

Brown adipose tissue (BAT), which specializes in dissipating energy as heat (thermogenesis) due to its high mitochondrial content and expression of uncoupling protein 1 (UCP1), plays an important role in energy homeostasis maintenance in rodents [1–3]. This tissue is also involved in plasma triacylglycerol clearance [4] and in glucose homeostasis [5]. These features underline the importance of BAT to prevent obesity and its related metabolic disorders, such as type 2 diabetes and hiperlipidaemia [6].

For many years, the general belief was that only rodents and human newborns showed active BAT, and that this tissue was rapidly lost postnatally [7]. Consequently, the activation of BAT as a tool to combat obesity was discarded. However, in recent years unexpected observations made by radiologists using glucose uptake to search for tumors have demonstrated the presence of BAT in adult humans, specifically in neck, supraclavicular, mediastinum (para-aortic) paravertebral and suprarenal regions [8–14]. This has promoted a renewed interest in BAT thermogenesis as a possible target for stimulation of energy expenditure.

Moreover, a new process called “browning” has been evidenced. It consists in the appearance of disseminated adipocytes in white adipose tissue (WAT), which show similar characteristics to brown adipocytes in response to appropriate stimuli. These brown-like adipocytes are called “beige” or “brite (brown-in white)” [15–18]. Although this is a controversial issue, several authors have proposed that cells in BAT from humans resemble brite fat [18, 19] rather than canonical brown adipocytes [20], based on gene expression profile. In this context, the interest of the scientific community in BAT and brite adipocytes has grown in recent years as potentially useful tools in the fight against obesity and co-morbidities.

Many manipulations that induce browning converge in sympathetic activation of WAT, cold exposure [21] and treatments with  $\beta$ -adrenergic and peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) agonists being the main stimuli [16, 22–24]. The intake of several dietary components has been associated with the browning of WAT [25]. As far as polyphenols are concerned, resveratrol has been reported to induce a browning effect in *in vitro* studies. Thus, in previous studies from our group, this biomolecule enhanced mitochondrial DNA content and fatty acid oxidation, together with UCP1 expression in MEF-derived adipocytes; however, in fully mature 3T3-L1 adipocytes resveratrol enhanced fatty acid oxidation but failed to induce UCP1 expression [26].

It is well known that resveratrol and quercetin are able to activate SIRT1, and that this activation mediates a great number of the effects induced by these molecules, such as their positive effects on lipid metabolism [27–31]. On the other hand, in a recent report the browning function of SIRT1, acting by deacetylating PPAR $\gamma$ , has been shown by using three mouse models of altered SIRT1 activity [32]. Furthermore, it has been reported that the main stimulus for browning induction is the increase in cAMP produced by sympathetic nervous system. In this context, increases in cAMP production induced by these two polyphenols have been reported [33, 34]. Taking all that into account, and considering that *in vivo* data supporting a WAT browning effect is lacking so far, the aim of the present study was to analyze whether two polyphenols that have been reported in the literature to show anti-obesity

## RESULTS AND DISCUSSION

---

properties, resveratrol and quercetin, were able to induce WAT browning in rats fed an obesogenic diet. The effects of a combination of these two polyphenols were also assessed.

### MATERIAL AND METHODS

#### *Animals, diets and experimental design*

The experiment was conducted with twenty seven male 5-week-old Wistar rats purchased from Harlan Ibérica (Barcelona, Spain) and took place in accordance with the institution's guide for the care and use of laboratory animals (CUEID CEBA/30/2010). Rats were individually housed in polycarbonate metabolic cages (Techniplast Gazzada, Guguggiate, Italy), and placed in an air-conditioned room ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) with a 12 h light-dark cycle. After a 6 d adaptation period, rats were randomly divided into four dietary groups: a control group (C group,  $n = 6$ ), a group treated with 15 mg resveratrol/kg body weight/d (RSV group,  $n = 6$ ), a group treated with 30 mg quercetin/kg body weight/d (Q group,  $n = 6$ ), and a group treated with both 15 mg resveratrol/kg body weight/d and 30 mg quercetin/kg body weight/d (RSV+Q group,  $n = 9$ ). All animals were fed a commercial obesogenic diet, high in sucrose (20%) and fat (24%) (OpenSource Diets Inc., Ref. D12451M) for 6 weeks. *Trans*-resveratrol was supplied by Monteloeder (Elche, Spain) and quercetin aglicone by Sigma (St. Louis, MO, USA). Resveratrol and quercetin were added to the diet as previously reported [35] in order to ensure the above mentioned doses. All animals had free access to food and water. Food intake and body weight were measured daily. These animals were a sub-cohort of an experiment carried out previously in our laboratory [36].

At the end of the experimental period, animals were sacrificed under anaesthesia (chloral hydrate) by cardiac exsanguinations after a 12-hour fasting period. WAT from four anatomical locations (perirenal, epididymal, mesenteric and subcutaneous) and interscapular BAT (iBAT) were dissected, weighed and immediately frozen in liquid nitrogen. These samples were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis. For morphologic and immunohistochemical analysis, samples of the different WAT depots were fixed in 4% paraformaldehyde, washed in phosphate buffer and then dehydrated in a graded series of ethanol, before being cleared in xylene and embedded in paraffin blocks.

#### *Morphological analysis*

Five-micrometre-thick sections of perirenal and subcutaneous WAT depots were stained with hematoxylin and eosin to visualise morphology and to identify the presence of multilocular brite adipocytes. Images were acquired with a Zeiss Axioskop 2 microscope equipped with AxioCam ICc3 digital camera and AxioVision 40V 4.6.3.0 Software (Carl Zeiss, S.A., Barcelona, Spain). For morphological analysis 6-9 animals per group were used.

#### *UCP1 immunostaining*

Five-micrometre-thick sections of perirenal and subcutaneous were immunostained by means of the avidin-biotin technique [37]. Briefly, sections were incubated with normal goat serum (Vector Laboratories, Burlingame, CA) to block unspecific sites and then with primary rabbit polyclonal UCP1 antibody (GeneTex International Corporation) diluted 1:350 in PBS overnight at  $4^{\circ}\text{C}$ . Sections were then incubated with the corresponding biotinylated anti-rabbit IgG



## RESULTS AND DISCUSSION

secondary antibody (Vector Laboratories, Burlingame, CA), and finally with ABC complex (Vectastain ABC kit, Vector). Peroxidase activity was revealed by 3,3'-diaminobenzidine hydrochloride as chromogen (Sigma, St. Lois, MO) in water. Sections were counterstained with haematoxylin and mounted in Eukitt (Kindler, Germany). Images were acquired as described in the previous section.

### *Extraction and quantification by real time RT-PCR*

Total RNA was isolated from 100 mg of perirenal WAT and iBAT samples using Trizol (Invitrogen, Carlsbad, Ca, USA), according to the manufacturer's instructions. RNA samples were then treated with DNA-free kit (Applied Biosystems, Austin, TX, USA) to remove any contamination with genomic DNA. The yield and quality of the RNA were assessed by measuring absorbance at 260, 270, 280 and 310 nm. 1.5 µg of total RNA of each sample was reverse-transcribed to first-strand complementary DNA (cDNA) using iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). mRNA expression levels of three key brown/brite adipocyte markers, cell death-inducing DFFA-like effector a (*Cidea*), homeobox C9 (*Hoxc9*), and PR domain containing 16 (*Prdm16*) genes were quantified, as well as  $\beta$ -actin, which served as the reference gene.

A 9.5 µL aliquot of each diluted cDNA sample was used for polymerase chain reaction amplification in a 25 µL reaction volume. The cDNA samples were amplified on an iCycler-MyiQ Real Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) in the presence of SYBRGreen master mix (Applied Biosystems, Austin, TX, USA) and a 300 nM concentration of each of the sense and antisense primers. The PCR parameters were as follows: initial 2 minutes at 50°C, denaturation at 95°C for 10 minutes followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 seconds, annealing at 60°C for 30 seconds and extension at 60°C for 30 seconds. In the case of *Cidea* and *Prdm16* in perirenal adipose tissue, the annealing temperature was 68°C and 58°C respectively. Specific primers were synthesized commercially (Integrated DNA Technologies, Leuven Belgium), and the sequences are shown in Table 1.

**Table 1.** Primers for PCR amplification of each gene studied.

Gene	Primer Sense (5' → 3')	Primer Antisense (5' → 3')
<i>Hoxc9</i>	CGG CAG CAA GCA CAA AGA	AGA AAC TCC TTC TCC AGT TCC A
<i>Cidea</i>	TCA GAC CCT AAG AGA CAA CAC A	CAT TGA GAC AGC CGA GGA
<i>Prdm16</i>	CTT CTC CGA GAT CCG AAA CTT C	GAT CTC AGG CCG TTT GTC CAT
$\beta$ -actin	ACG AGG CCC AGA GCA AGA G	GGT GTG GTG CCA GAT CTT CTC

Hoxc9: homeobox C9; Cidea: cell death-inducing DFFA-like effector a; Prdm16: PR domain containing 16.

Gene expression analysis was performed using the Comparative threshold cycle (Ct) method. Amplification of  $\beta$ -actin sequence was performed in parallel and was used to normalize values obtained for target genes. The results were expressed as fold changes of threshold cycle (Ct) value relative to controls using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method (Livak *et al.*, 2001a).

## RESULTS AND DISCUSSION

---

### *UCP1 western blot analysis*

For the UCP1 western blot, iBAT samples were obtained from each rat and then 100 mg of the tissue was homogenated in 500  $\mu$ L of cellular PBS (pH 7.4), containing nuclease inhibitors, 100 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and 100 mM iodoacetamide. Homogenates were centrifuged at 500 *g* for 10 min at 4°C. Protein concentrations in homogenates were measured with the Bradford method (Bradford, 1976) using bovine serum albumin as standard.

For the perirenal WAT samples, 150 mg of the tissue was homogenated in 500  $\mu$ L of cellular PBS (pH 7.4), containing nuclease inhibitors, 100 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and 100 mM iodoacetamide. Homogenates were centrifuged at 500 *g* for 10 min at 4°C. The obtained sample was concentrated in this case in a centrifugal evaporator system in a cold room during 4 hours (Heto Holten DNA Mini, UK labs Direct). Afterwards, the concentrated proteins were measured with the Bradford method (Bradford, 1976) using bovine serum albumin as standard.

Immunoblot analyses were performed using 30  $\mu$ g of iBAT and 80  $\mu$ g of perirenal WAT extracts separated by electrophoresis in a 10% SDS-polyacrylamide gel and transferred to PVDF membranes. The membranes were then blocked with 5% caseine PBS-Tween buffer for 2 hours at room temperature. Subsequently, they were incubated with the appropriate antibodies overnight at 4°C. UCP1 was detected via specific goat antibody for UCP1 (1:1000) (Santa Cruz Biotech, CA, USA). Afterwards, membranes were incubated with secondary antibody, anti-goat IgG for UCP1 (1:10000) (Sigma, St. Louis, MO, USA), for 2 hours at room temperature. Equal loading of proteins was confirmed by staining the membranes with Coomassie Blue as well as incubating these membranes with polyclonal mouse  $\beta$ -actin antibody (Sigma, St. Louis, MO, USA) as housekeeping protein. The  $\beta$ -actin primary antibody was first overnight incubated (1:5,000) and secondly (after the corresponding whases) with anti-mouse for  $\beta$ -actin (Sigma, St. Louis, MO, USA) antibodies (1:5,000) for 2 h at room temperature. Both UCP1 and  $\beta$ -actin bound antibody was visualized by an ECL system (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA) and quantified by a ChemiDoc MP imaging system (Biorad, Hercules, Ca, USA). Specific bands were identified by using a standard loading buffer (Precision Plus protein standards dual color; Ref. 161-0374 Biorad), and  $\beta$ -actin was used to normalize the results.

### *Statistical analysis*

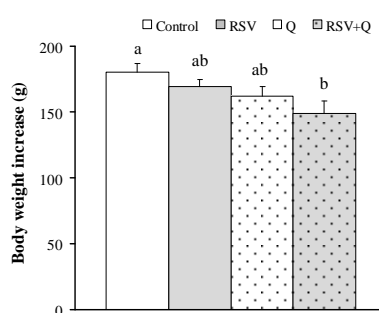
Results are presented as means  $\pm$  standard error of the means. Statistical analysis was performed using SPSS 19.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA). Normal distribution of data was confirmed by Shapiro-Wilks test, and then they were analyzed by using one-way ANOVA followed by Tukey *post hoc* test. Statistical significance was set-up at the  $P < 0.05$  level.

## RESULTS

### *Body weight, food intake and white adipose tissue weights*

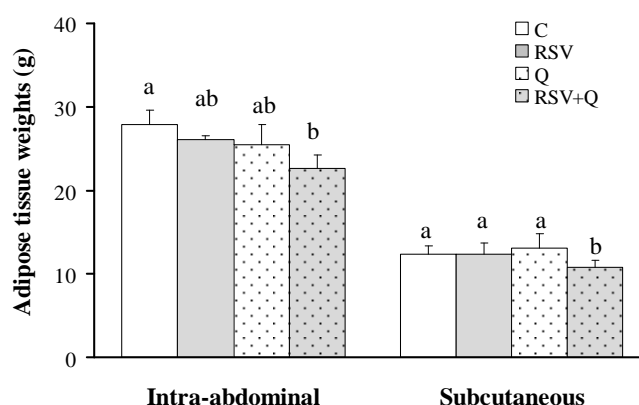
No statistical differences in food intake were found among experimental groups (data not shown). The increase in body weight induced by the obesogenic diet was significantly lower in rats treated with the combination of resveratrol and quercetin (Figure 1).

## RESULTS AND DISCUSSION



**Figure 1.** Body weight increase during the 6 weeks of treatment in rats from the four experimental groups. Results are expressed as means $\pm$ SEM. Bars not sharing a common letter are significantly different ( $P<0.05$ ).

As far as adipose tissue weights are concerned, resveratrol and quercetin induced slight reductions that did not reach statistical significance in intra-abdominal adipose depots (perirenal, epididymal and mesenteric). Interestingly, when both molecules were administered together, the reductions were significant in both intra-abdominal and subcutaneous WAT ( $P<0.05$ ) (Figure 2). iBAT weight remained unchanged ( $0.88\pm 0.09$  g in C group,  $0.86\pm 0.04$  g in RSV group,  $0.98\pm 0.16$  g in Q group and  $0.72\pm 0.05$  g in RSV+Q group).

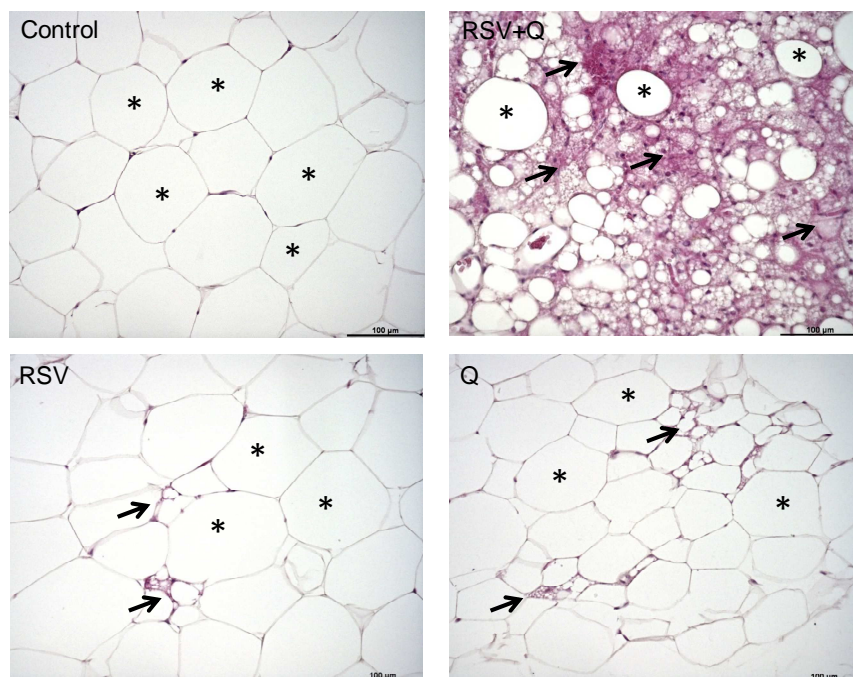


**Figure 2.** Adipose tissue weights of the intra-abdominal (perirenal, epididymal and mesenteric) and subcutaneous depots in rats from the four experimental groups. Results are expressed as means $\pm$ SEM. Bars not sharing a common letter are significantly different ( $P<0.05$ ).

### *Histological analysis and UCP1 immunostaining in white adipose tissue*

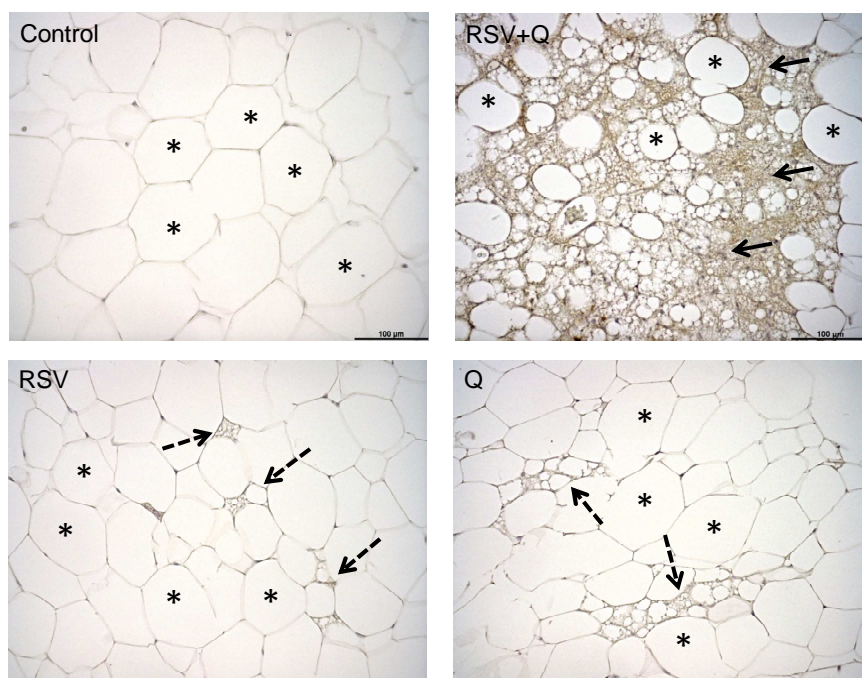
In perirenal adipose tissue from the control, RSV and Q groups, the vast majority of cells showed an appearance of white unilocular adipocytes. By contrast, in RSV+Q group, numerous multilocular adipocytes, disseminated among white unilocular adipocytes, were found (Figure 3), showing a brown-like remodeling of this tissue. This effect was not observed in subcutaneous adipose tissue, where the majority of cells showed an appearance of white unilocular adipocytes (data not shown).

## RESULTS AND DISCUSSION



**Figure 3.** Representative hematoxylin-eosin stained sections of the histological study of perirenal adipose tissue in rats from the four experimental groups. Arrows: multilocular adipocytes; asterisk: white adipocytes.

When immunostaining for UCP1 was carried out, multilocular adipocytes in perirenal adipose tissue from rats treated with the combination RSV+Q showed positive staining (Figure 4).

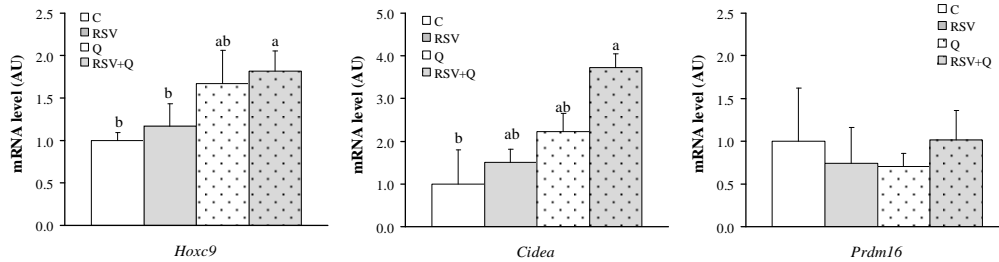


**Figure 4.** Representative immunostaining of UCP1 (brown color) in sections of perirenal adipose tissue in rats from the control and the RSV+Q groups. Arrows: positive UCP1 staining; asterisk: white adipocytes.

## RESULTS AND DISCUSSION

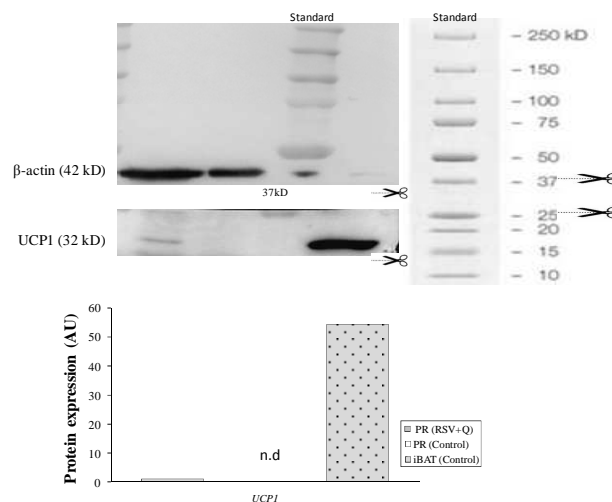
### Gene and protein expressions in white adipose tissue

Taking into account that perirenal, but not subcutaneous adipose tissue, showed multilocular adipocytes and positive UCP1 immunostaining, gene expression of several brown/brite adipocyte markers, *Hoxc9*, *Cidea* and *Prdm16*, were measured in this anatomical location. No changes were observed in the expression of *Prdm16* among the four experimental groups. By contrast, *Hoxc9* and *Cidea* were significantly increased only in RSV+Q group ( $P<0.05$ ) (Figure 5).



**Figure 5.** mRNA expression levels of *Hoxc9*, *Cidea* and *Prdm16* in perirenal adipose tissue in rats from the four experimental groups. Data represent values of  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  according to Livak & Schmittgen method [38]. Results are expressed as means $\pm$ SEM. Bars not sharing a common letter are significantly different ( $P<0.05$ ).

UCP1 protein expression was measured in perirenal adipose tissue from rats treated with the combination RSV+Q, owing to both UCP1 immunohistochemistry and *Hoxc9*, *Cidea* gene expression were modified only in this group (Figure 6). Whereas in control group UCP1 was not detectable, in some samples from RSV+Q-treated rats, this protein was detected. iBAT was used as a positive control. As expected, the amount of UCP1 in this tissue was far higher than that found in perirenal adipose tissue.



**Figure 6.** UCP1 protein expression in perirenal adipose tissue from control rats and rats treated with the combination of resveratrol and quercetin (RSV+Q). iBAT from control rats was used as positive control for UCP1 protein expression. The image on the right represents the standard loading buffer charged into the same gel as target proteins. Cutting (represented by scissors) is performed to allow simultaneous antibody incubation ( $\beta$ -actin which molecular weight is 42 kD and UCP1, 32 kD). The big difference in  $\beta$ -actin protein expression between WAT and BAT

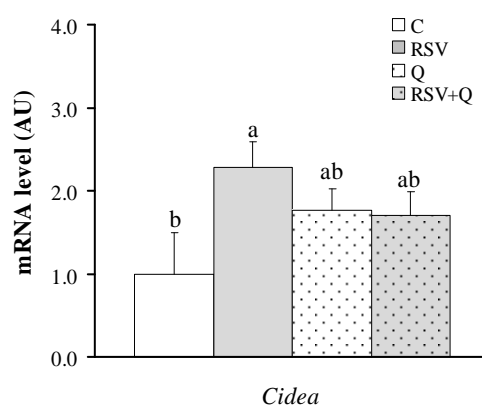
## RESULTS AND DISCUSSION

samples can be explained by the amount of charged protein during the electrophoresis (5  $\mu$ g for iBAT and 80 $\mu$ g for WAT samples).

UCP1, uncoupling protein 1; AU, (arbitrary units); nd, non detected.

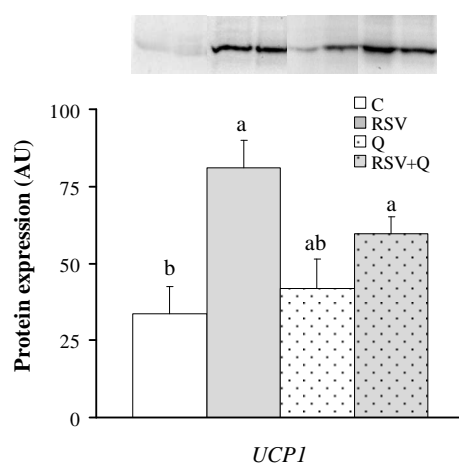
### *Gene and protein expressions in interscapular brown adipose tissue*

As far as iBAT is concerned, expression levels of *Cidea* were measured. A significant increase was only observed in RSV group ( $P<0.05$ ) (Figure 7).



**Figure 7.** mRNA expression levels of *Cidea* in interscapular brown adipose tissue in rats from the four experimental groups. Data represent values of  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  according to Livak method [38]. Results are expressed as means $\pm$ SEM. Bars not sharing a common letter are significantly different ( $P<0.05$ ).

Western blot analysis showed that treatments with resveratrol alone and with the combination of resveratrol and quercetin significantly increased protein expression in iBAT ( $P<0.05$ ). No significant changes were observed in rats treated with quercetin (Figure 8).



**Figure 8.** Protein levels of UCP1 in interscapular brown adipose tissue in rats from the four experimental groups. Results, presented as arbitrary units, are expressed as means $\pm$ SEM. Bars not sharing a common letter are significantly different ( $P<0.05$ ).

## RESULTS AND DISCUSSION

---

### DISCUSSION

Resveratrol and quercetin are two polyphenols that have been reported to show anti-obesity properties [40–48]. In the present study, we chose treatment doses of 15 mg/kg body weight/d for resveratrol and 30 mg/kg body weight/d for quercetin. In a previous study from our laboratory we observed that resveratrol, when administered for 6 weeks at a dose of 6 mg/kg/d to rats fed an obesogenic diet, had no effect on body fat accumulation. By contrast, a dose of 30 mg/kg/d induced a significant reduction in this parameter, and a dose of 60 mg/kg/d did not increase the effect of 30 mg/kg/d, meaning that a “plateau” was reached (Macarulla *et al.*, 2009a). Taking this into account, we decided to choose an intermediate dose in the range 6–30 mg/kg/d, to avoid being near the “plateau”, because this situation might mask any increase in effects. In the case of quercetin, in another earlier study from our laboratory we observed that the sum of epididymal, perirenal, mesenteric and subcutaneous adipose depots was reduced (–9.1%) in rats fed an obesogenic diet and treated with 30 mg/kg/d of this polyphenol for 6 weeks, but this reduction did not reach statistical significance (Arias *et al.*, 2014)

Under our experimental conditions, 6 weeks of treatment with resveratrol at a dose of 15 mg/kg/d, or quercetin at a dose of 30 mg/kg/d for 6 weeks, led to slight but not significant decrease in body fat accretion under obesogenic feeding conditions. Interestingly, when both polyphenols were administered together the reduction in adipose mass was significant. In the present work we were interested in the study of the effects of both polyphenols, as well as their combination, on brown-like remodelling of WAT, and to determine the potential contribution of this effect to the synergistic effect described on body fat accumulation.

Histological analysis revealed the appearance of adipocytes with multilocular lipid droplets, with positive immunostaining for UCP1 (brite adipocytes), dispersed in the perirenal adipose tissue of rats treated with the combination of both polyphenols. Furthermore, UCP1 was detected by western blot in the samples that were positive in the immunostaining. These results suggest the brown remodelling of this fat depot. Notably, the presence of multilocular adipocytes in perirenal adipose tissue was accompanied by an increased expression of *Hoxc9* and *Cidea*, which have been described as brite/brown adipocyte gene markers [19, 50]. This confirms the idea that the combination of resveratrol and quercetin induces a brown-like remodelling in perirenal WAT.

By using mouse models, it has been reported that *de novo* formation of brite adipocytes leads to an increase in energy consumption, and consequently to weight loss [51]. On the other hand, the number of brite cells has been inversely correlated with body mass index in humans [52]. Hence finding the greatest presence of brite cells in perirenal WAT of animals treated with the combination of resveratrol and quercetin, also corroborated with the higher expression levels of browning markers compared to controls, suggests that induction of browning could be one of the mechanisms underlying the relative protection of fat accumulation found in animals treated with the combination of resveratrol and quercetin when they were fed an obesogenic diet.

## RESULTS AND DISCUSSION

---

An interesting question is whether brown remodelling varies among different WAT depots. Thus, in the present study two different anatomical locations, perirenal and subcutaneous, were analyzed. The combination of resveratrol and quercetin induced browning in perirenal, but not in subcutaneous adipose tissue. Data in the literature suggest that the visceral/epididymal WAT is less prone to browning than the subcutaneous/inguinal [18, 53]. Waldén *et al.* [50] reported that both subcutaneous and perirenal depots showed a greater propensity towards browning than did the epididymal. The reason for the different pattern of response between subcutaneous and perirenal depots observed in the present study is not clear. Both sympathetic activation and PPAR $\gamma$  agonists have been described as the main stimuli in the browning process [16, 21–24]. Notably, it has been reported that visceral WAT displays higher density of beta-adrenoceptors and higher abundance of PPAR $\gamma$  compared to subcutaneous WAT [54], therefore suggesting that visceral adipose tissue could be more sensitive to the browning process. This could explain the difference observed in the present study between perirenal and subcutaneous depots, but not the lack of effect in epididymal adipose tissue reported in the literature.

Some of the agents able to induce browning in WAT have dual effects in rodents, also activating BAT. By contrast, others appear to act selectively or specifically on WAT [55]. In order to investigate which of these was the case in the polyphenols analyzed in the present study, their effects on several parameters in iBAT were analyzed. No differences in the weight of this depot were observed among the four experimental groups. As far as gene expression is concerned, only resveratrol induced a significant increase in *Cidea* expression in iBAT. UCP1 protein expression was significantly increased in both RSV and RSV+Q groups, without differences in Q group. In a previous study we also observed increases in protein expression of UCP1 when resveratrol was administered to rats at a dose of 30 mg/kg body weight/day [56]. Taken together, these results suggest that the effects of the combination of resveratrol and quercetin are more prominent in WAT remodelling than in BAT activation. The opposite situation takes place for resveratrol alone.

In conclusion, the present results show that a combination of resveratrol and quercetin seems to display a brown-like remodelling effect in WAT, which may contribute to the reduction of body fat accretion induced by an obesogenic diet. Further studies are needed in order to gain more insight concerning the effects on polyphenols on this process.

### *Acknowledgements*

We thank Enzo Ceresi for technical assistance in morphological analysis. CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición is an initiative of the ISCIII. This study was supported by grants from the Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2011-27406-ALI to MPP and AGL2012-33692 to AP), Government of the Basque Country (IT-572-13), University of the Basque Country (UPV/EHU) (ELDUNANOTEK UFI11/32) and the EU FP7 project HEALTH-F2-2011-278373 (DIABAT). N. Arias is a recipient of a doctoral fellowship from the Basque Country Government. Laboratory of Molecular Biology, Nutrition and Biotechnology is a member of the European Research Network of Excellence NuGO (The European Nutrigenomics Organization, EU Contract: FOOD-CT-2004-506360 NUGO).



## RESULTS AND DISCUSSION

---

### REFERENCES

- [1] Feldmann, H.-M., Golozoubova, V., Cannon, B., Nedergaard, J., UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality. *Cell Metab.* 2009, 9,203–209.
- [2] Lowell, B.-B., et al., Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. *Nature* 1993, 366, 740–742.
- [3] Palou, A., Picó, C., Bonet, M.-L., Oliver, P., The uncoupling protein, thermogenin. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 1998, 30, 7–11.
- [4] Bartelt, A., et al., Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat. Med.* 2011, 17, 200–205.
- [5] Guerra, C., et al., Brown adipose tissue-specific insulin receptor knockout shows diabetic phenotype without insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 2001, 108, 1205–1213.
- [6] Palou, A., Bonet, M.-L., Challenges in obesity research. *Nutr. Hosp.* 2013, 28 Suppl 5, 144–153.
- [7] Heaton, J.-M., The distribution of brown adipose tissue in the human. *J. Anat.* 1972, 112, 35–39.
- [8] Nedergaard, J., Bengtsson, T., Cannon, B., Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2007, 293, E444–E452.
- [9] Orava, J., et al., Different metabolic responses of human brown adipose tissue to activation by cold and insulin. *Cell Metab.* 2011, 14, 272–279.
- [10] Cypess, A.-M., et al., Cold but not sympathomimetics activates human brown adipose tissue in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012, 109, 10001–10005.
- [11] Vijgen, G.-H., et al., Brown adipose tissue in morbidly obese subjects. *PLoS One* 2011, 6, e17247.
- [12] Yoneshiro, T., et al., Brown adipose tissue, whole-body energy expenditure, and thermogenesis in healthy adult men. *Obesity (Silver Spring)* 2011, 19, 13–16.
- [13] Ouellet, V., et al., Brown adipose tissue oxidative metabolism contributes to energy expenditure during acute cold exposure in humans. *J. Clin. Invest.* 2012, 122, 545–552.
- [14] Vosselman, M.-J., et al., Systemic  $\beta$ -adrenergic stimulation of thermogenesis is not accompanied by brown adipose tissue activity in humans. *Diabetes* 2012, 61, 3106–3113.
- [15] Virtanen, K.-A., et al., Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N. Engl. J. Med.* 2009, 360, 1518–1525.
- [16] Petrovic, N., et al., Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J. Biol. Chem.* 2010, 285, 7153–7164.
- [17] Kozak, L.-P., Koza, R.-A., The genetics of brown adipose tissue. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2010, 94, 75–123.
- [18] Wu, J., et al., Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* 2012, 150, 366–376.
- [19] Sharp, L.-Z., et al., Human BAT possesses molecular signatures that resemble beige/brite cells. *PLoS One* 2012, 7, e49452.

## RESULTS AND DISCUSSION

---

- [20] Cypess, A.-M., et al., Anatomical localization, gene expression profiling and functional characterization of adult human neck brown fat. *Nat. Med.* 2013, 19, 635–639.
- [21] Fuster, A., Oliver, P., Sánchez, J., Picó, C., Palou, A., UCP1 and oxidative capacity of adipose tissue in adult ferrets (*Mustela putorius furo*). *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 2009, 153, 106–112.
- [22] Vernochet, C., et al., C/EBPalpha and the corepressors CtBP1 and CtBP2 regulate repression of select visceral white adipose genes during induction of the brown phenotype in white adipocytes by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *Mol. Cell. Biol.* 2009, 29, 4714–4728.
- [23] Koh, Y.-J., et al., Activation of PPAR gamma induces profound multilocularization of adipocytes in adult mouse white adipose tissues. *Exp. Mol. Med.* 2009, 41, 880–895.
- [24] Frontini, A., Cinti, S., Distribution and development of brown adipocytes in the murine and human adipose organ. *Cell Metab.* 2010, 11, 253–256.
- [25] Bonet, M.-L., Oliver, P., Palou, A., Pharmacological and nutritional agents promoting browning of white adipose tissue. *Biochim. Biophys. Acta* 2013, 1831, 969–985.
- [26] Mercader, J., Palou, A., Bonet, M.-L., Resveratrol enhances fatty acid oxidation capacity and reduces resistin and Retinol-Binding Protein 4 expression in white adipocytes. *J. Nutr. Biochem.* 2011, 22, 828–834.
- [27] Barger, J.-L., et al., A low dose of dietary resveratrol partially mimics caloric restriction and retards aging parameters in mice. *PLoS One* 2008, 3, e2264.
- [28] Baur, J.-A., Biochemical effects of SIRT1 activators. *Biochim. Biophys. Acta* 2010, 1804, 1626–1634.
- [29] Tauriainen, E., et al., Distinct effects of calorie restriction and resveratrol on diet-induced obesity and Fatty liver formation. *J. Nutr. Metab.* 2011, 2011, 525094.
- [30] Chen, S., et al., Resveratrol induces Sirt1-dependent apoptosis in 3T3-L1 preadipocytes by activating AMPK and suppressing AKT activity and survivin expression. *J. Nutr. Biochem.* 2012, 23, 1100–1112.
- [31] Lasa, A., Churrua, I., Eseberri, I., Andrés-Lacueva, C., Portillo, M.-P., Delipidating effect of resveratrol metabolites in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Nutr. Food Res.* 2012, 56, 1559–1568.
- [32] Qiang, L., et al., Brown remodeling of white adipose tissue by Sirt1-dependent deacetylation of Pparγ. *Cell* 2012, 150, 620–632.
- [33] Kuppasamy, U.-R., Das, N.-P., Effects of flavonoids on cyclic AMP phosphodiesterase and lipid mobilization in rat adipocytes. *Biochem. Pharmacol.* 1992, 44, 1307–1315.
- [34] Szkudelska, K., Nogowski, L., Szkudelski, T., Resveratrol, a naturally occurring diphenolic compound, affects lipogenesis, lipolysis and the antilipolytic action of insulin in isolated rat adipocytes. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2009, 113, 17–24.
- [35] Macarulla, M.-T., et al., Effects of different doses of resveratrol on body fat and serum parameters in rats fed a hypercaloric diet. *J. Physiol. Biochem.* 2009, 65, 369–376.
- [36] Arias, N., Macarulla, M.T., Aguirre, L., Milton, I., Portillo, M.P., The combination of resveratrol and quercetin enhances the individual effects of these molecules on triacylglycerol metabolism in white adipose tissue. *Eur J Nutr.* 2015.
- [37] Hsu, S.-M., Raine, L., Fanger, H., Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.* 1981, 29, 577–580.

## RESULTS AND DISCUSSION

---

- [38] Livak, K.-J., Schmittgen, T.-D., Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001, 25, 402–408.
- [39] Bradford, M.-M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976, 72, 248–254.
- [40] Alberdi, G., et al., Changes in white adipose tissue metabolism induced by resveratrol in rats. *Nutr. Metab. (Lond.)* 2011, 8, 29.
- [41] Gómez-Zorita, S., et al., Resveratrol attenuates steatosis in obese Zucker rats by decreasing fatty acid availability and reducing oxidative stress. *Br. J. Nutr.* 2012, 107, 202–210.
- [42] Lagouge, M., et al., Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell* 2006, 127, 1109–1122.
- [43] Rivera, L., Morón, R., Zarzuelo, A., Galisteo, M., Long-term resveratrol administration reduces metabolic disturbances and lowers blood pressure in obese Zucker rats. *Biochem. Pharmacol.* 2009, 77, 1053–1063.
- [44] Shang, J., et al., Resveratrol improves non-alcoholic fatty liver disease by activating AMP-activated protein kinase. *Acta Pharmacol. Sin.* 2008, 29, 698–706.
- [45] Kim, S., Jin, Y., Choi, Y., Park, T., Resveratrol exerts anti-obesity effects via mechanisms involving down-regulation of adipogenic and inflammatory processes in mice. *Biochem. Pharmacol.* 2011, 81, 1343–1351.
- [46] Kobori, M., Masumoto, S., Akimoto, Y., Oike, H., Chronic dietary intake of quercetin alleviates hepatic fat accumulation associated with consumption of a Western-style diet in C57/BL6J mice. *Mol. Nutr. Food Res.* 2011, 55, 530–540.
- [47] Jung, C.-H, Cho, I., Ahn, J., Jeon, T.-I., Ha, T.-Y., Quercetin reduces high-fat diet-induced fat accumulation in the liver by regulating lipid metabolism genes. *Phytother. Res.* 2013, 27, 139–143.
- [48] Panchal, S.-K., Poudyal, H., Brown, L., Quercetin ameliorates cardiovascular, hepatic, and metabolic changes in diet-induced metabolic syndrome in rats. *J. Nutr.* 2012, 142, 1026–1032.
- [49] Arias, N, Macarulla MT, Aguirre L, Martínez-Castaño L, Portillo MP. Quercetin can reduce insulin resistance without decreasing adipose tissue and skeletal muscle fat accumulation. *Genes Nutr.* 2014. 9(1):361.
- [50] Waldén, T.-B., Hansen, I.-R., Timmons, J.-A., Cannon, B., Nedergaard, J., Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, "brite," and white adipose tissues. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2012, 302, E19–E31.
- [51] Beranger, G.-E., et al., In vitro brown and "brite"/"beige" adipogenesis: human cellular models and molecular aspects. *Biochim. Biophys. Acta* 2013, 1831, 905–914.
- [52] Saito, M., et al., High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes* 2009, 58, 1526–1531.
- [53] Seale, P., et al., Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *J. Clin. Invest.* 2011, 121, 96–105.
- [54] Lafontan, M., Berlan, M., Do regional differences in adipocyte biology provide new pathophysiological insights? *Trends Pharmacol. Sci.* 2003, 24, 276–283.

## RESULTS AND DISCUSSION

---

- [55] Palou, A., Picó, C., Bonet, M.-L., Nutritional potential of metabolic remodelling of white adipose tissue. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 2013, 16, 650–656.
- [56] Alberdi, G., et al., Thermogenesis is involved in the body-fat lowering effects of resveratrol in rats. *Food Chem.* 2013, 141, 1530–1535.



**Manuscrito 6 - Manuscript 6**

Arias N, Macarulla MT, Aguirre L, Miranda J, Portillo MP

***Efecto reductor de la grasa hepática mediado por una combinación de resveratrol y quercetina en ratas alimentadas con una dieta obesogénica.***

***Liver delipidating effect of a combination of resveratrol and quercetin in rats fed an obesogenic diet.***

J. Physiol. Biochem. 2015



# RESULTS AND DISCUSSION

---

## ABSTRACT

*Introduction:* Liver steatosis is characterized by an abnormal accumulation of triacylglycerols in this organ. This metabolic disorder is closely associated with obesity.

*Purpose:* In the present study, we aimed to analyze the effect of a combination of resveratrol and quercetin on liver steatosis in an animal model of dietetic obesity, and to compare it with one induced by the administration of each polyphenol separately.

*Methods:* Rats were divided into four dietary groups of nine animals each and fed a high-fat, high-sucrose diet: an untreated control group and three groups treated either with resveratrol (15 mg/kg/d; RSV), with quercetin (30 mg/kg/d; Q), or with both (15 mg resveratrol/kg/d and 30 mg quercetin/kg/d; RSV+Q) for 6 weeks.

*Results:* Liver weight and triacylglycerol content decreased only in the RSV+Q group. A significant reduction in acetyl-CoA carboxylase activity was observed in RSV and RSV+Q groups, without changes in fatty acid synthase activity. A significant increase in carnitine palmitoyltransferase-1a activity was observed only in rats treated with the combination of resveratrol and quercetin, suggesting increased fatty acid oxidation. Citrate synthase, a marker of mitochondrial density, remained unchanged in all groups. No significant changes were observed in the expression of PPAR $\alpha$ , NRF-1 and TFAM.

*Conclusion:* In conclusion, resveratrol and quercetin together, combining two doses which were shown to be ineffective singly, is an interesting tool to prevent liver steatosis associated with high-fat high-sucrose feeding. The delipidating effect seems to be mediated by increased fatty acid oxidation not associated with increased mitochondriogenesis, and by reduced de novo lipogenesis.

**Key words:** resveratrol, quercetin, combination, liver steatosis, rat, obesogenic diet



# RESULTS AND DISCUSSION

---

## INTRODUCTION

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) encompasses a wide spectrum of liver pathologies which range from simple steatosis to non-alcoholic steatohepatitis (NASH). Steatosis is characterized by an abnormal accumulation of triacylglycerols in the liver [1]. This metabolic disorder is closely associated with obesity, insulin resistance and type 2 diabetes [2].

In recent years a great deal of attention has been paid to bioactive molecules, present in foodstuffs and plants and with beneficial effects on health, such as phenolic compounds. In this context, an active field of research concerns obesity and its related co-morbidities, such as fatty liver and insulin resistance. According to the literature, resveratrol and quercetin are among the more widely studied polyphenols [3].

Resveratrol (*trans*-3,5,4'-trihydroxystilbene) is a phytoalexin polyphenolic compound occurring naturally in various foodstuffs, such as grapes, berries and peanuts. It is produced in response to stress and it represents a defence mechanism against fungal, viral, bacterial infections and damage from exposure to ultraviolet radiation [4]. Quercetin is a flavonoid which belongs to the group of flavonols. It is found in onions, cocoa, broccoli, tomatoes, apples and berries, which are significant sources of this flavonoid in the Western diet [5].

In the vast majority of the studies reported, these molecules have been investigated as monotherapies. However, the use of combinations of natural products to achieve additive or synergistic effects might be an interesting approach. In the present study we aimed to analyze the effect of a combination of resveratrol and quercetin on liver steatosis in a model of dietetic obesity, and to compare it with one induced by the administration of each polyphenol separately. Given that *de novo* lipogenesis and fatty acid oxidation are two key metabolic pathways in the control of hepatic triacylglycerol metabolism, and hence in liver fat accumulation, the effects of polyphenol treatments on the activities of several enzymes involved in these pathways were investigated.

## MATERIAL AND METHODS

### *Animals, diets and experimental design*

The experiment was conducted with thirty-six male 6-week-old Hsd:Han Wistar rats purchased from Harlan Ibérica (Barcelona, Spain) and took place in accordance with the institution's guide for the care and use of laboratory animals (CUEID CEBA/30/2010). Rats were individually housed in polycarbonate metabolic cages (Techniplast Gazzada, Guguggiate, Italy), and placed in an air-conditioned room ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) with a 12 h light-dark cycle. After a 6 d adaptation period, rats were randomly divided into four dietary groups of nine animals each: a control group, a group treated with 15 mg resveratrol/kg body weight/d (RSV), a group treated with 30 mg quercetin/kg body weight/d (Q), and a group treated with both 15 mg resveratrol/kg body weight/d and 30 mg quercetin/kg body weight/d (RSV+Q). All animals were fed a commercial obesogenic diet, high in sucrose (20%) and fat (24%) (OpenSource Diets Inc., Ref. D12451M) for 6 weeks. According to previous studies from our group this feeding protocol induces a significant increase in body and liver fat accumulation not only in Wistar rats, but also in Sprague-Dawley rats [6]. Resveratrol was supplied by Monteloeder (Elche, Spain) and

## RESULTS AND DISCUSSION

---

quercetin by Sigma (St. Louis, MO, USA). Resveratrol and quercetin were added to the diet as previously reported [7] in order to ensure the above mentioned doses. Briefly, given that the rats started eating immediately when the diet was daily replaced, the polyphenols solutions were added to the surface of the diet contained in the food box of the metabolic cage. All animals had free access to food and water. Food intake and body weight were measured daily.

At the end of the experimental period, animals were sacrificed under anaesthesia (chloral hydrate) by cardiac exsanguinations after a 12-hour fasting period. Liver was dissected, weighed and immediately frozen in liquid nitrogen. Serum was obtained from blood samples after centrifugation (1000 g for 10 min, at 4°C). All samples were stored at -80°C until analysis.

### *Liver triacylglycerol and cholesterol contents, and serum transaminases*

Hepatic total lipids were extracted following the method described by Folch et al. [8]. The lipid extract was dissolved in isopropanol and triacylglycerol and cholesterol contents were measured using commercial kits (BioSystems, Barcelona, Spain). Commercial kits (Spinreact, Barcelona, Spain) were used for the analysis of serum aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT).

### Enzyme activities

For lipogenic enzyme analysis, samples of liver (500 mg) were homogenized in 5 mL of buffer (pH 7.6) containing 150 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM N-acetyl-cysteine and 0.5 mM dithiothreitol. After centrifugation at 100,000 g for 40 min at 4°C, the supernatant fraction was used for quantitation of the enzyme activities. Fatty acid synthase (FAS) activity was measured spectrophotometrically as previously described [9-11] and expressed as nmol NADPH consumed, per minute, per mg of protein.

For acetyl-CoA carboxylase (ACC) activity determination, the amounts of total ACC and phosphorylated-ACC were measured by western blot analysis. Tissue extracts were obtained by homogenizing 100 mg of liver in a PBS buffer containing protease inhibitors (pH 7.4) and centrifuged (40 g for 10 min at 4°C), and 60 µg of these extracts were separated by electrophoresis in a SDS-polyacrylamide gel and transferred to PVDF membranes (Millipore, Bradford, MA, USA). Then, the membranes were blocked with casein PBS-Tween buffer for 2 hours. The membranes were incubated overnight at 4°C with ACC antibody (Cell signalling Technology, Beverly, MA, USA) (1:1000). Antibodies were visualized by using a chemiluminescent substrate (Thermo Scientific, USA). The intensity of the bands was determined by densitometric analysis and quantified by a ChemiDoc MP imaging system (BioRad, USA). After antibody stripping, the membranes were blocked and then incubated with a phosphorylated-ACC antibody (Cell signalling Technology, Beverly, MA, USA) (1:1000) and measured again.

Carnitine palmitoyltransferase-1a (CPT-1a) activity was assessed in the mitochondrial/peroxisomal fraction. Liver samples (500 mg) were homogenized in 3 vol (wt/vol) of buffer pH 7.4 containing 0.25 mol/L sucrose, 1 mmol/L EDTA and 10 mmol/L Tris-HCl. Homogenates were centrifuged (700 g for 10 min at 4°C) and supernatant fluid was again centrifuged (12,000 g for 15 min at 4°C). Pellets were resuspended in 70 mmol/L sucrose, 220

## RESULTS AND DISCUSSION

---

mmol/L manitol, 1 mmol/L EDTA, 2 mmol/L HEPES buffer, pH 7.4. CPT-1a activity was assayed by using the Bieber et al. method [12]. The pellet protein content was determined according to the Bradford method [13]. CPT-1a activity was expressed as nmol CoA formed per minute, per mg protein.

Citrate synthase (CS) activity was determined spectrophotometrically following the Srere method [14], by measuring the appearance of free CoA. Briefly, liver samples were homogenized in 10 vol of 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0), and diluted by a factor of 200 in this buffer. Homogenates were incubated for 5 min at 30°C with 0.1 M Tris-HCl buffer containing 0.1 mM DTNB, 0.25% Triton X-100, 0.5 mM oxalacetate and 0.31 mM acetyl-CoA, and readings were taken at 412 nm. CS activity was expressed as nmol CoA formed per minute, per mg of protein.

### *Extraction and analysis of RNA and quantification by reverse transcription-polymerase chain reaction (Real Time RT-PCR)*

RNA samples were extracted from 100 mg of liver by using Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. The integrity of the RNA extracted from all samples was verified and quantified using a RNA 6000 Nano Assay (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). RNA samples were then treated with DNase I kit (Ambion, Applied Biosystems, Austin, Texas, USA) to remove any contamination by genomic DNA.

1.5 µg of total RNA of each sample in a total reaction volume of 20 µL was reverse transcribed to first-strand complementary DNA (cDNA) using the iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Hercules, California, USA) according to the manufacturer's protocols. Reactions were incubated initially at 25°C for 10 min and subsequently at 37°C for 120 min and 85°C for 5 min.

Relative mRNA levels were quantified using Real-Time PCR with an iCycler™ - MyiQ™ Real Time PCR Detection System (BioRad, Hercules, CA, USA) in presence of SYBR Green master mix (Applied Biosystems, Austin, TX, USA) and a 300 nM concentration of each of the sense and antisense primers. 18S mRNA levels were similarly measured and served as the reference gene. The PCR reagent mixture consisted of 9.5 µL aliquot of each diluted cDNA sample in a 25 µL reaction volume. Specific primers were synthesized commercially (Integrated DNA technologies, Leuven Belgium), and the sequences and PCR conditions are shown in Table 1. Results are expressed as fold changes of threshold cycle (Ct) value relative to controls using the 2<sup>-ΔΔCt</sup> method [15].

## RESULTS AND DISCUSSION

**Table 1.** Primers and conditions for PCR amplification of each gene studied.

Primers	Sense primer	Antiense primer	PCR conditions
PPAR $\alpha$	5'-GCT ACT TCG AGT CCC CTT GAG-3'	5'-CCA GCG TCG CTT CAG TTC C -3'	Anneling T. 60 °C Denaturation cycles. 40
TFAM	5'-CAC GAG CCC TGG AGT ACC C-3'	5'-CCA CAT TCC CCG GAA CAG C-3'	Anneling T. 61.9 °C Denaturation cycles. 45
NFR-1	5'-GTC ATT TCA CCG CCC TGT A-3'	5'-GAT GCT TCA GAA CTG CCA AC-3'	Anneling T. 60 °C Denaturation cycles. 40
18S	5'-GTG GGC CTG CGG CTT AAT-3'	5'-GCC AGA GTC TCG TTC GTT ATC-3'	Anneling T. 60 °C Denaturation cycles. 40

PPAR $\alpha$ : Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ ; TFAM: Transcription factor A mitochondrial; NFR-1 Nuclear respiratory factor 1

### *Statistical analysis*

Results are presented as means  $\pm$  standard error of the means. Statistical analysis was performed using SPSS 17.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA). All the parameters were normally-distributed according to the Shapiro-Wilks test. Subsequently, the data were analysed by ANOVA I test and Newman-Keuls as a post-hoc test. Statistical significance was set-up at the  $P < 0.05$  level.

## RESULTS

### *Energy intake, body weight gain, liver weigh, hepatic lipid content, and serum transaminases*

No significant differences in energy intake were found among the four experimental groups. As far as body weight gain was concerned, no changes were observed when resveratrol or quercetin were administered separately. By contrast, rats treated with the combination of both molecules showed a significantly lower value (Table 2).

Liver weight, expressed as absolute values or as percentages of body weight, was reduced in rats treated with the combination of resveratrol and quercetin. In line with this result, the amount of triacylglycerols and cholesterol were also decreased in this group. The administration of resveratrol or quercetin separately did not modify these parameters. With regard to serum transaminases, no significant differences were found among the experimental groups (Table 2).

## RESULTS AND DISCUSSION

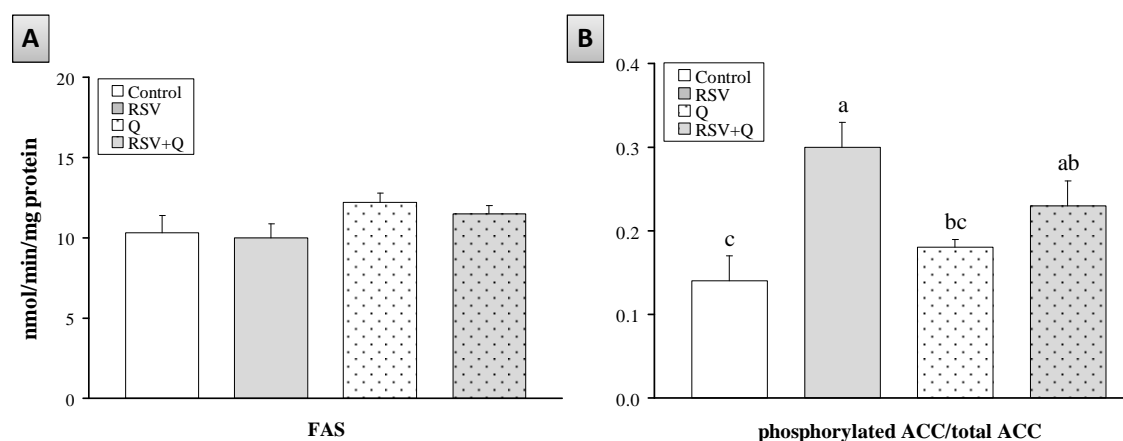
**Table 2.** Energy intake, body weight gain, liver weigh, hepatic lipid content and serum transaminases of rats fed on the experimental diets for 6 weeks.

	Control	RSV	Q	RSV+Q
Energy intake (kcal/d)	78.8 ± 0.9	79.0 ± 1.4	76.7 ± 1.4	75.0 ± 2.4
Body weight gain (g)	183 ± 5 <sup>a</sup>	172 ± 5 <sup>a</sup>	176 ± 3 <sup>a</sup>	149 ± 9 <sup>b</sup>
Liver weight (g)	10.1 ± 0.3 <sup>a</sup>	10.1 ± 0.1 <sup>a</sup>	9.7 ± 0.4 <sup>ab</sup>	8.8 ± 0.3 <sup>b</sup>
(% of body weight)	2.7 ± 0.1 <sup>a</sup>	2.6 ± 0.1 <sup>a</sup>	2.6 ± 0.1 <sup>a</sup>	2.4 ± 0.0 <sup>b</sup>
Hepatic lipid content (mg/g)				
Triacylglycerols	52.3 ± 3.3 <sup>a</sup>	52.0 ± 4.0 <sup>a</sup>	59.0 ± 3.7 <sup>a</sup>	44.4 ± 0.9 <sup>b</sup>
Cholesterol	9.3 ± 0.6 <sup>a</sup>	8.3 ± 0.4 <sup>ab</sup>	9.7 ± 0.7 <sup>a</sup>	7.3 ± 0.3 <sup>b</sup>
Serum transaminases (U/L)				
AST	42 ± 5	48 ± 5	41 ± 4	47 ± 2
ALT	23 ± 3	15 ± 1	16 ± 2	18 ± 1

Values are means ± SEM (n = 9). Values in the same row with different superscript are significantly different at P<0.05.

### Enzyme activities

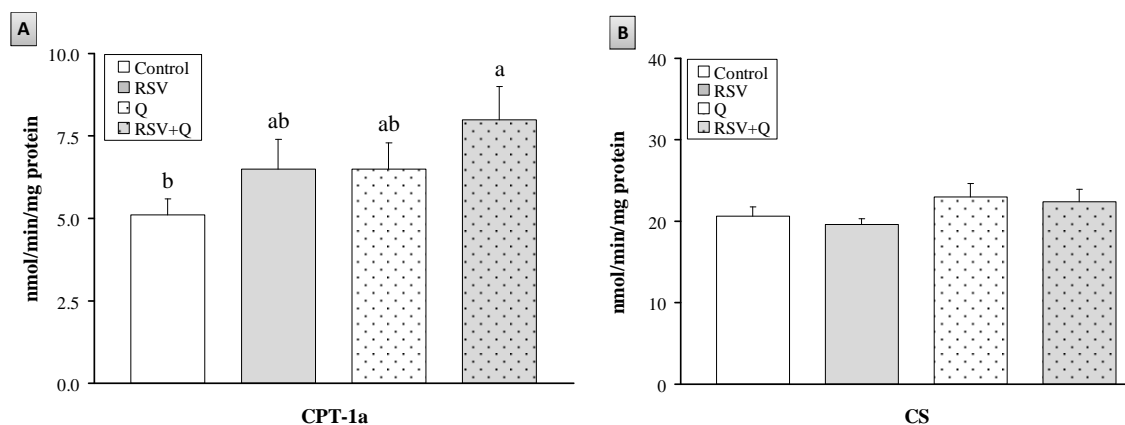
As far as lipogenic enzymes are concerned, no significant changes were observed in the activity of FAS among the four experimental groups. Bearing in mind that phosphorylation of ACC leads to its inactivation, we measured the ratio phosphorylated ACC/total ACC as an index of ACC activity. We observed that both resveratrol and resveratrol+quercetin combination induced a significant reduction in ACC activity (Figure 1).



**Figure 1.** FAS activity (A) and phosphorylated ACC/total ACC protein ratio (B) in liver from rats treated with resveratrol (RSV), quercetin (Q) or the combination RSV+Q for 6 weeks. Values are means ± SEM (n = 9). Values not sharing a common letter are significantly different (P<0.05). FAS: fatty acid synthase; ACC: acetyl-CoA carboxylase.

## RESULTS AND DISCUSSION

With regard to enzymes involved in fatty acid oxidation, a significant increase was observed in CPT-1a activity in rats treated with the combination of resveratrol and quercetin, without changes in other experimental groups. By contrast, no changes were observed in the activity of citrate synthase (Figure 2).



**Figure 2.** CPT-1a (A) and CS (B) activities in liver from rats treated with resveratrol (RSV), quercetin (Q) or the combination RSV+Q for 6 weeks. Values are means  $\pm$  SEM (n = 9). Values not sharing a common letter are significantly different ( $P < 0.05$ ). CPT-1a: carnitine palmitoyltransferase-1a; CS: citrate synthase.

### Gene expression

No significant changes were observed in gene expression of Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ), Transcription factor A mitochondrial (TFAM) and Nuclear respiratory factor 1 (NRF-1), three genes involved in the control of mitochondriogenesis (Table 3).

**Table 3.** mRNA levels (arbitrary units) in liver from rats fed on the experimental diets for 6 weeks.

	Control	RSV	Q	RSV+Q
PPAR $\alpha$	1.00 $\pm$ 0.22	1.10 $\pm$ 0.30	0.87 $\pm$ 0.27	1.04 $\pm$ 0.19
TFAM	1.00 $\pm$ 0.27	0.85 $\pm$ 0.15	0.72 $\pm$ 0.33	0.84 $\pm$ 0.24
NRF-1	1.00 $\pm$ 0.30	1.41 $\pm$ 0.09	0.98 $\pm$ 0.30	1.24 $\pm$ 0.25

Values are means  $\pm$  SEM (n = 9). No significant changes were found at  $P < 0.05$ . PPAR $\alpha$ : Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ ; TFAM: Transcription factor A mitochondrial; NRF-1 Nuclear respiratory factor 1.

## RESULTS AND DISCUSSION

---

### DISCUSSION

Resveratrol and quercetin have been reported to have positive effects on lipid metabolism. In this context, several studies have shown that they can be effective in reducing liver steatosis [3]. In the present study, we chose treatment doses of 15 mg/kg body weight/d for resveratrol and 30 mg/kg body weight/d for quercetin. In a previous study from our laboratory we observed that resveratrol, when administered for 6 weeks at a dose of 6 mg/kg/d to rats fed an obesogenic diet, had no effect on body fat accumulation. By contrast, a dose of 30 mg/kg/d induced a significant reduction in this parameter, and a dose of 60 mg/kg/d did not increase the effect of 30 mg/kg/d, meaning that a “plateau” was reached [7]. Taking this into account, we decided to choose an intermediate dose in the range 6-30 mg/kg/d, to avoid being near the “plateau”, because this situation might mask any increase in effects. In the case of quercetin, in another earlier study from our laboratory we observed that the sum of epididymal, perirenal, mesenteric and subcutaneous adipose depots was reduced (-9.1%) in rats fed an obesogenic diet and treated with 30 mg/kg/d of this polyphenol for 6 weeks, but this reduction did not reach statistical significance [16].

Under our experimental conditions, neither resveratrol nor quercetin showed delipidating effects in liver. At first sight these results may be surprising if we compare them with those reported in the literature. As far as resveratrol is concerned, several studies have analyzed the effects of this polyphenol on liver from mice or rats fed a high-fat diet. As the mouse is a more responsive species than the rat, this discussion section will only deal with the results obtained in the present study compared with studies carried out using rats. Shang et al. [17] observed that 100 mg resveratrol/kg body weight/day reduced hepatic triacylglycerol content after 10 weeks of treatment. Poulsen et al. [18] reported that resveratrol, administered at a dose of 100 mg/d (approximately equivalent to 270 mg/kg body weight/d), prevented liver triacylglycerol accumulation induced by high-fat feeding in rats after 8 weeks of treatment. The discrepancy between these results and those obtained in the present work can be attributed to the fact that in the reported studies a dose far higher than that used in our experiment (15 mg/kg body weight/d) was administered to rats. Similarly, longer experimental periods were used. In a previous study from our laboratory performed following the same experimental design, a dose of 30 mg/kg/d of resveratrol was able to reduce hepatic triacylglycerol content [19]. Once again, the present dose was lower, thus explaining the lack of significant effect. There also data in the literature showing that doses similar to that used in the present study induced liver delipidation but, it is important to emphasize that, in these cases other animal models of steatosis were used [20, 21].

With regard to quercetin, Panchal et al. [22] observed attenuated hepatic steatosis in rats treated for 8 weeks with this molecule at a dose of 50 mg/kg body weight/d. In this case, the experimental period length was longer and the dose was higher than in the present study.

According to the results described above, it seems that the doses of 15 mg/kg/d and 30 mg/kg/d for resveratrol and quercetin respectively are below the threshold needed for these molecules to reduce liver triacylglycerol content, at least after 6 weeks of treatment. Interestingly, in spite of the lack of delipidating effects of resveratrol and quercetin when administered separately, the combination of these two molecules resulted in a significant

## RESULTS AND DISCUSSION

---

reduction in liver triacylglycerol content. By comparing the value of this parameter in RSV+Q group (44.4 mg/g) with values shown by Wistar rats fed a standard laboratory diet (10-20 mg/g) reported by our group [23], as well as by other authors [24], it can be concluded that the combination of both polyphenols partially prevent steatosis induced by the obesogenic diet. In spite of the delipidating effect of the combination, serum transaminases were not significantly modified. Probably, the lack of effect on these parameters is due to the fact that serum transaminases were in the range of physiological values [25], associated to a mild degree of steatosis in these rats.

Lipogenesis and fatty acid oxidation are two key metabolic pathways in the control of hepatic triacylglycerol metabolism, and hence in fat accumulation in the liver [26]. The effects of treatments with these polyphenols on the activity of several enzymes involved in these two pathways were investigated in order to gain insight into the mechanisms underlying the effects on liver triacylglycerol content that had been observed.

As far as the lipogenic enzymes are concerned, no significant changes were observed in the activity of FAS among the four experimental groups. By contrast, the activity of ACC was significantly reduced in both RSV and RSV+Q groups. Considering that this is the rate-limiting enzyme in *de novo* lipogenesis, it may be proposed that resveratrol and the mixture of resveratrol and quercetin could induce a reduction in this metabolic process. With regard to enzymes involved in fatty acid oxidation, no changes were observed among groups in the activity of citrate synthase, an enzyme present in the mitochondrial matrix and commonly used as a quantitative marker of mitochondrial density. By contrast, the activity of CPT-1a, a rate-limiting enzyme in beta-oxidation involved in the transport of fatty acids into the mitochondria matrix, was significantly increased only in rats treated with the combination of resveratrol and quercetin. This suggests that fatty acid oxidation was increased in this group. In view of these results, it can be hypothesized that the potential decrease in *de novo* lipogenesis was not sufficient to reduce triacylglycerol content in liver because this parameter remained unchanged in rats treated with resveratrol. In the case of the resveratrol and quercetin mixture, the combination of increased fatty acid oxidation and reduced *de novo* lipogenesis was able to induce a significant delipidating effect. Nevertheless, potential effects on direct uptake of circulating lipids and the secretion of lipids through VLDL, other important metabolic pathways involved in the accumulation of triacylglycerols in liver cannot be discarded.

In order to look further into the molecular mechanism underlying the increase in fatty acid oxidation, we measured gene expression of PPAR $\alpha$ , NRF-1 and TFAM, three genes involved in the control of mitochondriogenesis. No significant differences were found among experimental groups, suggesting that the polyphenol treatments did not induce mitochondriogenesis, at least under our experimental conditions. This hypothesis is supported by the lack of change observed in citrate synthase activity. Consequently, the increase in CPT-1a activity observed in RSV+Q seems to be a direct effect on this enzyme.

In conclusion, resveratrol and quercetin, combining doses shown to be ineffective on their own, is an interesting tool in the prevention of liver steatosis associated with high-fat high sucrose feeding. The delipidating effect seems to be mediated by increased fatty acid oxidation and reduced *de novo* lipogenesis.



## RESULTS AND DISCUSSION

---

### **Acknowledgements**

This study was supported by grants from the Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2011-27406-ALI), Instituto de Salud Carlos III (CIBERobn), Government of the Basque Country (IT-572-13) and University of the Basque Country (UPV/EHU) (ELDUNANOTEK UFI11/32). N. Arias is a recipient of a doctoral fellowship from the Basque Country Government.

## RESULTS AND DISCUSSION

---

### REFERENCES

- [1] Adams, L.A., et al., The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology*, 2005. 129(1): p. 113-21
- [2] Castaño, D., et al., Cardiotrophin-1 eliminates hepatic steatosis in obese mice by mechanisms involving AMPK activation. *J Hepatol*, 2014. 60(5): p. 1017-25.
- [3] Aguirre, L., et al., Effects of resveratrol and other polyphenols in hepatic steatosis. *World J Gastroenterol*, 2014. 20(23): p. 7366-80.
- [4] Bradamante, S., L. Barengi, and A. Villa, Cardiovascular protective effects of resveratrol. *Cardiovasc Drug Rev*, 2004. 22(3): p. 169-88.
- [5] Somers, S.M. and L. Johannot, Dietary flavonoid sources in Australian adults. *Nutr Cancer*, 2008. 60(4): p. 442-9.
- [6] Alberdi, G., et al., Resveratrol does not increase body fat loss induced by energy restriction. *J Physiol Biochem*, 2014. 70(2): p. 639-46.
- [7] Alberdi, G., et al., Hepatic lipid metabolic pathways modified by resveratrol in rats fed an obesogenic diet. *Nutrition*, 2013. 29(3): p. 562-7.
- [8] Macarulla, M.T., et al., Effects of different doses of resveratrol on body fat and serum parameters in rats fed a hypercaloric diet. *J Physiol Biochem*, 2009. 65(4): p. 369-76.
- [9] FOLCH, J., M. LEES, and G.H. SLOANE STANLEY, A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*, 1957. 226(1): p. 497-509.
- [10] Zabala, A., et al., The trans-10,cis-12 isomer of conjugated linoleic acid reduces hepatic triacylglycerol content without affecting lipogenic enzymes in hamsters. *Br J Nutr*, 2004. 92(3): p. 383-9.
- [11] Miranda, J., et al., A comparison between CLNA and CLA effects on body fat, serum parameters and liver composition. *J Physiol Biochem*, 2009. 65(1): p. 25-32.
- [12] Miranda, J., et al., Hepatomegaly induced by trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid in adult hamsters fed an atherogenic diet is not associated with steatosis. *J Am Coll Nutr*, 2009. 28(1): p. 43-9.
- [13] Bieber, L.L., T. Abraham, and T. Helmuth, A rapid spectrophotometric assay for carnitine palmitoyltransferase. *Anal Biochem*, 1972. 50(2): p. 509-18.
- [14] Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976. 72: p. 248-54.
- [15] Sreere, P.A. and G.C. Brooks, The circular dichroism of glucagon solutions. *Arch Biochem Biophys*, 1969. 129(2): p. 708-10.
- [16] Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>( $\Delta\Delta C_T$ ) Method. *Methods*, 2001. 25(4): p. 402-8.
- [17] Arias, N., et al., Quercetin can reduce insulin resistance without decreasing adipose tissue and skeletal muscle fat accumulation. *Genes Nutr*, 2014. 9(1): p. 361.
- [18] Shang, J., et al., Resveratrol improves non-alcoholic fatty liver disease by activating AMP-activated protein kinase. *Acta Pharmacol Sin*, 2008. 29(6): p. 698-706.
- [19] Poulsen, M.M., et al., Resveratrol up-regulates hepatic uncoupling protein 2 and prevents development of nonalcoholic fatty liver disease in rats fed a high-fat diet. *Nutr Res*, 2012. 32(9): p. 701-8.

## RESULTS AND DISCUSSION

---

- [20] Gómez-Zorita, S., et al., Resveratrol attenuates steatosis in obese Zucker rats by decreasing fatty acid availability and reducing oxidative stress. *Br J Nutr*, 2012. 107(2): p. 202-10.
- [21] Bujanda, L., et al., Resveratrol inhibits nonalcoholic fatty liver disease in rats. *BMC Gastroenterol*, 2008. 8: p. 40.
- [22] Panchal, S.K., H. Poudyal, and L. Brown, Quercetin ameliorates cardiovascular, hepatic, and metabolic changes in diet-induced metabolic syndrome in rats. *J Nutr*, 2012. 142(6): p. 1026-32.
- [23] Macarulla, M.T., et al., Effects of the whole seed and a protein isolate of faba bean (*Vicia faba*) on the cholesterol metabolism of hypercholesterolaemic rats. *Br J Nutr*, 2001. 85(5): p. 607-14.
- [24] Zhang, L., et al., Temporal Relationship between Diet-Induced Steatosis and Onset of Insulin/Leptin Resistance in Male Wistar Rats. *PLoS One*, 2015. 10(2): p. e0117008.
- [25] Boehm, O., et al., Clinical chemistry reference database for Wistar rats and C57/BL6 mice. *Biol Chem*, 2007. 388(5): p. 547-54.
- [26] Berlanga, A., et al., Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Exp Gastroenterol*, 2014. 7: p. 221-39.

**PATENTE - PATENT**

Arias N, Macarulla MT, Aguirre L, J Miranda, Picó C, Palou A, Portillo MP

“Composiciones y usos en la activación de la termogénesis”.

N/Ref.:ES2654.6. Publicada en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial, Marzo 2015



# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

**TÍTULO:** “Composiciones y usos en la activación de la termogénesis”

## **DESCRIPCIÓN**

La presente invención se refiere al uso de composiciones que comprenden resveratrol y quercetina para la activación (estimulación, aumento, mayor eficiencia, mayor capacidad) de la termogénesis, y su utilización en el tratamiento y/o la prevención de sobrepeso, obesidad y/o patologías o alteraciones o desórdenes asociadas al sobrepeso en mamíferos, en el mantenimiento de la temperatura corporal y en las situaciones en las que se puede producir una hipofunción térmica o termogénica, así como en los trastornos del ahorro o eficiencia energética. Además la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas, complementos alimenticios y composiciones cosméticas que comprenden dicha composición. Por tanto, la invención se podría encuadrar en el campo de las industrias farmacéutica, alimenticia y cosmética.

## **ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

El tejido adiposo responsable del almacenamiento del excedente de energía como grasa es el tejido adiposo blanco. Este tejido está formado por adipocitos blancos que almacenan la grasa en forma de una única gota lipídica que ocupa casi todo el citoplasma (adipocitos uniloculares). Pero, además, existe otro tipo de tejido adiposo, el tejido adiposo marrón, también conocido como tejido adiposo pardo, formado por adipocitos marrones, que está especializado en el gasto energético. Los adipocitos marrones almacenan la grasa en forma de múltiples gotas lipídicas (adipocitos multiloculares) y actúan disipando el exceso de energía (grasa) como calor, en un proceso que se conoce como termogénesis, en respuesta a estímulos como el frío o una dieta hipercalórica y gracias a la acción de la proteína desacoplante termogénica 1 o UCP1 (Cannon, B et al., *J. Physiol. Rev.* 84, 277-359, 2004; Palou, A et al., *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 30, 7-11, 1998).

Para que el peso corporal se mantenga estable es necesario que haya un equilibrio homeostático entre la ingesta y el gasto energético. De esta manera, la activación de la termogénesis en el tejido adiposo marrón contribuye a aumentar el gasto energético y por tanto a prevenir el exceso de adiposidad corporal. De hecho, en roedores el tejido adiposo marrón contribuye a mantener el peso corporal, y se ha descrito que su activación promueve el gasto energético, reduce la adiposidad y protege de la aparición de obesidad inducida por la dieta (Ghorbani, M et al., *Biochem. Pharmacol.* 54: 121-131, 1997).

Sin embargo, no había mucho interés por el tejido adiposo marrón porque, a diferencia de lo que ocurre en roedores, durante años se pensó que los humanos adultos carecíamos de este tejido y que por tanto no contribuía al mantenimiento del peso corporal en nuestra especie. Pero hace unos años se ha descrito que esto no es así, sino que los humanos adultos mantenemos tejido adiposo marrón activo en cantidades significativas y de modo disperso en áreas discretas, localizadas principalmente en la región cervical, supraclavicular, axilar y paravertebral (Nedergaard, J et al., *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 293, 444-452, 2007). Es más, este tejido adiposo marrón puede ser activado en la mayoría de los humanos y su

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

activación se correlaciona inversamente con el índice de masa corporal, el contenido de grasa total y la diabetes y otras alteraciones, ya que utiliza para su funcionamiento sobre todo grasa pero también glucosa (Celi, F. S. et al., *N. Engl. J. Med.* 360: 1553-1556, 2009).

Gracias a estos conocimientos, el tejido adiposo marrón y su potencial termogénico es actualmente una diana reconocida a nivel internacional para combatir el sobrepeso, la obesidad y la diabetes tipo 2. Precisamente, el proyecto europeo DIABAT, en el que participan inventores de esta patente, tiene como objetivo la activación de la termogénesis en el tejido adiposo marrón para prevenir y tratar la diabetes tipo 2.

A parte de los adipocitos marrones clásicos presentes en el tejido adiposo marrón se ha descrito en modelos animales (principalmente roedores) que frente a determinados estímulos pueden aparecer adipocitos con características similares a los marrones pero en depósitos de tejido adiposo blanco, en un proceso que se ha denominado *browning* o marronización (Loncar, D. et al., *Cell Tissue Res.* 266: 149-161, 1991).

También en humanos se han encontrado zonas o áreas de tejido adiposo marrón dentro de depósitos de grasa blanca, y adipocitos con características de adipocitos marrones que expresan ARNm de UCP1 (Garruti, G. et al., *J. Lipid. Res.* 38: 2125-2133, 1997). Estas células han recibido el nombre de células o adipocitos *brite* (del inglés, *brown-in-white*, marrón en blanco), también conocidas como células *beige*, que llegan a desarrollar una capacidad termogénica similar a la de los adipocitos marrones clásicos (Petrovic, N et al., *J. Biol. Chem.* 285: 7153-7164, 2010) por lo que podrían contribuir al gasto energético y al mantenimiento del peso corporal.

La posibilidad de aumentar la cantidad de adipocitos marrones funcionales, especialmente aquellos presentes en los abundantes depósitos de grasa blanca (*brite*) aparece como una interesante herramienta o posibilidad terapéutica para combatir (prevenir o tratar) la obesidad y problemas relacionados. De hecho, se cree que la remodelación del tejido adiposo blanco a marrón puede conferir protección frente a la obesidad en numerosos modelos experimentales (Bonet, M.L et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1831: 969-985, 2013).

El control farmacológico o nutricional de la termogénesis emerge en este contexto como una nueva estrategia terapéutica en el control de la termorregulación, del peso corporal, la obesidad y sus complicaciones relacionadas, especialmente la resistencia a la insulina y la diabetes, la dislipemia y el hígado graso. En concreto, la resistencia a la insulina es una de las alteraciones fisiopatológicas más estrechamente relacionadas con la obesidad y el sobrepeso. El exceso de grasa corporal genera inflamación del tejido adiposo y una lipotoxicidad sistémica que conduce a la resistencia a la insulina y eventualmente al fallo o disfunción de las células pancreáticas productoras de insulina, lo que origina diabetes (Saltiel, A.R., *Cell* 104:517-529, 2001). En general, la obesidad se asocia a una serie de alteraciones y síntomas característicos que suelen ir ligados, como son resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa, dislipemia e hipertensión, y que en su conjunto definen lo que se conoce como síndrome metabólico. Interesantemente también el correcto funcionamiento de la

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

termogénesis se está revelando como muy importante para combatir (prevenir o tratar) la diabetes tipo 2 (véase proyecto DIABAT).

Aparte de contribuir a mantener el balance y la homeostasis energética y el peso corporal, la termogénesis juega un papel importante en la termorregulación, que consiste en la capacidad de mantener la temperatura corporal correcta bajo condiciones ambientales cambiantes. Un cuerpo sano mantiene su temperatura dentro de un estrecho margen (36-37,5°C) usando mecanismos de termorregulación. El mantenimiento de una correcta temperatura corporal es crucial para poder mantener las funciones vitales (McCallum, M. y Higgins, D. *Nurs Times*. 108 (45):20-2, 2012). Desde hace muchos años se conoce la importancia de la termogénesis inducida por el frío en el tejido adiposo marrón para mantener la temperatura corporal en humanos recién nacidos (Nedergaard, J et al., *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 293, 444-452, 2007). A raíz de los datos más recientes que indican que los humanos adultos siguen manteniendo cantidades considerables de este tejido, su papel termorregulador en la edad adulta se ha hecho también evidente (Nedergaard, J et al., *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 293, 444-452, 2007).

A la vista de lo anterior, proporcionar métodos y composiciones para el tratamiento, prevención o control de la termorregulación (temperatura), del sobrepeso, así como de algunas de sus complicaciones metabólicas, es un tema de enorme interés tanto terapéutico como nutricional, además del puramente estético.

Una insuficiente producción de calor (termogénesis) puede producirse en situaciones como exposición a ambientes fríos, dietas hipocalóricas para pérdida de peso que bajan el metabolismo basal e ingesta disminuida de alimentos, entre otros.

El resveratrol es un polifenol que aparece de manera natural en uvas y en otros alimentos de origen vegetal y para el que se han descrito importantes efectos sobre el metabolismo energético. En ratones alimentados con dietas hiperlipídicas la suplementación con altas dosis de resveratrol (200-400 mg/kg/día) protege del desarrollo de la obesidad y resistencia a la insulina, a la vez que aumenta el gasto energético (Lagouge, M. et al., *Cell* 127:1109-1122, 2006). Además, también existen datos en humanos que muestran que la suplementación con resveratrol durante 30 días tiene efectos sobre la salud comparables a los de la restricción calórica (Timmers, S. et al., *Cell Metab.* 14: 612-622, 2011).

La inducción de la expresión de UCP1 se ha observado *in vitro* en adipocitos blancos en estado de diferenciación tratados con resveratrol, pero no en adipocitos maduros (Picard, F. et al., *Nature* 429: 771-776, 2004). Por tanto, los efectos anti-obesidad del resveratrol pueden ser debidos, en parte, a los efectos sobre el metabolismo del tejido adiposo, pero no existen evidencias *in vivo* de que produzcan un efecto inductor de la remodelación de tejido adiposo blanco en marrón (termogénesis).

La quercetina es un flavonoide que aparece en alimentos de origen vegetal de la dieta y para el que se han descrito efectos beneficiosos en relación a las enfermedades cardiovasculares (Arts, I. C. et al., *Am. J. Clin. Nutr.* 81:317S-325S, 2005). Al igual que el resveratrol, el



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

tratamiento con altas dosis de quercetina (250 mg/kg/día) en ratas es capaz de prevenir la ganancia de peso inducida por la ingesta de una dieta hiperlipídica (Jung, C.H., et al., *Phytother Res.* 27:139-43, 2013). No existe ninguna evidencia de los efectos de la quercetina sobre el tejido adiposo marrón, la termogénesis, o sobre el proceso de marronización.

### DESCRIPCION DE LA INVENCION

Esta invención se basa en el efecto potenciador de la capacidad termogénica en el control de la temperatura corporal, así como en el efecto anti-obesidad de la combinación de resveratrol y quercetina que, en dosis bajas y por si solos no producen efecto, pero que en combinación sorprendentemente muestran una sinergia que resulta en efectos claros de activación del sistema de gasto energético, la capacidad de producir calor, la reducción de grasa y de peso corporal y de las complicaciones asociadas.

La presente invención se refiere al uso combinado de resveratrol y quercetina para el tratamiento y/o prevención de una insuficiente termogénesis y así de sus consecuencias (prevención del sobrepeso u obesidad y/o patologías asociadas al sobrepeso en mamíferos, prevención de una deficiente termorregulación y prevención de un excesivo ahorro energético por bajada del metabolismo basal o asociado a circunstancias de baja termorregulación).

Las ventajas que presenta la presente invención son:

- Mantenimiento del peso corporal;
- Pérdida de peso corporal en personas con sobrepeso/obesidad;
- Normalización de los parámetros y funciones metabólicas alteradas relacionadas con una adiposidad incrementada: hiperglucemia, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, hígado graso e hipertensión;
- Mantenimiento de una correcta temperatura corporal, especialmente en aquellas personas con factores de predisposición a la hipotermia;
- Mantenimiento de una tasa metabólica basal;
- Prevención de una excesiva eficiencia o aprovechamiento energético en la utilización de distintos alimentos o nutrientes, como la que se da en regímenes dietéticos bajos en calorías;
- Prevención de una bajada en la tasa metabólica debida a tratamientos farmacológicos, médicos o nutricionales.

Por tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere al uso combinado de al menos un estilbenoide seleccionado de resveratrol, pterostilbeno y piceatannol y al menos un flavonol seleccionado de quercetina, quercetina 4'-O-glucósido, quercetina 3,4' diglucósido, kaempferol, miricetina e isorhamnetina para la fabricación de una composición para el tratamiento y/o la prevención de la hipofunción termogénica y/o patologías asociadas a la hipofunción termogénica en mamíferos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a una composición que comprende al menos un estilbenoide seleccionado de resveratrol, pterostilbeno y piceatannol y al menos un flavonol seleccionado de quercetina, quercetina 4'-O-glucósido, quercetina 3,4' diglucósido, kaempferol, miricetina e isorhamnetina, caracterizada porque la proporción de estilbenoide:flavonol está comprendida entre 1:0,05 y 1:10.

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la composición tal y como se ha descrito anteriormente junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Un cuarto aspecto de la presente invención, se refiere a un complemento o suplemento alimenticio que comprende la composición tal y como se ha descrito anteriormente.

Un quinto aspecto de la presente invención se refiere a una composición cosmética que comprende la composición tal y como se ha descrito anteriormente junto con un vehículo cosméticamente aceptable.

### **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN**

Por tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere al uso combinado de al menos un estilbenoide seleccionado de resveratrol, pterostilbeno y piceatannol y al menos un flavonol seleccionado de quercetina, quercetina 4'-O-glucósido, quercetina 3,4' diglucósido, kaempferol, miricetina e isorhamnetina para la fabricación de una composición para el tratamiento y/o la prevención de la hipofunción termogénica y/o patologías asociadas a la hipofunción termogénica en mamíferos.

Los estilbenoides son derivados hidroxilados de estilbeno. En el contexto de la invención, el estilbenoide se selecciona de resveratrol, pterostilbeno y piceatannol.

Los flavonoles son una clase de flavonoides que tienen como esqueleto 3-hidroxi-flavona. En el contexto de la invención, el flavonol se selecciona de quercetina, quercetina 4'-O-glucósido, quercetina 3,4' diglucósido, kaempferol, miricetina e isorhamnetina.

Por el término "hipofunción termogénica" se entiende a la actividad por debajo de lo normal de la función termogénica, es decir, a una insuficiente función termogénica.

Por "patologías asociadas a la hipofunción termogénica" se entiende cualquier patología derivada de una insuficiente función termogénica, como pueden ser el sobrepeso (incluida obesidad), patologías asociadas al sobrepeso/obesidad y desórdenes de la temperatura corporal.

Por "sobrepeso" o exceso de peso en el contexto de la invención se entiende la acumulación excesiva de grasa corporal, que aparece cuando la ingesta sobrepasa al gasto energético. Por sobrepeso en el contexto de la invención se entiende todo el sobrepeso, desde el sobrepeso leve (índice de masa corporal, IMC > 25) a la obesidad clínicamente manifiesta (IMC > 30).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

Por “patologías asociadas al sobrepeso” se entiende cualquier patología que pueda deberse a un estado de sobrepeso u obesidad. Ejemplos no limitantes de estas patologías son: resistencia a la insulina, diabetes tipo 2, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, hígado graso, hipertensión, enfermedad cardiovascular, apnea obstructiva del sueño, cáncer, etc.

Por “desórdenes de la temperatura corporal” se entiende cualquier alteración de la temperatura por fuera de los márgenes normales (36-37,5°C), incluyendo las hipotermias accidentales.

El término “tratamiento” tal como se entiende en la presente invención se refiere a combatir los efectos causados como consecuencia de una enfermedad o condición patológica o anómala de interés en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano) que incluye:

- (i) inhibir la enfermedad o condición patológica o anómala, es decir, detener su desarrollo;
- (ii) aliviar la enfermedad o la condición patológica o anómala, es decir, causar la regresión de la enfermedad o la condición patológica o anómala o su sintomatología;
- (iii) estabilizar la enfermedad o la condición patológica o anómala.

El término “prevención” tal como se entiende en la presente invención consiste en evitar la aparición de la enfermedad, es decir, evitar que se produzca la enfermedad o la condición patológica o anómala en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano), en particular, cuando dicho sujeto tiene predisposición por la condición patológica o anómala.

En otras palabras, un primer aspecto de la presente invención se refiere a una composición de al menos un estilbenoide seleccionado de resveratrol, pterostilbeno y piceatannol y al menos un flavonol seleccionado de quercetina, quercetina 4'-O-glucósido, quercetina 3,4' diglucósido, kaempferol, miricetina e isorhamnetina para usar en el tratamiento y/o prevención la hipofunción termogénica y/o patologías asociadas a la hipofunción termogénica en mamíferos. También se podría decir que el primer aspecto de la presente invención, está dirigido a un procedimiento de tratar y/o prevenir la hipofunción termogénica y/o patologías asociadas a la hipofunción termogénica, que comprende administrar al mamífero en necesidad del mismo una cantidad eficaz de una composición de al menos un estilbenoide seleccionado de resveratrol, pterostilbeno y piceatannol y al menos un flavonol seleccionado de quercetina, quercetina 4'-O-glucósido, quercetina 3,4' diglucósido, kaempferol, miricetina e isorhamnetina. Preferiblemente el estilbenoide comprende resveratrol y el flavonol comprende quercetina, más preferiblemente el estilbenoide es resveratrol y el flavonol es quercetina.

En una realización del primer aspecto de la presente invención, las patologías asociadas a la hipofunción termogénica se seleccionan de sobrepeso, patologías asociadas al sobrepeso y desórdenes de la temperatura corporal.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

En una realización del primer aspecto de la presente invención, las patologías asociadas a la hipofunción termogénica se seleccionan de sobrepeso y patologías asociadas al sobrepeso.

En otras palabras, una realización del primer aspecto de la presente invención se refiere a una composición de al menos un estilbenoide seleccionado de resveratrol, pterostilbeno y piceatannol y al menos un flavonol seleccionado de quercetina, quercetina 4'-O-glucósido, quercetina 3,4' diglucósido, kaempferol, miricetina e isorhamnetina para usar en el tratamiento y/o prevención de sobrepeso y/o patologías asociadas al sobrepeso en mamíferos. También se podría decir que una realización del primer aspecto de la presente invención, está dirigido a un procedimiento de tratar y/o prevenir sobrepeso y/o patologías asociadas al sobrepeso en mamíferos, que comprende administrar al mamífero en necesidad del mismo una cantidad eficaz de una composición de al menos un estilbenoide seleccionado de resveratrol, pterostilbeno y piceatannol y al menos un flavonol seleccionado de quercetina, quercetina 4'-O-glucósido, quercetina 3,4' diglucósido, kaempferol, miricetina e isorhamnetina. Preferiblemente el estilbenoide comprende resveratrol y el flavonol comprende quercetina, más preferiblemente el estilbenoide es resveratrol y el flavonol es quercetina.

En una realización del primer aspecto de la presente invención, las patologías asociadas a la hipofunción termogénica son desórdenes de la temperatura corporal.

En otra realización del primer aspecto de la presente invención, las patologías asociadas al sobrepeso se seleccionan de diabetes tipo 2, resistencia a la insulina, hígado graso y dislipidemia.

Por "diabetes tipo 2" o "diabetes mellitus tipo 2" se entiende una enfermedad metabólica caracterizada por altos niveles de glucosa en la sangre con alteraciones del sistema insulínico.

Por "resistencia a la insulina", también llamada insulinoresistencia, se entiende a una condición fisiológica en la cual las células no responden a las acciones normales de la hormona insulina.

"Hígado graso" o "esteatosis hepática" es una condición en la que se produce una acumulación excesiva de grasa en las células del hígado (hepatocitos), lo cual puede llevar a inflamación hepática, con la posibilidad de desarrollar un daño hepático crónico (cirrosis).

Por "dislipidemia" se entiende una serie de condiciones patológicas cuyo elemento en común es una alteración del metabolismo de los lípidos, con su consecuente alteración de las condiciones de lípidos y lipoproteínas en la sangre. Preferiblemente, por dislipidemia se entiende hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia.

En otra realización del primer aspecto de la presente invención se refiere a una composición de al menos un estilbenoide seleccionado de resveratrol, pterostilbeno y piceatannol y al menos un flavonol seleccionado de quercetina, quercetina 4'-O-glucósido, quercetina 3,4' diglucósido, kaempferol, miricetina e isorhamnetina para la fabricación de una composición para el mantenimiento de la temperatura corporal (termorregulación), de interés en cualquier

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

individuo, pero especialmente en situaciones en las que se produzcan descensos de la temperatura por debajo de lo habitual, incluyendo hipotermias.

Por "termorregulación" se entiende la capacidad de mantener la temperatura corporal adecuada (36-37,5°C) bajo condiciones ambientales cambiantes.

Por "hipotermia" se entiende un descenso involuntario de la temperatura corporal por debajo de los 35°C. Esta situación tiene diversos factores predisponentes: exposición al frío, consumo de drogas o fármacos (barbitúricos, tranquilizantes, antidepresivos, anestésicos, etanol...), procesos metabólicos (desnutrición/malnutrición, hipotiroidismo, hipopituitarismo, hipermagnesemia, hipoglucemia, acidosis láctica, cetoacidosis, hipoxemia, uremia, ...), disfunción del sistema nervioso central, así como otras causas (inmovilidad, edad avanzada, coma, psoriasis, quemaduras, lesiones medulares, transfusiones de sangre a baja temperatura...). De todas ellas, entre las causas más frecuentes de hipotermia destacan la exposición al frío, el uso de fármacos depresores del sistema nervioso central y la hipoglucemia.

En una realización del primer aspecto de la presente invención, la proporción estilbenoide:flavonol está comprendida entre 1:0,05 y 1:10, preferiblemente entre 1:1 y 1:5, y más preferiblemente la proporción estilbenoide:flavonoles 1:2. Preferiblemente el estilbenoide comprende resveratrol y el flavonol comprende quercetina, más preferiblemente el estilbenoide es resveratrol y el flavonol es quercetina.

En otra realización del primer aspecto de la presente invención, la composición se selecciona de entre un medicamento, una composición cosmética, un complemento alimenticio.

El medicamento al que se refiere la presente invención puede ser de uso humano o veterinario. El "medicamento de uso humano" es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades para el tratamiento o prevención de enfermedades en seres humanos o que pueda usarse en seres humanos o administrarse a seres humanos con el fin de restaurar, corregir o modificar las funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico médico. El "medicamento de uso veterinario" es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades curativas o preventivas con respecto a las enfermedades animales o que pueda administrarse al animal con el fin de restablecer, corregir o modificar sus funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico veterinario. También se considerarán "medicamentos veterinarios" las "premezclas para piensos medicamentosos" elaboradas para ser incorporadas a un pienso.

En la presente invención se entiende como "cosmético" a aquellas preparaciones constituidas por sustancias naturales o sintéticas o sus mezclas, de uso externo en las diversas partes del cuerpo humano: piel, sistema capilar, uñas, labios, órganos genitales externos, dientes y membranas mucosas de la cavidad oral, preferiblemente piel, con el objeto exclusivo o principal de higienizarlas, perfumarlas, cambiarles su apariencia, protegerlos o mantenerlos en

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

buen estado y/o corregir olores corporales pero no para producir un efecto terapéutico. La composición cosmética puede contener excipientes y/o vehículos farmacéuticamente y farmacológicamente aceptables tal como se ha descrito en párrafos anteriores. Por otra parte la composición cosmética puede presentarse en cualquier forma adaptada a la administración tópica.

Por “complementos alimenticios”, también conocidos como “complementos dietéticos” o “suplementos dietéticos o alimenticios” se entienden los preparados que tienen como objetivo complementar la dieta y aportar nutrientes, como vitaminas, minerales, ácidos grasos y aminoácidos. En el contexto de la invención, por “complementos alimenticios” también se entienden alimentos funcionales, que son alimentos que son elaborados no sólo por sus características nutricionales sino también para cumplir una función específica como puede ser mejorar la salud y/o reducir el riesgo de contraer o desarrollar enfermedades. En los alimentos funcionales la composición se puede ver acompañada de otros componentes como por ejemplo pero no limitadamente leche, yogur, agua, harinas, chocolate, cereales y zumos de frutas.

En otra realización del primer aspecto de la presente invención, el estilbenoide se administra en una dosis de entre 1mg/kg/día y 150mg/kg/día, preferiblemente entre 10mg/kg/día y 20mg/kg/día.

En otra realización del primer aspecto de la presente invención, la flavonol se administra en una dosis de entre 2mg/kg/día y 300mg/kg/día, preferiblemente de entre 25 mg/kg/día y 35 mg/kg/día.

En otra realización del primer aspecto de la presente invención, el estilbenoide se administra en una dosis de entre 1mg/kg/día y 150mg/kg/día y el flavonol se administra en una dosis de entre 2mg/kg/día y 300mg/kg/día, preferiblemente el estilbenoide se administra en una dosis de entre 10mg/kg/día y 20mg/kg/día y la flavonol se administra en una dosis de entre 25 mg/kg/día y 35 mg/kg/día. Preferiblemente el estilbenoide comprende resveratrol y el flavonol comprende quercetina, más preferiblemente el estilbenoide es resveratrol y el flavonol es quercetina.

En otra realización del primer aspecto de la presente invención, la composición además comprende al menos un antioxidante seleccionado de vitamina C, vitamina D, vitamina E, carotenoides, polifenoles, ácido lipoico.

En otra realización del primer aspecto de la presente invención, la composición se encuentra en una forma adecuada para su administración por vía oral, por vía tópica o vía inyectable, preferiblemente la composición se encuentra en una forma adecuada para su administración por vía oral o por vía tópica.

En otra realización del primer aspecto de la presente invención, la composición se administra por vía oral.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

En otra realización del primer aspecto de la presente invención, la composición se administra por vía oral y la composición es un medicamento. Preferiblemente, la composición se encuentra en una forma farmacéutica seleccionada de comprimidos, pastillas, cápsulas, polvos, gránulos, jarabes, suspensiones, soluciones y gotas.

En otra realización del primer aspecto de la presente invención, la composición es un complemento alimenticio.

En otra realización del primer aspecto de la presente invención, la composición se administra por vía tópica.

En otra realización del primer aspecto de la presente invención, la composición se administra por vía tópica y es una composición cosmética.

En otra realización del primer aspecto de la presente invención, la composición se administra como crema, loción, gel, ungüento, pomada, linimento, solución o aerosol.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a una composición que comprende al menos un estilbenoide seleccionado de resveratrol, pterostilbeno y piceatannol y al menos un flavonol seleccionado de quercetina, quercetina 4'-O-glucósido, quercetina 3,4' diglucósido, kaempferol, miricetina e isorhamnetina,, caracterizada porque la proporción de estilbenoide:flavonol está comprendida entre 1:0,05 y 1:10. Preferiblemente el estilbenoide comprende resveratrol y el flavonol comprende quercetina, más preferiblemente el estilbenoide es resveratrol y el flavonol es quercetina.

En una realización del segundo aspecto de la presente invención, la proporción estilbenoide:flavonol está comprendida entre 1:1 y 1:5, preferiblemente la proporción estilbenoide:flavonoles 1:2. Preferiblemente el estilbenoide comprende resveratrol y el flavonol comprende quercetina, más preferiblemente el estilbenoide es resveratrol y el flavonol es quercetina.

En otra realización del segundo aspecto de la presente invención, la composición además comprende al menos un antioxidante seleccionado de vitamina C, vitamina D, vitamina E, carotenoides, polifenoles, ácido lipoico.

Por el término "antioxidante" se entiende una composición capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. Las reacciones de oxidación pueden producir radicales libres que comienzan reacciones en cadena que dañan células.

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la composición tal y como se ha descrito anteriormente junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La composición farmacéutica puede comprender un "vehículo" o portador, que es preferiblemente una sustancia inerte. La función del vehículo es facilitar la incorporación de otros compuestos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

a la composición farmacéutica. Por tanto, el vehículo es una sustancia que se emplea para diluir cualquiera de los componentes de la composición farmacéutica de la presente invención hasta un volumen o peso determinado; o bien que aún sin diluir dichos componentes es capaz de permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma al medicamento. Además, el excipiente y el vehículo deben ser farmacológicamente aceptables, es decir, que el excipiente y el vehículo esté permitido y evaluado de modo que no cause daño a los organismos a los que se administra.

En una primera realización del tercer aspecto de la presente invención, la composición farmacéutica se encuentra en una forma farmacéutica seleccionada de comprimidos, pastillas, cápsulas, polvos, gránulos, jarabes, suspensiones, soluciones y gotas.

Un cuarto aspecto de la presente invención, se refiere a un complemento alimenticio que comprende la composición tal y como se ha descrito anteriormente.

En una realización del cuarto aspecto de la presente invención, el complemento alimenticio se encuentra en una forma seleccionada de comprimidos, pastillas, cápsulas, polvos, gránulos, jarabes, suspensiones, soluciones, gotas y alimento funcional.

Un quinto aspecto de la presente invención se refiere a una composición cosmética que comprende la composición tal y como se ha descrito anteriormente vehículo cosméticamente aceptable.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

### DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1. Incremento de peso por grupo. I(g): Incremento de peso en gramos; Control: grupo control; RSV: grupo tratado con resveratrol (15 mg/kg/día); Q: grupo tratado con quercetina (30 mg/kg/día); RSV+Q: grupo tratado con 15 mg/kg/día de resveratrol y 30 mg/kg/día de quercetina. Los datos con letras diferentes (a, b) son estadísticamente distintos (test de Newman-Keuls,  $P < 0,05$ ).

Fig. 2. Peso de tejido adiposo por depósito por grupo. PTA (g): Peso de tejido adiposo en gramos; I: tejido adiposo inguinal; Pr: tejido adiposo perirrenal; M: tejido adiposo mesentérico; E: tejido adiposo epididimal. Control: grupo control; RSV: grupo tratado con resveratrol (15 mg/kg/día); Q: grupo tratado con quercetina (30 mg/kg/día); RSV+Q: grupo tratado con 15 mg/kg/día de resveratrol y 30 mg/kg/día de quercetina. Los datos con letras diferentes (a, b) son estadísticamente distintos (test de Newman-Keuls,  $P < 0,05$ ).



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

Figs. 3A y 3B. Diámetro de los adipocitos por depósito por grupo. DPr: diámetro de los adipocitos del tejido perirrenal; DI: diámetro de los adipocitos del tejido inguinal. Control: grupo control; RSV: grupo tratado con resveratrol (15 mg/kg/día); Q: grupo tratado con quercetina (30 mg/kg/día); RSV+Q: grupo tratado con 15 mg/kg/día de resveratrol y 30 mg/kg/día de quercetina. Los datos con letras diferentes (a, b) son estadísticamente distintos (test de Newman-Keuls,  $P < 0,05$ ).

Figs. 4A y 4B. Número de adipocitos por depósito por grupo. A Pr (%): número de adipocitos por grupo en el tejido perirrenal en %; A I (%): número de adipocitos por grupo en el tejido inguinal en %. Control: grupo control; RSV: grupo tratado con resveratrol (15 mg/kg/día); Q: grupo tratado con quercetina (30 mg/kg/día); RSV+Q: grupo tratado con 15 mg/kg/día de resveratrol y 30 mg/kg/día de quercetina.

Fig. 5. Micrografías de secciones de tejido adiposo perirrenal. Las secciones están teñidas con hematoxilina/eosina. \*: adipocitos blancos uniloculares; →: adipocitos multiloculares "brite". Control: grupo control; RSV: grupo tratado con resveratrol (15 mg/kg/día); Q: grupo tratado con quercetina (30 mg/kg/día); RSV+Q: grupo tratado con 15 mg/kg/día de resveratrol y 30 mg/kg/día de quercetina.

Fig. 6. Micrografías de tinciones inmunohistoquímica para la UCP1 en el tejido adiposo retroperitoneal. \*: adipocitos blancos uniloculares, UCP1 negativos; → (flecha continua): adipocitos multiloculares "brite", UCP1 positivos (proteína teñida); → (flecha discontinua): adipocitos multiloculares "brite", UCP1 negativos. Control: grupo control; RSV: grupo tratado con resveratrol (15 mg/kg/día); Q: grupo tratado con quercetina (30 mg/kg/día); RSV+Q: grupo tratado con 15 mg/kg/día de resveratrol y 30 mg/kg/día de quercetina.

Fig. 7A y 7B. Niveles de expresión de los ARNm para *Cidea* y *Hoxc9* (marcadores de marronización) en el depósito de tejido adiposo blanco perirrenal usando ARNm para beta-actina como control interno, en unidades arbitrarias, dando valor 1 al grupo control. ARNm *Hoxc9*: niveles de expresión para *Hoxc9*; ARNm *Cidea*: niveles de expresión para *Cidea*. Los datos con letras diferentes (a, b) son estadísticamente distintos (test de Newman-Keuls,  $P < 0,05$ ).\*;  $P < 0,01$  RSV+Q vs Control, *t*-test.

Figs. 8A, 8B y 8C. Parámetros relacionados con la sensibilidad a la insulina en ratas. G (mM): glucosa en mM; Ins (mU/l): insulina en mU/l; HOMA-IR: índice HOMA-IR. Control: grupo control; RSV: grupo tratado con resveratrol (15 mg/kg/día); Q: grupo tratado con quercetina (30 mg/kg/día); RSV+Q: grupo tratado con 15 mg/kg/día de resveratrol y 30 mg/kg/día de quercetina. Los datos con letras diferentes (a, b) son estadísticamente distintos (test de Newman-Keuls,  $P < 0,05$ ).

Fig. 9. Concentración de triacilglicéridos circulantes. T(mg/dl): triacilglicéridos en mg/dl; Control: grupo control; RSV: grupo tratado con resveratrol (15 mg/kg/día); Q: grupo tratado con quercetina (30 mg/kg/día); RSV+Q: grupo tratado con 15 mg/kg/día de resveratrol y 30 mg/kg/día de quercetina. Los datos con letras diferentes (a, b) son estadísticamente distintos (test de Newman-Keuls,  $P < 0,05$ ).

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

## EJEMPLOS

### **Ejemplo 1. Eficacia de una composición de la invención sobre la reducción del sobrepeso en ratas alimentadas con dieta obesogénica.**

Las dietas obesogénicas consisten normalmente en dietas hipercalóricas e hiperlipídicas, que administradas a animales de experimentación son capaces de inducir un incremento de peso y la aparición de obesidad.

Se utilizaron ratas Wistar (*Harlan Laboratories*) de 5 semanas de edad al inicio del experimento. Fueron estabuladas a 22°C con un periodo de luz/oscuridad de 12 horas. Los animales se alimentaron *ad libitum* con una dieta hipergrasa (*OpenSource DietsInc.*, Ref. D12451M) que contenía 4,73 kcal/g de dieta, y con un 45% de las calorías procedentes de la grasa. Los animales se dividieron en cuatro grupos (Tabla 1).

**Tabla 1.** Grupos del ejemplo 1.

Grupo	Tamaño grupo (n)	Composición
Control	6	Vehículo
Resveratrol (RSV)	6	15 mg/kg/día resveratrol
Quercetina (Q)	6	30 mg/kg/día quercetina
Resveratrol + Quercetina (RSV+Q)	9	15 mg/kg/día resveratrol + 30 mg/kg/día quercetina

Cada grupo recibió diariamente por vía oral y durante 6 semanas las composiciones indicadas en la tabla.

Los polifenoles fueron añadidos diariamente en la superficie de la dieta calculando la cantidad necesaria para conseguir las dosis indicadas, en función del peso de cada rata. El grupo control recibió una cantidad equivalente de etanol. Se hizo un seguimiento del peso corporal y la ingesta de los animales durante todo el tratamiento. Al final del periodo experimental los animales fueron sacrificados por exanguinación mediante punción cardíaca tras anestesia con hidrato de cloral (1 ml al 4%/g peso corporal), procediéndose a la recogida de sangre y tejidos, y al peso de los tejidos adiposos. La significancia estadística de los efectos observados fue analizada mediante el test de Newman-Keuls. El umbral de significancia se estableció a  $P < 0,05$ .

El incremento de peso de los grupos está representado en la tabla 2 y en la figura 1.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Tabla 2.** Incremento de peso por grupo.

	Incremento de peso (g)	Error estándar de la media
Control	179,8	7,4
RSV	169,2	6,3
Q	162,2	6,9
RSV+Q	149,3	9,3

Tal y como se puede apreciar tanto en la tabla como en la figura, el incremento de peso corporal de los animales tratados con la composición de la invención tuvieron un incremento de peso un 7% menor que los controles. Se puede ver que el tratamiento con únicamente resveratrol o únicamente quercetina produce una tendencia a un menor incremento, pero que no resultó estadísticamente diferente respecto a los animales control.

Todos los depósitos adiposos seleccionados, tanto subcutáneo (inguinal, (I)) como viscerales (perirrenal(Pr), mesentérico(M) y epididimal (E)) fueron significativamente menores en los animales tratados con la composición de la invención (Tabla 3).

**Tabla 3.** Peso de tejido adiposo por depósito por grupo.

Tejido adiposo	Peso de tejido adiposo (g)							
	Control	Error estándar de la media	RSV	Error estándar de la media	Q	Error estándar de la media	RSV+Q	Error estándar de la media
I	13,0	0,8	12,4	1,3	11,7	1,1	10,8	0,8
Pr	12,8	1,1	11,9	0,2	11,8	0,9	9,8	0,9
M	4,3	0,2	4,4	0,1	4,0	0,5	3,6	0,3
E	10,2	0,4	8,9	0,8	8,6	0,7	8,8	0,5

Los datos están también representados en la figura 2.

Estos resultados indican que la composición de la invención reduce la ganancia de peso corporal en animales alimentados con una dieta obesogénica y reduce la adiposidad corporal,

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

con un efecto sinérgico que excede a la suma de los efectos de los componentes individuales de la combinación por separado.

### **Ejemplo 2. Eficacia de una composición de la presente invención sobre la reducción del tamaño de adipocitos blancos en ratas**

Se emplearon los mismos grupos experimentales del ejemplo 1. El tamaño (diámetro) de los adipocitos blancos uniloculares y su distribución por tamaño se determinó en los depósitos de tejido adiposo blanco perirrenal e inguinal seleccionados como representativos de la grasa visceral y subcutánea, respectivamente. Para ello se fijaron secciones de ambos tejidos en paraformaldehído al 4% en tampón fosfato salino (PBS) durante una noche a 4°C. Los tejidos fijados se deshidrataron con alcoholes (etanol) de graduación creciente, se aclararon en xileno y se incluyeron en parafina. Se cortaron secciones de 5 µm de grosor que se montaron en portaobjetos y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Para medir el tamaño de los adipocitos blancos uniloculares en las secciones teñidas se tomaron imágenes con microscopía óptica que fueron digitalizadas, para lo cual se utilizó un microscopio Zeiss Axioscop 2 acoplado a una cámara digital AxioCam ICc3 (Carl Zeiss, España) Los análisis morfológicos se realizaron en 6-9 animales por grupo. En concreto, se midió el diámetro de un total de aproximadamente 1000 adipocitos por grupo experimental mediante el programa informático Axio Vision (Carl Zeiss, España). Posteriormente se representaron los adipocitos distribuidos según su tamaño a partir de los tamaños de los adipocitos individuales. La significancia estadística de los efectos observados fue analizada mediante el test de Newman-Kels. El umbral de significancia se estableció a  $P < 0,05$ .

El tratamiento con una composición de resveratrol resultó en un menor tamaño de los adipocitos blancos del depósito perirrenal, y el tratamiento con quercetina, en un menor tamaño de los adipocitos en el tejido inguinal. Sin embargo, los animales tratados con una composición de la invención (RSV+Q) presentaron adipocitos blancos más pequeños en los dos depósitos de tejido adiposo analizados, tanto en el visceral (perirrenal) como en el subcutáneo (inguinal). Los datos se presentan en la tabla 4 y en las figuras 3A y 3B.

**Tabla 4.** Diámetro de los adipocitos por tejido por grupo.

	Diámetro de los adipocitos en tejido perirrenal	Error estándar de la media	Diámetro de los adipocitos en tejido inguinal	Error estándar de la media
Control	83,14	2,65	64,50	1,29
RSV	69,92	3,50	55,67	3,10
Q	74,53	3,38	52,34	3,46
RSV+Q	73,46	2,72	51,78	3,71

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Además, si se observa la distribución de los adipocitos uniloculares por tamaño, se puede ver cómo, en ambos depósitos grasos, los animales tratados con una composición de la invención tienen una menor población de adipocitos de mayor tamaño en comparación con los animales del grupo control. Los datos se presentan en las tablas 5 y 6 y en las figuras 4A y 4B.

**Tabla 5.** Diámetro de los adipocitos por grupo en el tejido perirrenal.

	Diámetro					
	0-30 $\mu\text{m}$	31-60 $\mu\text{m}$	61-90 $\mu\text{m}$	91-120 $\mu\text{m}$	121-150 $\mu\text{m}$	>150 $\mu\text{m}$
Control	3,2	20	36,2	33,8	6,7	0,14
RSV	8	30,6	39,6	19,5	1,87	0,11
Q	8,7	23,8	38,4	26,5	2,69	0
RSV+Q	6,12	26,9	43	21,8	2,13	0,18

**Tabla 6.** Diámetro de los adipocitos por grupo en el tejido inguinal.

	Diámetro				
	0-25 $\mu\text{m}$	26-50 $\mu\text{m}$	51-75 $\mu\text{m}$	76-100 $\mu\text{m}$	101-125 $\mu\text{m}$
Control	0,2	23,4	50,2	23,1	2,1
RSV	5,5	38,4	44,9	10,4	0,9
Q	7,7	47,1	35,4	8,2	1,5
RSV+Q	5,7	50,1	36,6	7,7	0

El tratamiento produjo un descenso en la población de adipocitos mayores de 90 y 50  $\mu\text{m}$ , en los depósitos grasos perirrenal e inguinal, respectivamente. Por tanto, podemos decir que el efecto reductor de la adiposidad observado en el Ejemplo 1 va asociado a una disminución del tamaño de los adipocitos blancos y, en consecuencia a una reducción del contenido de grasa en estos adipocitos.

### **Ejemplo 3. Efecto de la suplementación con una composición de la presente invención sobre la remodelación del tejido adiposo blanco a marrón y la capacidad termogénica en ratas.**

Se empleó una composición que contenía una mezcla de resveratrol y quercetina en una dosificación de 15 mg/kg/día para el RSV y de 30 mg/kg/día para la Q.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

Se emplearon animales tratados diariamente con una composición conteniendo resveratrol y quercetina tal cual está explicado en el ejemplo 1. Diferentes depósitos de tejido adiposo blanco visceral (perirrenal, mesentérico y epididimal) y el depósito subcutáneo (inguinal) fueron fijados en paraformaldehído, deshidratados e incluidos en parafina. Se cortaron secciones de 5 µm de grosor que se montaron en portaobjetos. Secciones de los diferentes tejidos, teñidas con hematoxilina y eosina fueron observadas al microscopio óptico para visualizar la morfología e identificar la presencia de adipocitos marrones/*brite* multiloculares.

En aquellas muestras en las que se identificó la presencia de adipocitos marrones/*brite* se determinó también la presencia de UCP1 (responsable molecular de la termogénesis) mediante inmunohistoquímica mediante la técnica de avidina-biotina (Hsu, S.M. *et al.*, *J. Histochem. Cytochem.* 29: 577-80, 1981). De manera sintética, las secciones de tejido incluidas en parafina se incubaron durante una noche a 4°C con un anticuerpo policlonal primario anti-UCP1 de conejo (GeneTex, Inc) diluido 1:150 en PBS. Posteriormente las secciones se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario biotinilado anti-IgG de rata (Vector Laboratories, USA) diluido 1:200 y, posteriormente, con el complejo ABC (Vectastain ABC kit, Vector). La actividad peroxidasa se reveló utilizando 3,3'-diaminobencidina hidrocloreuro como cromógeno (Sigma, España) en agua. Las secciones fueron teñidas también con hematoxilina y montadas en Eukitt (Kindler, Alemania). Se realizaron controles negativos por omisión del anticuerpo primario. Las imágenes se adquirieron con un microscopio Zeiss Axioskop 2 equipado con una cámara digital (Carl Zeiss, España).

Para los análisis morfológicos se utilizaron 6-9 animales por grupo experimental.

El tratamiento durante 6 semanas con una composición de la invención, conteniendo 15 mg/kg/día de resveratrol y 30 mg/kg/día de quercetina produjo una remodelación del tejido adiposo perirrenal de rata, con la aparición de abundantes adipocitos marrones/*brite* multiloculares. En la figura 5 puede observarse la presencia de adipocitos blancos uniloculares intercalados con numerosos adipocitos multiloculares. En el tejido adiposo perirrenal de animales tratados con 15 mg/kg/día de resveratrol, o en los animales tratados con 30 mg/kg/día de quercetina no se encontraron adipocitos multiloculares o bien fueron escasos.

Cuando se analizó la presencia de UCP1 en las muestras de tejido adiposo perirrenal se pudo observar que los adipocitos multiloculares expresaban dicha proteína desacoplante, que es la responsable molecular de la termogénesis (figura 6).

Por tanto, una combinación de resveratrol y quercetina dentro del rango de concentración que se propone en la presente invención, es capaz de promover la remodelación de parte del tejido adiposo blanco a marrón, induciendo la aparición de adipocitos multiloculares que expresan UCP1 y de aumentar la capacidad termogénica del animal. Esta marronización del tejido adiposo blanco explica los efectos reductores de adiposidad promovida por la mezcla de resveratrol y quercetina. Los resultados permiten afirmar que las composiciones de la presente invención aumentan la capacidad termogénica del tejido adiposo y el gasto energético.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Ejemplo 4. Eficacia de una composición de la presente invención sobre la inducción de la expresión de marcadores moleculares de adipocitos marrones/"brite" en tejido adiposo blanco en ratones

Se estudió la inducción de la expresión génica de un marcador específico de adipocitos "brite", el *Hoxc9* ("homeobox C92), y de un marcador selectivo de adipocitos marrones, el *Cidea* (del inglés, "Cell death-inducing DNA fragmentation factor-alpha-like effector A") (Walden, T.B., et al., *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 302: E19-E31, 2012).

Se emplearon los mismos grupos experimentales del ejemplo 1. Se analizó la expresión de ARNm de *Hoxc9* y *Cidea*, genes relacionados con la marca molecular de adipocitos "brite" y de adipocitos marrones, respectivamente, en el tejido adiposo blanco perirrenal. Los niveles de ARNm se determinaron por PCR (*polymerase chain reaction*) a tiempo real, a partir de ARN total extraído de los tejidos con reactivo Trizol y retrotranscrito con transcriptasa inversa, utilizando ARNm de beta-actina como control interno. Las parejas de primers específicas de cada gen se sintetizaron comercialmente por Integrated Technologies ADN (Bélgica). El análisis de expresión génica se realizó usando el método comparativo del número de ciclos de amplificación (Ct). La amplificación de la secuencia de beta-actina se realizó en paralelo y se utilizó para normalizar los valores obtenidos para los genes estudiados. Los resultados se expresaron utilizando el método de Livak y Schmittgen (Livak, K.J.; Schmittgen, T.D., *Methods* 25:402-408, 2001). La significancia estadística de los efectos observados fue analizada mediante el test de Newman-Keuls. El umbral de significancia se estableció a  $P < 0,05$ .

El tratamiento durante 6 semanas con una composición de la invención produjo un aumento en la expresión de los marcadores de adipocitos marrones y "brite", *Cidea* y *Hoxc9*, respectivamente en el tejido adiposo perirrenal, tal y como se puede ver en la tabla 7 y en las figuras 7A y 7B.

**Tabla 7.** Niveles de expresión de los ARNm (ARNmensajeros) para *Hoxc9* y *Cidea* en el depósito de tejido adiposo blanco perirrenal. Los niveles de ARNm para beta-actina se utilizaron como control interno. Los resultados están expresados en unidades arbitrarias, dando valor 1 al grupo control.

	Hoxc9	Error estándar de la media	Cidea	Error estándar de la media
Control	1,00	0,09	1,00	0,80
RSV	1,17	0,26	1,50	0,31
Q	1,67	0,39	2,23	0,43
RSV+Q	1,81	0,24	3,73	0,33

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### **Ejemplo 5. Efecto de la suplementación con una composición de la presente invención sobre parámetros relacionados con la sensibilidad a la insulina en ratas.**

Se emplearon animales estabulados y alimentados en las mismas condiciones que en el ejemplo 1. En este caso se utilizaron animales de dos grupos experimentales, que recibieron diariamente por vía oral y durante 6 semanas: vehículo (grupo control, n=6 animales) o una composición de la presente invención (15 mg/kg/día de resveratrol y 30 mg/kg/día de quercetina) (grupo RSV+Q, n=9 animales).

A los animales se les extrajo sangre tras un ayuno de 12 h, para la determinación de los niveles circulantes de glucosa en suero (utilizando un kit de Biosystems) e insulina (mediante un kit de ELISA, distribuido por Mercodia). Para cada animal se calculó el índice HOMA-IR (del inglés, *homeostatic model assessment for insulin resistance*), que es un índice bien aceptado indicativo de la sensibilidad relativa a la insulina, utilizando la fórmula de Matthews (Matthews *et al.*, *Diabetologia* 28: 412-419, 1985):

$$\text{HOMA-IR} = \text{glucosa en ayunas (mM)} \times \text{insulina en ayunas (mU/l)} / 22,5$$

Cuanto menor el índice HOMA-IR, menor es la resistencia a la insulina y por tanto mayor la sensibilidad a esta hormona. La significancia estadística de los efectos observados fue analizada mediante el test de la *t* de Student. El umbral de significancia se estableció a  $P < 0,05$ .

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 8 y en las figuras 8A, 8B, 8C.

**Tabla 8.** Niveles circulantes de glucosa en mM (G) e insulina en mU/l (Ins) e índice HOMA-IR.

	G (mM)	Error estándar de la media	Ins (mU/l)	Error estándar de la media	HOMA-IR	Error estándar de la media
Control	6,6	0,2	45,8	8,8	13,5	2,6
RSV+Q	6	0,3	24,8	3	6,4	1,3

### **Ejemplo 6. Efecto de la suplementación por vía oral con una composición de la presente invención sobre los niveles de triacilglicérols en ratas**

Se utilizaron los mismos grupos experimentales del ejemplo 5. Se determinaron los niveles de triglicéridos circulantes en suero de ratas ayunadas preparado a partir de sangre extraída por punción cardíaca, mediante un ensayo enzimático colorimétrico comercial (Sigma). La significancia estadística de los efectos observados fue analizada mediante el test de la *t* de Student. El umbral de significancia se estableció a  $P < 0,05$ .

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 9 y en la figura 9.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

**Tabla 9.** Niveles circulantes de triacilgliceroles en mg/dl.

	triacilgliceroles (mg/dL)	Error estándar de la media
Control	53,4	1,5
RSV	35,8	0,7
Q	42,7	2,5
RSV+Q	30,6	3

Como se puede ver en la tabla 9 y figura 9, los animales suplementados con la composición de la invención presentaron menor trigliceridemia que los controles. En consecuencia, las composiciones de la presente invención pueden ser de gran utilidad en el tratamiento o prevención de la dislipidemia y en reducir la concentración de triglicéridos en sangre.

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

## REIVINDICACIONES

1. Uso combinado de al menos un estilbenoide seleccionado de resveratrol, pterostilbeno y piceatannol y al menos un flavonol seleccionado de quercetina, quercetina 4'-O-glucósido, quercetina 3,4' diglucósido, kaempferol, miricetina e isorhamnetina para la fabricación de una composición para el tratamiento y/o la prevención de la hipofunción termogénica y/o patologías asociadas a la hipofunción termogénica en mamíferos.
2. Uso según la reivindicación anterior, donde las patologías de la hipofunción termogénica se seleccionan de sobrepeso (incluida obesidad), patologías asociadas al sobrepeso y desórdenes de la temperatura corporal.
3. Uso según la reivindicación anterior, donde las patologías asociadas al sobrepeso se seleccionan de diabetes tipo 2, resistencia a la insulina, hígado graso y dislipidemia.
4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la proporción estilbenoide:flavonol está comprendida entre 1:0,05 y 1:10.
5. Uso según la reivindicación anterior, donde la proporción estilbenoide:flavonol está comprendida entre 1:1 y 1:5.
6. Uso según la reivindicación anterior, donde la proporción estilbenoide:flavonol es 1:2.
7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la composición se selecciona de entre un medicamento, una composición cosmética, un complemento alimenticio.
8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el estilbenoide se administra en una dosis de entre 1mg/kg/día y 150mg/kg/día.
9. Uso según la reivindicación anterior, donde el estilbenoide se administra en una dosis de entre 10mg/kg/día y 20mg/kg/día.
10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la flavonol se administra en una dosis de entre 2mg/kg/día y 300mg/kg/día.
11. Uso según la reivindicación anterior, donde la flavonol se administra en una dosis de entre 25 mg/kg/día y 35 mg/kg/día.
12. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el estilbenoide es resveratrol y el flavonol es quercetina.
13. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la composición además comprende al menos un antioxidante seleccionado de vitamina C, vitamina D, vitamina E, carotenoides, polifenoles, ácido lipoico.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

14. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la composición se encuentra en una forma adecuada para su administración por vía oral o por vía tópica.
15. Uso según la reivindicación anterior donde la composición se administra por vía oral.
16. Uso según la reivindicación anterior donde la composición es un medicamento.
17. Uso según la reivindicación anterior, donde la composición se encuentra en una forma farmacéutica seleccionada de comprimidos, pastillas, cápsulas, polvos, gránulos, jarabes, suspensiones, soluciones y gotas.
18. Uso según la reivindicación 15, donde la composición es un complemento alimenticio.
19. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, donde la composición se administra por vía tópica.
20. Uso según la reivindicación anterior, donde la composición es una composición cosmética.
21. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 19 o 20, donde la composición se administra como crema, loción, gel, ungüento, pomada, linimento, solución o aerosol.
22. Composición que comprende al menos un estilbenoide seleccionado de resveratrol, pterostilbeno y piceatannol y al menos un flavonol seleccionado de quercetina, quercetina 4'-O-glucósido, quercetina 3,4' diglucósido, kaempferol, miricetina e isorhamnetina, caracterizada porque la proporción de estilbenoide:flavonol está comprendida entre 1:0,05 y 1:10.
23. Composición según la reivindicación anterior, donde la proporción estilbenoide:flavonol está comprendida entre 1:1 y 1:5.
24. Composición según la reivindicación anterior, donde la proporción estilbenoide:flavonol es 1:2.
25. Composición cualquiera de las reivindicaciones 22a 24, donde el estilbenoide es resveratrol y el flavonol es quercetina.
26. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 22a 24 que además comprende al menos un antioxidante seleccionado de vitamina C, vitamina D, vitamina E, carotenoides, polifenoles, ácido lipoico.
27. Composición farmacéutica que comprende la composición según cualquiera de las reivindicaciones 22a 26 junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
28. Composición farmacéutica según la reivindicación anterior donde la composición farmacéutica se encuentra en una forma farmacéutica seleccionada de comprimidos, pastillas, cápsulas, polvos, gránulos, jarabes, suspensiones, soluciones y gotas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

29. Complemento alimenticio que comprende la composición según cualquiera de las reivindicaciones 22a 26.
30. Complemento alimenticio según la reivindicación anterior, donde el complemento alimenticio se encuentra en una forma seleccionada de comprimidos, pastillas, cápsulas, polvos, gránulos, jarabes, suspensiones, soluciones, gotas y alimento funcional.
31. Composición cosmética que comprende la composición según cualquiera de las reivindicaciones 22a 26 junto con un vehículo cosméticamente aceptable.

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## FIGURAS-DIBUJOS

FIG. 1

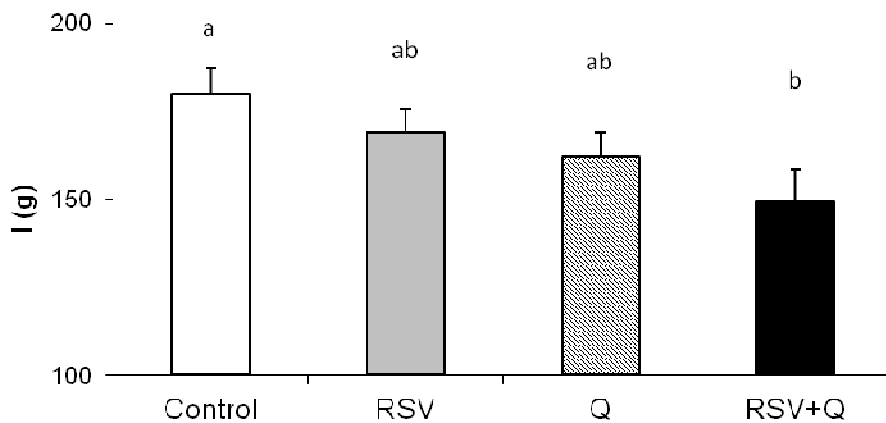


FIG. 2

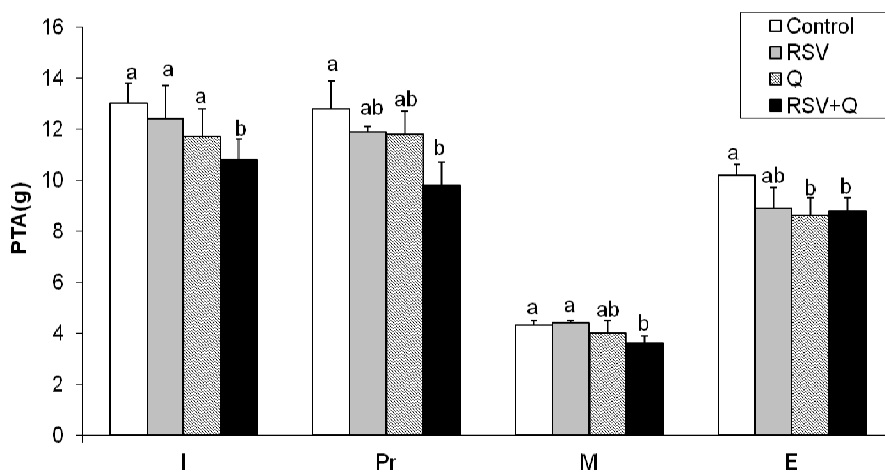


FIG. 3A

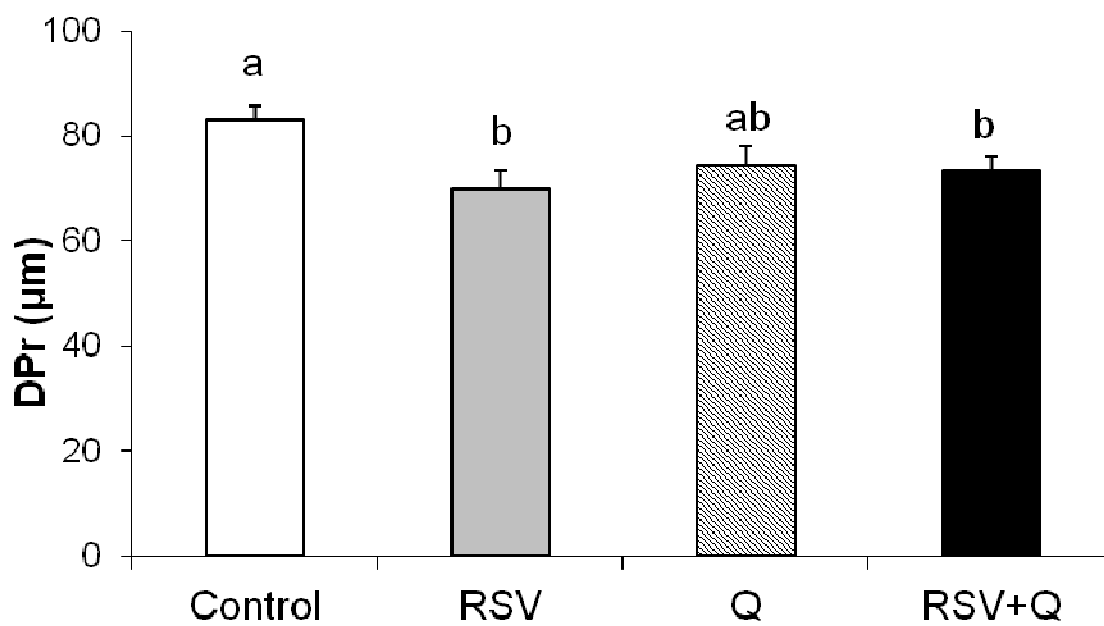
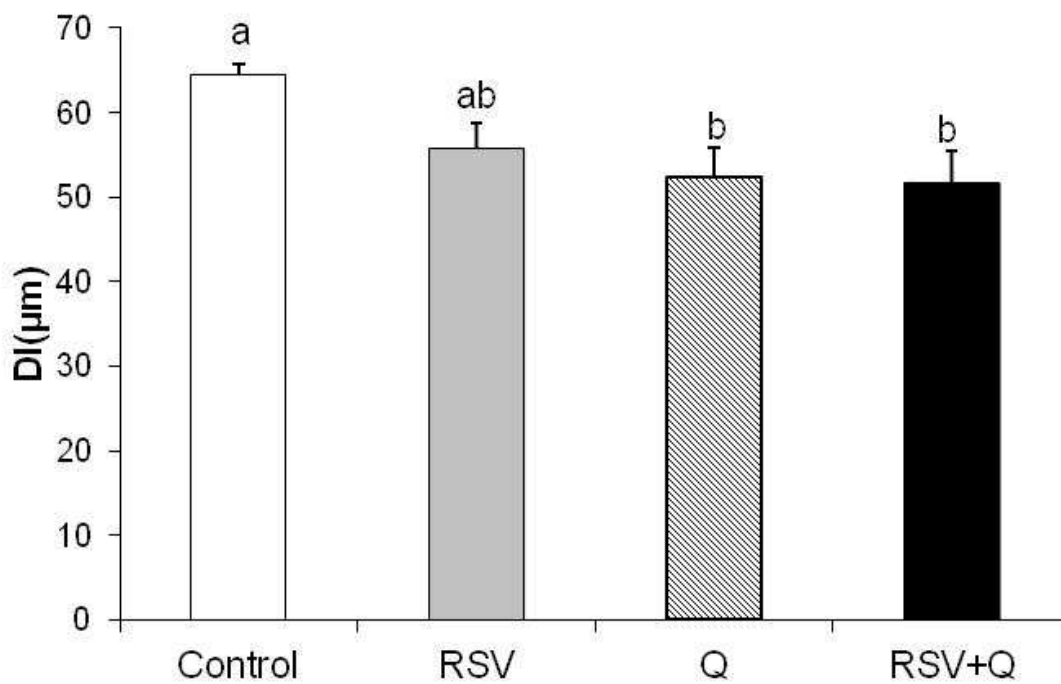


FIG. 3B



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

FIG. 4A

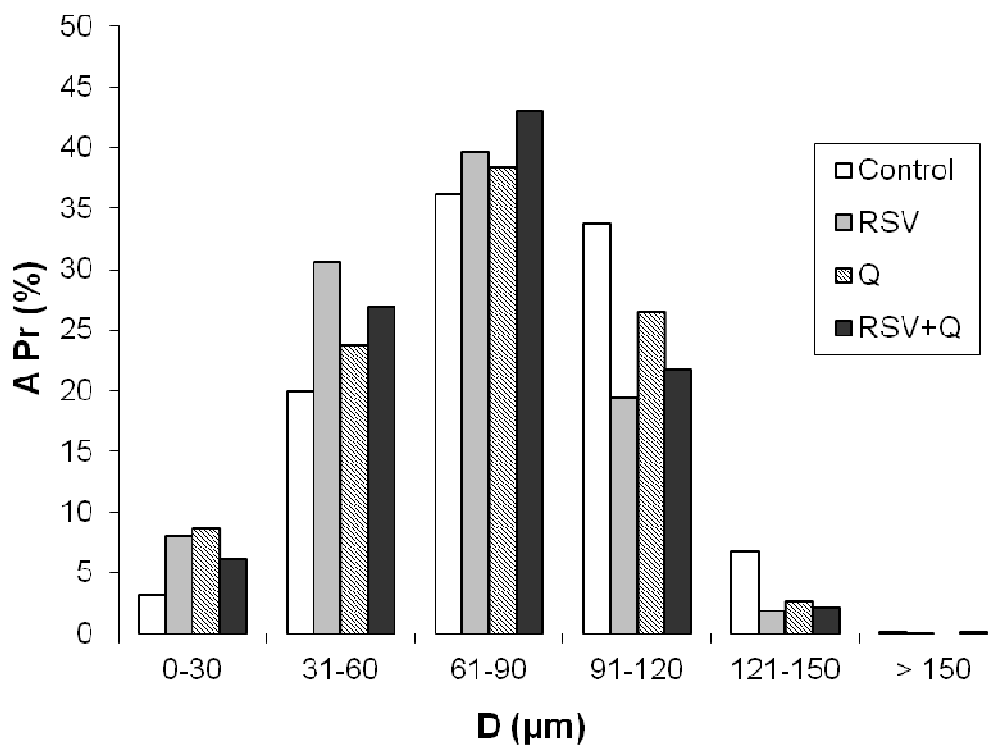


FIG. 4B

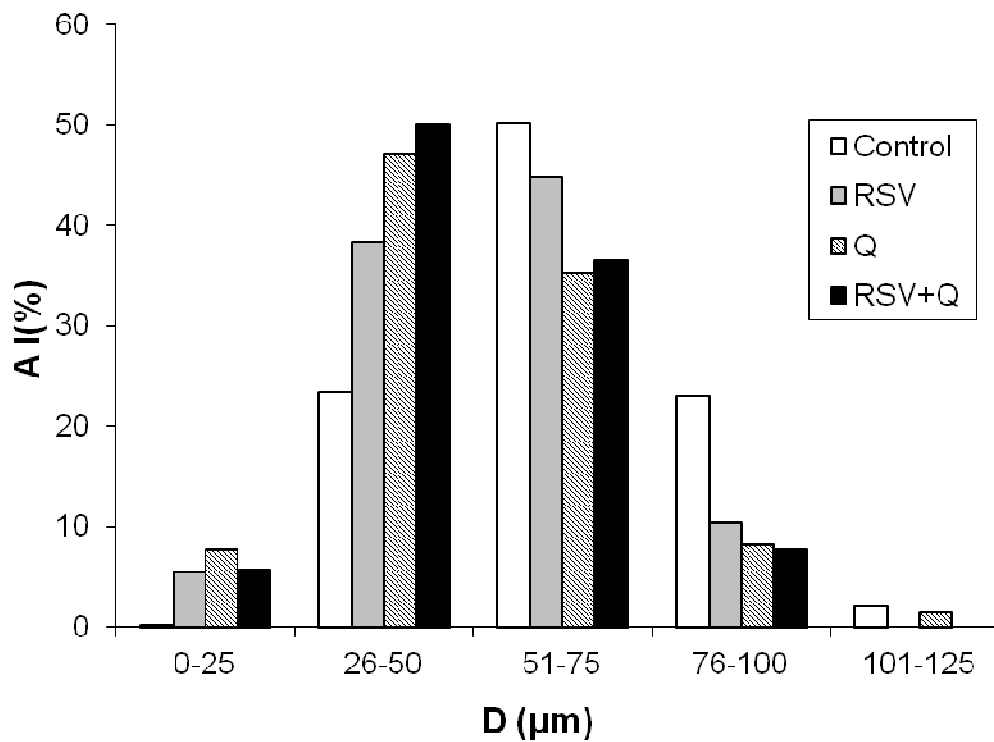


FIG. 5

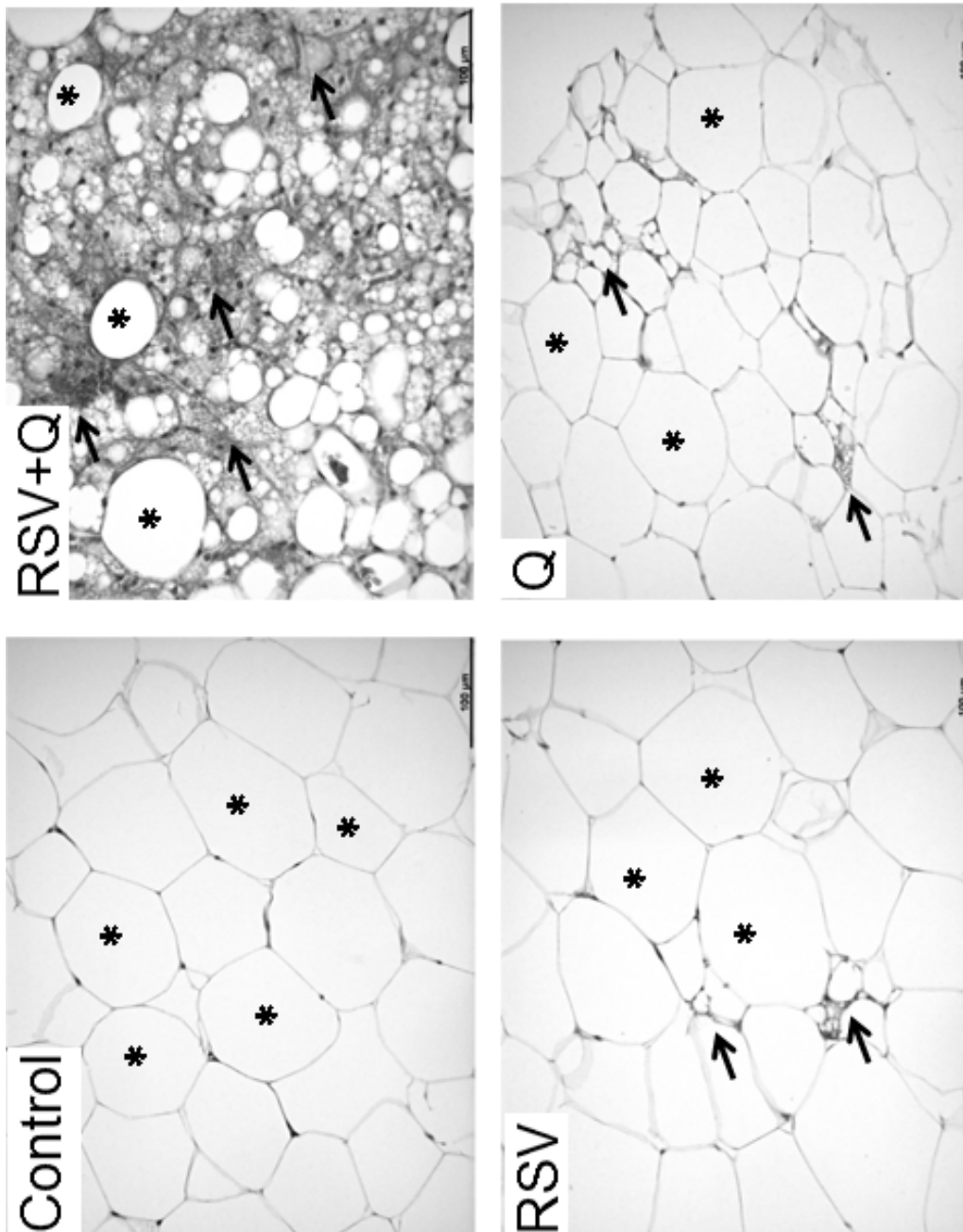




FIG. 6

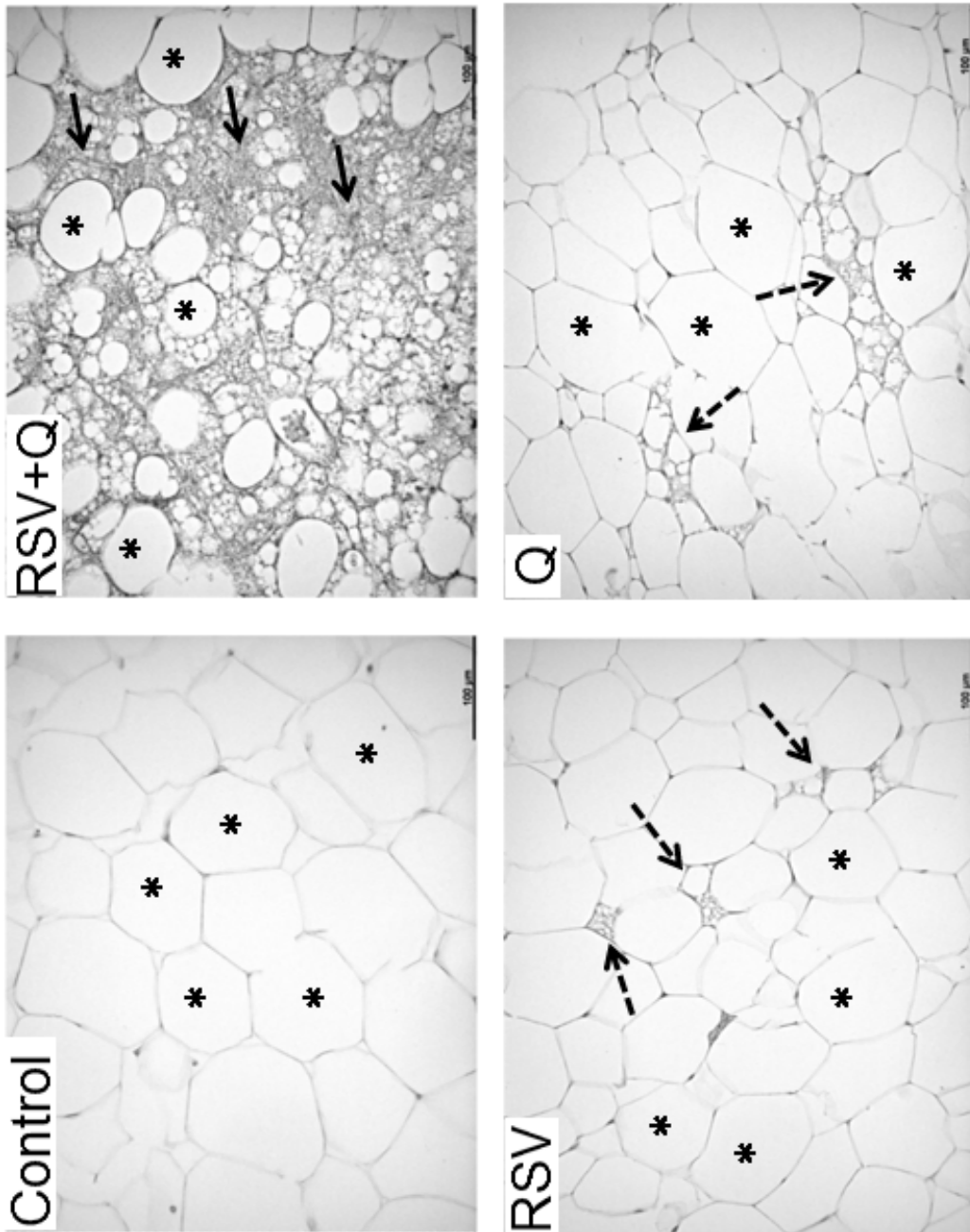


FIG. 7A

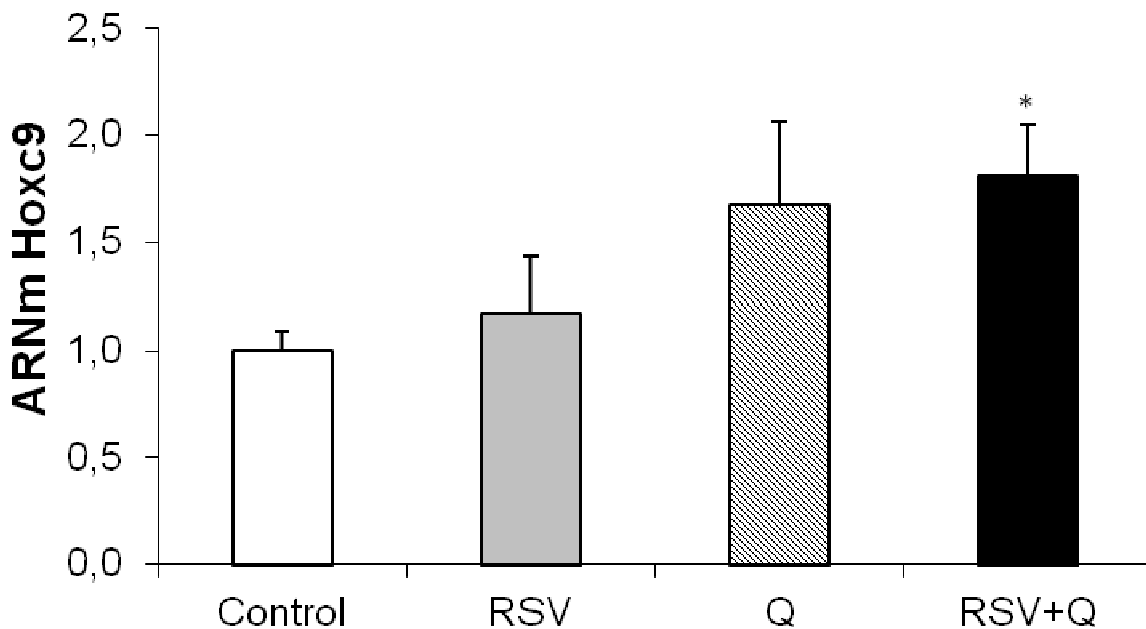
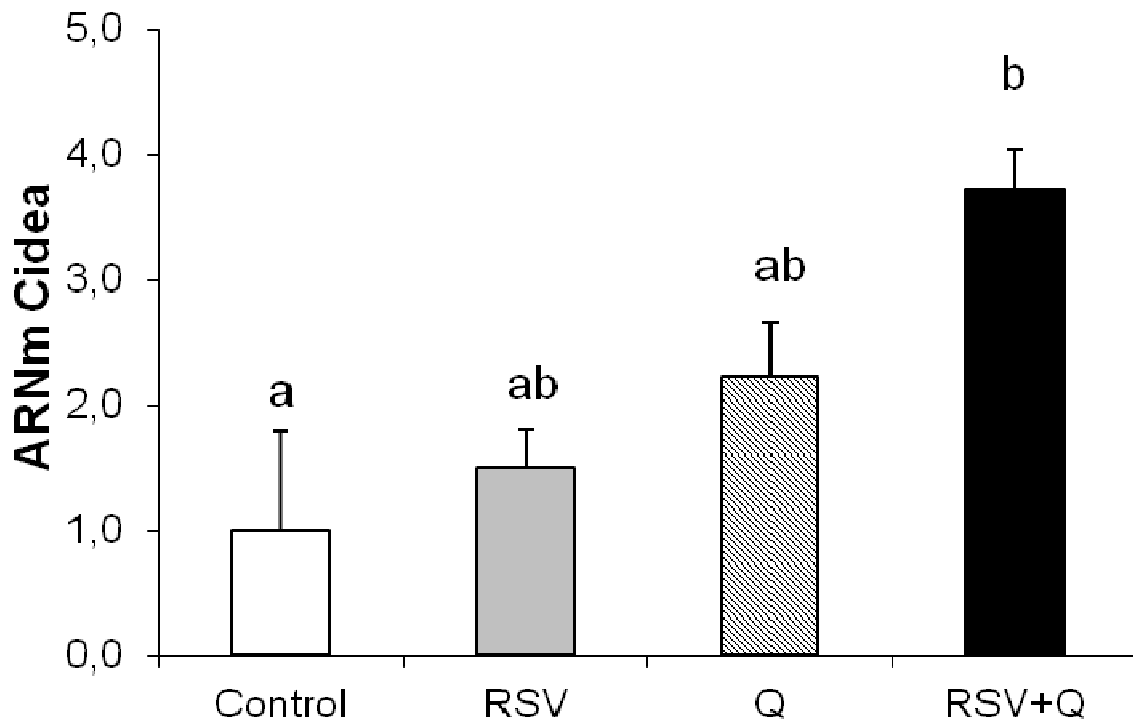


FIG. 7B



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

FIG. 8A

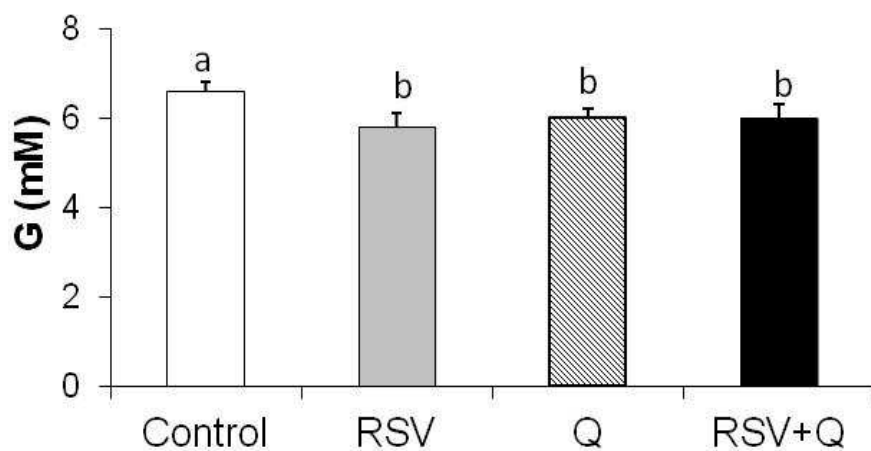


FIG. 8B

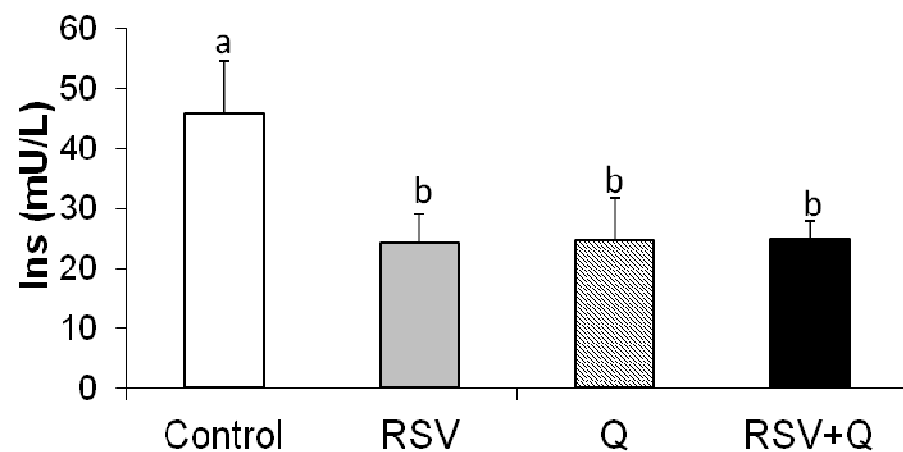
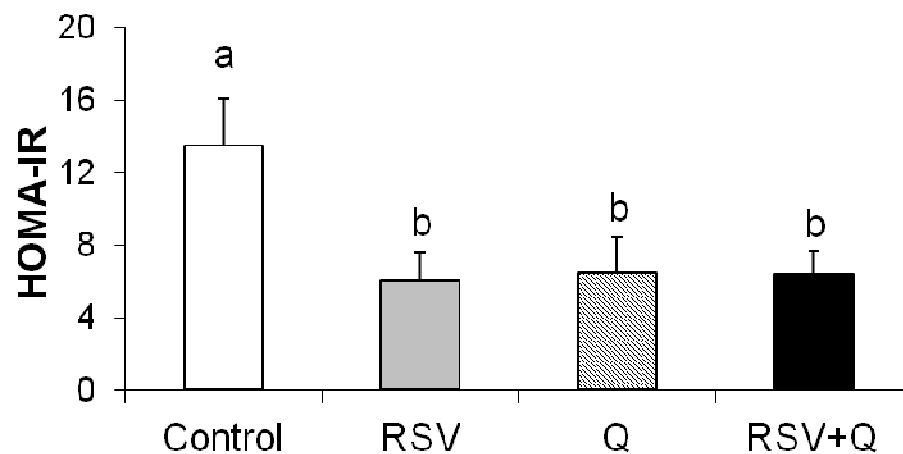


FIG. 8C



### RESUMEN

#### Título

La presente invención se refiere al uso combinado de estilbenoide seleccionado de resveratrol, pterostilbeno y piceatannol y al menos un flavonol seleccionado de quercetina, quercetina 4'-O-glucósido, quercetina 3,4' diglucósido, kaempferol, miricetina e isorhamnetina para la fabricación de una composición para el tratamiento y/o la prevención de sobrepeso/obesidad, desórdenes de temperatura corporal y/o patologías asociadas a ambas condiciones en mamíferos. Además la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas, complementos alimenticios y composiciones cosméticas que comprenden dicha composición.



**RECAPITULACIÓN/  
SUMMARY**





# RECAPITULACIÓN

---

## RECAPITULACIÓN

Como ya se ha mencionado en la introducción de la presente Tesis Doctoral, dada la creciente prevalencia de obesidad y de los problemas derivados de esta enfermedad a nivel mundial, la investigación científica está constantemente trabajando en la búsqueda de nuevas moléculas que resulten eficaces para evitar el exceso de acumulación de grasa corporal y/o para reducirla una vez acumulada.

Nuestro grupo de investigación, dirigido por la Dra. María del Puy Portillo, dispone de una amplia experiencia en el estudio de los efectos sobre el metabolismo lipídico de diversos componentes de la dieta, como proteínas de diversa procedencia y distintos tipos de grasas, en el campo de la investigación básica. El presente trabajo forma parte de una línea de investigación que comenzó en nuestro laboratorio en el año 2002, y que se ha centrado en el análisis de los efectos que producen determinadas moléculas bioactivas. Iniciamos nuestro trabajo en esta línea estudiando ácidos grasos conjugados, fundamentalmente ácido linoléico conjugado (CLA). En el año 2009 comenzamos nuestros estudios con polifenoles. En este campo, nuestros esfuerzos se han dedicado principalmente al resveratrol.

En los últimos quince años nuestros estudios han puesto de manifiesto los efectos anti-obesidad del CLA (especialmente su isómero *trans*-10,*cis*-12) y del resveratrol. También se han identificado algunos de los mecanismos de acción a través de los cuales las mencionadas moléculas producen sus efectos. Por todo ello, los estudios de nuestro grupo han contribuido al conocimiento de estas moléculas y al avance científico que éste conlleva.

En este contexto, el presente trabajo de investigación se centra en la búsqueda de combinaciones de moléculas cuya eficacia en la reducción de la grasa corporal sea mayor que la de las moléculas administradas de manera individual, debido a fenómenos de adición y/o sinergia.



## RECAPITULACIÓN

---

### A) ESTUDIO DEL EFECTO DE UNA COMBINACIÓN DE RESVERATROL Y ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO (CLA) SOBRE LA ACUMULACIÓN DE GRASA CORPORAL EN RATAS ALIMENTADAS CON UNA DIETA OBESOGÉNICA.

Dado que los resultados de nuestros estudios anteriores habían demostrado que tanto el CLA como el resveratrol eran capaces de reducir la grasa corporal, y que estas dos moléculas presentaban mecanismos de acción, que en ocasiones eran similares, y en ocasiones complementarios, nos planteamos su administración conjunta como primera combinación a estudiar. Para llevar a cabo este primer experimento, se seleccionó el modelo animal de rata Wistar, que fue alimentado con una dieta obesogénica rica en grasa saturada y sacarosa.

En cuanto a la selección de las dosis, éstas fueron principalmente establecidas de acuerdo con los resultados previamente obtenidos por nuestro grupo de investigación. En un estudio llevado a cabo en ratas alimentadas con una dieta obesogénica que recibieron 6, 30 y 60 mg/kg peso corporal /d de resveratrol, la dosis más baja no produjo ningún efecto. En cuanto a las dosis de 30 y 60 mg/kg peso corporal/d, ambas fueron eficaces, si bien la dosis de 60 mg/kg peso corporal/d no produjo ningún efecto adicional respecto al de la dosis de 30 mg/kg peso corporal/d (Macarulla *et al.*, 2009). Es decir, en este rango de dosis se produjo un efecto *plateau*. Por todo lo anteriormente expuesto, se optó por la dosis de 30 mg/kg peso corporal /día de resveratrol.

Para seleccionar la dosis de CLA se tuvo en cuenta, por un lado que 0,5 g del isómero activo del CLA (*trans*-10,*cis*-12) por cada 100 g de dieta (dosis de 0,5%) es la dosis más utilizada en la bibliografía para la reducción de la grasa corporal, y por otro lado que estudios previos en nuestro laboratorio habían demostrado su eficacia (Zabala *et al.*, 2006). A su vez, y de una forma similar a la observada con el resveratrol, en el estudio de Zabala y col. (Zabala *et al.*, 2006) demostramos que si bien una dosis de 0,5% de *trans*-10,*cis*-12 del CLA era suficiente para observar el efecto reductor de la grasa corporal, una dosis de 1% no presentaba ninguna ventaja adicional. Dado que para este estudio la fuente de CLA fue un preparado comercial (Clarinol®), que contiene una mezcla equimolecular de los isómeros *trans*-10,*cis*-12 y *cis*-9,*trans*-11 de CLA, se añadió a la dieta 1 g de Clarinol® por cada 100 g de dieta, con el fin de asegurar que el isómero *trans*-10,*cis*-12 se encontrase al 0,5%. Atendiendo al peso corporal medio de los animales utilizados y su ingesta media diaria, esta cantidad se corresponde aproximadamente con 530 mg/kg peso corporal/día del isómero *trans*-10,*cis*-12 CLA.

Al finalizar el experimento, de 6 semanas de duración, se observó una reducción significativa del peso corporal de los animales que fueron alimentados con una dieta obesogénica suplementada con resveratrol, lo que se justificó por la disminución del sumatorio de pesos de tejidos adiposos epididimal, perirrenal, mesentérico y subcutáneo (-20%). De todos los tejidos analizados, el epididimal y el perirrenal fueron los más sensibles a este efecto. Estos cambios no se debieron a una menor ingesta. Cabe señalar que estos resultados coinciden con los obtenidos en experimentos anteriores llevados a cabo por nuestro grupo bajo condiciones experimentales similares (Macarulla *et al.*, 2009) y con estudios de otros autores llevados a cabo en otras cepas de rata (Zucker obesa) y ratones (Lagouge *et al.*, 2006; Rivera *et al.*, 2009).

A su vez, el CLA también produjo una reducción de magnitud parecida (-18%) en el sumatorio de tejidos adiposos, pero en este caso sin cambios en el peso corporal. El tejido adiposo con

## RECAPITULACIÓN

---

mayor reducción fue el epididimal. Es bien sabido que el isómero *cis*-9, *trans*-11, presente en la mezcla de CLA, produce un efecto anabolizante que, en este caso, podría contrarrestar la reducción de peso asociada a la reducción de los tejidos adiposos. Se explicaría así, por tanto, la ausencia de efecto observada en el peso corporal final de estos animales (Bhattacharya *et al.*, 2006). Estos resultados, también estuvieron en concordancia con los observados en estudios previos de nuestro grupo y con la mayor parte de los resultados mostrados en la bibliografía en trabajos realizados con roedores (Navarro *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2008; Miranda *et al.*, 2009b).

Como ya se ha mencionado anteriormente, dado que algunos mecanismos de acción del resveratrol y del CLA son similares (aumento de la oxidación de AG en músculo e hígado, disminución de la captación de TG y de la lipogénesis en tejido adiposo, e inducción de la apoptosis de adipocitos), y otros son complementarios (mecanismos de reducción de la síntesis de TG e incremento de la biogénesis mitocondrial en músculo mediados por el CLA y el resveratrol respectivamente), cabría esperar un efecto de adición o de potenciación al administrar conjuntamente estas dos moléculas. Sorprendentemente, los animales tratados con la combinación RSV+CLA mostraron una disminución de los depósitos de grasa (-7%) menor que la observada en los animales tratados con cada compuesto administrado individualmente, y esta reducción no alcanzó significación estadística.

La administración conjunta de RSV+CLA atenuó el efecto ejercido por cada molécula administrada de forma individual en la reducción de la acumulación de grasa corporal. Por tanto, la combinación de resveratrol y CLA parece no ser útil en la prevención de la obesidad.

Con el objetivo de analizar la causa de la ausencia de efecto observada en la reducción de la grasa corporal en los animales tratados con la combinación de las dos moléculas (RSV+CLA), se valoraron los efectos de la suplementación de la dieta con las moléculas objeto de estudio administradas de forma individual o conjunta sobre algunas rutas metabólicas relevantes en el metabolismo lipídico. Se comenzó con el análisis de la actividad de dos enzimas clave: la FAS, enzima limitante en el proceso de síntesis de ácidos grasos o lipogénesis *de novo*, y la LPL, enzima involucrada en la captación de ácidos grasos a partir de triglicéridos circulantes.

Nuestros resultados mostraron que el resveratrol disminuyó ambas actividades, lo que sugiere que este polifenol actúa sobre las dos rutas metabólicas anteriormente mencionadas. Los cambios observados en estas enzimas justificaron, al menos en parte, la reducción de la masa de tejido adiposo inducida por resveratrol. Estos efectos ya se habían puesto de manifiesto en estudios previos de nuestro grupo llevados a cabo en ratas Sprague-Dawley (Alberdi *et al.*, 2011).

En lo que respecta al CLA, éste no modificó la actividad FAS. A día de hoy no existe consenso acerca de los efectos de esta molécula sobre la lipogénesis *de novo* (Park *et al.*, 1997; Park *et al.*, 1999; Azain *et al.*, 2000; Faulconnier *et al.*, 2004; Miranda *et al.*, 2009a). Por otra parte, los animales tratados con CLA mostraron una reducción de la actividad LPL que, si bien no alcanzó significación estadística, representó un 28%. Aunque son escasos los datos en la bibliografía

## RECAPITULACIÓN

---

relativos a los efectos del CLA sobre este enzima, Xu y col. observaron un efecto similar al nuestro (Xu *et al.*, 2003).

Cuando se analizaron los efectos de la combinación RSV+CLA sobre la actividad de estos dos enzimas, no se observó cambio alguno en ninguno de ellos. Pese a que estos resultados fueron en paralelo con la no modificación en el tamaño del tejido adiposo mediada por esta combinación, resulta llamativo el hecho de que dos moléculas que parecen actuar a través de un mismo mecanismo, no produzcan ningún efecto cuando son administradas conjuntamente a dosis que han demostrado eficacia.

Con el fin de seguir indagando en los posibles mecanismos involucrados en los efectos observados, se analizó la influencia de los distintos tratamientos en el proceso lipolítico. Para ello se determinó la expresión génica de las dos lipasas principales: ATGL y HSL (Miyoshi *et al.*, 2008; Watt *et al.*, 2008). Pese a que no hubo diferencias significativas en la ATGL, tanto el resveratrol como el CLA produjeron un incremento en la expresión de la HSL, lo que sugiere una activación de la lipólisis, que podría estar involucrada en la reducción de la grasa corporal inducida por estas dos moléculas. El resultado obtenido tras la administración de resveratrol fue en paralelo con nuestros estudios anteriores, los cuales también mostraron un incremento de la expresión de HSL en ratas tratadas con este polifenol (Alberdi *et al.*, 2011; Gómez-Zorita *et al.*, 2013). En cuanto al CLA, la mayoría de los trabajos publicados indican que esta molécula potencia la lipólisis *in vitro*, lo que está en concordancia con nuestros resultados.

Con respecto al grupo RSV+CLA, nuevamente no se observaron cambios en ninguna de las lipasas. Esta ausencia de efecto sobre las lipasas, junto con la falta de efecto sobre las actividades FAS y LPL en el grupo tratado con la combinación RSV+CLA, contribuyó a explicar la ausencia de efecto sobre la disminución de grasa corporal mostrada por esta combinación.

A la vista de estos resultados, se hacía necesario seguir investigando para establecer los motivos por los cuales en aquellos animales que recibieron una combinación de RSV+CLA, los efectos ejercidos en las actividades enzimáticas por cada una de estas moléculas administradas de forma individual, desaparecían. Cabría pensar en cambios en la absorción y/o metabolización de estas dos moléculas debido a su administración conjunta. Puesto que no se disponía de muestras de heces para cuantificar las cantidades excretadas, se analizaron las cantidades de ambas moléculas presentes en muestras de tejido adiposo.

Con respecto a los isómeros de CLA, se observó una reducción del 37% del isómero *cis-9, trans-11* y del 42% en el isómero *trans-10, cis-12* en el grupo tratado con RSV+CLA en comparación con el tratado sólo con CLA. Por lo tanto, la cantidad de CLA que alcanzó el tejido adiposo fue inferior cuando éste se administró en combinación con resveratrol. Ésto nos ayuda a entender en cierto modo por qué los efectos producidos por el CLA cuando es administrado de forma individual (como el incremento de la HSL), desaparecen tras la administración conjunta.

Esta reducción en la cantidad de CLA presente en el grupo RSV+CLA podría explicarse por una disminución en la absorción intestinal de CLA. También se podría plantear un posible incremento en la oxidación del CLA, ya que se ha demostrado que el resveratrol aumenta la actividad hepática de la CPT-1a, enzima que actúa como lanzadera de AG al interior de la

## RECAPITULACIÓN

---

mitocondria para su oxidación. De hecho, este efecto también fue observado en el presente estudio (Arias *et al.*, 2011).

Algunos autores han demostrado que tras la administración de resveratrol, éste está presente sólo en cantidades muy pequeñas en plasma y tejidos, o incluso ausente, debido a su rápida metabolización (Maier-Salamon *et al.*, 2008; Walle, 2011; Andres-Lacueva *et al.*, 2012). En el presente estudio, en línea con lo anteriormente mencionado, no se detectó resveratrol en el tejido adiposo de los animales de los grupos resveratrol y RSV+CLA. Sin embargo, sí se encontraron cantidades cuantificables de sus metabolitos sulfatados y glucuronados. La cantidad total de estos metabolitos fue similar en ambos grupos, lo que sugiere que el resveratrol llegó a ellos en la misma cantidad. Cabría esperar, por tanto, que al menos los efectos producidos por esta molécula se mantuvieran en el grupo RSV+CLA.

En un estudio llevado a cabo en adipocitos primarios humanos por Kennedy y col. (Kennedy *et al.*, 2009) cuyo objetivo fue determinar el grado en que el resveratrol revertía algunos de los efectos secundarios asociados a la administración del isómero *trans*-10,*cis*-12 del CLA (inflamación, resistencia a la insulina, estrés celular), los autores propusieron, entre otros mecanismos, que el resveratrol bloqueaba los cambios producidos por el isómero *trans*-10,*cis*-12 del CLA en la concentración de  $Ca^{+2}$  intracelular (Kennedy *et al.*, 2009).

Teniendo ésto en cuenta, se midió la concentración intracelular de  $Ca^{+2}$  en el tejido adiposo de todos los grupos experimentales y se observó que el CLA no indujo ningún cambio en la concentración de  $Ca^{+2}$  intracelular, como habían propuesto Kennedy y col. en su estudio *in vitro*. Por el contrario, se observó un aumento significativo en este parámetro en el grupo tratado con la combinación de RSV+CLA. Dado que un aumento de  $Ca^{+2}$  intracelular en adipocitos conduce a un aumento de la lipogénesis (Kim *et al.*, 1996; Zemel, 2005; Boon *et al.*, 2007), se podría argumentar que la disminución de la actividad FAS inducida por el resveratrol en el grupo RSV+CLA podría haber sido contrarrestada por la estimulación de la lipogénesis asociada al incremento de  $Ca^{+2}$  intracelular en el grupo. Por lo tanto, finalmente, ésto hizo que no se diera ningún cambio en la actividad FAS en este grupo experimental.

Se ha descrito también que un incremento de  $Ca^{+2}$  intracelular regula la activación de la LPL, convirtiendo los monómeros inactivos de ésta en dímeros activos (Zhang *et al.*, 2005). Por tanto, siguiendo el mismo razonamiento que para la FAS, cabe pensar en la posibilidad de una compensación entre la inactivación de la LPL inducida por el resveratrol con la activación mediada por un incremento de  $Ca^{+2}$  intracelular, obteniendo como resultado final la ausencia de efecto en la actividad LPL en el grupo RSV+CLA.

SIRT1 es una desacetilasa perteneciente a la familia de las sirtrinas que juega un papel importante en el metabolismo lipídico. Se ha constatado que la activación de SIRT1 disminuye la expresión génica de FAS y su actividad enzimática, inhibiendo así la lipogénesis (Ponugoti *et al.*, 2010). A su vez, se ha propuesto que un mecanismo importante a través del cual el resveratrol ejerce sus múltiples efectos beneficiosos, es la activación de esta desacetilasa (Howitz *et al.*, 2003; Picard *et al.*, 2004; Lagouge *et al.*, 2006).

A pesar de que en nuestro estudio no se observaron cambios en la expresión génica de SIRT1 en el grupo resveratrol, es asumible que su activación (no determinada en este estudio) fuera

## RECAPITULACIÓN

---

probablemente uno de los mecanismos responsables de la reducción de la actividad de FAS observada en este grupo. Por el contrario, tanto el grupo CLA como el grupo RSV+CLA redujeron la expresión de este gen, lo que probablemente se traduce en una menor cantidad de SIRT1 en el tejido adiposo. Teniendo en cuenta estos resultados podemos pensar que, aunque haya una mayor actividad de SIRT1 (efecto del resveratrol), si su cantidad está disminuida (efecto inducido por CLA), finalmente no haya un efecto neto sobre FAS vía SIRT1.

Los efectos observados en el metabolismo de TG cuando resveratrol y CLA son administrados de forma individual, es decir, la reducción de la lipogénesis mediada por el resveratrol y la disminución de la captación de ácidos grasos así como el incremento de la lipólisis ejercidos tanto por resveratrol como por el CLA, desaparecen cuando éstas moléculas son administradas en combinación. Por tanto, la combinación de resveratrol y CLA parece no ser útil para modificar los procesos metabólicos que conllevan al desarrollo de la obesidad.

En el presente estudio también se analizaron los efectos de las moléculas seleccionadas en las concentraciones plasmáticas de colesterol total, colesterol HDL y colesterol no-HDL, los cuales no se vieron modificados en ninguno de los grupos experimentales. Los TG plasmáticos sólo se vieron reducidos en los animales tratados con resveratrol.

En cuanto al metabolismo de la glucosa, durante la última década, son numerosos los estudios que atribuyen al CLA una inducción de resistencia a la insulina en modelos animales de ratón. Por el contrario, el resveratrol ha sido asociado a una mejora de la acción de la insulina. Sin embargo, ha sido ampliamente constatado que el ratón resulta una especie muy reactiva a los efectos del CLA, mientras que la rata parece más resistente. De acuerdo con esta argumentación, y a la vista de los valores del índice HOMA (indicativo de resistencia a la insulina) observados en el presente estudio, se puede afirmar que el CLA en este experimento no incrementó la resistencia a la insulina inducida por la dieta obesogénica, si bien tampoco mejoró este índice. Por el contrario, los animales que recibieron el suplemento de resveratrol sí mostraron una mejoría en la función insulínica en comparación con el grupo control, hecho que fue reflejado en la reducción de niveles basales de glucosa, insulina y, por tanto, del índice HOMA, así como niveles de fructosamina (indicador del valor medio de glucemia durante las últimas 2-3 semanas). En líneas generales estos efectos se mantuvieron en el grupo RSV+CLA.

El efecto beneficioso del resveratrol en el control glucémico prevalece cuando éste es administrado conjuntamente con CLA.

## RECAPITULACIÓN

---

### **B) ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA QUERCETINA SOBRE LA ACUMULACIÓN DE GRASA CORPORAL Y EL CONTROL GLUCÉMICO EN RATAS ALIMENTADAS CON UNA DIETA OBESOGÉNICA.**

Los trabajos realizados por De Santi y col. (De Santi *et al.*, 2000a; De Santi *et al.*, 2000b), en los cuales se observó un incremento de la biodisponibilidad del resveratrol cuando éste fue administrado con quercetina, efecto producido por una acción protectora de la quercetina en el metabolismo del resveratrol, nos sirvieron de punto de partida para plantear nuestra siguiente combinación: resveratrol y quercetina.

Al contrario que con el resveratrol y con el CLA, los cuales habían sido ampliamente estudiados en nuestro laboratorio, poco o nada se había realizado hasta el momento con quercetina. Este polifenol ha sido ampliamente estudiado en investigación por su elevada presencia en la dieta humana, y ha demostrado ser una molécula eficaz para la mejora de la resistencia a la insulina y, por tanto, posible preventivo de la diabetes mellitus tipo 2. Sin embargo, cabe señalar que en lo que respecta a la obesidad, son todavía escasos los estudios llevados a cabo hasta la fecha.

Por este motivo, y antes de dar comienzo al estudio de la segunda combinación (RSV+Q), se decidió realizar un experimento aislado con quercetina, con el objetivo de conocer tanto la viabilidad de su administración, como la respuesta que nuestro modelo animal podía presentar ante el tratamiento con este polifenol bajo nuestras condiciones experimentales.

Basándonos en el hecho de que nuestros estudios previos habían demostrado la eficacia del resveratrol tras su administración a una dosis de 30 mg/kg peso corporal/d, y con el objetivo, entre otros, de poder establecer una comparativa de efectos producidos por la suplementación con distintos polifenoles, nos decantamos por la utilización de esta misma dosis para la quercetina.

Tras el tratamiento de 6 semanas llevado a cabo en ratas alimentadas con una obesogénica suplementada o no con 30 mg/kg peso corporal/d de quercetina se observó una reducción en la suma de los cuatro depósitos adiposos diseccionados (epididimal + perirrenal + mesentérico + subcutáneo) de un 9,1%, pero que no alcanzó significación estadística.

Con posterioridad a la realización de nuestro estudio, los resultados de otros trabajos *in vivo* llevados a cabo tanto en ratón (Kobori *et al.*, 2011; Jung *et al.*, 2013), como en rata (Wein *et al.*, 2010; Panchal *et al.*, 2012), demostraron que periodos largos de tratamiento con quercetina, superiores a 8 semanas, reducían la adiposidad mientras que periodos más cortos no producían cambios. Por tanto la ausencia de cambios en nuestro caso podría atribuirse a una duración del tratamiento no suficientemente larga.

Por otro lado, si comparamos los efectos producidos por distintos polifenoles, cabe señalar que en nuestro estudio anterior (Arias *et al.*, 2011), y en otros llevados a cabo en nuestro laboratorio (Alberdi *et al.*, 2011) bajo las mismas condiciones experimentales (misma dosis, modelo animal, dieta y duración del tratamiento), el resveratrol mostró una eficacia en la reducción de grasa en los distintos depósitos adiposos mientras que la quercetina no.

## RECAPITULACIÓN

---

Podemos concluir, por tanto, que el efecto reductor de la grasa corporal de estos dos polifenoles es claramente diferente.

Con el objetivo de analizar los efectos de la quercetina en el metabolismo de TG, se midió la actividad de los siguientes enzimas lipogénicos: glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PDH) y enzima málica (ME), que aportan el poder reductor necesario para que este proceso se lleve a cabo, acetil coenzimaA carboxilasa (ACC) y ácido graso sintasa (FAS), enzimas limitantes de la síntesis *de novo* de AG, y lipoproteína lipasa (LPL), involucrada en el proceso de captación de AG de TG circulantes. No se observaron cambios en estas actividades, lo que indicó que ninguno de estos dos procesos metabólicos se vió afectado por este polifenol.

Bajo nuestras condiciones experimentales la quercetina no resulta útil como molécula antiobesidad.

Es bien sabido que una dieta hipergrasa y rica en sacarosa no sólo conlleva un aumento de la acumulación de grasa corporal, sino que también induce resistencia a la insulina (Hegarty *et al.*, 2003). El análisis del control glucémico de los animales del presente estudio reveló una mejoría en aquéllos que recibieron quercetina. Ésto se reflejó en una disminución del índice HOMA-IR, parámetro de estimación de resistencia a la insulina (Cacho *et al.*, 2008), una mejora de los niveles de glucemia medidos mediante el test de tolerancia a la glucosa, y una disminución de niveles séricos de fructosamina. Al no observarse cambios en la reducción de los depósitos grasos, la mejora de los parámetros mencionados fue resultado de un efecto directo de la quercetina sobre el control glucémico, es decir, independiente de la acumulación de grasa. Estos resultados coinciden con los publicados por otros autores cuyas investigaciones han sido llevadas a cabo en modelos animales con resistencia a la insulina inducida por la dieta o con diabetes mellitus de tipo 2 (Rivera *et al.*, 2008; Wein *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2011; Jeong *et al.*, 2012).

Los diversos autores que han constatado un efecto beneficioso en el control glucémico mediado por la quercetina han propuesto varios mecanismos que explican cómo y por qué se produce este efecto: a) la capacidad antioxidante sobre los islotes pancreáticos (Coskun *et al.*, 2005; Babujanarthanam *et al.*, 2010; Jeong *et al.*, 2012), b) el incremento de concentraciones de adiponectina circulante (Wein *et al.*, 2010), c) la inhibición de la actividad glucosidasa del intestino delgado (Kim *et al.*, 2011), d) la reducción en la absorción intestinal de glucosa mediada por el receptor GLUT2 (Kwon *et al.*, 2007), e) el incremento de la actividad glucokinasa (Vessal *et al.*, 2003), y f) el incremento en los transportadores GLUT4 en el músculo esquelético (Jung *et al.*, 2011; Anhê *et al.*, 2012; Shen *et al.*, 2012).

En el año 2012, Shen y col. (Shen *et al.*, 2012) propusieron un nuevo mecanismo que explicaba la mejora de la resistencia a la insulina mediada por pentametilquercetina en un experimento llevado a cabo en miotubos C2C12. Estos autores justifican que este efecto beneficioso tiene lugar gracias a un incremento en la expresión de genes involucrados en la oxidación de ácidos grasos como son el PPAR- $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$ , CPT-1b y ACO.

El tejido muscular esquelético, tejido periférico en el que se produce la mayor captación de glucosa en respuesta a una señal de insulina, es uno de los principales tejidos afectados por la

## RECAPITULACIÓN

---

resistencia a la insulina. En determinados casos de sobrealimentación que conducen al desarrollo de obesidad, el flujo de ácidos grasos hacia el músculo se ve incrementado, lo que hace que la concentración de TG intramiocelulares sea mayor y éste degenere en una resistencia a la insulina por una alteración de los factores de señalización de la insulina (Eckardt *et al.*, 2011).

Este mecanismo no había sido previamente demostrado en experimentos *in vivo*. Por ello, en nuestro estudio, se quiso analizar en qué medida el efecto positivo ejercido por la quercetina sobre el control glucémico, a través de una disminución de la resistencia a la insulina, se podía relacionar con un incremento de la oxidación de ácidos grasos a nivel muscular (delipidación muscular). La quercetina no modificó la expresión de genes relacionados con la oxidación de ácidos grasos a nivel muscular, como son el factor de transcripción PPAR- $\alpha$  y tampoco su co-activador PGC-1 $\alpha$ , ni sobre los dos enzimas clave en la oxidación reguladas por PPAR- $\alpha$ , CPT-1b y ACO. Con respecto a la expresión de genes considerados como marcadores de mitocondriogénesis, TFAM y COX-2, el resultado fue similar, no observándose cambios en ninguno de ellos. Finalmente, también se midió la expresión de UCP3, proteína desacoplante relacionada con la oxidación muscular de ácidos grasos (Senese *et al.*, 2011), y de CD36, transportador de ácidos grasos, los cuáles tampoco mostraron ningún cambio tras el tratamiento con quercetina.

Adicionalmente, y en la misma línea de los resultados presentados hasta el momento, tampoco se modificó ni la actividad enzimática de la CPT-1b ni de la CS, marcador de densidad mitocondrial (Pajuelo *et al.*, 2011), y tampoco se produjo una delipidación muscular. Estos resultados demuestran que los cambios en los genes relacionados con la oxidación de ácidos grasos observados en miotubos C2C12 no se produce en un modelo animal con resistencia a la insulina, al menos bajo nuestras condiciones experimentales.

La quercetina es más eficaz como molécula anti-diabética que anti-obesidad. Su capacidad para mejorar la resistencia a la insulina es independiente de la acumulación de grasa corporal y no está mediada por una disminución de la grasa a nivel muscular



## RECAPITULACIÓN

---

### C) ESTUDIO DEL EFECTO DE UNA COMBINACIÓN DE RESVERATROL Y QUERCETINA SOBRE LA ACUMULACIÓN DE GRASA CORPORAL EN RATAS ALIMENTADAS CON UNA DIETA OBESOGÉNICA.

Nuestros trabajos con resveratrol nos permitieron tomar conciencia tanto por la bibliografía consultada como por nuestros propios resultados, de que la biodisponibilidad del resveratrol es muy baja. Para intentar incrementar ésta, una de las posibilidades es reducir su metabolismo por sulfatación y/o glucuronización. En este sentido, algunos autores habían señalado que la quercetina podía proteger al resveratrol de la metabolización hepática e intestinal (De Santi *et al.*, 2000a). Por otro lado, estudios *in vitro* (Yang *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2008) habían puesto de manifiesto un efecto sinérgico entre el resveratrol y la quercetina en lo que respecta a la reducción de triglicéridos acumulados, efectos mediados por una inhibición de la adipogénesis y estimulación de la apoptosis de estas células. Es importante señalar que en estos estudios *in vitro* la sinergia se produjo, como es obvio, al margen de posibles efectos sobre el metabolismo.

Ante esta situación, y dado que hasta el momento no se había estudiado, nos pareció de interés analizar los posibles efectos anti-obesidad de una combinación de resveratrol y quercetina, y compararlos con los producidos por la administración individual de ambos compuestos.

En cuanto a la selección de las dosis (15 y 30 mg/kg peso corporal/d de resveratrol y quercetina respectivamente), éstas fueron establecidas, como ya se ha mencionado, de acuerdo a los resultados obtenidos en experimentos anteriores de nuestro grupo. Éstos demostraron la ineficacia del resveratrol sobre la acumulación de grasa corporal a dosis de 6 mg/kg peso corporal/d, la eficacia a una dosis de 30 mg/kg peso corporal/d y un efecto *plateau* a dosis de 60 mg/kg peso corporal/d (Macarulla *et al.*, 2009). Para llevar a cabo el presente experimento nos decantamos por una dosis intermedia en el rango de 6 y 30 mg/kg peso corporal/d (15 mg/kg peso corporal/d) para evitar estar cerca del efecto *plateau*, ya que si éste se diera, enmascararía un incremento en el efecto derivado de la combinación con quercetina. En el caso de la quercetina, en el estudio anterior, que forma parte de la presente tesis, observamos que una dosis de 30 mg/kg peso corporal/d durante un tratamiento de 6 semanas redujo el peso de la suma de tejidos adiposos en un 9,1%, si bien esta reducción no fue estadísticamente significativa. En este caso, mantuvimos esta misma dosis con el objetivo de averiguar si una dosis que no llega a ser eficaz, puede serlo a través de la combinación con otra biomolécula (Arias *et al.*, 2014).

Es importante enfatizar que las dosis de resveratrol y quercetina utilizadas en el presente estudio, que resultan similares a otras utilizadas en trabajos con roedores, fueron equivalentes a 170 mg /kg peso corporal/d de resveratrol y 340 mg /kg peso corporal/d de quercetina en humanos adultos de 70 kg de peso corporal (Reagan-Shaw *et al.*, 2008). Estas dosis se encuentran dentro del rango de dosis que están siendo probadas en este momento en estudios de intervención en humanos y también entre las utilizadas en ensayos clínicos ya finalizados (Timmers *et al.*, 2012; de Ligt *et al.*, 2014).

## RECAPITULACIÓN

---

Tras el tratamiento con los polifenoles señalados durante 6 semanas, los grupos tratados con resveratrol y quercetina no mostraron ninguna reducción significativa en el peso de los depósitos adiposos en comparación con el grupo control. Por el contrario, las ratas que recibieron la combinación de ambos polifenoles mostraron una reducción significativa de todos los depósitos grasos estudiados (epididimal, perirrenal, mesentérico y subcutáneo). De forma teórica, se calculó la suma del porcentaje de reducción de grasa producido por cada molécula administrada por separado y se encontró que este valor calculado fue inferior al valor real de reducción de grasa observado en el grupo tratado con RSV+Q.

Dosis de resveratrol y quercetina que resultan ineficaces cuando estos dos compuestos son administrados de forma individual, producen una reducción sinérgica de la grasa corporal al ser administrados en combinación, siendo así una posible herramienta para la prevención o el tratamiento de la obesidad.

Con el objetivo de analizar los mecanismos que conducían a este efecto sinérgico, se estudiaron los principales procesos involucrados en el metabolismo de TG en el tejido adiposo. En cuanto al proceso de lipogénesis, se analizaron las actividades de dos enzimas limitantes de este proceso, la FAS y la ACC, así como la captación de AG a partir de TG circulantes a través de la medición de la actividad de la LPL.

La actividad de la FAS no sufrió cambios bajo ninguno de los tratamientos. El análisis de la expresión proteica de la ACC y su forma inactiva o fosforilada (ACC-p) reveló un aumento del ratio ACC-p/ACC total en el grupo RSV+Q. Dado que esta enzima es el encargado de producir malonil-CoA (a partir de una molécula de acetil-CoA) que servirá de sustrato para la FAS, la cual sintetiza finalmente el ácido graso, resulta el enzima limitante de este proceso de lipogénesis *de novo* (Lane *et al.*, 1974). En cuanto a la captación de AG a partir de TG circulantes gracias a la acción de la LPL, se observó una inhibición de la actividad de este enzima tanto en el grupo tratado con resveratrol como en el grupo tratado con la combinación RSV+Q, pero no en el grupo quercetina, sin producirse en este caso un efecto sinérgico o de potenciación.

Otra ruta metabólica importante para la regulación de la acumulación de grasa en el tejido adiposo es la lipólisis. Para analizar este proceso metabólico se midió la expresión proteica de las dos principales lipasas, ATGL y HSL. En el caso de la HSL, se requiere una activación de ésta que promueva su migración desde el citoplasma a la gotícula de grasa donde ejerce su acción. Dicha activación se realiza a través de la fosforilación de regiones diana para la PKA, en concreto residuos de serina entre los que destacan el residuo 660. Por ello, también se midió la expresión proteica fosforilada de HSL en el residuo Ser<sup>660</sup>.

La expresión proteica de la ATGL se vio incrementada sólo en el grupo tratado con la combinación de ambos polifenoles. Por el contrario, el ratio correspondiente a la fracción fosforilada de HSL Ser<sup>660</sup> y HSL total, no se vio modificado por ninguno de los tratamientos. Teniendo en cuenta que la hidrólisis de diglicéridos por HSL se produce a una velocidad entre 10 y 30 veces mayor que la hidrólisis de los TG por la ATGL (punto de partida de la ruta lipolítica), podemos considerar la actividad de esta última como limitante de la velocidad del

## RECAPITULACIÓN

---

proceso lipolítico (Zimmermann *et al.*, 2004; Miyoshi *et al.*, 2008). Además existen trabajos que demuestran como una sobreexpresión de ATGL aumenta la lipólisis (Watt *et al.*, 2008).

El efecto reductor de la grasa corporal observado en el grupo RSV+Q está mediado por una inhibición de la lipogénesis y de la captación de ácidos grasos, y por un incremento de la lipólisis en el tejido adiposo blanco de ratas alimentadas con una dieta obesogénica. A su vez, podemos concluir que el número de mecanismos que se ven modificados es mayor en el grupo que recibió la combinación de polifenoles que en los grupos que recibieron cada polifenol de forma individual.

La termogénesis, proceso de producción de calor en respuesta al frío o dietas hipercalóricas, es un componente importante del gasto energético que tiene lugar en el músculo (tiriteo o *shivering*) y en el tejido adiposo marrón. Debido a su alta capacidad termogénica, el tejido adiposo marrón ha suscitado un interés creciente como regulador del balance energético, hasta tal punto que su inactivación podría dar lugar a un mayor grado de adiposidad (Lowell *et al.*, 1993). Por este motivo, una de las líneas de investigación en obesidad se centra en la búsqueda de moléculas capaces de estimular este proceso.

Por todo lo anteriormente expuesto, y dado que en un estudio previo en nuestro laboratorio se demostró cómo tras la administración de resveratrol se producía un incremento de la expresión de UCP1 (Alberdi *et al.*, 2013), principal termogénina encargada de la termogénesis en el tejido adiposo marrón, consideramos interesante analizar posibles cambios en este tejido que pudieran contribuir a explicar la sinergia observada en la reducción de peso corporal en el grupo RSV+Q. Para ello se analizó tanto la expresión génica como proteica de la UCP1 en TAM.

En cuanto al peso de este tejido, no se encontraron diferencias entre los cuatro grupos estudiados. Sin embargo, la expresión proteica de UCP1 se vió incrementada en el grupo resveratrol y en el grupo RSV+Q. En cuanto al efecto del resveratrol, este resultado estuvo en concordancia con los obtenidos por nuestro grupo en un estudio previo y también con los mostrados por otros autores (Lagouge *et al.*, 2006; Alberdi *et al.*, 2013). La sobreexpresión de proteína UCP1 observada en el grupo RSV+Q fue similar a la producida por el resveratrol. La quercetina, por el contrario, no indujo ninguna modificación.

Tanto el resveratrol como la combinación de resveratrol y quercetina podrían activar la termogénesis en el tejido adiposo marrón. Sin embargo, en este caso, la combinación de ambos polifenoles no produce ningún efecto sinérgico o de potenciación.

Mientras que muchos compuestos actúan de forma selectiva en un solo tejido (Bonet *et al.*, 2013), algunos agentes como el frío o estimulantes  $\beta$ -adrenérgicos presentan efectos duales en roedores, siendo capaces no sólo de estimular la actividad del tejido adiposo marrón, sino también de inducir marronización en el tejido adiposo blanco.

Investigaciones recientes han puesto de manifiesto la existencia de un tercer tipo de adipocito con características intermedias entre el adipocito blanco y el marrón, los cuales han sido denominados adipocitos "brite" (de *Brown in White*) o células beige. Estos adipocitos, pese a

## RECAPITULACIÓN

---

tener una procedencia común a los adipocitos blancos, ante determinados estímulos (frío, agonistas PPAR $\gamma$ ,  $\beta$ -adrenérgicos) son capaces de expresar UCP1. Con el objetivo de averiguar si el efecto sinérgico reductor de la grasa corporal observado en el presente estudio en el grupo RSV+Q pudiera estar mediado por un mecanismo de marronización, se analizaron determinados parámetros involucrados en este proceso en el tejido adiposo blanco.

Mediante el análisis morfo-histológico se observó una infiltración de adipocitos multiloculares en el seno del tejido adiposo perirrenal de los animales tratados tanto con resveratrol como con la combinación RSV+Q. En el resto de depósitos adiposos estudiados (epididimal, mesentérico y subcutáneo) no se vieron cambios morfológicos de este tipo. Si bien en el caso del grupo resveratrol la presencia de “*brites*” fue escasa, y nula en el grupo quercetina, en los tejidos de los animales tratados con RSV+Q dicha positividad resultó abundante y muy abundante en algunos cortes de tejido. El estudio morfológico fue confirmado mediante un posterior análisis inmunohistoquímico que reveló la positividad para UCP1 en aquellas muestras que habían mostrado cambios histológicos.

En el presente experimento también se analizó la expresión génica de UCP1 y CideA, marcadores propios de adipocitos marrones y comunes a los adipocitos “*brites*”, y de HoxC9, identificador molecular de adipocitos blancos y “*brites*”, tanto en el tejido adiposo perirrenal como en el subcutáneo. En el caso del grupo RSV+Q, se observó un aumento en la expresión de HoxC9 y CideA en tejido adiposo perirrenal, lo que de nuevo sugiere la presencia de “*brites*” en este tejido (Sharp *et al.*, 2012; Waldén *et al.*, 2012). De nuevo, no hubo cambios en el tejido adiposo subcutáneo. En cuanto a la expresión génica de UCP1, no se observaron cambios en ninguno de los tejidos y por tanto en ninguno de los grupos tratados. No obstante, la positividad de CideA en ausencia de cambios en la expresión de UCP1 en adipocitos multiloculares presentes en depósitos de adipocitos blancos de ratones que fueron sometidos a frío ha sido propuesto como un marcador de un estadio temprano en la transdiferenciación de adipocito blanco a “*brite*” (Barneda *et al.*, 2013).

No obstante, a pesar de la ausencia de cambios en la expresión génica de UCP1, el análisis de la expresión proteica de UCP1 en las muestras de tejido adiposo perirrenal de todos los animales objeto de estudio reveló la presencia de UCP1 sólo en aquellas muestras que habían dado positividad morfológica (en el resto no se observaron indicios de la presencia de esta proteína). Estos resultados refuerzan los obtenidos hasta ahora mediante el estudio morfo-histológico e inmunohistoquímico y, por tanto, en lo relativo a la marronización del tejido adiposo blanco.

Cabe señalar que la mayoría de estudios descritos en la bibliografía muestran una inducción de “*brites*” en el tejido adiposo inguinal, bajo estímulos de frío o agonistas PPAR $\gamma$  (Fuster *et al.*, 2009; Koh *et al.*, 2009; Vernochet *et al.*, 2009; Frontini *et al.*, 2010; Petrovic *et al.*, 2010). Sin embargo, en el presente estudio este efecto se observó en el TA perirrenal pero no en el subcutáneo y tampoco en ninguno de los demás depósitos grasos analizados. Los resultados de nuestro estudio, pese a no coincidir con los datos de la literatura, resultan lógicos y esperables dado que el tejido adiposo blanco visceral ha sido identificado como mayor poseedor de receptores beta adrenérgicos y mayor cantidad de receptores  $\gamma$  en comparación al subcutáneo, lo que nos lleva a pensar que este tejido debiera ser más sensible a la

## RECAPITULACIÓN

---

marronización que el subcutáneo (Lafontan *et al.*, 2003). Si bien este razonamiento ayuda a entender la diferencia observada entre el tejido adiposo perirrenal y el subcutáneo, plantea la duda de por qué el tejido adiposo epididimal no se vio afectado, duda que a día de hoy permanece sin ser esclarecida en nuestro caso. Otra gran diferencia entre nuestro estudio y la mayor parte de trabajos relacionados con el efecto marronizante del tejido adiposo blanco es el modelo animal utilizado. Mientras que la bibliografía muestra numerosas investigaciones llevadas a cabo en ratones, escasas son las realizadas con ratas.

La combinación de resveratrol y quercetina, y en menor medida el resveratrol, producen un cambio morfológico del tejido adiposo blanco perirrenal mediante la infiltración de adipocitos “*brite*”. La detección de UCP1 en estas muestras sostiene la teoría de una posible “marronización del tejido adiposo blanco” con la posibilidad de que se dé una activación de la termogénesis. Este hecho podría justificar también, al menos en parte, la reducción observada en los depósitos grasos y el peso corporal en el grupo RSV+Q.

Estudios llevados a cabo en modelos animales, han demostrado que la proliferación de adipocitos “*brite*” conlleva un aumento en el gasto energético y, consecuentemente, a una pérdida de peso (Beranger *et al.*, 2013). A su vez, estudios en humanos ponen de manifiesto que el número de adipocitos *brite* se correlacionan inversamente con el IMC (Saito *et al.*, 2009).

Sin embargo, teniendo en cuenta que el principal tejido encargado de llevar a cabo la termogénesis es el tejido adiposo marrón, la importancia de la actividad llevada a cabo por éste siempre será superior a la inducción de marronización del tejido adiposo blanco (cuya función principal es el almacenamiento de la grasa).

Tras los resultados obtenidos en el presente experimento, indicativos de una posible marronización ejecutada por el resveratrol y en mayor medida por la combinación RSV+Q, y la aparición de las primeras evidencias científicas que mostraban la posible aparición de este efecto tras el tratamiento con resveratrol (Qiang *et al.*, 2012; Bonet *et al.*, 2013), se realizó un último estudio con el objetivo de profundizar más en el proceso de marronización. Éste fue llevado a cabo en el Wenner-Gren-Institute de la Universidad de Estocolmo, bajo la supervisión de la catedrática Barbara Cannon y gracias a una ayuda para tal fin concedida por el Gobierno Vasco.

Durante esta estancia se llevó a cabo un experimento en adipocitos primarios aislados del tejido adiposo inguinal de ratones jóvenes, que presenta características intermedias entre el tejido adiposo blanco y el marrón. Ante determinados estímulos de tipo agonista PPAR $\gamma$ , este tejido posee una sensibilidad especial a la marronización. Por todo ello, este tejido ha sido ampliamente utilizado en estudios de este tipo (Loncar, 1991; Wu *et al.*, 2012).

Una vez aisladas y diferenciadas las células, y tras ser tratadas durante 24 horas con diversas dosis de cada polifenol (1,2 y 3  $\mu$ M de resveratrol y de quercetina) o de su combinación (1+1 y 2+2  $\mu$ M de RSV+Q), se analizó la expresión génica de UCP1, principal proteína encargada del proceso termogénico, y cuya expresión génica en adipocitos blancos está ligada a la presencia de células “*brite*”. También se analizó la expresión de CideA (marcador exclusivo de adipocito

## RECAPITULACIÓN

---

marrón), HoxC9 (identificador molecular de adipocito blanco que regula la síntesis de éstos y que también es expresado en “*brites*”) y aP2 (indicador de la diferenciación celular).

Cabe mencionar que dentro de cada grupo de células tratado con las distintas dosis de cada polifenol y de su combinación, la mitad de las células fueron estimuladas con una dosis 2  $\mu\text{M}$  de noradrenalina durante las 2 horas previas al aislamiento del material genético. El objetivo de esta estimulación fue determinar si el efecto producido por estos polifenoles podría incrementar o no el claro efecto producido por la noradrenalina en el incremento de la expresión de UCP1.

Los resultados de este experimento mostraron que dosis de 3  $\mu\text{M}$  modificaban el crecimiento celular, pudiendo estar próximas a dosis tóxicas. Por otro lado, sólo el grupo tratado con la combinación de ambos polifenoles (RSV+Q) a una dosis de 2+2  $\mu\text{M}$  y en ausencia de estimulación noradrenérgica duplicaban los valores de expresión de UCP1 con respecto al grupo control, aunque este incremento no alcanzó significación estadística. Esto sugiere que una combinación de ambos polifenoles podría dar lugar a una marronización del tejido adiposo blanco. Puesto que la expresión de aP2 no fue alterada en ninguno de los grupos, podemos suponer, además, que este incremento de la expresión de UCP1 no fue asociado a cambios en la diferenciación celular. Los resultados correspondientes a la expresión de CideA fueron en la misma línea que los obtenidos para la UCP1. Finalmente, HoxC9 no se vió modificado en ninguno de los grupos tratados.

Bajo la estimulación con noradrenalina, no se observaron cambios en la expresión de UCP1 en ninguno de los grupos tratados. Cabe pensar que el efecto previamente observado en células no tratadas con beta-adrenérgicos pueda verse enmascarado por la gran estimulación ejercida por la noradrenalina, umbral que resulta difícilmente superable por estas moléculas dado el potencial de la noradrenalina para activar la termogénesis.

A pesar de las grandes diferencias existentes entre los estudios *in vivo* y los *in vitro*, los datos correspondientes a este último estudio realizado durante la estancia predoctoral demostraron estar en la misma línea que los ya obtenidos previamente en el estudio llevado a cabo en animales en lo referente al efecto marronizante inducido por la combinación RSV+Q en el tejido adiposo blanco.

Las células procedentes de un tejido adiposo blanco de ratón muestran una tendencia al aumento de la expresión de genes relacionados con la termogénesis cuando son tratados con una mezcla de resveratrol y quercetina.

Volviendo a nuestro estudio *in vivo*, en cuanto a los parámetros séricos, es bien conocido que una dieta rica en grasa y sacarosa produce un aumento en la concentración de glucosa y lípidos (Panchal *et al.*, 2011). Los polifenoles han sido ampliamente estudiados por su capacidad de prevenir estas alteraciones (Vang *et al.*, 2011; Babacanoglu *et al.*, 2013; Arias *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014).

En el presente estudio tanto el resveratrol como la quercetina así como la combinación de ambos polifenoles, redujeron las concentraciones séricas de ácidos grasos libres y glucosa.

## RECAPITULACIÓN

---

Estas reducciones fueron similares en todos los grupos tratados, no encontrándose ningún efecto aditivo o sinérgico en el grupo RSV+Q. Ésto puede ser debido a que las reducciones alcanzadas en cada grupo tratado tras la administración de los compuestos por separado alcanzaron un valor fisiológico normal, el cual resulta difícilmente modificable.

Puesto que existe una clara relación entre la resistencia a la insulina y la esteatosis hepática, especialmente cuando factores de riesgo como la obesidad, diabetes mellitus y/o la dislipidemia coexisten en un organismo, y dado que diversos trabajos habían demostrado la eficacia de diversos polifenoles en la prevención de esta alteración metabólica, consideramos conveniente analizar los efectos de la combinación de resveratrol y quercetina en el metabolismo hepático de triglicéridos.

Ninguno de los dos polifenoles administrados por separado mostró un efecto delipidante del hígado. Sin embargo, la administración conjunta de ambas moléculas nuevamente resultó eficaz en la reducción del contenido de triglicéridos hepáticos.

Los resultados obtenidos con la administración individual de cada polifenol no coinciden con los datos publicados. Así, en un estudio llevado a cabo por nuestro grupo bajo las mismas condiciones experimentales pero utilizando una dosis de resveratrol de 30 mg/kg peso corporal/d se observó una disminución de la esteatosis hepática (Aguirre *et al.*, 2014b). En el estudio llevado a cabo por Shang y col. (Shang *et al.*, 2008), se observó que la suplementación de la dieta con 100 mg/kg peso corporal/d de resveratrol disminuía el contenido de TG hepáticos tras 10 semanas de tratamiento. En esta misma línea, Poulsen y col. (Poulsen *et al.*, 2012), que utilizaron una dosis aproximada de 270 mg/kg peso corporal/d, observaron efectos similares tras un tratamiento de 8 semanas. Con respecto a la quercetina, Panchal y col. (Panchal *et al.*, 2012) demostraron una disminución de la esteatosis hepática en ratas tratadas durante 8 semanas con esta molécula a una dosis de 50 mg/kg peso corporal/d.

Las discrepancias entre los resultados mostrados por otros autores y los obtenidos en nuestro estudio cuando se administran los polifenoles de forma individual pueden ser atribuidas principalmente a las dosis. En el presente estudio, las dosis empleadas para cada polifenol resultaron ser bastante menores que en los experimentos previamente mencionados. Del mismo modo, la duración de los tratamientos anteriores en casi todos los casos fue superior a 6 semanas. Por tanto, esta diferencia en la ausencia de efecto producido por cada polifenol podría deberse tanto por la dosis como la duración del tratamiento.

Dosis de 15 y 30 mg/kg peso corporal/d de resveratrol y quercetina respectivamente, administradas individualmente durante 6 semanas en una dieta obesogénica, no son suficientes para reducir el contenido de triglicéridos hepáticos. Por el contrario, la administración conjunta de ambos polifenoles reduce eficazmente la acumulación de grasa hepática.

## RECAPITULACIÓN

---

Con el objetivo de analizar los posibles mecanismos que llevaron a esta reducción de grasa hepática mediada por la combinación RSV+Q, se analizaron dos rutas metabólicas clave en el control de la acumulación de grasa en este órgano, la lipogénesis *de novo* y la oxidación de ácidos grasos, mediante el análisis de las principales actividades enzimáticas implicadas en ellas (Berlanga *et al.*, 2014).

En cuanto a la lipogénesis *de novo*, no se observaron cambios en la actividad de FAS en ninguno de los cuatro grupos experimentales. Por el contrario, la fosforilación (inactivación) de la ACC aumentó significativamente, tanto en el grupo resveratrol como en el grupo RSV + Q. Sin embargo, en el caso del resveratrol, esta reducción parece no ser un mecanismo suficiente para reducir el contenido hepático de TG, puesto que éste no se vió modificado. Con respecto a la oxidación de ácidos grasos, se analizó la actividad de la CPT-1a que sólo se vió incrementada en el grupo RSV+Q.

La delipidación hepática producida por la combinación de resveratrol y quercetina (RSV+Q) está mediada por una reducción de la lipogénesis *de novo* y un incremento de la  $\beta$ -oxidación de AG en el hígado.

En relación con la oxidación de ácidos grasos se midió también la actividad de la citrato sintasa, enzima presente en la matriz mitocondrial y comúnmente utilizada como un marcador cuantitativo de la densidad mitocondrial (Srere *et al.*, 1969). Esta vez, no se observaron cambios en ninguno de los grupos experimentales. A pesar de ello, puesto que la actividad de este enzima no es el único marcador de biogénesis mitocondrial, se decidió analizar la expresión de tres genes implicados en el control de la mitocondriogénesis: PPAR $\alpha$ , NRF-1 y TFAM. Los resultados obtenidos se mantuvieron en concordancia con los mostrados para la actividad citrato sintasa, puesto que, nuevamente, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales.

El aumento observado en el grupo RSV+Q en la oxidación hepática de AG no parece estar mediado por una estimulación de la biogénesis mitocondrial, puesto que ninguno de los tratamientos probados dio lugar a cambios en este proceso.

Como conclusión general de este estudio, la combinación de RSV+Q podría resultar una herramienta interesante en la prevención y/o tratamiento de la esteatosis hepática asociada a una dieta rica en grasa y sacarosa. A su vez, el aumento de la oxidación de ácidos grasos en el hígado podría contribuir de manera indirecta a la reducción del tejido adiposo blanco.





## SUMMARY

---

### SUMMARY

As previously mentioned in the introduction to this Doctoral Thesis, given the increasing prevalence of obesity and the problems caused by this disease worldwide scientific research is constantly looking for new molecules which would be effective in avoiding excess body fat accumulation and/or reducing it once accumulated.

Our research group, led by Prof. María del Puy Portillo, has extensive experience in the study of the effects of different dietary components, such as proteins from several sources and different types of fats, on lipid metabolism in the field of basic research. This work is part of a research line which began in our laboratory in 2002 and which has focused on the analysis of the effects produced by some bioactive molecules. We began our work in this line by studying conjugated fatty acids, mainly conjugated linoleic acid (CLA). In 2009 we began our study of polyphenols. In this field, our efforts have been devoted mainly to resveratrol.

For the last fifteen years our studies have shown the anti-obesity effects of CLA (especially its isomer trans -10,cis -12) and resveratrol. Some of the mechanisms of action by which these molecules produce their effects have also been identified. Therefore, studies from our group have contributed to knowledge about these molecules and to the scientific advancement that this entails.

In this context, this research focuses on finding combinations of molecules whose efficiency in reducing body fat is greater than the molecules administered individually, due to the phenomena of addition and/or synergy.

## SUMMARY

---

### A) STUDY OF THE EFFECT OF A COMBINATION OF RESVERATROL AND CONJUGATED LINOLEIC ACID (CLA) ON BODY FAT ACCUMULATION IN RATS FED AN OBESOGENIC DIET.

Since the results of our previous studies showed that both CLA and resveratrol were able to reduce body fat, and that these two molecules have mechanisms of action which are sometimes similar and sometimes complementary, we considered the administration of both molecules to be the first combination to study. To carry out this first experiment the animal model of Wistar rat was selected and fed an obesogenic diet high in saturated fat and sucrose.

The doses selected were mainly set according to the previous results obtained by our research group. In a study conducted in rats fed an obesogenic diet receiving 6, 30 and 60 mg/kg body weight/d of resveratrol, the lower dose did not produce any effect. Doses of 30 and 60 mg/kg body weight/d were both effective, although the dose of 60 mg/kg body weight/d produced no additional effect compared to the dose of 30 mg/kg body weight/d (Macarulla *et al.*, 2009). Therefore, a *plateau* effect appears in this range of dose. Given the above, we chose the dose of 30 mg/kg body weight/d of resveratrol.

To select the dose of CLA we considered, first of all, that 0.5 g of the active CLA isomer (*trans*-10,*cis*-12) per 100 g of diet (dose of 0.5%) is the dose which is most often used in the literature for reducing body fat. Previous studies in our laboratory had shown its effectiveness (Zabala *et al.*, 2006). In turn, and in a similar way to that observed with resveratrol, Zabala *et al.* (Zabala *et al.*, 2006) showed that while a dose of 0.5% of *trans*-10,*cis*-12 CLA was sufficient to observe the reducing body fat effect, a dose of 1% did not present any additional advantage. The CLA source for this study was a commercial preparation (Clarinol®) containing an equimolar mixture of the *trans*-10,*cis* 12 and *cis*-9,*trans*-11 of CLA. 1 g of Clarinol® was added to 100 g diet, in order to ensure 0.5% of *trans*-10,*cis*-12 isomer. Considering the average animal body weights and their daily intake, this amount approximately corresponds to 530 mg/kg body weight/d of the *trans*-10,*cis*-12 of CLA.

At the end of the experimental period, after 6 weeks, a significant reduction in animal body weight was observed in the group supplemented with resveratrol, which was explained by the decrease (-20%) of the sum of adipose tissue weights (epididymal, perirenal, mesenteric and subcutaneous). Epididymal and perirenal were the most sensitive tissues to this effect. These changes were not due to a change in the diet intake. It is worth noting that these results agree with those obtained in a previous experiment carried out by our group under similar experimental conditions (Macarulla *et al.*, 2009) and also with studies by other authors using other strains of rat (Zucker obese) and mice (Lagouge *et al.*, 2006; Rivera *et al.*, 2009).

In turn, CLA also showed a reduction of similar magnitude (-18%) in the sum of adipose tissues, but in this case no change in body weight was observed. Epididymal was the most reduced adipose tissue. The anabolic effect that *cis*-9,*trans*-11, present in the CLA mixture, produces is well known. This could counteract the adipose tissue weight reductions and therefore it could explain the lack of effect observed in these animal final body weights (Bhattacharya *et al.*, 2006). These results were also consistent with those observed in previous studies by our group, most of which are shown in the bibliography in studies conducted with rodents (Navarro *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2008; Miranda *et al.*, 2009b).

## SUMMARY

---

As already mentioned above, because some mechanisms of action of resveratrol and CLA are similar (increased oxidation of AG in muscle and liver, decreased uptake of TG and lipogenesis in adipose tissue, and induction of adipocyte apoptosis) and because others are complementary (reduced TG synthesis and increased mitochondrial biogenesis in the muscle mid resveratrol and CLA respectively), an additive or potentiating effect when administering these two molecules might be expected. Surprisingly, animals treated with the combination of RSV+CLA showed lower fat depot decreases (-7%) than those observed in animals treated with each molecule individually administered and this reduction did not reach statistical significance.

Co-administration of RSV+CLA attenuated the body fat accumulation reducing effects exerted by each molecule administered individually. Therefore, the combination of resveratrol and CLA does not appear to be useful in preventing obesity.

In order to analyze the cause of the lack of effect in body fat reduction of the animals treated with the combination of the two molecules (RSV+CLA) which had been observed, the effects of these molecules on some relevant lipid metabolism metabolic pathways were analyzed. The role of two key enzymes activities, FAS, limiting enzyme in the fatty acids synthesis or *lipogenesis novo*, and LPL, the enzyme involved in fatty acid uptake from circulating triglycerides, were analyzed.

Our results showed that resveratrol decreased both activities, suggesting that this polyphenol acts on the two above mentioned metabolic pathways. These changes can justify, at least in part, the reduction in adipose tissue mass induced by resveratrol. These effects have already been highlighted in previous studies of our group conducted on Sprague-Dawley rats (Alberdi *et al.*, 2011).

With regard to CLA treated animals, FAS activity did not change in this supplemented group. To date there is no consensus about the effects of this molecule on *de novo* lipogenesis (Park *et al.*, 1997; Park *et al.*, 1999; Azain *et al.*, 2000; Faulconnier *et al.*, 2004; Miranda *et al.*, 2009c). Furthermore, CLA treated animals showed a reduction of LPL activity (-28%) that did not reach statistical significance. Although few data in the literature show the CLA effects on this enzyme, Xu *et al.* observed a similar effect to ours (Xu *et al.*, 2003).

When these two enzyme activities were analyzed in the group treated with the combination (RSV+CLA) no change was observed in either. Although these results were parallel with the modification and the adipose tissue size mediated by this combination, it is striking that the two molecules, which appear to act through a common mechanism, produce no effect when administered together at doses that have been demonstrated to be effective.

To continue examining possible mechanisms involved in the effects observed, the influence of different treatments on the lipolytic process was analyzed. The gene expression of the two major lipases: ATGL and HSL (Miyoshi *et al.*, 2008; Watt *et al.*, 2008) were analyzed. Although no significant difference in the ATGL was found between both resveratrol and CLA, an increased HSL expression was shown in both resveratrol and CLA treated groups, which suggests that the lipolysis process could be involved in the reduction of body fat induced by

## SUMMARY

---

these two molecules. The results obtained after administration of resveratrol was in parallel with our previous studies, which also showed increased HSL expression in rats treated with this polyphenol (Alberdi *et al.*, 2011; Gómez-Zorita *et al.*, 2013). Most published studies with CLA indicate that this molecule enhances *in vitro* lipolysis, which is also consistent with our results.

In the case of the RSV+CLA group, once more no changes were observed in any of lipases. This lack of effect on lipases, along with the lack of effect on FAS and LPL activities contributes to explaining the lack of effect on body fat reduction shown by this combination.

In view of these results, further research was necessary to establish why in those animals that received a combination of RSV+CLA the effects exerted on enzyme activities for each of these molecules administered individually should disappear. It became necessary to consider changes in absorption and/or metabolism of these two molecules due to its co-administration. Since there were no stool samples to quantify the amounts excreted available, the quantities of both molecules in adipose tissue samples were analyzed.

With regard to CLA isomers, a reduction of 37% of *cis-9,trans-11* and 42% of *trans-10,cis-12* isomer was observed in RSV+CLA treated group comparing to those treated only with CLA. Therefore, the amount of CLA which reached adipose tissue was lower when it was administered in combination with resveratrol. It helps us to understand somewhat why CLA produces effects (such as the increase in HSL gene expression) when it is individually administered but these disappear after co-administration with resveratrol.

This reduction in the amount of CLA present in the RSV+CLA group could be explained by a decrease in intestinal absorption of CLA mediated by resveratrol. A possible increase in the oxidation of CLA may also be considered, as it has been shown that resveratrol increases hepatic CPT-1 activity, an enzyme that acts by increasing FA oxidation within the mitochondria. In fact, this effect was also observed in the present study (Arias *et al.*, 2011).

Some authors has shown that orally administered resveratrol is only present in very small amounts, or is even absent, in plasma and tissues due to its rapid metabolism (Maier-Salamon *et al.*, 2008; Walle, 2011; Andres-Lacueva *et al.*, 2012). In the present study, in line with the above, resveratrol was measured in the adipose tissue of both resveratrol and RSV+CLA treated animals. Although the parent compound of resveratrol was not quantifiable, its sulfated and glucuronated metabolites were found. The total amount of these metabolites was similar in both groups, suggesting that resveratrol reached them in the same amount. So we could expect that the effects of this molecule were at least maintained in the RSV+CLA group.

In a study conducted in human primary adipocytes by Kennedy *et al.* (Kennedy *et al.*, 2009), whose purpose was to determine the extent to which resveratrol reversed some of the side effects associated with the administration of *trans-10,cis-12* CLA isomer (inflammation, insulin resistance, cellular stress), the authors proposed that, among other mechanisms, resveratrol blocks the changes produced by *trans-10,cis-12* CLA isomer in the intracellular  $Ca^{+2}$  concentration (Kennedy *et al.*, 2009).

Taking this into account we measured the intracellular  $Ca^{+2}$  concentrations in adipose tissue of all the experimental groups and observed that CLA did no change this parameter, as had been

## SUMMARY

---

proposed by Kennedy *et al.* in their *vitro* study. By contrast, a significant increase was observed in this parameter in the group treated with the combination of RSV+CLA group. Since an increase in intracellular  $\text{Ca}^{+2}$  in adipocytes leads to increased lipogenesis (Kim *et al.*, 1996; Zemel, 2005; Boon *et al.*, 2007), it could be argued that the decrease in FAS activity induced by resveratrol in CLA+RSV group could have been counteracted by the lipogenesis stimulation associated with increased intracellular  $\text{Ca}^{+2}$  concentration in this group. Therefore, finally, this could make no change in FAS activity in this experimental group.

It has also been reported that an increase in intracellular  $\text{Ca}^{+2}$  regulates the activation of LPL, with inactive monomers of this enzyme becoming active dimers (Zhang *et al.*, 2005). Therefore, following the same reasoning as for FAS, one should consider the possibility of a compensation between the LPL inactivation induced by resveratrol and an activation mediated by increased intracellular  $\text{Ca}^{+2}$ , obtaining as the final result a lack of effect on LPL activity in the RSV+CLA group.

SIRT1 is a deacetylase belonging to the family of sirtruis which plays a important role in lipid metabolism. It has been shown that activation of SIRT1 decreases FAS gene expression and enzyme activity, thereby inhibiting lipogenesis (Ponugoti *et al.*, 2010). In turn, it has been proposed that an important mechanism by which resveratrol exerts its multiple beneficial effects is the activation of this deacetylase (Howitz *et al.*, 2003; Picard *et al.*, 2004; Lagouge *et al.*, 2006).

Despite not seeing any change in SIRT1 gene expression in resveratrol treated rats from our study its activation may be supposed (not determined in this study) to be the mechanism responsible for the observed FAS activity reduction in this group. By contrast, both CLA and RSV+CLA groups reduced the expression of this gene, which probably results in less SIRT1 in adipose tissue. Given these results we think that although there is an increased activity of SIRT1 (effect of resveratrol), if the quantity is decreased (CLA induced effect), the final effect is the lack of change in FAS via SIRT1.

The effects observed in TG metabolism when resveratrol and CLA are administered individually, such as reduced lipogenesis mediated by resveratrol and decreased uptake of fatty acids and increased lipolysis induced by both resveratrol and CLA, disappear when these molecules are administered in combination. Therefore, the combination of resveratrol and CLA does not appear to be useful in modifying the metabolic processes that lead to the development of obesity.

In the present study the plasma concentrations of total cholesterol, HDL and non-HDL cholesterol, were also analyzed. All of these parameters remained unchanged in all of the experimental group molecules except plasmatic TG, which was reduced only in resveratrol treated animals.

With reference to glucose metabolism, during the last decade numerous studies have attributed an induction of insulin resistance in mouse animal models to CLA. By contrast, resveratrol has been associated with an improvement of the insulin action. However, it has been widely reported that the mouse is highly reactive to the effects of CLA, while the rat

## SUMMARY

---

seems resistant. According to this argument, and in view of HOMA index values (indicative of insulin resistance) observed in the present study, it can be said that CLA in this experiment did not increase insulin resistance induced by an obesogenic diet, but that this index was not improved either. Nevertheless, animals receiving a resveratrol supplement did show an improvement in insulin function compared with the control group, a fact that was reflected in reduced basal levels of glucose, insulin and therefore HOMA index and fructosamine levels (an indicator of average blood glucose over the past 2-3 weeks). In general these effects were maintained in the RSV + CLA group.

The beneficial effect of resveratrol on glycaemic control is not lost when it is administered with CLA.

## SUMMARY

---

### **B) STUDY OF THE EFFECTS OF QUERCETIN ON BODY FAT ACCUMULATION AND GLYCEMIC CONTROL IN RATS FED A OBESOGENIC DIET.**

The works performed by De Santi *et al.* (De Santi *et al.*, 2000a; De Santi *et al.*, 2000b), in which an increase in resveratrol bioavailability was observed when it was administered with quercetin, an effect produced by a protective action of quercetin in resveratrol metabolism, served as our starting point to put forward our next combination: resveratrol and quercetin.

Unlike resveratrol and CLA, which had been extensively studied in our laboratory, little or nothing had been done involving quercetin. This polyphenol has been extensively studied due to its high presence in the human diet, and has proven effective in improving insulin resistance and therefore possible preventing type 2 diabetes mellitus. However, it is worth noting that as far as obesity is concerned, the studies conducted to date are still scarce.

For this reason, and before beginning the study of the second combination (RSV+Q), we decided to perform an isolated quercetin experiment, in order to establish both the viability of its administration as well as to answer if our animal model was suitable for treatment with this polyphenol under our experimental conditions.

Based on the fact that our previous studies have demonstrated the efficacy of resveratrol after administration at a dose of 30 mg/kg body weight/d, and in order to establish a comparison between the effects of different polyphenols supplementation, we chose the same dose for quercetin.

After 6 weeks treatment conducted in rats fed a obesogenic diet supplemented, or not, with 30 mg/kg body weight/d of quercetin a reduction in the four sum of dissected fat depots (epididymal + perirenal + mesenteric + subcutaneous) of 9.1% was observed. However, this reduction did not reach statistical significance.

After the completion of our study, the results of other *in vivo* works carried out both in mice (Kobori *et al.*, 2011; Jung *et al.*, 2013) and in rats (Wein *et al.*, 2010; Panchal *et al.*, 2012), demonstrated that long term treatment with quercetin, over 8 weeks, reduced adiposity while shorter periods produced no changes. Therefore the non-change in our case could be attributed to the treatment length not being enough.

Furthermore, if we compare the effects of different polyphenols, it is noteworthy that in our previous study (Arias *et al.*, 2011), and in others carried out in our laboratory (Alberdi *et al.*, 2011) under the same experimental conditions (same dose, animal model, diet and treatment length), resveratrol was able to reduce fat in different anatomical localizations while quercetin was not. We can conclude, therefore, that the body fat lowering effect of these two polyphenols is clearly different.

In order to analyze the effects of quercetin on TG metabolism, the activity of the following lipogenic enzymes was measured: glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) and malic (ME) enzyme, which provide the necessary reducing power for this process to take place, acetyl coenzyme A carboxylase (ACC) and fatty acid synthase (FAS), limiting enzyme in the *de novo synthesis* of FA, and lipoproteína lipase (LPL), involved in the process of uptake of FA from



## SUMMARY

---

circulating TG. No changes in these activities were observed, indicating that none of these metabolic processes are affected by this polyphenol.

Under our experimental conditions quercetin is not useful in preventing obesity.

It is well known that a high fat diet rich in sucrose not only leads to increased accumulation of body fat, but also induces insulin resistance (Hegarty *et al.*, 2003). The analysis of glycemic control in the animals of this study revealed an improvement in those which received quercetin. This was reflected in a decrease of the HOMA-IR index (the parameter that estimates insulin resistance (Cacho *et al.*, 2008)), an improvement of blood glucose levels measured by the glucose tolerance test and decrease of serum fructosamine. After no changes in fat depots, improvement of the above parameters was due to a direct effect of quercetin on glycaemic control, separate from the fat accumulation. These results agree with those reported by other authors, whose research was conducted in animal models of diet induced insulin resistance or type 2 diabetes mellitus (Rivera *et al.*, 2008; Wein *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2011; Jeong *et al.*, 2012).

Various authors have found beneficial effects in quercetin mediated glycaemic control. The proposed mechanisms to explain how and why this effect occurs are : a) the increased antioxidant capacity of the pancreatic islets (Coskun *et al.*, 2005; Babujanarthanam *et al.*, 2010; Jeong *et al.*, 2012), b ) the increased circulating adiponectin concentrations [36], c) inhibiting the activity of small intestine glucosidase (Wein *et al.*, 2010) d) reduction of intestinal glucose absorption mediated by GLUT2 receptor (Kwon *et al.*, 2007), e) increased glucokinase activity (Vessal *et al.*, 2003), and f) increased skeletal muscle GLUT4 transporters (Jung *et al.*, 2011; Anhê *et al.*, 2012; Shen *et al.*, 2012).

In 2012, Shen *et al.* (Shen *et al.*, 2012) proposed a new mechanism explaining the improvement of insulin resistance mediated by penthamethylquercetin in C2C12 myotubes. These authors suggested that this beneficial effect occurs due to an increase in the expression of genes involved in fatty acid oxidation, such as PPAR- $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$ , ACO and CPT-1b.

Skeletal muscle, in which peripheral tissue glucose uptake occurs in response to an insulin signal, is one of the main tissues affected by insulin resistance. In certain cases this boost may lead to the development of obesity, so fatty acid flow to the muscle is increased, which increases intramyocellular TG concentration and degenerates into insulin resistance by an alteration of insulin signaling factors (Eckardt *et al.*, 2011).

This mechanism has not been previously demonstrated in *in vivo* experiments. Therefore, in our study, we wanted to analyze to what extent the positive effect exerted by quercetin on glycaemic control, through a decrease in insulin resistance, could be related to an increase in fatty acid oxidation on the muscle (muscle delipidation). Quercetin did not modify the expression related to fatty acid oxidation genes in muscle, such as transcription factor PPAR- $\alpha$ , or either co-activator PGC-1 $\alpha$ , or the two key enzymes regulated by PPAR oxidation - $\alpha$ , CPT-1b and ACO. With respect to gene expression of mitochondriogenesis marker, TFAM and COX-2,

## SUMMARY

---

the result was similar, as no changes observed in any of them. Finally, UCP3 expression, uncoupling protein related to muscle fatty acid oxidation (Senese *et al.*, 2011) was also measured, and CD36, fatty acid transporter, which also showed no change after treatment with quercetin.

In addition, and in line with the results presented so far, neither the enzymatic activity of CPT-1b nor CS, a marker of mitochondrial density (Pajuelo *et al.*, 2011) was modified, nor was there any muscle delipidation. These results demonstrate that changes in the related fatty acid oxidation genes observed in C2C12 myotubes do not occur in an animal model with insulin resistance, at least under our experimental conditions.

Quercetin is more effective as an anti-obesity than as an anti-diabetic molecule. Its ability to improve insulin resistance is independent of the accumulation of body fat and is not mediated by a decrease in muscle fat.

## SUMMARY

---

### C) STUDY OF THE EFFECT OF A COMBINATION OF RESVERATROL AND QUERCETIN ON BODY FAT ACCUMULATION IN RATS FED AN OBESOGENIC DIET.

Our own previous results as well as the results found in the literature concerning resveratrol led us to conclude that its bioavailability is very low. In order to increase this one possibility is to reduce the metabolism mediated by sulphation and/or glucuronidation. In this sense, some authors have suggested that quercetin could protect resveratrol from liver and intestinal metabolism (De Santi *et al.*, 2000a). Furthermore, *in vitro* studies (Yang *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2008) have demonstrated that a synergistic effect between resveratrol and quercetin reduces triglyceride accumulation through the inhibition of adipogenesis and apoptosis stimulation of these cells. Importantly, in these *in vitro* studies synergy occurred, leaving aside any possible effects on metabolism.

In this context, we thought it interesting to analyze the potential anti-obesity effect of a combination of resveratrol and quercetin, and compare it with those effects produced by single administration of each compound.

With regard to the selection of the doses (15 and 30 mg/kg body weight/d of resveratrol and quercetin respectively), these were established, as already mentioned, in accordance with our previous experiment results. These showed the ineffectiveness of resveratrol in reducing body fat accumulation at a dose of 6 mg/kg body weight/d, and its efficacy at 30 mg/kg body weight/d, showing a *plateau* effect at 60 mg/kg body weight/d (Macarulla *et al.*, 2009). To perform this experiment we opted for an intermediate dose in the range of 6 to 30 mg/kg body weight/d (15 mg/kg body weight/d) in order to avoid the *plateau effect*, because if this dose was given it would mask an increase in the effect derived from the combination with quercetin. In the previous study with quercetin, we noted that 30 mg/kg body weight/d for 6 weeks treatment reduced the weight of the sum of adipose tissues in 9.1% although this reduction was not statistically significant. For quercetin, we maintained the same dose in order to find out if an ineffective dose can become effective through its combination with another biomolecule (Arias *et al.*, 2014).

It is important to emphasize that the doses of resveratrol and quercetin used in the present study, which are very similar to those used in other studies carried out in rodents, were equivalent to 170 mg of resveratrol/kg body weight/day and 340 mg of quercetin/kg body weight/day in humans, for a 70 kg body weight subject (Reagan-Shaw *et al.*, 2008). These doses are in the range of those used in reported and ongoing human intervention studies (Timmers *et al.*, 2012; de Ligt *et al.*, 2014). The dose of resveratrol is higher than the amount usually present in the diet (0.5 mg/day in Mediterranean diets), and thus, nutraceuticals or functional foods are needed to achieve it. By contrast, the dose of quercetin is in the range of average human consumption (200–400 mg/day).

When the weight of adipose tissue from different anatomical locations was measured, we observed that rats treated with resveratrol or quercetin did not show significant reductions compared with the controls. By contrast, in rats treated with the combination of these two polyphenols, all the fat pads analyzed were significantly decreased. When the theoretical additive effects were calculated, it was observed that these values were far lower than real

## SUMMARY

---

values found in RSV+Q group, meaning that a synergistic effect was induced by the combination of these biomolecules.

Resveratrol and quercetin individually administered at doses that are ineffective produce a synergistic reduction of body fat when administered in combination, making them a potential tool for the prevention or treatment of obesity.

In order to analyze the mechanisms leading to this synergistic effect, the main processes involved in white adipose tissue TG metabolism were assessed in perirenal adipose tissue. As far as lipogenesis is concerned, the activities of two limiting enzymes of this process, the FAS and ACC, and FA uptake from circulating TG through LPL activity were analyzed.

The activity of FAS was not affected by polyphenol treatments. At the doses used in the present study, resveratrol and quercetin did not individually modify the phosphorylated ACC/total ACC protein ratio; however, their combination induced an increase in this parameter, meaning that ACC was inhibited.

Taking into account that ACC is the rate-limiting enzyme in de novo lipogenesis (Lane *et al.*, 1974), it can be proposed that inhibition of this metabolic pathway is one of the mechanisms that could explain the ability of RSV+Q combination to reduce adipose tissue size.

Another important metabolic pathway involved in triacylglycerol accumulation in adipocytes is the uptake from circulating TG, which is mediated by LPL. When the activity of HR-LPL (the active form of this enzyme which is placed in adipose tissue endothelium) was measured, a significant reduction was observed in rats treated with resveratrol alone or with the combination of the two polyphenols, but not with quercetin alone.

Triacylglycerol amount accumulated in adipocytes also depends on lipid mobilization. ATGL and HSL are the main lipases involved in this metabolic process. In the present study, protein expression of ATGL was significantly increased by the combination of both polyphenols, but not by these molecules administered separately. By contrast, the ratio Ser<sup>660</sup> phosphorylated HSL/total HSL, an indicator of HSL activity, was not modified by polyphenol treatments. The hydrolysis of diacylglycerols by HSL occurs at a rate 10- to 30-fold higher than the hydrolysis of triacylglycerols by ATGL, which is the initiating and rate limiting step in lipolysis (Zimmermann *et al.*, 2004; Miyoshi *et al.*, 2008). Moreover, it has been reported that overexpression of ATGL enhances lipolysis (Watt *et al.*, 2008). Taking all this into account, it may be proposed that increased lipolysis in RSV+Q group, but not in RSV and Q groups, could be another mechanism justifying the synergism in lowering lipid accumulation in fat depots.

## SUMMARY

---

The effect of reducing body fat observed in the RSV + Q group is mediated by an inhibition of lipogenesis and fatty acid uptake, and by an increase in lipolysis in white adipose tissue of rats fed an obesogenic diet. In turn, we can conclude that the number of mechanisms that are modified is greater in the group receiving the combination of polyphenols than in the groups receiving each polyphenol individually.

Thermogenesis is a heat production process in response to cold or calorie diets, and it is an important component of energy expenditure that occurs in muscle (*shivering*) and brown adipose tissue. Due to its high thermogenic capacity, brown adipose tissue has attracted growing interest as a regulator of energy balance, in that its inactivation could lead to a higher degree of adiposity (Lowell *et al.*, 1993). For this reason, molecules able to stimulate this process could be interesting anti-obesity tools..

A previous study in our laboratory showed an increased expression of UCP1, the principal thermogenin produced in brown adipose tissue which is responsible for thermogenesis, after resveratrol treatment (Alberdi *et al.*, 2013). Thus, we considered it interesting to analyze possible changes in this tissue that may help explain the synergy observed in reducing body weight in the RSV+Q group. Both gene and protein expression of UCP1 in BAT were analyzed.

No differences in the weight of this depot were observed among the four experimental groups. However, the expression of UCP1 protein was increased in resveratrol group and RSV+Q groups. As for resveratrol, this result was in agreement with those obtained by our group in a previous study and also with those shown by other authors (Lagouge *et al.*, 2006; Alberdi *et al.*, 2013).. The overexpression observed in UCP1 protein in RSV+Q group was similar to that observed for resveratrol. Quercetin, by contrast, did not induce any changes.

Both resveratrol and the combination of resveratrol and quercetin could activate thermogenesis in brown adipose tissue. However, in this case, the combination of both polyphenols does not produce any synergistic or potentiating effect.

Some of the agents able to activate BAT have dual effects in rodents, also activating browning of WAT when certain stimuli are given. By contrast, others appear to act selectively or specifically on BAT (Bonet *et al.*, 2013). Recent research has revealed the existence of a third type of adipocyte with intermediate characteristics between white and brown adipocytes, which have been called either "brite" adipocytes (from *Brown in White*) or beige cells. These adipocytes, despite having a common origin with white adipocytes, are capable of expressing UCP1 under certain stimuli (cold, PPARy agonists, and  $\beta$  -adrenergics). In order to determine if the synergistic body fat reduction effect observed in RSV+Q group could be mediated by a white adipose tissue browning phenomenon we analyzed some parameters in white adipose tissue that are involved in this process.

Morpho-histological analysis revealed an infiltration of multilocular adipocytes within the perirenal adipose tissue of animals treated with resveratrol and RSV+Q. In the rest of the depots studied (epididymal, mesenteric and subcutaneous) no morphological changes of this type were found. While the presence of "*brites*" in resveratrol group were low and zero in the

## SUMMARY

---

quercetin group, tissues of animals treated with RSV+Q shown a high positivity with very abundant brites in some tissue sections. The morphological study was confirmed by subsequent immunohistochemical analysis that revealed positivity for UCP1 in those samples that had shown histological changes.

As far as gene expression is concerned, only RSV+Q induced a significant increase in *Cidea*, a marker of brown adipocytes also found in brites, and in *HoxC9*, a common molecular identifier of white and brites adipocytes, in perirenal white adipose tissue, suggesting the presence of "brites" in this tissue (Sharp *et al.*, 2012; Waldén *et al.*, 2012). UCP1 gene expression remained unchanged in all experimental groups. However, a positive *Cidea* in the absence of changes in the expression of UCP1 in multilocular adipocytes present in white adipocytes depots of mice that were subjected to cold has been proposed as a marker of early stage transdifferentiation from white to "brite" adipocyte (Barneda *et al.*, 2013). However, despite the lack of change in the UCP1 gene expression, analysis of the UCP1 protein expression in perirenal samples of all treated animals revealed the presence of UCP1 only in those samples that had given morphological positivity. These results reinforce those obtained to date using morpho-histological and immunohistochemical studies regarding the browning of white adipose tissue.

An interesting question is whether brown remodelling varies among different WAT depots. Thus, in the present study two different anatomical locations, perirenal and subcutaneous, were analyzed. The combination of resveratrol and quercetin induced browning in perirenal, but not in subcutaneous adipose tissue. Data in the literature suggest that the visceral/epididymal WAT is less prone to browning than the subcutaneous/inguinal (Fuster *et al.*, 2009; Koh *et al.*, 2009; Vernochet *et al.*, 2009; Frontini *et al.*, 2010; Petrovic *et al.*, 2010). The reason for the different pattern of response between subcutaneous and perirenal depots observed in the present study is not clear. Both sympathetic activation and PPAR $\gamma$  agonists have been described as the main stimuli in the browning process (Lafontan *et al.*, 2003). Notably, it has been reported that visceral WAT displays higher density of beta-adrenoceptors and higher abundance of PPAR $\gamma$  compared to subcutaneous WAT (Lafontan *et al.*, 2003), suggesting that visceral adipose tissue could be more sensitive to the browning process. This could explain the difference observed in the present study between perirenal and subcutaneous depots, but not the lack of effect in epididymal adipose tissue reported in the literature.

Another big difference between our study and the vast majority of the studies analyzing this browning effect is the animal model. While the literature shows numerous investigations conducted in mice, those performed with rats are rare.

The combination of resveratrol and quercetin produce an infiltration of "brites" in perirenal adipose tissue with UCP1 detection that theorizes a possible "browning of white adipose tissue" with the possibility that activation of thermogenesis is taking place. This could also explain, at least in part, the reduction observed in RSV+Q group in body weight and fat depots.

Studies conducted in animal models have demonstrated that "brite" adipocyte proliferation means increased energy expenditure and consequently loss of weight (Beranger *et al.*, 2013).

## SUMMARY

---

In turn, human studies show that the number of white adipocytes are inversely correlated with BMI (Saito *et al.*, 2009).

However, considering that the main thermogenesis process is performed by brown adipose tissue, the importance of the activity carried out by the latter will always be higher than the white adipose tissue browning induction (whose main function is fat storage).

After the results obtained in this experiment, indicative of a possible browning effect induced by the combination and in a lesser degree, by resveratrol, and the appearance of the first scientific evidence showing the possible occurrence of this effect following treatment with resveratrol (Qiang *et al.*, 2012; Bonet *et al.*, 2013), one last study was conducted in order to gain more insight into the browning process. This was carried out in the Wenner-Gren-Institute of the University of Stockholm, under the supervision of Professor Barbara Cannon and by a grant for that purpose granted by the Basque Government.

During this stay an experiment was carried out in isolated primary adipocytes from inguinal adipose tissue of young mice, which has intermediate characteristics between white tissue and brown adipose tissues. Under certain PPAR $\gamma$  agonist stimulation, this tissue has a special sensitivity to browning process. Therefore, this depot has been widely used in these studies (Loncar, 1991; Wu *et al.*, 2012).

After cell isolation and differentiation, these were treated with different doses of each polyphenol (1, 2 and 3  $\mu$ M of resveratrol and quercetin) or combination (1 + 1 and 2 + 2  $\mu$ M RSV + Q) for the last 24 hours before harvesting. UCP1, CideA (exclusive marker of brown adipocyte), Hoxc9 (molecular identifier common to white and white adipocytes) and aP2 (indicator of cell differentiation) gene expression were analyzed.

Within each group treated with different doses of each polyphenol cells and their combination, half of the cells were stimulated with norepinephrine 2  $\mu$ M for 2 hours before their harvest. The purpose of this was to determine if the stimulation effect of these polyphenols may increase the considerable effect in increased UCP1 expression caused by noradrenaline.

The results of this experiment showed that doses of 3  $\mu$ M modified cell growth and could be close to toxic doses. On the other hand, only the group treated with the combination of both polyphenols (RSV+Q) at a dose of 2+2  $\mu$ M and with the absence of noradrenergic stimulation duplicated UCP1 gene expression values compared to control group, although this increase did not reach statistical significance. This suggests that a combination of both polyphenols could result in white adipose tissue browning. Since aP2 expression was not altered in either group, we can further assume that this increase in UCP1 expression was not associated with cell differentiation changes. As far as CideA expression was concerned, the results were in line with those obtained for UCP1. Hoxc9 was not modified in any of the treated groups.

Under noradrenaline stimulation, no changes were observed in UCP1 expression of any of the treated groups. It may be supposed that the previously observed effect in cells not treated with beta-adrenergic is masked by the high norepinephrine stimulation exerted.

Despite the great differences between the *in vivo* and *in vitro* studies, the data for the latter

## SUMMARY

---

study during the predoctoral stay proved to be in line with those already obtained concerning the browning effect induced by RSV+Q combination in white adipose tissue in the study conducted in animals

White adipocyte from mouse inguinal adipose tissue treated with a combination of resveratrol and quercetin has a tendency to increase the expression of genes related to thermogenesis.

Returning to our *in vivo* study, it is well known that high fat and high sucrose diet causes an increase in glucose and lipid concentrations (Panchal *et al.*, 2011). Polyphenols have been widely studied for their ability to prevent these changes (Vang *et al.*, 2011; Babacanoglu *et al.*, 2013; Arias *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014).

In this study, resveratrol as well as quercetin, each administered separately, and the combination of both polyphenols reduced serum concentrations of free fatty acids and glucose. These reductions were similar in all treated groups, without any additive or synergistic effect in the RSV+Q group. This may be due to the reductions observed in each treatment group after administration of the compounds separately achieving normal physiological values, which hardly changed.

Since there is a clear relationship between insulin resistance and hepatic steatosis, especially when risk factors such as obesity, diabetes mellitus and/or dyslipidemia coexist in an organism, and since several studies have demonstrated the efficacy of various polyphenols in preventing this metabolic disorder, we considered analyzing the effects of the combination of resveratrol and quercetin in hepatic triglyceride metabolism.

Neither polyphenols separately administered showed any liver delipidating effect. However, coadministration of both molecules was again effective at reducing hepatic triglyceride content.

The results obtained with individual administration of each polyphenol do not match the published data. Thus, in a study carried out by our group under the same experimental conditions but using a dose of 30 mg/kg body weight/d of resveratrol, decreased hepatic steatosis was observed (Aguirre *et al.*, 2014). In the study conducted by Shang *et al.* (Shang *et al.*, 2008) it was found that dietary supplementation with 100 mg/kg body weight/d of resveratrol decreased hepatic TG content after 10 weeks of treatment. In this line, Poulsen *et al.* (Poulsen *et al.*, 2012), observed similar effects after 8 weeks of 270 mg/kg body weight/d of resveratrol treatment. Regarding quercetin, Panchal *et al.* (Panchal *et al.*, 2012) showed a decrease in hepatic steatosis in rats treated for 8 weeks with 50 mg/kg body weight/d of this molecule.

The discrepancies observed between the results of other authors and those obtained in our study when polyphenols are administered individually can be attributed mainly to the dose given. In the present study, the doses used for each polyphenol were somewhat lower than in the experiments mentioned. Similarly, the length of the above treatments was over 6 weeks in most cases. Therefore, this difference in the absence of effect of each polyphenol could be caused by dose and length of therapy.



## SUMMARY

---

Doses of 15 and 30 mg/kg body weight/d of resveratrol and quercetin respectively, individually administered for 6 weeks with an obesogenic diet, are not sufficient to reduce hepatic triglyceride content. By contrast, coadministration of both polyphenols effectively reduces liver fat accumulation.

With the aim of analyzing the possible mechanisms leading to this reduction in liver fat mediated by the combination RSV+Q, two key metabolic pathways in fat controlling accumulation in this organ, lipogenesis *de novo* and fatty acids oxidation, were analyzed through the main enzymes involved in these processes (Berlanga *et al.*, 2014).

Regarding lipogenesis *de novo*, no changes were observed in the activity of FAS in any of the four experimental groups. By contrast, phosphorylation (inactivation) of ACC increased significantly in both the resveratrol and RSV+Q groups. However, in the case of resveratrol, this reduction seems to be an insufficient mechanism for reducing hepatic TG content, since this parameter was not affected. With regard to fatty acid oxidation, the CPT-1a activity analyzed was increased in RSV+Q group.

Liver delipidating effect produced by the combination of resveratrol and quercetin (RSV+Q) is mediated by a reduction of *de novo* lipogenesis and increased fatty acid  $\beta$ -oxidation.

Regarding fatty acid oxidation, the activity of citrate synthase, an enzyme commonly used as a quantitative marker for mitochondrial density (Srere *et al.*, 1969), was also measured. This time, no changes were observed in any of the experimental groups. However, since the activity of this enzyme is not the only marker of mitochondrial biogenesis, we decided to analyze the expression of three genes involved in the control of mitochondriogenesis: PPAR $\alpha$ , NRF-1 and TFAM. The results remained consistent with those shown for the citrate synthase activity, since again, no significant difference was found between experimental groups.

The increased hepatic fatty oxidation observed in RSV+Q group seems not to be mediated by mitochondrial biogenesis stimulation since none of the treatments tested led to changes in the process.

The overall conclusion of this study area that the combination of RSV+Q may provide a useful tool in the prevention and/or treatment of fatty liver associated with a high fat and high sucrose diet. In turn, increased fatty acid oxidation in the liver may contribute indirectly to reduced white adipose tissue manner.

**CONCLUSIONES/  
CONCLUSIONS**

---

---



# CONCLUSIONES

---

## CONCLUSIONES

- 1) La administración de una combinación de resveratrol y ácido linoleico conjugado (CLA) atenúa el efecto ejercido por cada molécula administrada de forma individual sobre la reducción de la acumulación de grasa corporal.
- 2) Este hecho puede estar relacionado con la ausencia de efecto de la mezcla RSV+CLA sobre las rutas metabólicas involucradas en la lipogénesis y la lipólisis, que parecen verse modificadas por estas moléculas cuando son administradas de forma individual.
- 3) El efecto beneficioso del resveratrol en el control glucémico se mantiene cuando éste es administrado conjuntamente con CLA.
- 4) La quercetina es más eficaz como molécula anti-diabética que anti-obesidad. Su capacidad para mejorar la resistencia a la insulina es independiente de la acumulación de grasa corporal y no está mediada por una disminución de la grasa intra-muscular.
- 5) La administración de una combinación de resveratrol y quercetina, a dosis que resultan ineficaces cuando estos dos compuestos son administrados de forma individual, produce una reducción de la grasa corporal, siendo así una posible herramienta para la prevención y/o el tratamiento de la obesidad.
- 6) El efecto reductor de la grasa corporal producido por la combinación de resveratrol y quercetina está mediado por una inhibición de la lipogénesis y probablemente también por un incremento de la lipólisis en el tejido adiposo blanco.
- 7) Tanto el resveratrol como la combinación de resveratrol y quercetina podrían activar la termogénesis en el tejido adiposo marrón, pero la combinación de ambos polifenoles no produce un efecto sinérgico.
- 8) La combinación de resveratrol y quercetina, y en menor medida el resveratrol sólo, producen un cambio morfológico del tejido adiposo blanco perirrenal mediante la infiltración de adipocitos "brite". La detección de UCP1 sostiene la teoría de una posible "marronización del tejido adiposo blanco" con la posibilidad de que se dé una activación de la termogénesis.
- 9) La administración de una combinación de resveratrol y quercetina a dosis que resultan ineficaces cuando estos compuestos son administrados de forma individual, previene la esteatosis hepática producida por la dieta obesogénica.
- 10) Este efecto está mediado por una reducción de la lipogénesis *de novo* y un incremento de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos en el hígado.
- 11) El aumento en la oxidación hepática de ácidos grasos inducido por la combinación de resveratrol y quercetina no parece estar mediado por una estimulación de la biogénesis mitocondrial.
- 12) Las células procedentes de un tejido adiposo blanco de ratón, cuando son tratados con una mezcla de resveratrol y quercetina, muestran una tendencia al aumento de la expresión de genes relacionados con la termogénesis.

# CONCLUSIONS

---

## CONCLUSIONS

- 1) The administration of a combination of resveratrol and conjugated linoleic acid (CLA) attenuates the effect exerted by each molecule administered individually in reducing body fat accumulation.
- 2) This effect may be related to the absence of effect of RSV+CLA mixture on metabolic pathways involved in lipogenesis and lipolysis, which appear to be modified by these molecules when administered individually.
- 3) The beneficial effect of resveratrol on glycemic control is maintained when it is administered with CLA.
- 4) Quercetin is more effective as an anti-diabetic than as an anti-obesity molecule. Its ability to improve insulin resistance is independent of the body fat accumulation and is not mediated by muscle fat delipidating effect.
- 5) The combination of resveratrol and quercetin at doses that are ineffective when these two compounds are administered individually produced a reduction in body fat, making it a potential tool for the prevention and / or the treatment of obesity.
- 6) The effect of reducing body fat observed in the RSV+Q group is mediated by an inhibition of lipogenesis and probably also by increased lipolysis in white adipose tissue of rats fed a obesogenic diet.
- 7) Both resveratrol alone and resveratrol and quercetin combined could activate thermogenesis in brown adipose tissue, but neither of the polyphenols combination produces a synergistic effect.
- 8) The combination of resveratrol and quercetin, and to a lesser extent resveratrol on its own, produce a morphological change of perirenal fat by "brite" adipocytes infiltrations. UCP1 detection in these samples theorizes the possible "browning of white adipose tissue" with the possibility that thermogenesis activation takes place.
- 9) The administration of resveratrol and quercetin at doses which are ineffective when these compounds are administered individually prevents hepatic steatosis caused by an obesogenic diet when both molecules are administered in combination.
- 10) This effect is mediated by reduced lipogenesis *de novo* and increased fatty acid oxidation in the liver.
- 11) The increase observed in hepatic fatty acid oxidation in RSV+Q group does not appear to be mediated by stimulation of mitochondrial biogenesis.
- 12) The white fat cells from mouse inguinal adipose tissue have a tendency to increase the expression of genes related to thermogenesis when treated with a mixture of resveratrol and quercetin.

**BIBLIOGRAFÍA/  
REFERENCES**

---



# BIBLIOGRAFÍA. REFERENCES

---

## BIBLIOGRAFÍA

Abellán CL (2009). Estudio de la complejación de resveratrol por diferentes tipos de ciclodextrinas. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias de la Salud, de la Actividad Física y del Deporte. Universidad Católica San Antonio de Murcia (UCAM).

Adams LA, Lymp JF, St Sauver J, Sanderson SO, Lindor KD, Feldstein A, Angulo P (2005). The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology* 129(1): 113-121.

AESAN (2013). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Informe del Comité Científico de la AESAN sobre condiciones de uso de determinadas sustancias distintas de vitaminas, minerales y plantas para ser empleadas en complementos alimenticios. Revista del Comité Científico de la AESAN, 17, pp: 11-246.

Aguirre L, Arias N, Macarulla MT, Gracia A, Portillo MP (2011). Beneficial Effects of Quercetin on Obesity and Diabetes. *Open Nutraceutical Journal*. Vol 4: 189-198

Aguirre L, Fernández-Quintela A, Arias N, Portillo MP (2014a). Resveratrol: Anti-Obesity Mechanisms of Action. *Molecules* 19(11): 18632-18655.

Aguirre L, Portillo MP, Hijona E, Bujanda L (2014b). Effects of resveratrol and other polyphenols in hepatic steatosis. *World J Gastroenterol* 20(23): 7366-7380.

Aherne SA, O'Brien NM (2002). Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition* 18(1): 75-81.

Ahn J, Cho I, Kim S, Kwon D, Ha T (2008a). Dietary resveratrol alters lipid metabolism-related gene expression of mice on an atherogenic diet. *J Hepatol* 49(6): 1019-1028.

Ahn J, Lee H, Kim S, Park J, Ha T (2008b). The anti-obesity effect of quercetin is mediated by the AMPK and MAPK signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 373(4): 545-549.

Alberdi G, Rodríguez VM, Miranda J, Macarulla MT, Arias N, Andrés-Lacueva C, Portillo MP (2011). Changes in white adipose tissue metabolism induced by resveratrol in rats. *Nutr Metab (Lond)* 8(1): 29.

Alberdi G, Rodríguez VM, Macarulla MT, Miranda J, Churruga I, Portillo MP (2013a). Hepatic lipid metabolic pathways modified by resveratrol in rats fed an obesogenic diet. *Nutrition* 29(3): 562-567.

Alberdi G, Rodríguez VM, Miranda J, Macarulla MT, Churruga I, Portillo MP (2013b). Thermogenesis is involved in the body-fat lowering effects of resveratrol in rats. *Food Chem* 141(2): 1530-1535.

Alberdi G, Macarulla MT, Portillo MP, Rodríguez VM (2014). Resveratrol does not increase body fat loss induced by energy restriction. *J Physiol Biochem* 70(2): 639-646.



## BIBLIOGRAFÍA. REFERENCES

---

Alberdi G. (2013) Efectos del resveratrol sobre el metabolismo lipídico y su posible papel en la prevención y el tratamiento de la obesidad. Tesis Doctoral, Universidad del País Vasco - Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU).

Almeida L, Vaz-da-Silva M, Falcão A, Soares E, Costa R, Loureiro AI, Fernandes-Lopes C, Rocha JF, Nunes T, Wright L, Soares-da-Silva P (2009). Pharmacokinetic and safety profile of trans-resveratrol in a rising multiple-dose study in healthy volunteers. *Mol Nutr Food Res* 53 Suppl 1: S7-15.

Andrade JM, Frade AC, Guimarães JB, Freitas KM, Lopes MT, Guimarães AL, de Paula AM, Coimbra CC, Santos SH (2014). Resveratrol increases brown adipose tissue thermogenesis markers by increasing SIRT1 and energy expenditure and decreasing fat accumulation in adipose tissue of mice fed a standard diet. *Eur J Nutr* 53(7): 1503-1510.

Andres-Lacueva C, Macarulla MT, Rotches-Ribalta M, Boto-Ordóñez M, Urpi-Sarda M, Rodríguez VM, Portillo MP (2012). Distribution of resveratrol metabolites in liver, adipose tissue, and skeletal muscle in rats fed different doses of this polyphenol. *J Agric Food Chem* 60(19): 4833-4840.

Anhê GF, Okamoto MM, Kinote A, Sollon C, Lellis-Santos C, Anhê FF, Lima GA, Hirabara SM, Velloso LA, Bordin S, Machado UF (2012). Quercetin decreases inflammatory response and increases insulin action in skeletal muscle of ob/ob mice and in L6 myotubes. *Eur J Pharmacol* 689(1-3): 285-293.

Anthonsen M, Ronnstrand L, Wernstedt C, Degerman E, Holm C (1998). Identification of novel phosphorylation sites in hormone-sensitive lipase that are phosphorylated in response to isoproterenol and govern activation properties in vitro. *J Biol Chem* 273 (1): 215-221.

Anton SD, Embry C, Marsiske M, Lu X, Doss H, Leeuwenburgh C, Manini TM (2014). Safety and metabolic outcomes of resveratrol supplementation in older adults: results of a twelve-week, placebo-controlled pilot study. *Exp Gerontol* 57: 181-187.

Aranceta J, Serra L, Pérez C, Llopis J, Mataix J, Ribas L, Tojo R, Tur JM. (2000). Las vitaminas en la alimentación de los españoles. Estudio eVe. Ed.Panamericana, Madrid.

Arévalo M (2011). Bioquímica aplicada a la clínica. <http://bioquiwik1.wikispaces.com>

Arias N, Macarulla MT, Aguirre L, Martínez-Castaño MG, Gómez-Zorita S, Miranda J, Martínez JA, Portillo MP (2011). The combination of resveratrol and conjugated linoleic acid is not useful in preventing obesity. *J Physiol Biochem* 67(3): 471-477.

Arias N, Macarulla MT, Aguirre L, Martínez-Castaño MG, Portillo MP (2014). Quercetin can reduce insulin resistance without decreasing adipose tissue and skeletal muscle fat accumulation. *Genes Nutr* 9(1): 361.

Arias N, Macarulla MT, Aguirre L, Miranda J, Gracia A, García-Ceciaga I, Portillo MP (2011). Efectos de una mezcla de resveratrol y ácido linoleico conjugado sobre la actividad de enzimas involucrados en el metabolismo de los ácidos grasos. X Congreso de la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO), Barcelona.

## BIBLIOGRAFÍA. REFERENCES

---

Asensi M, Medina I, Ortega A, Carretero J, Baño MC, Obrador E, Estrela JM (2002). Inhibition of cancer growth by resveratrol is related to its low bioavailability. *Free Radic Biol Med* 33(3): 387-398.

Aura AM, O'Leary KA, Williamson G, Ojala M, Bailey M, Puupponen-Pimiä R, Nuutila AM, Oksman-Caldentey KM, Poutanen K (2002). Quercetin derivatives are deconjugated and converted to hydroxyphenylacetic acids but not methylated by human fecal flora in vitro. *J Agric Food Chem* 50(6): 1725-1730.

Azain MJ, Hausman DB, Sisk MB, Flatt WP, Jewell DE (2000). Dietary conjugated linoleic acid reduces rat adipose tissue cell size rather than cell number. *J Nutr* 130(6): 1548-1554.

Babacanoglu C, Yildirim N, Sadi G, Pektas MB, Akar F (2013). Resveratrol prevents high-fructose corn syrup-induced vascular insulin resistance and dysfunction in rats. *Food Chem Toxicol* 60: 160-167.

Babujanarthanam R, Kavitha P, Pandian MR (2010). Quercitrin, a bioflavonoid improves glucose homeostasis in streptozotocin-induced diabetic tissues by altering glycolytic and gluconeogenic enzymes. *Fundam Clin Pharmacol* 24(3): 357-364.

Bai L, Pang WJ, Yang YJ, Yang GS (2008). Modulation of Sirt1 by resveratrol and nicotinamide alters proliferation and differentiation of pig preadipocytes. *Mol Cell Biochem* 307(1-2): 129-140.

Baile CA, Yang JY, Rayalam S, Hartzell DL, Lai CY, Andersen C, Della-Fera MA (2011). Effect of resveratrol on fat mobilization. *Ann N Y Acad Sci* 1215: 40-47.

Banni S (2002). Conjugated linoleic acid metabolism. *Curr Opin Lipidol* 13(3): 261-266.

Banni S, Day B, Evans R, Corongiu F, Lobardi B (1994). Liquid chromatography-mass spectrometric analysis of conjugated diene fatty acids in a partially hydrogenated fat. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. Vol. 1, pp 1321-1325.

Barbatelli G, Murano I, Madsen L, Hao Q, Jimenez M, Kristiansen K, Giacobino JP, De Matteis R, Cinti S (2010). The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298(6): E1244-1253.

Barber M, Clegg R, Travers M, Vernon R. (1997). Lipid metabolism in the lactating mammary gland. *Biochim Biophys Acta* 1347 (2-3) 101-126.

Barbera MJ, Schluter A, Pedraza N, Iglesias R, Villarroya F, Giralt M (2001). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activates transcription of the brown fat uncoupling protein-1 gene. A link between regulation of the thermogenic and lipid oxidation pathways in the brown fat cell. *J Biol Chem* 276(2): 1486-1493.

Barneda D, Frontini A, Cinti S, Christian M (2013). Dynamic changes in lipid droplet-associated proteins in the "browning" of white adipose tissues. *Biochim Biophys Acta* 1831(5): 924-933.

Barnes LA (2007). Obesity in children. *Fetal Pediatr Pathol* 26(2): 75-85.

## BIBLIOGRAFÍA. REFERENCES

---

Basu S, Smedman A, Vessby B (2000). Conjugated linoleic acid induces lipid peroxidation in humans. *FEBS Lett* 468(1): 33-36.

Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta EG, Le Couteur D, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, de Cabo R, Sinclair DA (2006a). Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 444(7117): 337-342.

Baur JA, Sinclair DA (2006b). Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov* 5(6): 493-506.

Bays HE, González-Campoy JM, Bray GA, Kitabchi AE, Bergman DA, Schorr AB, Rodbard HW, Henry RR (2008). Pathogenic potential of adi-POSE tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 6(3):pp 343-368.

Bensadoun A (1991). Lipoprotein lipase. *Annu Rev Nutr* 11: 217-237.

Beranger GE, Karbiener M, Barquissau V, Pisani DF, Scheideler M, Langin D, *et al.* (2013). In vitro brown and "brite"/"beige" adipogenesis: human cellular models and molecular aspects. *Biochim Biophys Acta* 1831(5): 905-914.

Berlanga A, Guiu-Jurado E, Porras JA, Auguet T (2014). Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Exp Gastroenterol* 7: 221-239.

Bertelli A, Bertelli AA, Gozzini A, Giovannini L (1998). Plasma and tissue resveratrol concentrations and pharmacological activity. *Drugs Exp Clin Res* 24(3): 133-138.

Berven LA, Crouch MF (2000). Cellular function of p70S6K: a role in regulating cell motility. *Immunol Cell Biol* 78(4): 447-451.

Bhatt JK, Thomas S, Nanjan MJ (2012). Resveratrol supplementation improves glycemic control in type 2 diabetes mellitus. *Nutr Res* 32(7): 537-541.

Bhattacharya A, Banu J, Rahman M, Causey J, Fernandes G (2006). Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease. *J Nutr Biochem* 17(12): 789-810.

Bieber LL, Abraham T, Helmrath T (1972). A rapid spectrophotometric assay for carnitine palmitoyltransferase. *Anal Biochem* 50(2): 509-518.

Bieger J, Cermak R, Blank R, de Boer VC, Hollman PC, Kamphues J, Wolfram S (2008). Tissue distribution of quercetin in pigs after long-term dietary supplementation. *J Nutr* 138(8): 1417-1420.

Bischoff SC (2008). Quercetin: potentials in the prevention and therapy of disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 11(6): 733-740.

## BIBLIOGRAFÍA. REFERENCES

---

- Bjorntorp P, Furman RH (1962). Lipolytic activity in rat epididymal fat pads. *Am J Physiol* 203: 316-322.
- Boehm O, Zur B, Koch A, Tran N, Freyenhagen R, Hartmann M, Zacharowski K (2007). Clinical chemistry reference database for Wistar rats and C57/BL6 mice. *Biol Chem* 388(5): 547-554.
- Bogacka I, Xie H, Bray GA, Smith SR (2004). The effect of pioglitazone on peroxisome proliferator-activated receptor-gamma target genes related to lipid storage in vivo. *Diabetes Care* 27(7): 1660-1667.
- Bonet ML, Oliver P, Palou A (2013). Pharmacological and nutritional agents promoting browning of white adipose tissue. *Biochim Biophys Acta* 1831(5): 969-985.
- Boocock DJ, Patel KR, Faust GE, Normolle DP, Marczylo TH, Crowell JA, Brenner DE, Booth TD, Gescher A, Steward WP (2007). Quantitation of trans-resveratrol and detection of its metabolites in human plasma and urine by high performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 848(2): 182-187.
- Boon N, Hul GB, Stegen JH, Sluijsmans WE, Valle C, Langin D, Viguerie N, Saris WH. (2007). An intervention study of the effects of calcium intake on faecal fat excretion, energy metabolism and adipose tissue mRNA expression of lipid-metabolism related proteins. *Int J Obes (Lond)* 31(11): 1704-1712.
- Boots AW, Haenen GR, Bast A (2008). Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *Eur J Pharmacol* 585(2-3): 325-337.
- Bradamante S, Barenghi L, Villa A (2004). Cardiovascular protective effects of resveratrol. *Cardiovasc Drug Rev* 22(3): 169-188.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Brehm I, Preisig-Müller R, Kindl H (1999). Grapevine protoplasts as a transient expression system for comparison of stilbene synthase genes containing cGMP-responsive promoter elements. *Z Naturforsch C* 54(3-4): 220-229.
- Brown J, McIntosh M (2003). Conjugated linoleic acid in humans: regulation of adiposity and insulin sensitivity. *J Nutr* 133(10): 3041-3046.
- Brown VA, Patel KR, Viskaduraki M, Crowell JA, Perloff M, Booth TD, Vasilinin G, Sen A, Schinas AM, Piccirilli G, Brown K, Steward WP, Gescher AJ, Brenner DE (2010). Repeat dose study of the cancer chemopreventive agent resveratrol in healthy volunteers: safety, pharmacokinetics, and effect on the insulin-like growth factor axis. *Cancer Res* 70(22): 9003-9011.
- Bruckbauer A, Zemel MB, Thorpe T, Akula MR, Stuckey AC, Osborne D, Martin EB, Kennel S, Wall JS (2012). Synergistic effects of leucine and resveratrol on insulin sensitivity and fat metabolism in adipocytes and mice. *Nutr Metab (Lond)* 9(1): 77.

## BIBLIOGRAFÍA. REFERENCES

---

- Brun LD, Gagné C, Julien P, Tremblay A, Moorjani S, Bouchard C, Lupien PJ (1989). Familial lipoprotein lipase-activity deficiency: study of total body fatness and subcutaneous fat tissue distribution. *Metabolism* 38(10): 1005-1009.
- Bujanda L, Hijona E, Larzabal M, Beraza M, Aldazabal P, García-Urkiá N, Sarasqueta C, Cosme A, Irastorza B, González A, Arenas JJ Jr (2008). Resveratrol inhibits nonalcoholic fatty liver disease in rats. *BMC Gastroenterol* 8: 40.
- Bulgarella JA, Patton D, Bull AW (2001). Modulation of prostaglandin H synthase activity by conjugated linoleic acid (CLA) and specific CLA isomers. *Lipids* 36(4): 407-412.
- Burns J, Yokota T, Ashihara H, Lean ME, Crozier A (2002). Plant foods and herbal sources of resveratrol. *J Agric Food Chem* 50(11): 3337-3340.
- Cacho J, Sevillano J, de Castro J, Herrera E, Ramos MP (2008). Validation of simple indexes to assess insulin sensitivity during pregnancy in Wistar and Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295(5): E1269-1276.
- Calabrese EJ, Mattson MP, Calabrese V (2010). Resveratrol commonly displays hormesis: occurrence and biomedical significance. *Hum Exp Toxicol* 29(12): 980-1015.
- Campos-Toimil M, Elías J, Alvarez E, Verde I, Orallo F (2007). Effects of trans- and cis-resveratrol on Ca<sup>2+</sup> handling in A7r5 vascular myocytes. *Eur J Pharmacol* 577(1-3): 91-99.
- Cantó C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, Lagouge M, Noriega L, Milne JC, Elliott PJ, Puigserver P, Auwerx J (2009). AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD<sup>+</sup> metabolism and SIRT1 activity. *Nature* 458(7241): 1056-1060.
- Cantos E, Espín JC, Fernández MJ, Oliva J, Tomás-Barberán FA (2003). Postharvest UV-C irradiated grapes as a potential source for producing stilbene-enriched red wines. *J Agric Food Chem* 51(5): 1208-1214.
- Cantos E, Espín JC, Tomás-Barberán FA (2001). Postharvest induction modeling method using UV irradiation pulses for obtaining resveratrol-enriched table grapes: a new "functional" fruit? *J Agric Food Chem* 49(10): 5052-5058.
- Cantos E, Espín JC, Tomás-Barberán FA (2002). Postharvest stilbene-enrichment of red and white table grape varieties using UV-C irradiation pulses. *J Agric Food Chem* 50(22): 6322-6329.
- Cantos E, García-Viguera C, de Pascual-Teresa S, Tomás-Barberán FA (2000). Effect of postharvest ultraviolet irradiation on resveratrol and other phenolics of cv. Napoleon table grapes. *J Agric Food Chem* 48(10): 4606-4612.
- Carey GB (1998). Mechanisms regulating adipocyte lipolysis. *Adv Exp Med Biol* 441: 157-170.
- Cascales M, Doadrio AL (2014). Lipogénesis y termogénesis: participación de la mitocondria en la obesidad. Monografía. *Real Academia Nacional de Farmacia*. <http://www.analesranf.com>
- Castaño D, Larequi E, Belza I, Astudillo AM, Martínez-Ansó E, Balsinde J, Argemi J, Aragon T, Moreno-Aliaga MJ, Muntane J, Prieto J, Bustos M (2014). Cardiotrophin-1 eliminates hepatic steatosis in obese mice by mechanisms involving AMPK activation. *J Hepatol* 60(5): 1017-1025.

## BIBLIOGRAFÍA. REFERENCES

---

- Chen S, Li Z, Li W, Shan Z, Zhu W (2011). Resveratrol inhibits cell differentiation in 3T3-L1 adipocytes via activation of AMPK. *Can J Physiol Pharmacol* 89(11): 793-799.
- Chen S, Xiao X, Feng X, Li W, Zhou N, Zheng L, Sun Y, Zhang Z, Zhu W (2012). Resveratrol induces Sirt1-dependent apoptosis in 3T3-L1 preadipocytes by activating AMPK and suppressing AKT activity and survivin expression. *J Nutr Biochem* 23(9): 1100-1112.
- Chin SF, Liu W, Storkson JM, Ha YL, Pariza MW (1992). Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. *Journal of Food Composition and Analysis*. Vol. 5, pp 185-197.
- Chirumbolo S (2010). The role of quercetin, flavonols and flavones in modulating inflammatory cell function. *Inflamm Allergy Drug Targets* 9(4): 263-285.
- Cho SJ, Jung UJ, Choi MS (2012). Differential effects of low-dose resveratrol on adiposity and hepatic steatosis in diet-induced obese mice. *Br J Nutr* 108(12): 2166-2175.
- Cianflone K, Maslowska M, Sniderman AD (1999). Acylation stimulating protein (ASP), an adipocyte autocrine: new directions. *Semin Cell Dev Biol* 10(1): 31-41.
- Cinti S (2009). Transdifferentiation properties of adipocytes in the adipose organ. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297(5): E977-986.
- Clement L, Poirier H, Niot I, Bocher V, Guerre-Millo M, Krief S, Staels B, Besnard P (2002). Dietary trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid induces hyperinsulinemia and fatty liver in the mouse. *J Lipid Res* 43(9): 1400-1409.
- Coskun O, Kanter M, Korkmaz A, Oter S (2005). Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas. *Pharmacol Res* 51(2): 117-123.
- Cottart CH, Nivet-Antoine V, Beaudeau JL (2014). Review of recent data on the metabolism, biological effects, and toxicity of resveratrol in humans. *Mol Nutr Food Res* 58(1): 7-21.
- Crandall JP, Oram V, Trandafirescu G, Reid M, Kishore P, Hawkins M, Cohen HW, Barzilai N (2012). Pilot study of resveratrol in older adults with impaired glucose tolerance. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 67(12): 1307-1312.
- Crespy V, Morand C, Manach C, Besson C, Demigne C, Remesy C (1999). Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen. *Am J Physiol* 277(1 Pt 1): G120-126.
- Crespy V, Morand C, Besson C, Manach C, Demigne C, Remesy C (2002). Quercetin, but not its glycosides, is absorbed from the rat stomach. *J Agric Food Chem* 50(3): 618-621.
- Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, Kuo FC, Palmer EL, Tseng YH, Doria A, Kolodny GM, Kahn CR (2009). Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med* 360(15): 1509-1517.
- Cypess AM, White AP, Vernochet C, Schulz TJ, Xue R, Sass CA, Huang TL, Roberts-Toler C, Weiner LS, Sze C, Chacko AT, Deschamps LN, Herder LM, Truchan N, Glasgow AL, Holman AR,

## BIBLIOGRAFÍA. REFERENCES

---

Gavrila A, Hasselgren PO, Mori MA, Molla M, Tseng YH (2013). Anatomical localization, gene expression profiling and functional characterization of adult human neck brown fat. *Nat Med* 19(5): 635-639.

Dal-Pan A, Blanc S, Aujard F (2010). Resveratrol suppresses body mass gain in a seasonal non-human primate model of obesity. *BMC Physiol* 10: 11.

Dávalos A, Castilla P, Gómez-Cordovés C, Bartolomé B (2006). Quercetin is bioavailable from a single ingestion of grape juice. *Int J Food Sci Nutr* 57(5-6): 391-398.

Day AJ, Williamson G (1999). Human metabolism of dietary quercetin glycosides. *Basic Life Sci* 66: 415-434.

Day AJ, Cañada FJ, Díaz JC, Kroon PA, Mclauchlan R, Faulds CB, Plumb GW, Morgan MR, Williamson G (2000). Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Lett* 468(2-3): 166-170.

Day AJ, Mellon F, Barron D, Sarrazin G, Morgan MR, Williamson G (2001). Human metabolism of dietary flavonoids: identification of plasma metabolites of quercetin. *Free Radic Res* 35(6): 941-952.

Day AJ, Gee JM, DuPont MS, Johnson IT, Williamson G (2003). Absorption of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside in the rat small intestine: the role of lactase phlorizin hydrolase and the sodium-dependent glucose transporter. *Biochem Pharmacol* 65(7): 1199-1206.

de Deckere EA, van Amelsvoort JM, McNeill GP, Jones P (1999). Effects of conjugated linoleic acid (CLA) isomers on lipid levels and peroxisome proliferation in the hamster. *Br J Nutr* 82(4): 309-317.

Degerman E, Landström TR, Wijkander J, Holst LS, Ahmad F, Belfrage P, Manganiello V (1998). Phosphorylation and activation of hormone-sensitive adipocyte phosphodiesterase type 3B. *Methods*. 14 (1):43-53.

Deng T, Shan S, Li PP, Shen ZF, Lu XP, Cheng J, Ning ZQ (2006). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma transcriptionally up-regulates hormone-sensitive lipase via the involvement of specificity protein-1. *Endocrinology*. 147 (2):875-84.

de Ligt M, Timmers S, Schrauwen P (2014). Resveratrol and obesity: Can resveratrol relieve metabolic disturbances? *Biochim Biophys Acta*.

De Santi C, Pietrabissa A, Spisni R, Mosca F, Pacifici GM (2000a). Sulphation of resveratrol, a natural compound present in wine, and its inhibition by natural flavonoids. *Xenobiotica* 30(9): 857-866.

De Santi C, Pietrabissa A, Spisni R, Mosca F, Pacifici GM (2000b). Sulphation of resveratrol, a natural product present in grapes and wine, in the human liver and duodenum. *Xenobiotica* 30(6): 609-617.

## BIBLIOGRAFÍA. REFERENCES

---

de Vries JH, Hollman PC, Meyboom S, Buysman MN, Zock PL, van Staveren WA, et al. (1998). Plasma concentrations and urinary excretion of the antioxidant flavonols quercetin and kaempferol as biomarkers for dietary intake. *Am J Clin Nutr* 68(1): 60-65.

Del Prado M, Hernandez-Montes H, Villalpando S (1994). Characterization of a fluorometric method for lipoprotein lipase. *Arch Med Res* 25(3): 331-335.

Delmas D, Aires V, Limagne E, Dutartre P, Mazué F, Ghiringhelli F, et al. (2011). Transport, stability, and biological activity of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci* 1215: 48-59.

Delmas D, Jannin B, Latruffe N (2005). Resveratrol: preventing properties against vascular alterations and ageing. *Mol Nutr Food Res* 49(5): 377-395.

Demizieux L, Degrace P, Gresti J, Loreau O, Noël JP, Chardigny JM, Sébédio JL, Clouet P (2002). Conjugated linoleic acid isomers in mitochondria: evidence for an alteration of fatty acid oxidation. *J Lipid Res* 43(12): 2112-2122.

Dentin R, Benhamed F, Pégorier J, Fougelle F, Viollet B, Vaulont S, Girard J, Postic C (2005). Polyunsaturated fatty acids suppress glycolytic and lipogenic genes through the inhibition of ChREBP nuclear protein translocation. *J Clin Invest* 115 (10): 2843-2854.

Desarrollo AAPPlNye (Septiembre 2014). Promoción de la Alimentación Saludable.

Doolittle MH, Ben-Zeev O, Elovson J, Martin D, Kirchgessner TG (1990). The response of lipoprotein lipase to feeding and fasting. Evidence for posttranslational regulation. *J Biol Chem* 265(8): 4570-4577.

Dudley J, Das S, Mukherjee S, Das DK (2009). Resveratrol, a unique phytoalexin present in red wine, delivers either survival signal or death signal to the ischemic myocardium depending on dose. *J Nutr Biochem* 20(6): 443-452.

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(3): 163-172.

Eckel RH, Yost TJ (1987). Weight reduction increases adipose tissue lipoprotein lipase responsiveness in obese women. *J Clin Invest* 80(4): 992-997.

Egert S, Boesch-Saadatmandi C, Wolfram S, Rimbach G, Müller MJ (2010). Serum lipid and blood pressure responses to quercetin vary in overweight patients by apolipoprotein E genotype. *J Nutr* 140(2): 278-284.

Etherton T. (2000). The biology of somatotropin in adipose tissue growth and nutrient partitioning. *J Nutr* 130 (11): 2623-2625.

Evans M, Brown J, McIntosh M (2002a). Isomer-specific effects of conjugated linoleic acid (CLA) on adiposity and lipid metabolism. *J Nutr Biochem* 13(9): 508.

Evans M, Lin X, Odle J, McIntosh M (2002b). Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid increases fatty acid oxidation in 3T3-L1 preadipocytes. *J Nutr* 132(3): 450-455.



## BIBLIOGRAFÍA. REFERENCES

---

Faulconnier Y, Arnal MA, Patureau Mirand P, Chardigny JM, Chilliard Y (2004). Isomers of conjugated linoleic acid decrease plasma lipids and stimulate adipose tissue lipogenesis without changing adipose weight in post-prandial adult sedentary or trained Wistar rat. *J Nutr Biochem* 15(12): 741-748.

FDA Food and Drug Administration (2010). GRAS (Generally Recognize As Safe) notice for high-purity quercetin.

Fernandez-Marcos PJ, Auwerx J (2011). Regulation of PGC-1 $\alpha$ , a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. *Am J Clin Nutr* 93(4): 884S-890.

Fischer-Posovszky P, Kukulius V, Tews D, Unterkircher T, Debatin KM, Fulda S, et al. (2010). Resveratrol regulates human adipocyte number and function in a Sirt1-dependent manner. *Am J Clin Nutr* 92(1): 5-15.

Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem FIELD Full Journal Title: The Journal of biological chemistry* 226(1): 497-509.

Frémont L (2000). Biological effects of resveratrol. *Life Sci* 66(8): 663-673.

Frontini A, Giordano A (2010). Leptin-sensitive neurons in mouse preoptic area express alpha 1A- and alpha 2A-adrenergic receptor isoforms. *Neurosci Lett* 471(2): 83-88.

Fuster A, Oliver P, Sánchez J, Picó C, Palou A (2009). UCP1 and oxidative capacity of adipose tissue in adult ferrets (*Mustela putorius furo*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 153(2): 106-112.

Gallardo PG Biodisponibilidad y efecto de la Quercetina (2012). Tesis Doctoral. Universidad de Granada, España.

Gambini J, López-Grueso R, Olaso-González G, Inglés M, Abdelazid K, El Alami M, Bonet-Costa V, Borrás C, Viña J (2013). Resveratrol: distribution, properties and perspectives. *Rev Esp Geriatr Gerontol* 48(2): 79-88.

Gaullier JM, Halse J, Høye K, Kristiansen K, Fagertun H, Vik H, et al. (2004). Conjugated linoleic acid supplementation for 1 y reduces body fat mass in healthy overweight humans. *Am J Clin Nutr* 79(6): 1118-1125.

Gee JM, DuPont MS, Day AJ, Plumb GW, Williamson G, Johnson IT (2000). Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway. *J Nutr* 130(11): 2765-2771.

Gescher A, Steward WP, Brown K (2013). Resveratrol in the management of human cancer: how strong is the clinical evidence? *Ann N Y Acad Sci* 1290: 12-20.

Goldberg DM, Yan J, Soleas GJ (2003). Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. *Clin Biochem* 36(1): 79-87.

## BIBLIOGRAFÍA. REFERENCES

---

- Gómez-Zorita S, Fernández-Quintela A, Macarulla MT, Aguirre L, Hijona E, Bujanda L, et al. (2012). Resveratrol attenuates steatosis in obese Zucker rats by decreasing fatty acid availability and reducing oxidative stress. *Br J Nutr* 107(2): 202-210.
- Gomez-Zorita S, Tréguer K, Mercader J, Carpéné C (2013). Resveratrol directly affects in vitro lipolysis and glucose transport in human fat cells. *J Physiol Biochem* 69(3): 585-593.
- Gómez-Zorita S, Fernández-Quintela A, Lasa A, Hijona E, Bujanda L, Portillo MP (2013). Effects of resveratrol on obesity-related inflammation markers in adipose tissue of genetically obese rats. *Nutrition* 29(11-12): 1374-1380.
- Gonzalez-Baró MR, Lewin TM, Coleman RA (2007). Regulation of Triglyceride Metabolism. II. Function of mitochondrial GPAT1 in the regulation of triacylglycerol biosynthesis and insulin action. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292(5): G1195-1199.
- González-Barrio R, Beltrán D, Cantos E, Gil MI, Espín JC, Tomás-Barberán FA (2006). Comparison of ozone and UV-C treatments on the postharvest stilbenoid monomer, dimer, and trimer induction in var. 'Superior' white table grapes. *J Agric Food Chem* 54(12): 4222-4228.
- Graefe EU, Wittig J, Mueller S, Riethling AK, Uehleke B, Drewelow B, et al. (2001). Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *J Clin Pharmacol* 41(5): 492-499.
- Griinari JM, Corl BA, Lacy SH, Chouinard PY, Nurmela KV, Bauman DE (2000). Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by Delta(9)-desaturase. *J Nutr* 130 (9): 2285-2291.
- Gunawardana SC, Piston DW (2012). Reversal of type 1 diabetes in mice by brown adipose tissue transplant. *Diabetes* 61(3): 674-682.
- Guo Y, Bruno RS (2015). Endogenous and exogenous mediators of quercetin bioavailability. *J Nutr Biochem* 26(3): 201-210.
- Ha YL, Grimm NK, Pariza MW (1987). Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis* 8(12): 1881-1887.
- Ha YL, Storkson J, Pariza MW (1990). Inhibition of benzo(a)pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. *Cancer Res* 50(4): 1097-1101.
- Han JJ, Hao J, Kim CH, Hong JS, Ahn HY, Lee YS (2009). Quercetin prevents cardiac hypertrophy induced by pressure overload in rats. *J Vet Med Sci* 71(6): 737-743.
- Hannah V, Ou J, Luong A, Goldstein J, Brown M (2001). Unsaturated fatty acids down-regulate srebp isoforms 1a and 1c by two mechanisms in HEK-293 cells. *J Biol Chem* 276 (6): 4365-4372.
- Hansen IR. The Secretome of Brown adipose tissue. (2014). Doctoral Thesis in Physiology at Stockholm University, Sweden.

## BIBLIOGRAFÍA. REFERENCES

---

Hardie D. (1989). Regulation of fatty acid synthesis via phosphorylation of acetyl-CoA carboxylase. *Prog Lipid Res* 28 (2): 117-146.

Harwood M, Danielewska-Nikiel B, Borzelleca JF, Flamm GW, Williams GM, Lines TC (2007). A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. *Food Chem Toxicol* 45(11): 2179-2205.

Heber D (2004). Vegetables, fruits and phytoestrogens in the prevention of diseases. *J Postgrad Med* 50(2): 145-149.

Hegarty BD, Furler SM, Ye J, Cooney GJ, Kraegen EW (2003). The role of intramuscular lipid in insulin resistance. *Acta Physiol Scand* 178(4): 373-383.

Herrera F, Betancur D, Segura MR (2014). Compuestos bioactivos de la dieta con potencial en la prevención de patologías relacionadas con sobrepeso y obesidad; péptidos biológicamente activos. Dietary bioactive compounds with potential in preventing pathologies related with overweight and obesity;biologically active peptides. *Nutr Hosp.* 29(1):10-20.

Hertog MG, Hollman PC (1996). Potential health effects of the dietary flavonol quercetin. *Eur J Clin Nutr* 50(2): 63-71.

Hertog MG, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F, et al. (1995). Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med* 155(4): 381-386.

Himms-Hagen J, Melnyk A, Zingaretti MC, Ceresi E, Barbatelli G, Cinti S (2000). Multilocular fat cells in WAT of CL-316243-treated rats derive directly from white adipocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 279(3): C670-681.

Hoek-van den Hil EF, van Schothorst EM, van der Stelt I, Swarts HJ, Venema D, Sailer M, et al. (2014). Quercetin decreases high-fat diet induced body weight gain and accumulation of hepatic and circulating lipids in mice. *Genes Nutr* 9(5): 418.

Hollman PC, Bijlsman MN, van Gameren Y, Cnossen EP, de Vries JH, Katan MB (1999a). The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Radic Res* 31(6): 569-573.

Hollman PC, Katan MB (1999b). Health effects and bioavailability of dietary flavonols. *Free Radic Res* 31 Suppl: S75-80.

Hollman PC, de Vries JH, van Leeuwen SD, Mengelers MJ, Katan MB (1995). Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am J Clin Nutr* 62(6): 1276-1282.

Holm C (2003). Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochem Soc Trans* 31(Pt 6): 1120-1124.

## BIBLIOGRAFÍA. REFERENCES

---

Houseknecht KL, Vanden Heuvel JP, Moya-Camarena SY, Portocarrero CP, Peck LW, Nickel KP, *et al.* (1998). Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty fa/fa rat. *Biochem Biophys Res Commun* 244(3): 678-682.

Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B, Sinclair DA (2003). Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 425(6954): 191-196.

Hsu CL, Yen GC (2006). Induction of cell apoptosis in 3T3-L1 pre-adipocytes by flavonoids is associated with their antioxidant activity. *Mol Nutr Food Res* 50(11): 1072-1079.

Hu P, Zhao L, Chen J (2014). Physiologically achievable doses of resveratrol enhance 3T3-L1 adipocyte differentiation. *Eur J Nutr.*

Hui E, Xu A, Bo Yang H, Lam KS (2013). Obesity as the common soil of non-alcoholic fatty liver disease and diabetes: Role of adipokines. *J Diabetes Investig* 4(5): 413-425.

Hulver MW, Dohm GL (2004). The molecular mechanism linking muscle fat accumulation to insulin resistance. *Proc Nutr Soc* 63(2): 375-380.

Huss JM, Torra IP, Staels B, Giguère V, Kelly DP (2004). Estrogen-related receptor alpha directs peroxisome proliferator-activated receptor alpha signaling in the transcriptional control of energy metabolism in cardiac and skeletal muscle. *Mol Cell Biol* 24(20): 9079-9091.

IARC (1999). Quercetin. *Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 73: 497-515.

Ip MM, Masso-Welch PA, Shoemaker SF, Shea-Eaton WK, Ip C (1999). Conjugated linoleic acid inhibits proliferation and induces apoptosis of normal rat mammary epithelial cells in primary culture. *Exp Cell Res* 250(1): 22-34.

Jaworski K, Sarkadi-Nagy E, Duncan RE, Ahmadian M, Sul HS (2007). Regulation of triglyceride metabolism. IV. Hormonal regulation of lipolysis in adipose tissue. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 293 (1):G1-4.

Jannin B, Menzel M, Berlot JP, Delmas D, Lançon A, Latruffe N (2004). Transport of resveratrol, a cancer chemopreventive agent, to cellular targets: plasmatic protein binding and cell uptake. *Biochem Pharmacol* 68(6): 1113-1118.

Jeffcoat R. (2007) Obesity - a perspective based on the biochemical interrelationship of lipids and carbohydrates. *Med Hypotheses.* 68(5):1159-71.

Jenkins CM, Mancuso DJ, Yan W, Sims HF, Gibson B, Gross RW (2004). Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities. *J Biol Chem* 279(47): 48968-48975.

Jeong SM, Kang MJ, Choi HN, Kim JH, Kim JI (2012). Quercetin ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia and improves antioxidant status in type 2 diabetic db/db mice. *Nutr Res Pract* 6(3): 201-207.

## BIBLIOGRAFÍA. REFERENCES

---

Jespersen NZ, Larsen TJ, Peijs L, Daugaard S, Homøe P, Loft A, et al. (2013). A classical brown adipose tissue mRNA signature partly overlaps with brite in the supraclavicular region of adult humans. *Cell Metab* 17(5): 798-805.

Jiang WJ (2008). Sirtuins: novel targets for metabolic disease in drug development. *Biochem Biophys Res Commun* 373(3): 341-344.

Jump DB, Clarke SD, Thelen A, Liimatta M (1994). Coordinate regulation of glycolytic and lipogenic gene expression by polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res* 35(6): 1076-1084.

Jung CH, Cho I, Ahn J, Jeon TI, Ha TY (2013). Quercetin reduces high-fat diet-induced fat accumulation in the liver by regulating lipid metabolism genes. *Phytother Res* 27(1): 139-143.

Jung JY, Lim Y, Moon MS, Kim JY, Kwon O (2011). Onion peel extracts ameliorate hyperglycemia and insulin resistance in high fat diet/streptozotocin-induced diabetic rats. *Nutr Metab (Lond)* 8(1): 18.

Kang K, Miyazaki M, Ntambi JM, Pariza MW (2004). Evidence that the anti-obesity effect of conjugated linoleic acid is independent of effects on stearoyl-CoA desaturase1 expression and enzyme activity. *Biochem Biophys Res Commun* 315(3): 532-537.

Kang W, Hong HJ, Guan J, Kim DG, Yang EJ, Koh G, et al. (2012). Resveratrol improves insulin signaling in a tissue-specific manner under insulin-resistant conditions only: in vitro and in vivo experiments in rodents. *Metabolism* 61(3): 424-433.

Kannel WB, Cupples LA, Ramaswami R, Stokes J, Kreger BE, Higgins M (1991). Regional obesity and risk of cardiovascular disease; the Framingham Study. *J Clin Epidemiol* 44(2): 183-190.

Kaplan NM (1989). The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. *Arch Intern Med* 149(7): 1514-1520.

Kelly GS (2001). Conjugated linoleic acid: a review. *Altern Med Rev* 6(4): 367-382.

Kennedy A, Overman A, Lapoint K, Hopkins R, West T, Chuang CC, et al. (2009). Conjugated linoleic acid-mediated inflammation and insulin resistance in human adipocytes are attenuated by resveratrol. *J Lipid Res* 50(2): 225-232.

Kerner J, Distler AM, Minkler P, Parland W, Peterman SM, Hoppel CL (2004). Phosphorylation of rat liver mitochondrial carnitine palmitoyltransferase-I: effect on the kinetic properties of the enzyme. *J Biol Chem* 279(39): 41104-41113.

Kershaw E, Hamm J, Verhagen L, Peroni O, Katic M, Flier J (2006). Adipose triglyceride lipase: function, regulation by insulin, and comparison with adiponutrin. *Diabetes* 55 (1): 148-157.

Kersten S (2014). Physiological regulation of lipoprotein lipase. *Biochim Biophys Acta* 1841(7): 919-933.

Kersten S, Seydoux J, Peters JM, Gonzalez FJ, Desvergne B, Wahli W (1999). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest* 103(11): 1489-1498.

## BIBLIOGRAFÍA. REFERENCES

---

Kim DH, Jung EA, Sohng IS, Han JA, Kim TH, Han MJ (1998). Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities. *Arch Pharm Res* 21(1): 17-23.

Kim JH, Kang MJ, Choi HN, Jeong SM, Lee YM, Kim JI (2011). Quercetin attenuates fasting and postprandial hyperglycemia in animal models of diabetes mellitus. *Nutr Res Pract* 5(2): 107-111.

Kim JH, Mynatt RL, Moore JW, Woychik RP, Moustaid N, Zemel MB (1996). The effects of calcium channel blockade on agouti-induced obesity. *FASEB J* 10(14): 1646-1652.

Kim JY, van de Wall E, Laplante M, Azzara A, Trujillo ME, Hofmann SM, Schraw T, Durand JL, Li H, Li G, Jelicks LA, Mehler MF, Hui DY, Deshaies Y, Shulman GI, Schwartz GJ, Scherer PE. (2007). Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *J Clin Invest* 117(9): 2621-2637.

Kim MR, Park Y, Albright KJ, Pariza MW (2002). Differential responses of hamsters and rats fed high-fat or low-fat diets supplemented with conjugated linoleic acid. *Nutrition research (New York, N.Y.)* 22(6): 715-722.

Kissebah AH, Vydellingum N, Murray R, Evans DJ, Hartz AJ, Kalkhoff RK, Adams PW. (1982). Relation of body fat distribution to metabolic complications of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 54(2): 254-260.

Knab AM, Shanely RA, Henson DA, Jin F, Heinz SA, Austin MD, et al. (2011). Influence of quercetin supplementation on disease risk factors in community-dwelling adults. *J Am Diet Assoc* 111(4): 542-549.

Kobori M, Masumoto S, Akimoto Y, Oike H (2011). Chronic dietary intake of quercetin alleviates hepatic fat accumulation associated with consumption of a Western-style diet in C57/BL6J mice. *Mol Nutr Food Res* 55(4): 530-540.

Koh YJ, Park BH, Park JH, Han J, Lee IK, Park JW, et al. (2009). Activation of PPAR gamma induces profound multilocularization of adipocytes in adult mouse white adipose tissues. *Exp Mol Med* 41(12): 880-895.

Kopelman PG (2000). Obesity as a medical problem. *Nature* 404(6778): 635-643.

Kramer JK, Sehat N, Dugan ME, Mossoba MM, Yurawecz MP, Roach JA, et al. (1998). Distributions of conjugated linoleic acid (CLA) isomers in tissue lipid classes of pigs fed a commercial CLA mixture determined by gas chromatography and silver ion-high-performance liquid chromatography. *Lipids* 33(6): 549-558.

Krotkiewski M, Björntorp P, Sjöström L, Smith U (1983). Impact of obesity on metabolism in men and women. Importance of regional adipose tissue distribution. *J Clin Invest* 72(3): 1150-1162.

Kroupa O, Vorrjö E, Stienstra R, Mattijssen F, Nilsson SK, Sukonina V, et al. (2012). Linking nutritional regulation of Angptl4, Gpihbp1, and Lmf1 to lipoprotein lipase activity in rodent adipose tissue. *BMC Physiol* 12: 13.

## BIBLIOGRAFÍA. REFERENCES

---

- Kulkarni SS, Cantó C (2014). The molecular targets of Resveratrol. *Biochim Biophys Acta*.
- Kuppusamy UR, Das NP (1992). Effects of flavonoids on cyclic AMP phosphodiesterase and lipid mobilization in rat adipocytes. *Biochem Pharmacol* 44(7): 1307-1315.
- Kwon JY, Seo SG, Yue S, Cheng JX, Lee KW, Kim KH (2012). An inhibitory effect of resveratrol in the mitotic clonal expansion and insulin signaling pathway in the early phase of adipogenesis. *Nutr Res* 32(8): 607-616.
- Kwon O, Eck P, Chen S, Corpe CP, Lee JH, Kruhlak M, et al. (2007). Inhibition of the intestinal glucose transporter GLUT2 by flavonoids. *FASEB J* 21(2): 366-377.
- Kwon O, Eck P, Chen S, Corpe CP, Lee JH, Kruhlak M, et al. (2007). Inhibition of the intestinal glucose transporter GLUT2 by flavonoids. *FASEB J* 21(2): 366-377.
- Lafontan M, Berlan M (2003). Do regional differences in adipocyte biology provide new pathophysiological insights? *Trends Pharmacol Sci* 24(6): 276-283.
- 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(6): 1109-1122.
- Lane MD, Moss J, Polakis SE (1974). Acetyl coenzyme A carboxylase. *Curr Top Cell Regul* 8(0): 139-195.
- Lane MD, Flores-Riveros JR, Hresko RC, Kaestner KH, Liao K, Janicot M, et al. (1990). Insulin-receptor tyrosine kinase and glucose transport. *Diabetes Care* 13(6): 565-575.
- Langcake P, Pryce RJ (1977). A new class of phytoalexins from grapevines. *Experientia* 33(2): 151-152.
- Langin D. (2006) Control of fatty acid and glycerol release in adipose tissue lipolysis. *C R Biol.* 329 (8):598-607.
- Larsen TM, Toubro S, Astrup A (2003). Efficacy and safety of dietary supplements containing CLA for the treatment of obesity: evidence from animal and human studies. *J Lipid Res* 44(12): 2234-2241.
- Lasa A. (2010) *Ácido Linoléico Conjugado y Resveratrol: efecto de estos ingredientes funcionales sobre el metabolismo de los triglicéridos y la adiposidad.* Tesis Doctoral., Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU).
- Lasa A, Churrua I, Eseberri I, Andrés-Lacueva C, Portillo MP (2012a). Delipidating effect of resveratrol metabolites in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Nutr Food Res* 56(10): 1559-1568.
- Lasa A, Schweiger M, Kotzbeck P, Churrua I, Simón E, Zechner R, et al. (2012b). Resveratrol regulates lipolysis via adipose triglyceride lipase. *J Nutr Biochem* 23(4): 379-384.

## BIBLIOGRAFÍA. REFERENCES

---

Latasa M, Moon Y, Kim K, Sul H. (2000). Nutritional regulation of the fatty acid synthase promoter in vivo: sterol regulatory element binding protein functions through an upstream region containing a sterol regulatory element. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(19): 10619-10624.

Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM (2001). *Lehninger Principles of Biochemistry*. Third edition.

Lekakis J, Rallidis LS, Andreadou I, Vamvakou G, Kazantzoglou G, Magiatis P, et al. (2005). Polyphenolic compounds from red grapes acutely improve endothelial function in patients with coronary heart disease. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 12(6): 596-600.

Levi F, Pasche C, Lucchini F, Ghidoni R, Ferraroni M, La Vecchia C (2005). Resveratrol and breast cancer risk. *Eur J Cancer Prev* 14(2): 139-142.

Li JJ, Huang CJ, Xie D (2008). Anti-obesity effects of conjugated linoleic acid, docosahexaenoic acid, and eicosapentaenoic acid. *Mol Nutr Food Res* 52(6): 631-645.

Liang C, Oest ME, Prater MR (2009). Intrauterine exposure to high saturated fat diet elevates risk of adult-onset chronic diseases in C57BL/6 mice. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 86(5): 377-384.

Liang G, Yang J, Horton J, Hammer R, Goldstein J, Brown M (2002). Diminished hepatic response to fasting/refeeding and liver X receptor agonists in mice with selective deficiency of sterol regulatory element-binding protein-1c. *J Biol Chem* 277 (11): 9520-9528.

Lichtenstein L, Berbée JF, van Dijk SJ, van Dijk KW, Bensadoun A, Kema IP, et al. (2007). Angptl4 upregulates cholesterol synthesis in liver via inhibition of LPL- and HL-dependent hepatic cholesterol uptake. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27(11): 2420-2427.

Lidell ME, Betz MJ, Dahlqvist Leinhard O, Heglind M, Elander L, Slawik M, et al. (2013). Evidence for two types of brown adipose tissue in humans. *Nat Med* 19(5): 631-634.

Liew C, Schut HA, Chin SF, Pariza MW, Dashwood RH (1995). Protection of conjugated linoleic acids against 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline-induced colon carcinogenesis in the F344 rat: a study of inhibitory mechanisms. *Carcinogenesis* 16(12): 3037-3043.

Liu BL, Zhang X, Zhang W, Zhen HN (2007). New enlightenment of French Paradox: resveratrol's potential for cancer chemoprevention and anti-cancer therapy. *Cancer Biol Ther* 6(12): 1833-1836.

Livak K, Schmittgen T (2001a). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup> Method. *Methods* 25(4): 402-408.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001b). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup> Method. *Methods* 25(4): 402-408.

Lodhi IJ, Wei X, Semenkovich C (2011). Lipoexpediency: de novo lipogenesis as a metabolic signal transmitter. *Trends Endocrinol Metab.* 22(1):1-8

Loncar D (1991). Convertible adipose tissue in mice. *Cell Tissue Res* 266(1): 149-161.



## BIBLIOGRAFÍA. REFERENCES

---

Londos C, Brasaemle DL, Schultz CJ, Segrest JP, Kimmel AR (1999). Perilipins, ADRP, and other proteins that associate with intracellular neutral lipid droplets in animal cells. *Semin Cell Dev Biol* 10(1): 51-58.

Loor JJ, Lin X, Herbein JH (2002). Dietary trans-vaccenic acid (trans11-18:1) increases concentration of cis9,trans11-conjugated linoleic acid (rumenic acid) in tissues of lactating mice and suckling pups. *Reprod Nutr Dev* 42(2): 85-99.

Lopaschuk GD, Ussher JR, Folmes CD, Jaswal JS, Stanley WC (2010). Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol Rev* 90(1): 207-258.

Louet JF, Le May C, Pégorier JP, Decaux JF, Girard J (2001). Regulation of liver carnitine palmitoyltransferase I gene expression by hormones and fatty acids. *Biochem Soc Trans* 29(Pt 2): 310-316.

López RJ (2005). Función y biogénesis mitocondrial. Diferencias entre géneros. Tesis Doctoral. Universitat de les Illes Balears.

Lowell BB, S-Susulic V, Hamann A, Lawitts JA, Himms-Hagen J, Boyer BB, *et al.* (1993). Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. *Nature* 366(6457): 740-742.

Macarulla MT, Alberdi G, Gómez S, Tueros I, Bald C, Rodríguez VM, *et al.* (2009a). Effects of different doses of resveratrol on body fat and serum parameters in rats fed a hypercaloric diet. *J Physiol Biochem* 65(4): 369-376.

Macarulla MT, Alberdi G, Gómez S, Tueros I, Bald C, Rodríguez VM, *et al.* (2009b). Effects of different doses of resveratrol on body fat and serum parameters in rats fed a hypercaloric diet. *J Physiol Biochem* 65(4): 369-376.

Macarulla MT, Fernández-Quintela A, Zabala A, Navarro V, Echevarría E, Churrua I, *et al.* (2005). Effects of conjugated linoleic acid on liver composition and fatty acid oxidation are isomer-dependent in hamster. *Nutrition* 21(4): 512-519.

Macarulla MT, Medina C, De Diego MA, Chávarri M, Zulet MA, Martínez JA, *et al.* (2001). Effects of the whole seed and a protein isolate of faba bean (*Vicia faba*) on the cholesterol metabolism of hypercholesterolaemic rats. *Br J Nutr* 85(5): 607-614.

MacDonald HB (2000). Conjugated linoleic acid and disease prevention: a review of current knowledge. *J Am Coll Nutr* 19(2 Suppl): 111S-118S.

Maier-Salamon A, Hagenauer B, Reznicek G, Szekeres T, Thalhammer T, Jäger W (2008). Metabolism and disposition of resveratrol in the isolated perfused rat liver: role of Mrp2 in the biliary excretion of glucuronides. *J Pharm Sci* 97(4): 1615-1628.

Manach C, Morand C, Crespy V, Demigné C, Texier O, Régéat F, *et al.* (1998). Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. *FEBS Lett* 426(3): 331-336.

## BIBLIOGRAFÍA. REFERENCES

---

Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* 81(1 Suppl): 230S-242S.

Marcano Y, Ayala L, Verdi B, Lairet C, Maldonado M, de Vegas. J (2006). Funciones endocrinas del tejido adiposo. *Rev Venez Endocrinol Metab* 4: 15-21.

Marchal J, Pifferi F, Aujard F (2013). Resveratrol in mammals: effects on aging biomarkers, age-related diseases, and life span. *Ann N Y Acad Sci* 1290: 67-73.

Marier JF, Vachon P, Gritsas A, Zhang J, Moreau JP, Ducharme MP (2002). Metabolism and disposition of resveratrol in rats: extent of absorption, glucuronidation, and enterohepatic recirculation evidenced by a linked-rat model. *J Pharmacol Exp Ther* 302(1): 369-373.

Martin JC, Grégoire S, Siess MH, Genty M, Chardigny JM, Berdeaux O, *et al.* (2000). Effects of conjugated linoleic acid isomers on lipid-metabolizing enzymes in male rats. *Lipids* 35(1): 91-98.

Martin JC, Valeille K (2002). Conjugated linoleic acids: all the same or to everyone its own function? *Reprod Nutr Dev* 42(6): 525-536.

Martínez-Flórez S, González-Gallego J, Culebras JM, Tuñón MJ (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*. 17 (6):271-278.

Martino VS (2000). Los Flavonoides como Promisorios Agentes Preventivos y Terapéuticos. *Acta Farm. Bonaerense*. Vol. 4, pp 303-308.

Mater MK, Thelen AP, Jump DB (1999). Arachidonic acid and PGE2 regulation of hepatic lipogenic gene expression. *J Lipid Res* 40(6): 1045-1052.

Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28(7): 412-419.

Medina-Gómez G, Vidal-Puig A (2009). Tejido adiposo como diana terapéutica en la obesidad. *Endocrinol y Nutr*. 56 (8): 404-411.

Menet MC, Marchal J, Dal-Pan A, Taghi M, Nivet-Antoine V, Dargère D, Laprévotte O, Beaudoux JL, Aujard F, Epelbaum J, Cottart CH (2014). Resveratrol metabolism in a non-human primate, the grey mouse lemur (*Microcebus murinus*), using ultra-high-performance liquid chromatography-quadrupole time of flight. *PLoS One* 9(3): e91932.

Meng X, Maliakal P, Lu H, Lee MJ, Yang CS (2004). Urinary and plasma levels of resveratrol and quercetin in humans, mice, and rats after ingestion of pure compounds and grape juice. *J Agric Food Chem* 52(4): 935-942.

Merkel M, Weinstock PH, Chajek-Shaul T, Radner H, Yin B, Breslow JL, Goldberg IJ. (1998) Lipoprotein lipase expression exclusively in liver. A mouse model for metabolism in the neonatal period and during cachexia. *J Clin Invest*. 102(5):893-901.

## BIBLIOGRAFÍA. REFERENCES

---

Miller CC, Park Y, Pariza MW, Cook ME (1994). Feeding conjugated linoleic acid to animals partially overcomes catabolic responses due to endotoxin injection. *Biochem Biophys Res Commun* 198(3): 1107-1112.

Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Müller C, Carling D, et al. (2002). Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* 415(6869): 339-343.

Miranda J, Fernández-Quintela A, Churruga I, Rodríguez VM, Simón E, Portillo MP (2009a). Hepatomegaly induced by trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid in adult hamsters fed an atherogenic diet is not associated with steatosis. *J Am Coll Nutr* 28(1): 43-49.

Miranda J, Fernández-Quintela A, Macarulla MT, Churruga I, García C, Rodríguez VM, et al. (2009b). A comparison between CLNA and CLA effects on body fat, serum parameters and liver composition. *J Physiol Biochem* 65(1): 25-32.

Miranda J, Churruga I, Fernández-Quintela A, Rodríguez VM, Macarulla MT, Simón E, et al. (2009c). Weak effect of trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid on body fat accumulation in adult hamsters. *Br J Nutr* 102(11): 1583-1589.

Miranda J (2010). Efecto reductor de ácidos grasos conjugados sobre la grasa corporal. Tesis doctoral. Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU)

Miyoshi H, Souza S, Zhang H, Strissel K, Christoffolete M, Kovsan J et al (2006). Perilipin promotes hormone-sensitive lipase-mediated adipocyte lipolysis via phosphorylation dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem* 281 (23): 15837-15844.

Miyoshi H, Perfield JW, Obin MS, Greenberg AS (2008). Adipose triglyceride lipase regulates basal lipolysis and lipid droplet size in adipocytes. *J Cell Biochem* 105(6): 1430-1436.

Montero JC (2001). Obesidad: una visión antropológica. Departamento de humanidades médicas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Moon Y, Shah N, Mohapatra S, Warrington J, Horton J. (2001). Identification of a mammalian long chain fatty acyl elongase regulated by sterol regulatory element-binding proteins. *J Biol Chem* 276 (48): 45358-45366.

Moon YJ, Wang L, DiCenzo R, Morris ME (2008). Quercetin pharmacokinetics in humans. *Biopharm Drug Dispos* 29(4): 205-217.

Motoyashiki T, Morita T, Ueki H (1996). Involvement of the rapid increase in cAMP content in the vanadate-stimulated release of lipoprotein lipase activity from rat fat pads. *Biol Pharm Bull* 19(11): 1412-1416.

Movahed A, Nabipour I, Lieben Louis X, Thandapilly SJ, Yu L, Kalantarhormozi M, et al. (2013). Antihyperglycemic effects of short term resveratrol supplementation in type 2 diabetic patients. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013: 851267.

Mullen W, Rouanet JM, Auger C, Teissèdre PL, Caldwell ST, Hartley RC, et al. (2008). Bioavailability of [2-(14)C]quercetin-4'-glucoside in rats. *J Agric Food Chem* 56(24): 12127-12137.

## BIBLIOGRAFÍA. REFERENCES

---

Nagase I, Yoshida T, Kumamoto K, Umekawa T, Sakane N, Nikami H, et al. (1996). Expression of uncoupling protein in skeletal muscle and white fat of obese mice treated with thermogenic beta 3-adrenergic agonist. *J Clin Invest* 97(12): 2898-2904.

Nakae J, Park B, Accili D. (1999). Insulin stimulates phosphorylation of the forkhead transcription factor FKHR on serine 253 through a Wortmannin-sensitive pathway. *J Biol Chem* 274 (23): 15982-15985.

Nature Education. Reactions of beta oxidation (2010). <http://www.nature.com>

Navarro V, Miranda J, Churrua I, Fernández-Quintela A, Rodríguez V, Portillo M (2006). Effects of trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid on body fat and serum lipids in young and adult hamsters. *J Physiol Biochem* 62(2): 81-87.

Navarro V, Zabala A, Macarulla MT, Fernandez-Quintela A, Rodriguez VM, Simon E, et al. (2003). Effects of conjugated linoleic acid on body fat accumulation and serum lipids in hamsters fed an atherogenic diet. *J Physiol Biochem* 59(3): 193-199.

Nedergaard J, Golozoubova V, Matthias A, Asadi A, Jacobsson A, Cannon B (2001). UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. *Biochim Biophys Acta* 1504(1): 82-106.

Nelson DL, Cox MM. (2005). Lehninger Principles of Biochemistry, 4th Edition edn.

Neveu V, Perez-Jiménez J, Vos F, Crespy V, du Chaffaut L, Mennen L, Knox C, Eisner R, Cruz J, Wishart D, Scalbert A (2010). Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database (Oxford)*: bap024. [www.phenol-explorer.eu](http://www.phenol-explorer.eu).

Nieman DC, Williams AS, Shanely RA, Jin F, McAnulty SR, Triplett NT, et al. (2010). Quercetin's influence on exercise performance and muscle mitochondrial biogenesis. *Med Sci Sports Exerc* 42(2): 338-345.

Nikkilä EA, Taskinen MR, Rehunen S, Härkönen M (1978). Lipoprotein lipase activity in adipose tissue and skeletal muscle of runners: relation to serum lipoproteins. *Metabolism* 27(11): 1661-1667.

Nonomura S, Kanagawa H, Makimoto A (1963). Chemical constituents of polygonaceus plants I. Studies on the components of Ko-Jo-kon (*Polygonum cuspidatum* SIEB. ET. ZUCC. *Yakugaku Zasshi*. 83: 988-990.

Ntambi JM (1995). Cellular differentiation and dietary regulation of gene expression. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 52(2-3): 117-120.

Ntambi JM, Young-Cheul K (2000). Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr* 130(12): 3122S-3126S.

NTP: National Toxicology Program (1992). Toxicology and Carcinogenesis Studies of Quercetin in F344 Rats (Feed Studies). (CAS No. 117-39-5). *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser* 409: 1-171.

## BIBLIOGRAFÍA. REFERENCES

---

Nudda A, McGuire MA, Battacone G, Pulina G (2005). Seasonal variation in conjugated linoleic acid and vaccenic acid in milk fat of sheep and its transfer to cheese and ricotta. *J Dairy Sci* 88(4): 1311-1319.

Németh K, Plumb GW, Berrin JG, Juge N, Jacob R, Naim HY, et al. (2003). Deglycosylation by small intestinal epithelial cell beta-glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *Eur J Nutr* 42(1): 29-42.

O'Hagan S, Menzel A (2003). A subchronic 90-day oral rat toxicity study and in vitro genotoxicity studies with a conjugated linoleic acid product. *Food Chem Toxicol* 41(12): 1749-1760.

Ohnuki K, Haramizu S, Oki K, Ishihara K, Fushiki T (2001). A single oral administration of conjugated linoleic acid enhanced energy metabolism in mice. *Lipids* 36(6): 583-587.

Okamoto T (2005). Safety of quercetin for clinical application (Review). *Int J Mol Med* 16(2): 275-278.

OMS (2014). Organización Mundial de la Salud (World Health Organization). Obesidad y Sobrepeso.

Ong JM, Kern PA (1989). The role of glucose and glycosylation in the regulation of lipoprotein lipase synthesis and secretion in rat adipocytes. *J Biol Chem* 264(6): 3177-3182.

Orallo F (2006). Comparative studies of the antioxidant effects of cis- and trans-resveratrol. *Curr Med Chem* 13(1): 87-98.

Pajuelo D, Fernández-Iglesias A, Díaz S, Quesada H, Arola-Arnal A, Bladé C, et al. (2011). Improvement of mitochondrial function in muscle of genetically obese rats after chronic supplementation with proanthocyanidins. *J Agric Food Chem* 59(15): 8491-8498.

Panchal SK, Brown L (2011). Rodent models for metabolic syndrome research. *J Biomed Biotechnol* 2011: 351982.

Panchal SK, Poudyal H, Brown L (2012). Quercetin ameliorates cardiovascular, hepatic, and metabolic changes in diet-induced metabolic syndrome in rats. *J Nutr* 142(6): 1026-1032.

Pang WJ, Xiong Y, Zhang Z, Wei N, Chen N, Yang GS (2013). Lentivirus-mediated Sirt1 shRNA and resveratrol independently induce porcine preadipocyte apoptosis by canonical apoptotic pathway. *Mol Biol Rep* 40(1): 129-139.

Pardina E, Baena-Fustegueras JA, Llamas R, Catalán R, Galard R, Lecube A, et al. (2009). Lipoprotein lipase expression in livers of morbidly obese patients could be responsible for liver steatosis. *Obes Surg* 19(5): 608-616.

Pariza MW, Park Y, Cook ME (2001). The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Prog Lipid Res* 40(4): 283-298.

Park Y, Albright KJ, Liu W, Storkson JM, Cook ME, Pariza MW (1997). Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. *Lipids* 32(8): 853-858.

## BIBLIOGRAFÍA. REFERENCES

---

Park Y, Albright KJ, Storkson JM, Liu W, Cook ME, Pariza MW (1999). Changes in body composition in mice during feeding and withdrawal of conjugated linoleic acid. *Lipids* 34(3): 243-248.

Park A, Kim WK, Bae KH (2014). Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells* 6(1): 33-42.

Park Y, Storkson JM, Albright KJ, Liu W, Pariza MW (2005). Biological activities of conjugated fatty acids: conjugated eicosadienoic (conj. 20:2 $\Delta$ (c11,t13/t12,c14)), eicosatrienoic (conj. 20:3 $\Delta$ (c8,t12,c14)), and heneicosadienoic (conj. 21:2 $\Delta$ (c12,t14/c13,t15)) acids and other metabolites of conjugated linoleic acid. *Biochim Biophys Acta* 1687(1-3): 120-129.

Park Y, Albright KJ, Storkson JM, Liu W, Pariza MW (2007). Conjugated linoleic acid (CLA) prevents body fat accumulation and weight gain in an animal model. *J Food Sci* 72(8): S612-617.

Park HJ, Yang JY, Ambati S, Della-Fera MA, Hausman DB, Rayalam S, et al. (2008). Combined effects of genistein, quercetin, and resveratrol in human and 3T3-L1 adipocytes. *J Med Food* 11(4): 773-783

Pearce VP, Sherrell J, Lou Z, Kopelovich L, Wright WE, Shay JW (2008). Immortalization of epithelial progenitor cells mediated by resveratrol. *Oncogene* 27(17): 2365-2374.

Pearson KJ, Baur JA, Lewis KN, Peshkin L, Price NL, Labinskyy N, et al. (2008). Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. *Cell Metab* 8(2): 157-168.

Perea MJO (2004-2005). Papel de la termogénesis en el balance energético. Monografía. Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia, Universidad Autónoma de Madrid.

Pérez-Matute P, Marti A, Martínez JA, Fernández-Otero MP, Stanhope KL, Havel PJ, et al. (2007). Conjugated linoleic acid inhibits glucose metabolism, leptin and adiponectin secretion in primary cultured rat adipocytes. *Mol Cell Endocrinol* 268(1-2): 50-58.

Perez-Vizcaino F, Duarte J, Jimenez R, Santos-Buelga C, Osuna A (2009). Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin. *Pharmacol Rep* 61(1): 67-75.

Petrovic N, Walden TB, Shabalina IG, Timmons JA, Cannon B, Nedergaard J (2010). Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J Biol Chem* 285(10): 7153-7164.

Picard F, Kurtev M, Chung N, Topark-Ngarm A, Senawong T, Machado De Oliveira R, et al. (2004). Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature* 429(6993): 771-776.

Ponugoti B, Kim DH, Xiao Z, Smith Z, Miao J, Zang M, et al. (2010). SIRT1 deacetylates and inhibits SREBP-1C activity in regulation of hepatic lipid metabolism. *J Biol Chem* 285(44): 33959-33970.

## BIBLIOGRAFÍA. REFERENCES

---

Postic C, Girard J (2008). The role of the lipogenic pathway in the development of hepatic steatosis. *Diabetes Metab.* 34 (6 Pt 2):643-

Poulsen MM, Larsen J, Hamilton-Dutoit S, Clasen BF, Jessen N, Paulsen SK, et al. (2012). Resveratrol up-regulates hepatic uncoupling protein 2 and prevents development of nonalcoholic fatty liver disease in rats fed a high-fat diet. *Nutr Res* 32(9): 701-708.

Poulsen MM, Vestergaard PF, Clasen BF, Radko Y, Christensen LP, Stødkilde-Jørgensen H, et al. (2013). High-dose resveratrol supplementation in obese men: an investigator-initiated, randomized, placebo-controlled clinical trial of substrate metabolism, insulin sensitivity, and body composition. *Diabetes* 62(4): 1186-1195.

Preisig-Müller R, Schwekendiek A, Brehm I, Reif HJ, Kindl H (1999). Characterization of a pine multigene family containing elicitor-responsive stilbene synthase genes. *Plant Mol Biol* 39(2): 221-229.

Pérez Miguelsanz MJ, Cabrera Parra W, Varela Moreiras G, Garaulet M (2010). Regional distribution of the body fat: use of image techniques as tools for nutritional diagnosis. *Nutr Hosp* 25(2): 207-223.

Qiang L, Wang L, Kon N, Zhao W, Lee S, Zhang Y, et al. (2012). Brown remodeling of white adipose tissue by Sirt1-dependent deacetylation of Ppar $\gamma$ . *Cell* 150 (3): 620-632.

Ráfols ME (2014). Tejido adiposo: heterogeneidad celular y diversidad funcional. *Endocrinol y Nutr* 61(2): 100-112.

Ramos E RJ, Warnberg J, Marcos A. Dirección general de salud pública y alimentación. (2008). ¿Mas que alimentos? Alimentos funcionales. Aproximación a una nueva alimentación. Dirección general de salud pública y alimentación, pp 30-45.

Ransom J, Garfinkel AS, Nikazy J, Schotz MC, Kurokawa K (1981). Metabolic studies of adipose tissue in acute uremia. *Metabolism* 30(12): 1165-1169.

Rayalam S, Della-Fera MA, Ambati S, Boyan B, Baile CA (2007a). Enhanced effects of guggulsterone plus 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> on 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 364(3): 450-456.

Rayalam S, Della-Fera MA, Ambati S, Yang JY, Park HJ, Baile CA (2008a). Enhanced effects of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> plus genistein on adipogenesis and apoptosis in 3T3-L1 adipocytes. *Obesity (Silver Spring)* 16(3): 539-546.

Rayalam S, Della-Fera MA, Yang JY, Park HJ, Ambati S, Baile CA (2007b). Resveratrol potentiates genistein's antiadipogenic and proapoptotic effects in 3T3-L1 adipocytes. *J Nutr* 137(12): 2668-2673.

Rayalam S, Yang JY, Ambati S, Della-Fera MA, Baile CA (2008b). Resveratrol induces apoptosis and inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *Phytother Res* 22(10): 1367-1371.

Rayalam S, Yang JY, Della-Fera MA, Park HJ, Ambati S, Baile CA (2009). Anti-obesity effects of xanthohumol plus guggulsterone in 3T3-L1 adipocytes. *J Med Food* 12(4): 846-853.

## BIBLIOGRAFÍA. REFERENCES

---

Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N (2008). Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J* 22(3): 659-661.

Reddy NL, Jones TA, Wayte SC, Adesanya O, Sankar S, Yeo YC, Tripathi G, McTernan PG, Randeve HS, Kumar S, Hutchinson CE, Barber TM.(2014). Identification of brown adipose tissue using MR imaging in a human adult with histological and immunohistochemical confirmation. *J Clin Endocrinol Metab.* 99(1): E117-121..

Rexrode KM, Carey VJ, Hennekens CH, Walters EE, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, Manson JE. (1998). Abdominal adiposity and coronary heart disease in women. *JAMA* 280(21): 1843-1848.

Ricquier D, Nechad M, Mory G (1982). Ultrastructural and biochemical characterization of human brown adipose tissue in pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab* 54(4): 803-807.

Ringseis R, Müller A, Düsterloh K, Schleser S, Eder K, Steinhart H (2006). Formation of conjugated linoleic acid metabolites in human vascular endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1761(3): 377-383.

Risérus U, Arner P, Brismar K, Vessby B (2002). Treatment with dietary trans10cis12 conjugated linoleic acid causes isomer-specific insulin resistance in obese men with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 25(9): 1516-1521.

Ritzenthaler KL, McGuire MK, Falen R, Shultz TD, Dasgupta N, McGuire MA (2001). Estimation of conjugated linoleic acid intake by written dietary assessment methodologies underestimates actual intake evaluated by food duplicate methodology. *J Nutr* 131(5): 1548-1554.

Rivera L, Morón R, Sánchez M, Zarzuelo A, Galisteo M (2008). Quercetin ameliorates metabolic syndrome and improves the inflammatory status in obese Zucker rats. *Obesity (Silver Spring)* 16(9): 2081-2087.

Rivera L, Morón R, Zarzuelo A, Galisteo M (2009). Long-term resveratrol administration reduces metabolic disturbances and lowers blood pressure in obese Zucker rats. *Biochem Pharmacol* 77(6): 1053-1063.

Rosen ED, Spiegelman BM (2014). What we talk about when we talk about fat. *Cell* 156(1-2): 20-44.

Rosenow A, Noben JP, Jocken J, Kallendrusch S, Fischer-Posovszky P, Mariman EC, et al. (2012). Resveratrol-induced changes of the human adipocyte secretion profile. *J Proteome Res* 11(9): 4733-4743.

Rosenwald M, Perdikari A, Rüllicke T, Wolfrum C (2013). Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nat Cell Biol* 15(6): 659-667.

Rosenwald M, Wolfrum C (2014). The origin and definition of brite versus white and classical brown adipocytes. *Adipocyte* 3(1): 4-9.



## BIBLIOGRAFÍA. REFERENCES

---

Rotches-Ribalta M, Urpi-Sarda M, Llorach R, Boto-Ordoñez M, Jauregui O, Chiva-Blanch G, et al. (2012). Gut and microbial resveratrol metabolite profiling after moderate long-term consumption of red wine versus dealcoholized red wine in humans by an optimized ultra-high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry method. *J Chromatogr A* 1265: 105-113.

Ryder JW, Portocarrero CP, Song XM, Cui L, Yu M, Combatsiaris T, et al. (2001). Isomer-specific antidiabetic properties of conjugated linoleic acid. Improved glucose tolerance, skeletal muscle insulin action, and UCP-2 gene expression. *Diabetes* 50(5): 1149-1157.

Saito M, Okamatsu-Ogura Y, Matsushita M, Watanabe K, Yoneshiro T, Nio-Kobayashi J, Iwanaga T, Miyagawa M, Kameya T, Nakada K, Kawai Y, Tsujisaki M. (2009). High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes* 58(7): 1526-1531.

Salas-Salvado J, Marquez-Sandoval F, Bullo M (2006). Conjugated linoleic acid intake in humans: a systematic review focusing on its effect on body composition, glucose, and lipid metabolism. *Crit Rev Food Sci Nutr* 46(6): 479-488.

Santos JA, de Carvahó GS, Oliveira V, Raposo NR, da Silva AD (2013). Resveratrol and analogues: a review of antioxidant activity and applications to human health. *Recent Pat Food Nutr Agric* 5(2): 144-153.

Schutz Y (2004). Dietary fat, lipogenesis and energy balance. *Physiol Behav* 83(4): 557-564.

Seale P, Conroe HM, Estall J, Kajimura S, Frontini A, Ishibashi J, Cohen P, Cinti S, Spiegelman BM (2011). Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *J Clin Invest* 121(1): 96-105.

Sébédio JL, Angioni E, Chardigny JM, Grégoire S, Juanéda P, Berdeaux O (2001). The effect of conjugated linoleic acid isomers on fatty acid profiles of liver and adipose tissues and their conversion to isomers of 16:2 and 18:3 conjugated fatty acids in rats. *Lipids* 36(6): 575-582.

SEEDO Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad. La obesidad, ahora sí, una enfermedad de peso. Vol. 2014.

Senese R, Valli V, Moreno M, Lombardi A, Busiello RA, Cioffi F, et al. (2011). Uncoupling protein 3 expression levels influence insulin sensitivity, fatty acid oxidation, and related signaling pathways. *Pflugers Arch* 461(1): 153-164.

Serazetdinova L, Oldach KH, Lörz H (2005). Expression of transgenic stilbene synthases in wheat causes the accumulation of unknown stilbene derivatives with antifungal activity. *J Plant Physiol* 162(9): 985-1002.

Shabalina IG, Petrovic N, de Jong JM, Kalinovich AV, Cannon B, Nedergaard J (2013). UCP1 in brite/beige adipose tissue mitochondria is functionally thermogenic. *Cell Rep* 5(5): 1196-1203.

Shan T, Ren Y, Wang Y (2013). Sirtuin 1 affects the transcriptional expression of adipose triglyceride lipase in porcine adipocytes. *J Anim Sci* 91(3): 1247-1254.

## BIBLIOGRAFÍA. REFERENCES

---

Shang J, Chen LL, Xiao FX, Sun H, Ding HC, Xiao H (2008). Resveratrol improves non-alcoholic fatty liver disease by activating AMP-activated protein kinase. *Acta Pharmacol Sin* 29(6): 698-706.

Sharp LZ, Shinoda K, Ohno H, Scheel DW, Tomoda E, Ruiz L, Hu H, Wang L, Pavlova Z, Gilsanz V, Kajimura S (2012). Human BAT possesses molecular signatures that resemble beige/brite cells. *PLoS One* 7(11): e49452.

Shen JZ, Ma LN, Han Y, Liu JX, Yang WQ, Chen L, et al. (2012). Pentamethylquercetin generates beneficial effects in monosodium glutamate-induced obese mice and C2C12 myotubes by activating AMP-activated protein kinase. *Diabetologia* 55(6): 1836-1846.

Siemann EH, Creasy LL (1992). Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* Vol. 43, pp:49-52.

Silva P. (2002). The chemical logic behind... fatty acid metabolism. *Medicin ABC*. <http://www.medicinabc.com>

Simón E, Macarulla MT, Fernández-Quintela A, Rodríguez VM, Portillo MP (2005). Body fat-lowering effect of conjugated linoleic acid is not due to increased lipolysis. *J Physiol Biochem* 61(2): 363-369.

Singleton VL (1981). Naturally occurring food toxicants: phenolic substances of plant origin common in foods. *Adv Food Res* 27: 149-242.

Sisk MB, Hausman DB, Martin RJ, Azain MJ (2001). Dietary conjugated linoleic acid reduces adiposity in lean but not obese Zucker rats. *J Nutr* 131(6): 1668-1674.

Skibola CF, Smith MT (2000). Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radic Biol Med* 29(3-4): 375-383.

Smoliga JM, Vang O, Baur JA (2012). Challenges of translating basic research into therapeutics: resveratrol as an example. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 67(2): 158-167.

Sniderman AD (2000). Postprandial hypertriglyceridemia(s): time to enlarge our pathophysiologic perspective. *Eur J Clin Invest* 30(11): 935-937.

Soleas GJ, Angelini M, Grass L, Diamandis EP, Goldberg DM (2001). Absorption of trans-resveratrol in rats. *Methods Enzymol* 335: 145-154.

Somerset SM, Johannot L (2008). Dietary flavonoid sources in Australian adults. *Nutr Cancer* 60(4): 442-449.

Souza SC, Muliro KV, Liscum L, Lien P, Yamamoto MT, Schaffer JE, Dallal GE, Wang X, Kraemer FB, Obin M, Greenberg AS. (2002). Modulation of hormone sensitive lipase and protein kinase A-mediated lipolysis by perilipin A in an adenoviral reconstituted system. *J Biol Chem* 277 (10): 8267-8272.

Spiegelman BM (1998). PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes* 47(4): 507-514.

## BIBLIOGRAFÍA. REFERENCES

---

Spiegelman BM (2013). Banting Lecture (2012). Regulation of adipogenesis: toward new therapeutics for metabolic disease. *Diabetes* 62(6): 1774-1782.

Srere P (1969). Citrate synthase *Methods Enzymol.* Vol. 3, pp 3-11

Stanford KI, Middelbeek RJ, Townsend KL, An D, Nygaard EB, Hitchcox KM, Markan KR, Nakano K, Hirshman MF, Tseng YH, Goodyear LJ.(2013). Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *J Clin Invest* 123(1): 215-223.

Stanton C, Lawless F, Kjellmer G, Harrington D, Devery R, Connolly JF, Murphy J (1997). Dietary influences on bovine milk *cis-9,trans-11*-conjugated linoleic acid content. *Journal of Food Science.* Vol. 62, pp 1083-1086.

Stewart LK, Soileau JL, Ribnicky D, Wang ZQ, Raskin I, Poulev A, *et al.* (2008). Quercetin transiently increases energy expenditure but persistently decreases circulating markers of inflammation in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. *Metabolism* 57(7 Suppl 1): S39-46.

Strawford A, Antelo F, Christiansen M, Hellerstein MK. 2004 Adipose tissue triglyceride turnover, de novo lipogenesis, and cell proliferation in humans measured with  $2H_2O$ . *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 286(4): 577-88.

Stryer L, Berg JM, Tymoczko JL, Macarulla JM (1995). *Bioquímica* (Sexta Edición). Ed. Reverte.

Su C, Sztalryd C, Contreras J, Holm C, Kimmel A, Londos C (2003). Mutational analysis of the hormone sensitive lipase translocation reaction in adipocytes. *J Biol Chem* 278 (44): 43615-43619.

Sukonina V, Lookene A, Olivecrona T, Olivecrona G (2006). Angiopoietin-like protein 4 converts lipoprotein lipase to inactive monomers and modulates lipase activity in adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(46): 17450-17455.

PDRNS: Physician's Desk Reference for Nutritional Supplements. 2001 Quercetin. 1st Edition, Data Production Company, Montvale, New Jersey 390-392.

Svajger U, Obermajer N, Jeras M (2010). Dendritic cells treated with resveratrol during differentiation from monocytes gain substantial tolerogenic properties upon activation. *Immunology* 129(4): 525-535.

Svajger U, Jeras M (2012). Anti-inflammatory effects of resveratrol and its potential use in therapy of immune-mediated diseases. *Int Rev Immunol* 31(3): 202-222.

Szkudelska K, Nogowski L, Szkudelski T (2009). Resveratrol, a naturally occurring diphenolic compound, affects lipogenesis, lipolysis and the antilipolytic action of insulin in isolated rat adipocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 113(1-2): 17-24.

Szkudelska K, Szkudelski T (2010). Resveratrol, obesity and diabetes. *Eur J Pharmacol* 635(1-3): 1-8.

## BIBLIOGRAFÍA. REFERENCES

---

Szkudelski T, Szkudelska K (2011). Anti-diabetic effects of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci* 1215: 34-39.

Tai MM (1994). A mathematical model for the determination of total area under glucose tolerance and other metabolic curves. *Diabetes Care* 17(2): 152-154.

Takakoka MJ (1940). Of the phenolic substances of white hellebore (*Veratrum grandiflorum* Loes. Fil.). *J Agric Food Chem* 47:1435-14393.

Taylor CG, Zahradka P (2004). Dietary conjugated linoleic acid and insulin sensitivity and resistance in rodent models. *Am J Clin Nutr* 79(6 Suppl): 1164S-1168S.

Tchernof A, Lamarche B, Prud'Homme D, Nadeau A, Moorjani S, Labrie F, Lupien PJ, Després JP. (1996). The dense LDL phenotype. Association with plasma lipoprotein levels, visceral obesity, and hyperinsulinemia in men. *Diabetes Care* 19(6): 629-637.

Teglund S, McKay C, Schuet, E, van Deursen J, Stravopodis D, Wang D, Brown M, Bodner S, Grosveld G, Ihle J. (1998). Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell* 93 (5): 841-850.

Terao J, Murota K, Kawai Y (2011). Conjugated quercetin glucuronides as bioactive metabolites and precursors of aglycone in vivo. *Food Funct* 2(1): 11-17.

Thompson BR, Lobo S, Bernlohr DA. (2010) Fatty acid flux in adipocytes: the in's and out's of fat cell lipid trafficking. *Mol Cell Endocrinol.* 318 (1-2):24-33

Timmers S, Konings E, Bilet L, Houtkooper RH, van de Weijer T, Goossens GH, *et al.* (2011). Calorie restriction-like effects of 30 days of resveratrol supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans. *Cell Metab* 14(5): 612-622.

Timmers S, Auwerx J, Schrauwen P (2012). The journey of resveratrol from yeast to human. *Aging (Albany NY)* 4(3): 146-158.

Tischendorf F, Schone F, Kirchheim U, Jahreis G (2002). Influence of a conjugated linoleic acid mixture on growth, organ weights, carcass traits and meat quality in growing pigs. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 86(3-4): 117-128.

Tomé-Carneiro J, González M, Larrosa M, Yáñez-Gascón MJ, García-Almagro FJ, Ruiz-Ros JA, *et al.* (2012). One-year consumption of a grape nutraceutical containing resveratrol improves the inflammatory and fibrinolytic status of patients in primary prevention of cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 110(3): 356-363.

Tomé-Carneiro J, González M, Larrosa M, Yáñez-Gascón MJ, García-Almagro FJ, Ruiz-Ros JA, *et al.* (2013). Grape resveratrol increases serum adiponectin and downregulates inflammatory genes in peripheral blood mononuclear cells: a triple-blind, placebo-controlled, one-year clinical trial in patients with stable coronary artery disease. *Cardiovasc Drugs Ther* 27(1): 37-48.

Tso P (1985). Gastrointestinal digestion and absorption of lipid. *Adv Lipid Res* 21: 143-186.

## BIBLIOGRAFÍA. REFERENCES

---

- Tsuboyama-Kasaoka N, Takahashi M, Tanemura K, Kim HJ, Tange T, Okuyama H, *et al.* (2000). Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose tissue by apoptosis and develops lipodystrophy in mice. *Diabetes* 49(9): 1534-1542.
- Utesch D, Feige K, Dasenbrock J, Broschard TH, Harwood M, Danielewska-Nikiel B, *et al.* (2008). Evaluation of the potential in vivo genotoxicity of quercetin. *Mutat Res* 654(1): 38-44.
- Uyeda K, Repa JJ (2006). Carbohydrate response element binding protein, ChREBP, a transcription factor coupling hepatic glucose utilization and lipid synthesis. *Cell Metab* 4(2): 107-110.
- van Marken Lichtenbelt WD, Vanhommel JW, Smulders NM, Drossaerts JM, Kemerink GJ, Bouvy ND, Schrauwen P, Teule GJ. (2009). Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med* 360(15): 1500-1508.
- Vang O, Ahmad N, Baile CA, Baur JA, Brown K, Csiszar A, *et al.* (2011). What is new for an old molecule? Systematic review and recommendations on the use of resveratrol. *PLoS One* 6(6): e19881
- Velasco G, Gómez del Pulgar T, Carling D, Guzmán M (1998). Evidence that the AMP-activated protein kinase stimulates rat liver carnitine palmitoyltransferase I by phosphorylating cytoskeletal components. *FEBS Lett* 439(3): 317-320.
- Vernochet C, Peres SB, Davis KE, McDonald ME, Qiang L, Wang H, *et al.* (2009). C/EBPalpha and the corepressors CtBP1 and CtBP2 regulate repression of select visceral white adipose genes during induction of the brown phenotype in white adipocytes by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *Mol Cell Biol* 29(17): 4714-4728.
- Vernon RG, Taylor E (1986). Acetyl-CoA carboxylase of sheep adipose tissue: problems of the assay and adaptation during fetal development. *J Anim Sci* 63(4): 1119-1125.
- Vessal M, Hemmati M, Vasei M (2003). Antidiabetic effects of quercetin in streptozocin-induced diabetic rats. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 135C(3): 357-364.
- Vicente-Vicente L PM, Morales AI (2013). Efficacy and safety of quercetin as dietary supplement. *Rev. Toxicol.* Vol. 30, pp 171-181.
- Villarroya F (2003). La proteína desacoplante mitocondrial UCP3, ¿un nuevo actor en el metabolismo muscular de los ácidos grasos? *Clinica e Investigación en Arterioesclerosis*. Vol. 15, pp 114-123.
- Villarroya J, Cereijo R, Villarroya F (2013). An endocrine role for brown adipose tissue? *Am J Physiol Endocrinol Metab* 305(5): E567-572.
- Villena JA, Roy S, Sarkadi-Nagy E, Kim KH, Sul HS (2004). Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis. *J Biol Chem* 279(45): 47066-47075.

## BIBLIOGRAFÍA. REFERENCES

---

Vitali A, Murano I, Zingaretti MC, Frontini A, Ricquier D, Cinti S (2012). The adipose organ of obesity-prone C57BL/6J mice is composed of mixed white and brown adipocytes. *J Lipid Res* 53(4): 619-629.

Vitrac X, Desmoulière A, Brouillaud B, Krisa S, Deffieux G, Barthe N, *et al.* (2003). Distribution of [14C]-trans-resveratrol, a cancer chemopreventive polyphenol, in mouse tissues after oral administration. *Life Sci* 72(20): 2219-2233.

Wahle KW, Heys SD, Rotondo D (2004). Conjugated linoleic acids: are they beneficial or detrimental to health? *Prog Lipid Res* 43(6): 553-587.

Waite KA, Sinden MR, Eng C (2005). Phytoestrogen exposure elevates PTEN levels. *Hum Mol Genet* 14(11): 1457-1463.

Waldén TB, Hansen IR, Timmons JA, Cannon B, Nedergaard J (2012). Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, "brite," and white adipose tissues. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302(1): E19-31.

Walle T (2004). Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radic Biol Med* 36(7): 829-837.

Walle T (2011). Bioavailability of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci* 1215: 9-15.

Walle T, Hsieh F, DeLegge MH, Oatis JE, Walle UK (2004). High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab Dispos* 32(12): 1377-1382.

Walle T, Otake Y, Walle UK, Wilson FA (2000). Quercetin glucosides are completely hydrolyzed in ileostomy patients before absorption. *J Nutr* 130(11): 2658-2661.

Walle T, Walle UK (2003). The beta-D-glucoside and sodium-dependent glucose transporter 1 (SGLT1)-inhibitor phloridzin is transported by both SGLT1 and multidrug resistance-associated proteins 1/2. *Drug Metab Dispos* 31(11): 1288-1291.

Walle T, Walle UK, Halushka PV (2001). Carbon dioxide is the major metabolite of quercetin in humans. *J Nutr* 131(10): 2648-2652.

Wanders RJ, Vreken P, Ferdinandusse S, Jansen GA, Waterham HR, van Roermund CW, *et al.* (2001). Peroxisomal fatty acid alpha- and beta-oxidation in humans: enzymology, peroxisomal metabolite transporters and peroxisomal diseases. *Biochem Soc Trans* 29(Pt 2): 250-267.

Wang D, and Sul H. (1997). Upstream stimulatory factor binding to the E-box at -65 is required for insulin regulation of the fatty acid synthase promoter. *J Biol Chem* 272 (42): 26367-26374.

Wang Q, Xu J, Rottinghaus GE, Simonyi A, Lubahn D, Sun GY, *et al.* (2002). Resveratrol protects against global cerebral ischemic injury in gerbils. *Brain Res* 958(2): 439-447.

Wang QA, Tao C, Gupta RK, Scherer PE (2013). Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nat Med* 19(10): 1338-1344.

Wang S, Moustaid-Moussa N, Chen L, Mo H, Shastri A, Su R, *et al.* (2014). Novel insights of dietary polyphenols and obesity. *J Nutr Biochem* 25(1): 1-18.

## BIBLIOGRAFÍA. REFERENCES

---

Wang Y, Jones PJ (2004). Dietary conjugated linoleic acid and body composition. *Am J Clin Nutr* 79(6 Suppl): 1153S-1158S.

Wang Y, Jones PJ (2004). Conjugated linoleic acid and obesity control: efficacy and mechanisms. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28(8): 941-955.

Watt M, Steinberg G (2008) Regulation and function of triacylglycerol lipases in cellular metabolism. *Biochem J* 414 (3): 313–325

Wein S, Behm N, Petersen RK, Kristiansen K, Wolffram S (2010). Quercetin enhances adiponectin secretion by a PPAR-gamma independent mechanism. *Eur J Pharm Sci* 41(1): 16-22.

Wenzel E, Soldo T, Erbersdobler H, Somoza V (2005a). Bioactivity and metabolism of trans-resveratrol orally administered to Wistar rats. *Mol Nutr Food Res* 49(5): 482-494.

Wenzel E, Somoza V (2005b). Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. *Mol Nutr Food Res* 49(5): 472-481.

West DB, Blohm FY, Truett AA, DeLany JP (2000). Conjugated linoleic acid persistently increases total energy expenditure in AKR/J mice without increasing uncoupling protein gene expression. *J Nutr* 130(10): 2471-2477.

West DB, Delany JP, Camet PM, Blohm F, Truett AA, Scimeca J (1998). Effects of conjugated linoleic acid on body fat and energy metabolism in the mouse. *Am J Physiol* 275(3 Pt 2): R667-672.

WHO-OMS (2014). World health organization-Organización Mundial de la Salud. Obesity and overweight. Fact sheet N°311. Updated January 2015.

Wiczowski W, Romaszko J, Bucinski A, Szawara-Nowak D, Honke J, Zielinski H, *et al.* (2008). Quercetin from shallots (*Allium cepa* L. var. *aggregatum*) is more bioavailable than its glucosides. *J Nutr* 138(5): 885-888.

Williams MJ, Hunter GR, Kekes-Szabo T, Snyder S, Treuth MS (1997). Regional fat distribution in women and risk of cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 65(3): 855-860.

Wu J, Boström P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, *et al.* (2012). Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* 150(2): 366-376.

Wu JM, Wang ZR, Hsieh TC, Bruder JL, Zou JG, Huang YZ (2001). Mechanism of cardioprotection by resveratrol, a phenolic antioxidant present in red wine (Review). *Int J Mol Med* 8(1): 3-17.

Xu J, Teran-Garcia M, Park JH, Nakamura MT, Clarke SD (2001). Polyunsaturated fatty acids suppress hepatic sterol regulatory element-binding protein-1 expression by accelerating transcript decay. *J Biol Chem* 276(13): 9800-9807.

Xu Q, Si LY (2012). Resveratrol role in cardiovascular and metabolic health and potential mechanisms of action. *Nutr Res* 32(9): 648-658.

## BIBLIOGRAFÍA. REFERENCES

---

Xu X, Storkson J, Kim S, Sugimoto K, Park Y, Pariza MW (2003). Short-term intake of conjugated linoleic acid inhibits lipoprotein lipase and glucose metabolism but does not enhance lipolysis in mouse adipose tissue. *J Nutr* 133(3): 663-667.

Yamasaki M, Ikeda A, Oji M, Tanaka Y, Hirao A, Kasai M, *et al.* (2003). Modulation of body fat and serum leptin levels by dietary conjugated linoleic acid in Sprague-Dawley rats fed various fat-level diets. *Nutrition* 19(1): 30-35.

Yang JY, Della-Fera MA, Hausman DB, Baile CA (2007). Enhancement of ajoene-induced apoptosis by conjugated linoleic acid in 3T3-L1 adipocytes. *Apoptosis* 12(6): 1117-1128.

Yang JY, Della-Fera MA, Rayalam S, Ambati S, Baile CA (2007). Enhanced pro-apoptotic and anti-adipogenic effects of genistein plus guggulsterone in 3T3-L1 adipocytes. *Biofactors* 30(3): 159-169.

Yang JY, Della-Fera MA, Rayalam S, Ambati S, Hartzell DL, Park HJ, *et al.* (2008). Enhanced inhibition of adipogenesis and induction of apoptosis in 3T3-L1 adipocytes with combinations of resveratrol and quercetin. *Life Sci* 82(19-20): 1032-1039.

Yin D, Clarke S, Peters J, Etherton T. (1998). Somatotropin-dependent decrease in fatty acid synthase mRNA abundance in 3T3-F442A adipocytes is the result of a decrease in both gene transcription and mRNA stability. *Biochem J* 331 (Pt 3): 815-820.

Yoshino J, Conte C, Fontana L, Mittendorfer B, Imai S, Schechtman KB, *et al.* (2012). Resveratrol supplementation does not improve metabolic function in nonobese women with normal glucose tolerance. *Cell Metab* 16(5): 658-664.

Yu W, Fu YC, Wang W (2012). Cellular and molecular effects of resveratrol in health and disease. *J Cell Biochem* 113(3): 752-759.

Zabala A, Churrua I, Fernández-Quintela A, Rodríguez V, Macarulla M, Martínez J, *et al.* (2006a). trans-10,cis-12 Conjugated linoleic acid inhibits lipoprotein lipase but increases the activity of lipogenic enzymes in adipose tissue from hamsters fed an atherogenic diet. *Br J Nutr* 95(6): 1112-1119.

Zabala A, Churrua I, Macarulla MT, Rodríguez VM, Fernández-Quintela A, Martínez JA, *et al.* (2004). The trans-10,cis-12 isomer of conjugated linoleic acid reduces hepatic triacylglycerol content without affecting lipogenic enzymes in hamsters. *Br J Nutr* 92(3): 383-389.

Zabala A, Fernandez-Quintela A, Macarulla MT, Simon E, Rodriguez VM, Navarro V, *et al.* (2006b). Effects of conjugated linoleic acid on skeletal muscle triacylglycerol metabolism in hamsters. *Nutrition* 22(5): 528-533.

Zamora-Ros R, Andres-Lacueva C, Lamuela-Raventós RM, Berenguer T, Jakszyn P, Martínez C, *et al.* (2008). Concentrations of resveratrol and derivatives in foods and estimation of dietary intake in a Spanish population: European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Spain cohort. *Br J Nutr* 100(1): 188-196.

Zemel MB (2005). The role of dairy foods in weight management. *J Am Coll Nutr* 24(6 Suppl): 537S-546S.



## BIBLIOGRAFÍA. REFERENCES

---

Zhang L, Lookene A, Wu G, Olivecrona G (2005). Calcium triggers folding of lipoprotein lipase into active dimers. *J Biol Chem* 280(52): 42580-42591.

Zhang L, Song H, Ge Y, Ji G, Yao Z (2015). Temporal Relationship between Diet-Induced Steatosis and Onset of Insulin/Leptin Resistance in Male Wistar Rats. *PLoS One* 10(2): e0117008.

Zhang R, Yao Y, Wang Y, Ren G (2011). Antidiabetic activity of isoquercetin in diabetic KK -Ay mice. *Nutr Metab (Lond)* 8: 85.

Zhang Y, Ma K, Song S, Elam MB, Cook GA, Park EA (2004). Peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 alpha (PGC-1 alpha) enhances the thyroid hormone induction of carnitine palmitoyltransferase I (CPT-I alpha). *J Biol Chem* 279(52): 53963-53971.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372(6505): 425-432.

Zhou Y, Shimabukuro M, Koyama K, Lee Y, Wang M, Trieu F, Newgard C, Unger R. (1997). Induction by leptin of uncoupling protein-2 and enzymes of fatty acid oxidation. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 (12): 6386-6390.

Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, Schoiswohl G, Birner-Gruenberger R, Riederer M, et al. (2004). Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* 306(5700): 1383-1386.

*“La Tierra tiene lo suficiente para satisfacer las necesidades de todos, pero no tanto como para satisfacer la avaricia de algunos”.*

*— Mahatma Gandhi*

*“Earth has enough for everyone's need, but not for everyone's greed.”*

*— Mahatma Gandhi*