

Tesis Doctoral

Lipogénesis y gluconeogénesis en el
intestino delgado de pacientes con
obesidad mórbida



Carolina Gutiérrez Repiso

Málaga, 2015



Publicaciones y
Divulgación Científica

AUTOR: Carolina Gutiérrez Repiso

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está sujeta a una licencia Creative Commons:

Reconocimiento - No comercial - SinObraDerivada (cc-by-nc-nd):

[Http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es)

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización
pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer
obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de
Málaga (RIUMA): riuma.uma.es

Dr. **Federico J. Casimiro-Soriguer Escofet** y Dr. **Eduardo García Fuentes**:

CERTIFICAN: Que el trabajo que se expone en la memoria de la Tesis Doctoral realizada por **Carolina Gutiérrez Repiso** con el título "*Lipogénesis y gluconeogénesis en el intestino delgado de pacientes con obesidad mórbida*" se ha realizado en el Laboratorio de Investigación del Hospital Regional Universitario de Málaga integrado en el Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), correspondiendo fielmente a los resultados obtenidos. La presente memoria ha sido revisada bajo nuestra dirección, considerando que tiene el contenido y rigor científico necesario para ser sometida a juicio por el tribunal nombrado por la Universidad de Málaga para optar al grado de Doctor.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones legalmente vigentes a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado:

Director de la tesis:

Director de la tesis:

**Dr. Federico J.
Casimiro Soriguer Escofet**

Dr. Eduardo García Fuentes



Dr. **Manuel García Caballero**, Catedrático de Cirugía de la Universidad de Málaga.

CERTIFICA: Que el trabajo que se expone en la memoria de la Tesis Doctoral realizada por **Carolina Gutiérrez Repiso** con el título "*Lipogénesis y gluconeogénesis en el intestino delgado de pacientes con obesidad mórbida*" ha sido realizado en el Laboratorio de Investigación del Hospital Regional Universitario de Málaga integrado en el Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), correspondiendo fielmente a los resultados obtenidos. La presente memoria ha sido revisada bajo mi tutela, considerando que tiene el contenido y rigor científico necesario para ser sometida al juicio del tribunal nombrado por la Universidad de Málaga para optar al grado de Doctor.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones legalmente vigentes a los efectos oportunos, firmo el presente certificado:

Tutor de la tesis:

Dr. Manuel García Caballero

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Yo, **Carolina Gutiérrez Repiso** declaro que soy la autora del presente trabajo de investigación titulado "*Lipogénesis y gluconeogénesis en el intestino delgado de pacientes con obesidad mórbida*" que ha sido realizado en el Laboratorio de Investigación del Hospital Regional Universitario de Málaga integrado en el Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), bajo la dirección del Dr. Federico J. Casimiro Soriguer Escofet y el Dr. Eduardo García Fuentes.

Y para que así conste, firmo el presente certificado:

Carolina Gutiérrez Repiso

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Es difícil expresar en pocas líneas mi agradecimiento a todas las personas que me han acompañado y apoyado durante todo este tiempo, gran parte de este trabajo se la debo a ellos.

En primer lugar, quiero expresar mi profundo agradecimiento y reconocimiento a mi director de tesis Federico Soríguer, gracias por darme la oportunidad de formar parte de tu grupo de investigación, por tu dedicación, tu esfuerzo, tu sabiduría, tu cercanía, tu pasión por la investigación. He tenido la suerte de aprender junto al mejor maestro.

A Eduardo García, mi otro director de tesis, gracias por confiar en mí para llevar a cabo este trabajo. Además quiero agradecerte todo lo que me has enseñado, tu infinita paciencia y tu inestimable ayuda, por tener siempre una respuesta y una solución para todo. Gracias por haberme dado la oportunidad de descubrir el apasionante mundo de la investigación.

A mis compañeros del grupo de investigación, Gemma, Patri, Sonsoles, Juanmí, Ana, Roberto, Laura y en especial a Eva y a Sara por ayudarme y aconsejarme, siempre que lo he necesitado ellas han estado ahí. Gracias a este gran grupo, una pequeña gran familia con la cual siempre puedo contar, gracias a todos por vuestra ayuda y por los momentos de terapia.

A Ele, Gracia, Inma y Patri Rivera, además de compañeras, grandes amigas. Me siento muy afortunada de poder contar con vosotras, sois las mejores.

A todos mis compañeros del laboratorio de investigación; a Lourdes Sánchez y a Sole, por su ayuda con las técnicas de microscopía y citometría, a Raquel, Adri, Pepe.... a los que están y a los que se han ido. A mis compañeros del LMR por acogerme como a una compañera más y hacerme esas mañanas más llevaderas.

Al servicio de Endocrinología, al servicio de Cirugía Digestiva, al personal de quirófano y a los pacientes, gracias a todos ellos este proyecto se ha podido realizar.

A mis compañeros de facultad, con quienes comencé compartiendo ilusiones y sueños, en especial a Natalia, Ángel y Marina. Al final lo conseguimos.

A mis amigas Merche, Mari Ángeles, Rocío, Sonia, Desi, Lidia y en especial a Lorena, gracias a ella tuve la oportunidad de realizar esta tesis.

A mis compañeros del laboratorio de Santa Fe por animarme a dar el paso, porque no hay que conformarse con lo fácil.

A mis padres, a mi hermano. Por su confianza y su apoyo incondicional durante toda mi vida. Por su cariño, generosidad, sacrificio y amor, sin ellos nunca hubiera llegado hasta aquí. Gran parte de este trabajo se la debo a ellos.

Gracias a todos vosotros

Índice

Glosario de abreviaturas	21
1. Introducción	27
1.1 OBESIDAD: CONCEPTO, CAUSAS Y PATOLOGÍAS ASOCIADAS	29
1.1.1 Evolución del hombre hacia la obesidad extrema	29
1.1.2 Concepto de obesidad	30
1.1.3 Causas de la obesidad	30
1.1.4 Clasificación de la obesidad	36
1.1.5 Concepto de Obesidad Mórbida	38
1.1.6 Patologías asociadas a la obesidad	38
1.1.7 Tratamiento de la obesidad	47
1.1.8 Cirugía de la Obesidad Mórbida	47
1.1.9 Cirugía metabólica	52
1.2 INTESTINO DELGADO	61
1.2.1 Morfología del intestino delgado	61
1.2.2 Absorción, síntesis y secreción de triglicéridos	67
1.2.3 Papel del intestino en la dislipemia	82
1.2.4 Papel del intestino en la resistencia a la insulina	85
1.3 LIPOGÉNESIS DE NOVO	89
1.3.1 Complejo piruvato deshidrogenasa (PDH)	91
1.3.2 ATP citrato liasa (ACL)	92
1.3.3 Acetil-CoA carboxilasa (ACC)	93
1.3.4 Ácido graso sintetasa (FAS)	93
1.3.5 SREBP-1c	94
1.4 GLUCONEOGÉNESIS	97
1.4.1 Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK)	100
1.4.2 Fructosa 1,6-bifosfatasa (FBPasa)	101
1.4.3 Glucosa 6-fosfatasa (G6Pasa)	102
1.4.4 Glutaminasa	103
1.4.5 Regulación de la gluconeogénesis	104
1.4.6 Gluconeogenesis intestinal	108
2. Hipótesis y Objetivos	111
2.1 Hipótesis y objetivos	113
2.1.1 Hipótesis	113

2.1.2	Objetivos _____	114
3.	Material y Métodos _____	115
3.1	Diseño y sujetos del estudio _____	117
3.1.1	Diseño del estudio _____	117
3.1.2	Sujetos del estudio _____	117
3.1.3	VARIABLES DE ESTUDIO _____	118
3.1.4	Obtención de las muestras de yeyuno _____	121
3.1.5	Aislamiento e incubación de IECs _____	125
3.1.6	Determinación de los niveles de expresión de los genes candidatos _____	128
3.1.7	Análisis estadístico _____	133
4.	Resultados _____	137
4.1	Características generales _____	139
4.2	VARIABLES BIOQUÍMICAS _____	140
4.3	Contenido lipídico del yeyuno _____	140
4.4	Niveles de expresión relativa de los genes implicados en el metabolismo hidrocarbonado y lipídico _____	143
4.4.1	Lipogénesis <i>de novo</i> y síntesis de triglicéridos y quilomicrones _____	143
4.4.2	Gluconeogénesis intestinal _____	149
4.4.3	Señalización de la insulina _____	153
4.5	Caracterización fenotípica y viabilidad de las IECs aisladas _____	157
4.5.1	Caracterización fenotípica de las IECs _____	157
4.5.2	Viabilidad de las IECs aisladas _____	157
4.6	Efecto de la glucosa e insulina sobre la expresión relativa de los genes estudiados _____	158
4.6.1	Efecto de la insulina y glucosa sobre los niveles de expresión relativa de los genes implicados en la lipogénesis <i>de novo</i> y la síntesis de quilomicrones _____	158
4.6.2	Efecto de la insulina y glucosa sobre los niveles de expresión relativa SREBP-1c _____	161
4.6.3	Efecto de la insulina y glucosa sobre los niveles de expresión relativa de los genes implicados en la gluconeogénesis intestinal _____	162
4.6.4	Efecto de la insulina y glucosa sobre los niveles de expresión relativa de los genes implicados en la señalización de la insulina _____	164

4.7	Efecto de la leptina sobre la expresión relativa de los genes estudiados	165
4.7.1	Efecto de la leptina sobre la expresión relativa de los genes implicados en la lipogénesis <i>de novo</i> y la síntesis de quilomicrones _____	166
4.7.2	Efecto de la leptina sobre la expresión relativa de SREBP-1c _____	168
4.7.3	Efecto de la leptina sobre la expresión relativa de los genes implicados en la gluconeogénesis _____	168
4.7.4	Efecto de la leptina sobre los genes implicados en la ruta de señalización de la insulina _____	169
5.	Discusión _____	171
5.1	Lipogénesis <i>de novo</i> y síntesis de quilomicrones _____	173
5.2	Gluconeogénesis _____	181
5.3	Cascada de señalización de la insulina _____	187
6.	Conclusiones _____	191
6.1.1	Lipogénesis <i>de novo</i> y síntesis de quilomicrones _____	193
6.1.2	Glucogenogénesis _____	194
6.1.3	Cascada de señalización de la insulina _____	195
7.	Bibliografía _____	197
8.	Anexo _____	225

Glosario de abreviaturas

2-MAG: 2-monoacilglicerol

ACC: acetil-CoA carboxilasa

ACL: ATP citrato liasa

ADN: ácido desoxirribonucleico

Apo B-48: apolipoproteína B-48

Apo B-100: apolipoproteína B-100

Apo A-I: apolipoproteína A-I

Apo A-IV: apolipoproteína A-IV

Apo C: apolipoproteína C

Apo C-II: apolipoproteína C-II

Apo C-III: apolipoproteína C-III

Apo E: apolipoproteína E

ARNm: ARN mensajero

BME: β -mercaptoetanol

CEPT: proteína de transferencia de ésteres de colesterol

DAG: diacilglicerol

DE: desviación estándar

DGAT: acil CoA: diacilglicerol-acil-transferasa

DM2: diabetes mellitus tipo 2

EEM: error estándar de la media

ELISA: inmunoensayo enzimático

Elovl-6: elongasa de ácidos grasos de cadena larga tipo 6

FABP: proteína de unión a ácidos grasos

FABP_{pm}: proteína de unión a ácidos grasos de membrana plasmática

FATP: proteína transportadora de ácidos grasos

FAS: ácido graso sintetasa

FBPasa: fructosa 1,6-bifosfatasa

FTO: gen asociado a la masa grasa y a la obesidad

G6Pasa: glucosa-6-fosfatasa

GIP: péptido insulínico dependiente de la glucosa

GLP1: péptido similar al glucagón tipo 1

GLS: glutaminasa

HbA1c: hemoglobina glicosilada

HDL-c: lipoproteína de alta densidad

HOMA-IR: modelo de evaluación homeostática para determinar la resistencia a insulina

HSPG: proteoglicano de heparán sulfato

IEC: célula epitelial intestinal

I-FABP: proteína de unión a ácidos grasos intestinal

IMC: Índice de masa corporal

IRS-1: sustrato del receptor de insulina-1

L-FABP: proteína de unión a ácidos grasos hepática

LDL-c: lipoproteína de baja densidad

LepR: receptor de la leptina

LPL: lipoproteína lipasa

LRP: proteína relacionada con el receptor LDL

MAG: monoacilglicerol o monoglicérido

MC4R: receptor de la melanocortina

MGAT: acil-coenzima A monoacilglicerol aciltransferasa

MTP: proteína de transferencia microsomal

OM: obesos mórbidos

OM-alta IR: obesos mórbidos con alta resistencia a la insulina

OM-baja IR: obesos mórbidos con baja resistencia a la insulina

OM-DM2-met: obesos mórbidos con tratamiento con metformina

OMS: Organización Mundial de la Salud

PC: piruvato carboxilasa

PCTV: vesícula transportadora de prequilomicrones

PDH: complejo piruvato deshidrogenasa

PDHB: piruvato deshidrogenasa subunidad beta

PEPCK: fosfoenolpiruvato carboxiquinasa

PI3K: fosfatidilinositol-3-quinasa

PLTP: proteína de transferencia de fosfolípidos

RYGB: bypass gástrico en Y de Roux

SCD-1: esteoril-CoA desaturasa-1

SECO: Sociedad Española de Cirugía de la Obesidad

SEEDO: Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad

SNARE: proteína soluble de unión al factor sensible a la N-etilaleimida

SREBP-1c: proteína de unión a elementos regulados por esteroides-1c

TNF- α : factor de necrosis tumoral α

VAMP: proteína de membrana asociada a vesícula

VLDL: lipoproteína de muy baja densidad

1. Introducción

1.1 OBESIDAD: CONCEPTO, CAUSAS Y PATOLOGÍAS ASOCIADAS

1.1.1 Evolución del hombre hacia la obesidad extrema

Aunque en las últimas décadas el problema de la obesidad ha alcanzado niveles muy altos en las sociedades industrializadas, lo cierto es que la obesidad es el resultado de la interacción entre la biología del ser humano y la cultura a lo largo de la evolución. Los seres humanos tienen la capacidad de almacenar energía en forma de grasa durante las épocas de abundancia de alimentos; esta es la teoría del denominado “genotipo ahorrador” formulada por Neel en 1962 (Neel, 1962). Sin embargo, durante la evolución del ser humano estas épocas han sido escasas y no duraban mucho tiempo. Y es que nuestros antepasados hacían frente a situaciones de escasez de alimentos, además de tener un alto gasto energético debido a la gran actividad física.

Con el advenimiento de la agricultura y, más intensamente con la llegada de la Revolución Industrial, la actividad física disminuye y la ingesta de alimentos aumenta, haciendo que la obesidad se convierta en uno de los primeros problemas de salud de las sociedades modernas (Bellisari, 2008).

El concepto de que la obesidad es un riesgo para la salud ya fue claramente identificado en la Antigua Grecia por Hipócrates quien utilizó el término corpulencia refiriéndose a la obesidad y escribió “la corpulencia no es solamente una enfermedad por sí misma, sino el precursor de otras”. Casos de obesidad extrema han sido descritos a lo largo de la historia apareciendo con mayor frecuencia a partir de los tiempos de Galeno y del Imperio Romano, aunque la interpretación del concepto de obesidad ha variado según la época (Bray, 2004).

1.1.2 Concepto de obesidad

La obesidad es una enfermedad metabólica de origen multifactorial caracterizada por una acumulación excesiva de grasa corporal. Su prevalencia se ha incrementado considerablemente en los últimos años siendo considerada uno de los grandes problemas de salud pública de los países industrializados.

Según las últimas estimaciones mundiales de la Organización Mundial de la Salud (OMS) correspondientes a 2008, en general, más de una de cada diez personas de la población adulta mundial era obesa. El sobrepeso y la obesidad son el quinto factor de riesgo de defunción en el mundo. Cada año fallecen por lo menos 2,8 millones de personas adultas como consecuencia del sobrepeso o de la obesidad. En el plano mundial, el sobrepeso y la obesidad están relacionados con un mayor número de defunciones que la insuficiencia ponderal. Por ejemplo, el 65% de la población mundial vive en países donde el sobrepeso y la obesidad se cobran más vidas que la insuficiencia ponderal (WHO, 2015).

La OMS ha definido la obesidad como la epidemia del siglo XXI. Contribuye de forma muy importante a la aparición de enfermedades crónicas muy presentes en la sociedad actual tales como, la diabetes, hipertensión, aterosclerosis, dislipemias etc... (Olshansky y cols., 2005), de ahí la gran importancia y necesidad de conocer más a fondo los desórdenes que en esta enfermedad se producen.

1.1.3 Causas de la obesidad

La obesidad es una enfermedad que deriva del desequilibrio energético. Si la ingesta de energía excede al gasto, el resultado es la ganancia de peso (Hall y cols., 2012). La obesidad tiene múltiples causas y su desarrollo es consecuencia de una compleja interacción de factores genéticos, socioeconómicos, culturales y psicológicos. Las tasas de prevalencia están incrementándose en todo el mundo de manera alarmante, lo que indica que el principal motivo de aumento de peso no son las modificaciones genéticas sino los cambios en los factores ambientales y en los hábitos de vida. La hiperfagia, una baja tasa metabólica, tasas bajas de oxidación de grasas y desajustes en

la actividad del sistema nervioso simpático caracterizan los modelos animales de obesidad. Factores metabólicos similares han sido descritos en los seres humanos susceptibles a ganar peso (Galgani y Ravussin, 2008).

El peso y la composición corporal en el individuo adulto permanecen relativamente constantes por largos periodos de tiempo, a pesar de las fluctuaciones diarias en la ingesta y gasto energético. El organismo posee mecanismos de regulación que ajustan con precisión el aporte de nutrientes y las demandas energéticas con el fin de mantener una masa corporal estable. Está claro que cambios en la ingesta o en el gasto energético provocan modificaciones de procesos metabólicos que tienden a mantener la homeostasis. Aunque estos mecanismos homeostáticos se pueden ver sobrepasados si las perturbaciones en el equilibrio energético son muy grandes.

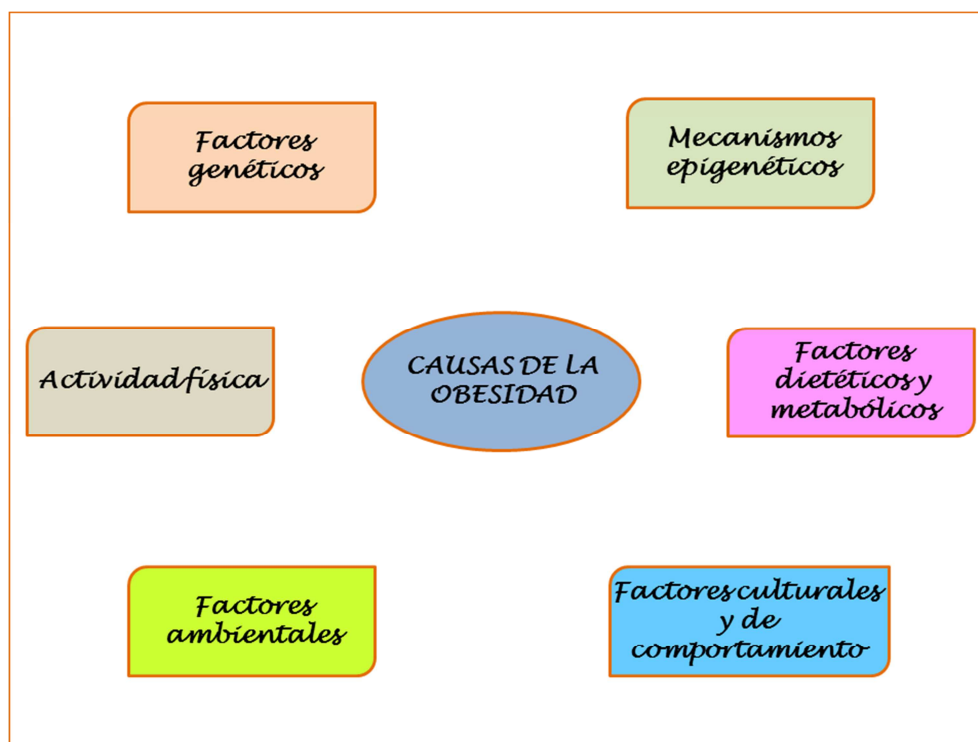


Figura 1: Causas de la obesidad.

La regulación del peso corporal requiere de mecanismos precisos de retroalimentación que controlen la masa corporal grasa (Galgani y Ravussin, 2008). El

desequilibrio continuo entre ingesta y gasto energético contribuye a la obesidad, aunque también influyen factores como la distribución de los macronutrientes en la dieta (Hall y cols., 2012), los componentes del gasto energético (Blaak, 2009) y el metabolismo de nutrientes específicos (Wycherley y cols., 2012). De los numerosos factores que están implicados en el desarrollo de la obesidad nos vamos a centrar en aquellos detallados en la Figura 1.

1.1.3.1 Factores genéticos

Numerosos estudios han mostrado la influencia de factores genéticos en el desarrollo de la obesidad. Los estudios realizados en niños adoptados sugieren que el índice de masa corporal (IMC) de un niño adoptado está correlacionado con el de sus padres biológicos en mayor medida que con sus padres adoptivos. Los estudios realizados en gemelos demuestran una alta heredabilidad de la obesidad y la importancia de las diferencias genéticas (Naukkarinen y cols., 2012). Las interacciones gen-ambiente, gen-dieta y gen-gen contribuyen no sólo a las diferencias en el desarrollo de la obesidad, también a la respuesta a los tratamientos y a la intervención.

El componente genético de la obesidad podría explicar entre un 40% y un 70% de su varianza (Allison y cols., 1996). La última actualización del Mapa Genético de la Obesidad Humana de 2006, cifra en 127 los genes candidatos para los cuales al menos un estudio muestra una asociación positiva con la obesidad (Rankinen y cols., 2006). Estos estudios han permitido la identificación de dos polimorfismos de un único nucleótido asociados con la obesidad, uno en el intrón del gen asociado a la masa grasa y a la obesidad (FTO del inglés “*fat mass and obesity-associated*”) y otro en el gen del receptor de la melanocortina 4 (MC4R del inglés “*melanocortin 4 receptor*”); estos dos polimorfismos de un único nucleótido tan solo explican el 2% de la varianza en el IMC en el adulto (Frayling y cols., 2007, Loos y cols., 2008).

Aunque en algunos casos la obesidad se explica mediante un modelo monogénico, en la mayor parte de los casos parece resultar de interacciones poligénicas, aunque no hay que obviar que en la inmensa mayoría de los casos, la obesidad es una patología con un complejo origen multifactorial.

1.1.3.2 Epigenética y obesidad

La regulación epigenética de la expresión génica ha emergido en los últimos tiempos como un factor que podría estar involucrado en las diferencias interindividuales presentes en la obesidad. Los mecanismos epigenéticos pueden alterar la función de los genes como respuesta a factores externos como la dieta, agentes farmacológicos o toxinas ambientales (Jirtle y Skinner, 2007). Estos cambios en la actividad génica se pueden propagar de una generación celular a la siguiente. Así, una misma secuencia de nucleótidos en dos individuos puede expresarse o no en función de las marcas epigenéticas específicas que presente. Los principales reguladores epigenéticos en las células de mamíferos son la metilación del ácido desoxirribonucleico (ADN) y la modificación de las histonas (Bollati y Baccarelli, 2010).

Uno de los factores de exposición más relevantes es la obesidad materna, la cual puede inducir alteraciones epigenéticas en su descendencia que confieran mayor susceptibilidad a desarrollar obesidad (McAllister y cols., 2009). Hay estudios que muestran que genes relacionados con la obesidad, como la leptina y la pro-piomelacortina, están regulados por mecanismos epigenéticos, estando relacionados estos cambios epigenéticos con su desregulación en la obesidad (Shen y cols., 2007).

1.1.3.3 Actividad física

Los seres humanos adultos mantienen un equilibrio entre los niveles de ingesta de energía y gasto energético, tal y como se demuestra por la constancia del peso y la composición corporal. El gasto energético está compuesto por tres componentes fundamentalmente: el metabolismo basal, la termogénesis y la actividad física. De todos ellos, sólo la actividad física puede ser controlada por el propio individuo. Por otra parte, la ingesta energética es totalmente voluntaria, por lo tanto los factores en los que se basa cualquier intento para reducir o controlar el peso son la dieta y el ejercicio físico.

Múltiples estudios, han puesto de manifiesto la relación existente entre niveles bajos de actividad física y la obesidad (Marshall y cols., 2004, Soriguer y cols., 2003).

Hay datos transversales que demuestran una asociación inversa entre la actividad física en el tiempo de ocio y el IMC, y otra asociación, pero directa, entre el tiempo de estar sentado y el incremento de IMC. Hay que tener en cuenta que, en las últimas décadas, ha disminuido considerablemente el esfuerzo físico en el trabajo, lo que ha tenido cierta repercusión en la prevalencia de obesidad (Chaput y Tremblay, 2009).

Otro factor a tener en cuenta en la actividad física son los cambios fisiológicos que se producen con la práctica de ejercicio. Hay estudios que muestran que el ejercicio físico agudo provoca cambios en los niveles de hormonas secretadas por el tracto intestinal, lo cual ayuda a explicar la supresión del apetito que se produce a corto plazo después del ejercicio (Martins y cols., 2007).

1.1.3.4 Factores dietéticos y metabólicos

Los carbohidratos, las proteínas y las grasas absorbidas son transformados en sustratos que pueden ser, o bien oxidados para obtener energía para los diversos procesos biológicos, o bien ser almacenados (Hall y cols., 2012). Hay estudios que se centran en los efectos que los diferentes macronutrientes tienen sobre el metabolismo. Se sabe que la composición de los alimentos tiene un gran impacto sobre la sensación de saciedad; las proteínas hacen desaparecer la sensación de hambre durante más tiempo que los hidratos de carbono, mientras que los lípidos son los que menos influyen en la sensación de saciedad (Hall y cols., 2012). La variabilidad de la carga glucémica de los alimentos afecta a los niveles de glucosa en sangre y por lo tanto, a la respuesta por parte de la insulina (Foster-Powell y cols., 2002); dietas con bajo índice glucémico pero con alta ingesta de grasas y proteínas parecen promover la saciedad (Johnstone y cols., 2008). Otros estudios se han centrado en el efecto de las dietas con fructosa o el consumo de bebidas que contienen sacarosa (Bray, 2010), así como en el tipo de ácidos grasos que conforman la dieta; se ha descrito que la incidencia de obesidad es menor en aquellas personas que consumen aceite de oliva (Soriguer y cols., 2009a).

Otro aspecto en la regulación del peso corporal es la flexibilidad metabólica, es decir, la capacidad de obtener energía mediante la oxidación utilizando como sustrato carbohidratos o grasas en función del tipo de alimento ingerido, cambios en la demanda

energética, factores ambientales... En individuos obesos este proceso no es tan eficiente, de modo que una menor tasa de oxidación de grasas conlleva un balance energético positivo y una acumulación de grasas (Astrup, 2011). El ajuste individual entre la distribución de macronutrientes de la dieta en función de la capacidad oxidativa podría jugar un papel crucial para permitir la estabilidad del peso corporal a corto y largo plazo.

Recientemente se ha destacado el papel que la flora intestinal tiene sobre el metabolismo energético y la capacidad de obtener energía del alimento ingerido. Dos grupos principales de bacterias caracterizan la flora intestinal, *Bacteroidetes* y *Firmicutes*, cuya eficiencia metabólica varía; los individuos obesos se caracterizan por presentar una mayor proporción de *Firmicutes* en su flora intestinal, los cuales tienen una mayor capacidad de obtener energía de los alimentos (Turnbaugh y cols., 2006), lo que contribuye a la ganancia de peso.

1.1.3.5 Factores ambientales, culturales y de comportamiento

El factor económico juega un papel importante en el desarrollo de la obesidad. Existe una relación inversa entre el coste de los alimentos y la densidad energética de los alimentos; los alimentos ricos en azúcares y grasas son más baratos que los vegetales o los alimentos integrales. Numerosos estudios han evaluado la influencia del nivel socio-económico sobre la obesidad; en países desarrollados los individuos con menor nivel socio-económico son los que padecen obesidad con una mayor frecuencia (McLaren, 2007). El nivel educacional también se ha relacionado con la obesidad, así el riesgo de ser obeso es mayor en personas sin estudios (Soriguer y cols., 2004).

La cantidad de estudios que evalúan la asociación entre las horas de sueño y el riesgo de obesidad se ha incrementado en los últimos años. Numerosos estudios encuentran asociación entre una menor duración del sueño y un aumento del IMC (Cappuccio y cols., 2008, Gutiérrez-Repiso y cols., 2014). Los mecanismos por los que la restricción del número de horas de sueño puede incrementar el riesgo de obesidad no están claros. Hay estudios que indican que la restricción del sueño puede aumentar el cansancio diurno y reducir la actividad física (Schmid y cols., 2009), aunque en este

sentido hay resultados contradictorios (Haghighatdoost y cols., 2012, Patel y cols., 2006). Se ha encontrado que la restricción de sueño durante periodos cortos de tiempo incrementa la ingesta de alimentos (Brondel y cols., 2010). Otros estudios han determinado que las personas que duermen menos ingieren más grasas y hacen dietas, en general, de peor calidad (Haghighatdoost y cols., 2012).

Los disruptores endocrinos son sustancias químicas que podemos encontrar en pesticidas, compuestos usados en la fabricación de plásticos y artículos de consumo, residuos industriales contaminantes... que en el organismo humano actúan alterando el equilibrio hormonal. Estos disruptores endocrinos han sido asociados con el incremento de prevalencia de obesidad; actúan alterando el metabolismo de lípidos, la tasa metabólica basal, la regulación del apetito... (McAllister y cols., 2009, De Coster y van Larebeke, 2012).

1.1.4 Clasificación de la obesidad

Las medidas antropométricas que se utilizan en la valoración del peso corporal y la obesidad son varias: circunferencia de la cintura, ratio cintura-cadera, IMC, ratio cintura-altura...

Tabla 1: Clasificación propuesta por la OMS según el IMC.

Tipificación	Valores límites de IMC (kg/m²)
Infrapeso	<18.5
Normopeso	18.5-24.9
Sobrepeso	25-29.9
Obesidad grado I	30-34.9
Obesidad grado II	35-39.9
Obesidad grado III (mórbida)	≥40

Por consenso científico, hace unos años se aceptó el IMC como método de clasificación del peso corporal. El IMC se define como el cociente entre el peso en kilogramos y el cuadrado de la talla en metros. Aunque el IMC no es un buen indicador de adiposidad en individuos musculados como deportistas, y en ancianos, es el índice utilizado por la mayoría de estudios epidemiológicos. La OMS propone una clasificación de la obesidad en función del IMC (WHO, 2000), que se recoge en la Tabla 1.

La Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO) y la Sociedad Española de Cirugía de la Obesidad (SECO) han elaborado un documento de consenso que permite a los distintos profesionales implicados en el tratamiento de la obesidad mórbida una orientación práctica a la hora de desarrollar sus propios protocolos en su ámbito de trabajo. La SEEDO especifica dos categorías para la obesidad mórbida: 40-49.9 kg/m² (obesidad mórbida) y ≥ 50 kg/m² (superobesidad mórbida), ya que desde el punto de vista quirúrgico tiene implicaciones a la hora de seleccionar la técnica más adecuada. Además la Sociedad Americana de Cirugía Bariátrica y la SECO incluyen una tercera categoría, la que corresponde a pacientes con IMC ≥ 60 kg/m² (Tabla 2) (Rubio, 2004).

Tabla 2: Criterios propuestos para definir la obesidad en grados según el IMC.

Tipificación	Valores límites de IMC (kg/m ²)
Obesidad grado I	30-34.9
Obesidad grado II	35-39.9
Obesidad grado III (Obesidad Mórbida)	40-49.9
Obesidad grado IV (Superobesidad)	50-59.9
Obesidad grado V (Super-superobesidad)	≥ 60

1.1.5 Concepto de Obesidad Mórbida

En los años ochenta, Van Itallie describió por primera vez el término de obesidad mórbida para referirse al grado de obesidad que compromete la esperanza de vida del individuo (Van Itallie, 1980), un tipo de obesidad rebelde a cualquier tipo de tratamiento médico y que predispone a graves enfermedades y trastornos psicosociales. Esta forma severa de obesidad se define como aquellas personas que presentan un valor de IMC mayor o igual a 40 kg/m^2 .

Numerosos estudios han demostrado un incremento de la mortalidad y morbilidad en pacientes obesos, de forma que cuanto mayor es el sobrepeso mayor es el riesgo vital (Flegal y cols., 2013). Diversos estudios han encontrado una asociación entre el IMC y la mortalidad, describiendo una relación en J o U entre el IMC y los años de vida perdidos (Fontaine y cols., 2003). En el caso de la obesidad mórbida, los riesgos se incrementan de manera drástica, estando su supervivencia limitada por enfermedades coronarias, hipertensión arterial, diabetes mellitus tipo 2 (DM2), síndrome de apnea del sueño y artrosis, entre otras (Sjostrom, 1992).

Esta enfermedad crónica presenta una tendencia epidémica en los países industrializados. En EE.UU. pasó de una prevalencia de 0.78% en 1990 al 2.2% en 2000 (Freedman y cols., 2002). En nuestro país los últimos datos del estudio Di@bet.es presentan una prevalencia de obesidad mórbida ajustada por edad y sexo de 2.34% (1.89-2.79 IC 95%) (datos no publicados). Los datos disponibles reflejan que, en general, la prevalencia de obesidad mórbida es mayor en mujeres y que tiende a aumentar con la edad principalmente en la población femenina.

1.1.6 Patologías asociadas a la obesidad

La obesidad es un factor de riesgo muy importante para el desarrollo de enfermedades crónicas de gran prevalencia en países desarrollados, como la hipertensión, dislipemia y DM2. Otras enfermedades que están incrementadas por el exceso de grasa corporal son: enfermedad isquémica coronaria, accidente vascular cerebral, síndrome de hipoventilación y apnea del sueño, esteatohepatitis no alcohólica,

colecistitis, osteoartrosis e infertilidad (Guh y cols., 2009). Asimismo, existen estudios que asocian la obesidad mórbida con un mayor riesgo de desarrollar diversos tipos de cáncer (Kaidar-Person y cols., 2011).

1.1.6.1 Hipertensión

Numerosos estudios han mostrado que existe una asociación entre obesidad e hipertensión. El riesgo de padecer hipertensión es 3.5 veces mayor en pacientes obesos que en individuos normo-peso (Kotchen, 2010). Un 5% de ganancia de peso incrementa la probabilidad de padecer hipertensión en un 20-30% (Vasan y cols., 2001), mientras que una reducción de peso conlleva una disminución de la presión arterial (Dall'Asta y cols., 2009).

Los mecanismos que relacionan la obesidad con la hipertensión son complejos e incluyen desajustes en múltiples sistemas: incremento en la actividad del sistema renina-angiotensina-aldosterona, incremento en la actividad del sistema nervioso simpático, desregulaciones metabólicas como la hiperinsulinemia, alteraciones en la secreción de adipoquinas y posibles daños en el tejido adiposo perivascular (Aghamohammadzadeh y Heagerty, 2012).

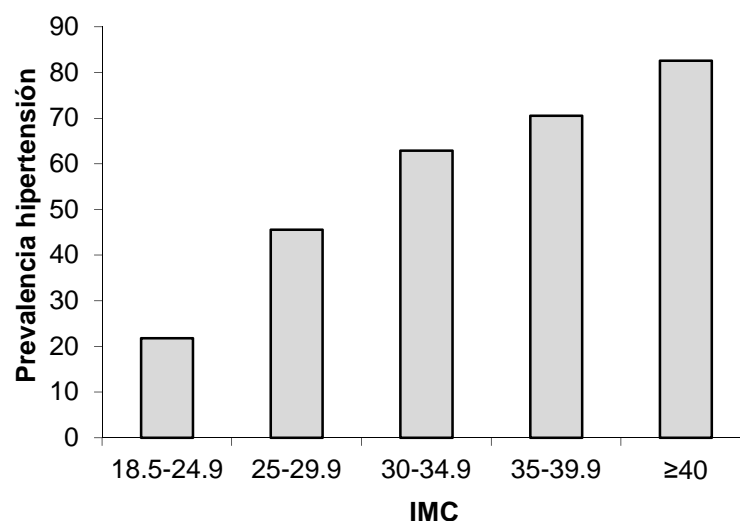


Figura 2: Prevalencia de hipertensión en España según categorías de IMC. Datos del Estudio Di@bet.es (datos no publicados).

1.1.6.2 Diabetes mellitus tipo 2 (DM2)

La DM2 se asocia estrechamente con la obesidad en ambos sexos y en todos los grupos étnicos. Más del 80% de los casos de DM2 se pueden atribuir a la obesidad. Asociaciones muy claras han sido descritas en grupos étnicos con alta susceptibilidad a la DM2, como es el caso de los indios Pima de Arizona, que presentan una tasa de prevalencia de obesidad y diabetes del 60% y del 40% respectivamente en adultos. En un estudio longitudinal con 23 años de seguimiento, se determinó que la obesidad está fuertemente asociada a la incidencia de DM2, incluso en sujetos sin antecedentes familiares de esta enfermedad (Knowler y cols., 1991).

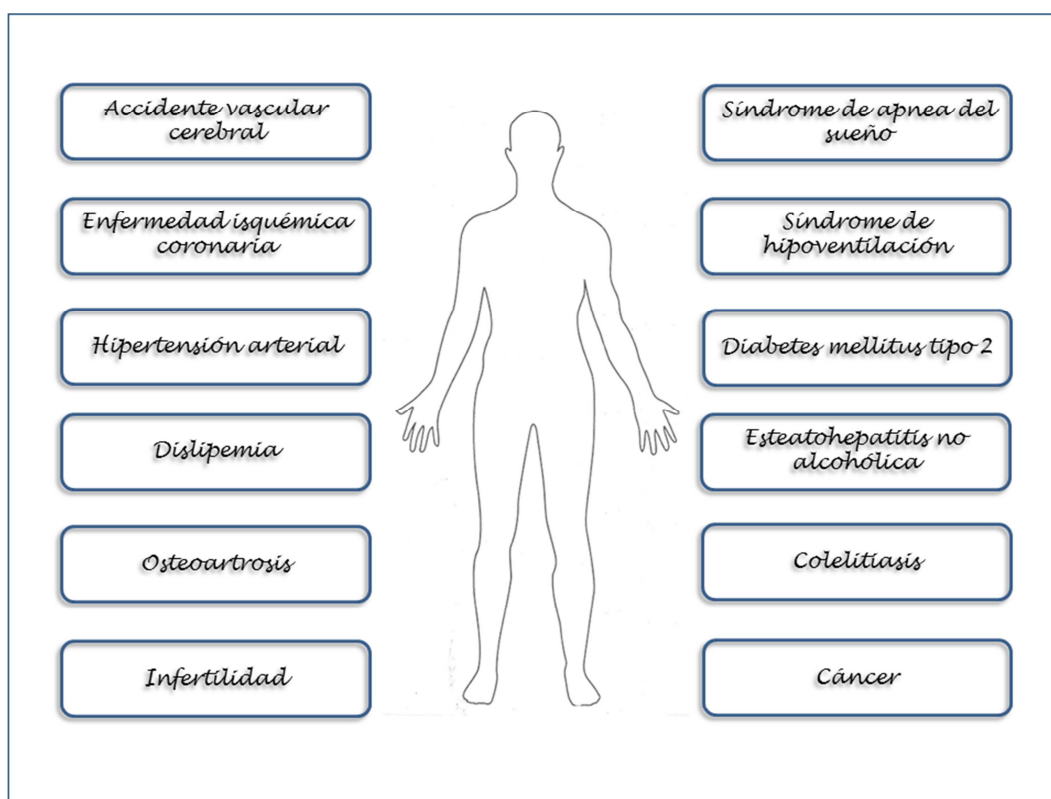


Figura 3: Principales patologías asociadas a la obesidad.

El riesgo de DM2 se incrementa con el grado y la duración de obesidad. Estudios como el “*Nurses’ Health Study*” con 14 años de seguimiento encontraron que

el riesgo más bajo de DM2 se asocia con un IMC inferior a 22 kg/m², incrementándose gradualmente con el aumento del IMC (Colditz y cols., 1995).

El efecto de la obesidad como factor de riesgo para el desarrollo de DM2 es más fuerte en la etapa de adulto joven. En el estudio “*European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition-Potsdam Study*”, la ganancia de peso en la etapa adulta entre 25-40 años se asoció con un mayor riesgo y un inicio más temprano de la enfermedad que la ganancia de peso después de los 40 años (Schienkiewitz y cols., 2006).

Se ha estimado que los individuos con IMC superior a 40 kg/m² tienen siete veces más probabilidad de desarrollar DM2 que aquellos individuos normo-peso (Mokdad y cols., 2003). Además la ganancia de peso incrementa el riesgo de desarrollar DM2 tanto en hombres como en mujeres. De manera que ganancias ponderales entre 8-10 kg de peso incrementan el riesgo relativo en 2.7. Por otro lado, la pérdida de peso se asocia con una reducción del riesgo de desarrollar DM2.

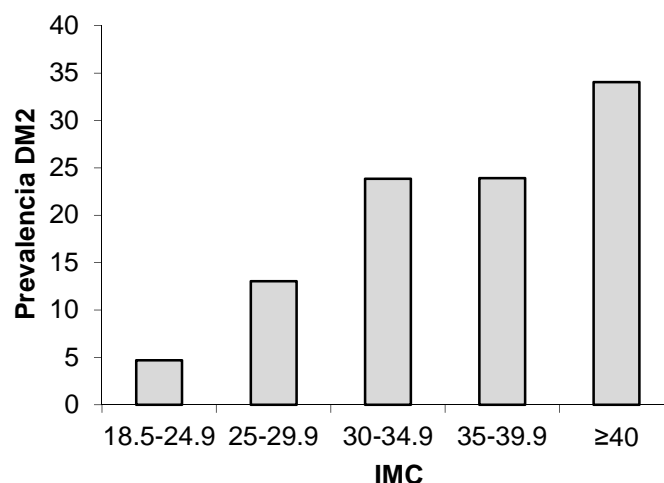


Figura 4: Prevalencia de DM2 en España según categorías de IMC. Datos del estudio Di@bet.es (datos no publicados).

La DM2, al igual que la obesidad, es una enfermedad de origen multifactorial donde la predisposición genética juega un papel muy importante junto con los factores ambientales. Numerosos estudios han evaluado el papel de la heredabilidad en el

desarrollo de la DM2. Estudios realizados en casos de adopciones cifran en un 30-70% el peso del componente hereditario en la DM2 (Meigs y cols., 2000).

a. Resistencia a la insulina

La insulina, secretada en respuesta a un incremento de la concentración de glucosa, reduce los niveles de glucosa circulantes ya que favorece la captación de glucosa por parte del músculo esquelético y el tejido adiposo, e inhibe la gluconeogénesis (Taniguchi y cols., 2006). Además la insulina regula numerosas rutas metabólicas como son la glucogénesis, lipogénesis y síntesis de proteínas (Kahn, 1994).

La DM2 está causada por la combinación de un incremento de la resistencia a la insulina en los tejidos periféricos y la pérdida de actividad de la célula β en el páncreas (Saltiel, 2001). El concepto de resistencia a la insulina se basa en la disminución de la acción biológica de la insulina, especialmente sobre sus tejidos diana: músculo esquelético, hígado y tejido adiposo. La falta de acción insulínica condiciona inicialmente el incremento de glucemia postprandial seguido en el tiempo de hiperglucemia basal. La secreción de insulina se va incrementando hasta que acaba claudicando la secreción de la célula β de forma progresiva como consecuencia de la hiperglucemia crónica, dando lugar finalmente a la DM2 e hipoinsulinemia.

La insulina activa numerosas rutas de señalización en todos aquellos tejidos donde se expresa el receptor transmembrana de la insulina. La ruta mediada por el sustrato del receptor de insulina (IRS, del inglés “*insulin receptor substrate*”) y por la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K, del inglés “*phosphatidylinositol 3-kinase*”) es la que juega un papel fundamental en las acciones metabólicas de la insulina, lo que sugiere que alteraciones de esta ruta pueden contribuir al desarrollo de la resistencia a la insulina. De hecho, en modelos animales, la disrupción del gen IRS1 desemboca en un incremento de la resistencia a la insulina principalmente en músculo y tejido adiposo, mientras que la disrupción del gen IRS2, no solo provoca resistencia a la insulina en músculo, hígado y tejido adiposo, sino que también desencadena el desarrollo de DM2 como resultado de fallos en la célula β (Previs y cols., 2000).

El receptor de la insulina es un heterotetrámero formado por dos subunidades α y por dos subunidades β que se encuentran unidas por puentes de disulfuro. La insulina se une a la subunidad α del receptor de insulina y activa la tirosín quinasa presente en la subunidad β . Una vez que la tirosín quinasa del receptor de insulina es activada, ésta promueve la autofosforilación de la subunidad β , así como la fosforilación de una serie de residuos de tirosina presentes en IRS. La activación de IRS mediante su fosforilación provoca la activación de PI3K y Akt. Todo ello conlleva un incremento del transporte de glucosa, una activación de la síntesis de glucagón e inhibición de la gluconeogénesis (Grimmsmann y cols., 2002, Taniguchi y cols., 2006). La no activación de la ruta donde participan PI3K/Akt está asociada con intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina, así como a un incremento de la expresión de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK, del inglés “*phosphoenolpyruvate carboxykinase*”) y la glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa) (Whiteman y cols., 2002).

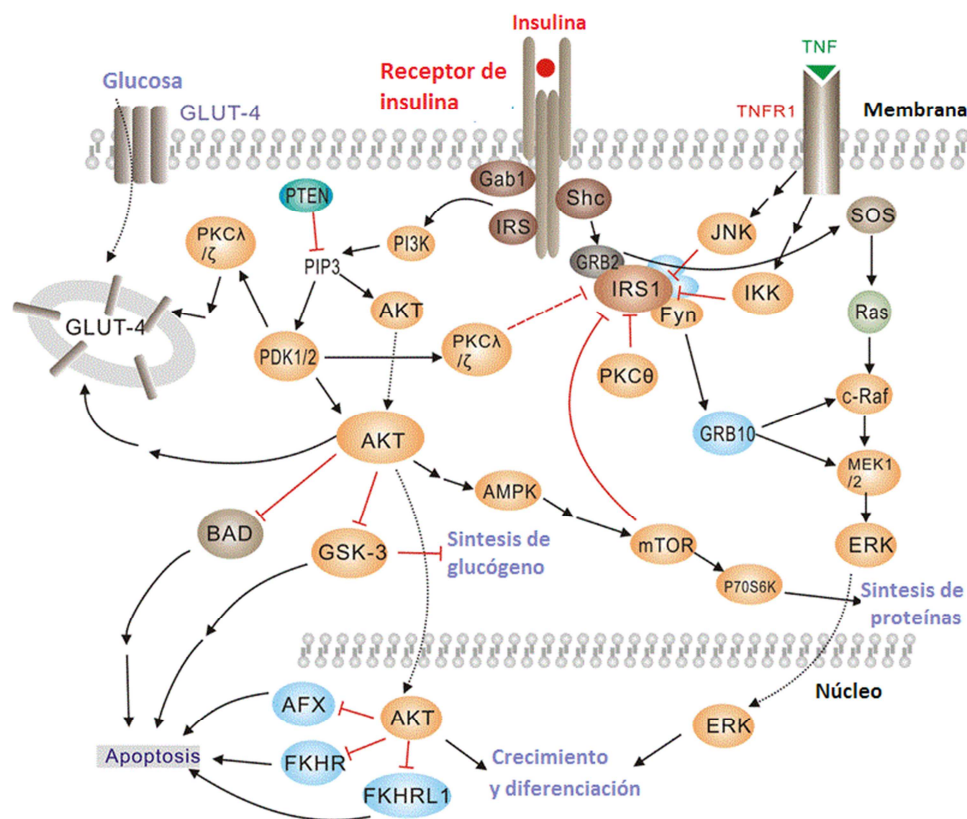


Figura 5: Ruta de señalización de la insulina.

PI3K es una familia de enzimas que catalizan la fosforilación de los fosfatidilinositoles, para dar como producto fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato. La función de los fosfolípidos como mensajeros consiste en permitir el anclaje de quinasas a la membrana plasmática, con el fin de que estas puedan interactuar con sus sustratos y fosforilarlos. PI3K participa en el control de numerosas funciones fisiológicas, entre ellas en la homeostasis de la glucosa (Vanhaesebroeck y cols., 2001).

PI3K clase I está formada por heterodímeros compuestos por una subunidad catalítica (p110) y una subunidad reguladora (p85), es la más estudiada y se divide en clase IA y clase IB. La clase IA contiene cinco posibles subunidades reguladoras (p85- α , p85- β , p55- γ , p55- α , p50- α), la cual se une a una de las subunidades catalíticas (p110- α , p110- β , o p110- δ). Se ha descrito que p85 participa en la estabilización de la conformación de la subunidad catalítica y en la inhibición de su actividad quinasa (Yu y cols., 1998).

En fibroblastos de embriones de ratón (Ueki y cols., 2002) y en células hepáticas de ratón (Mauvais-Jarvis y cols., 2002) se ha descrito la presencia de un exceso de p85 con respecto de p110, aunque existe un balance entre la cantidad de monómeros de p85 libres y la cantidad de heterodímeros p85-p110, siendo estos últimos los responsables de la actividad PI3K (Ueki y cols., 2002, Mauvais-Jarvis y cols., 2002). Tanto p85 libre como el heterodímero p85-p110 compiten por los mismos sitios de unión a las proteínas IRS; p85 en su forma monomérica no es capaz de transmitir señal pero inhibe la vía de señalización del dímero p85-p110 al competir por sus sitios de unión. Por lo tanto, un desequilibrio de este balance puede provocar alteraciones en la actividad PI3K (Giorgino y cols., 1997). Un exceso de la subunidad reguladora ha sido descrita en humanos con resistencia a la insulina inducida nutricionalmente (Cornier y cols., 2006), en mujeres embarazadas con resistencia a la insulina (Kirwan y cols., 2004) y en pacientes con DM2 (Bandyopadhyay y cols., 2005). Bien es cierto que existen ciertas evidencias experimentales que ponen en entredicho este modelo de exceso de p85 con respecto de p110 (Geering y cols., 2007, Brachmann y cols., 2005).

Las consecuencias clínicas de la resistencia a la insulina y el hiperinsulinismo compensador que la acompaña son muy variadas y se asocian a una serie de alteraciones metabólicas que condicionan finalmente un incremento del riesgo cardiovascular. Se

han propuesto varios mecanismos para unir la obesidad a la resistencia a la insulina y a la predisposición a desarrollar DM2:

1. Incremento en la producción de adipoquinas/citoquinas, incluyendo al factor de necrosis tumoral- α (TNF- α , del inglés “*tumor necrosis factor- α* ”), resistina y la proteína de unión al retinol 4, que contribuyen a la resistencia a la insulina, así como la disminución de niveles de adiponectina (Deng y Scherer, 2010).
2. Los depósitos de grasa ectópica, en concreto en el hígado y tal vez también en el músculo esquelético (Larson-Meyer y cols., 2011).
3. La disfunción mitocondrial, evidenciada por la disminución de la masa y/o actividad mitocondrial (Bournat y Brown, 2010).

1.1.6.3 Dislipemia

La enfermedad cardiovascular es la principal causa de mortalidad a nivel mundial (WHO, 2013). Las principales entidades clínicas de la enfermedad cardiovascular son la enfermedad arterial coronaria, el infarto isquémico y la enfermedad arterial periférica. Los factores de riesgo de enfermedad cardiovascular son multifactoriales e incluyen la edad, pertenecer al sexo masculino, el tabaquismo, la falta de actividad física, los hábitos alimenticios, la presión arterial y las dislipemias.

El término dislipemia, o niveles de lipoproteínas elevados o disminuidos, abarca un amplio espectro de anormalidades lipídicas. Las dislipemias pueden ser secundarias y relacionadas así a otras enfermedades, o primarias y ser debidas a una predisposición genética y a factores ambientales.

El perfil lipídico que se asocia con la obesidad se caracteriza por una elevación moderada de triglicéridos, bajos niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL-c, del inglés “*high density lipoprotein-cholesterol*”) y la presencia de lipoproteínas de baja densidad (LDL-c, del inglés “*low density lipoprotein-cholesterol*”) pequeñas, densas y muy aterogénicas. Aunque los niveles de colesterol total y de LDL-c no son

significativamente diferentes al de los individuos normo-peso, la presencia de estas partículas densas de LDL-c incrementa de manera significativa el riesgo cardiovascular. Otras anomalías que se encuentran son la hipertrigliceridemia postprandial y el incremento de los niveles de apolipoproteína B-100 (apo B-100). Dos mecanismos contribuyen fundamentalmente a la hipertrigliceridemia: el incremento de la síntesis hepática de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, del inglés “*very low density lipoprotein*”) por la afluencia de ácidos grasos procedentes del tejido adiposo visceral, y la disminución del catabolismo de las VLDL por acción de la lipoproteína lipasa (LPL), una enzima dependiente de la insulina (Ferns y cols., 2008).

En estudios poblacionales se ha puesto de manifiesto que las dislipemias asociadas a la obesidad aparecen desde la infancia y se incrementan con la edad (Wattigney y cols., 1991). La hipertrigliceridemia, además de con la obesidad, se asocia con la resistencia a la insulina, siendo un factor de riesgo para el desarrollo de DM2 (D'Agostino y cols., 2004) y de enfermedades cardiovasculares (Hopkins y cols., 2003). Estudios epidemiológicos prospectivos han mostrado una asociación positiva entre los niveles circulantes de triglicéridos y el riesgo de padecer enfermedad coronaria (Sarwar y cols., 2007). Los niveles de triglicéridos en sangre también correlacionan con el IMC. Usando como punto de corte un valor de triglicéridos >150 mg/dl se encontró en EE.UU. una prevalencia de hipertrigliceridemia del 27.5% para los individuos con un IMC inferior a 25 kg/m², 31% para aquellos con IMC entre 25 y 30 kg/m² y del 36% para los individuos con un IMC superior a 30 kg/m² (Ghandehari y cols., 2009).

Los tratamientos no farmacológicos para la dislipemia incluyen la reducción de peso, el incremento de la actividad física y la modificación de la dieta. El consumo diario de ácido graso omega-3 junto con la reducción de la ingesta de grasas saturadas y de energía ayudan a reducir los niveles de triglicéridos plasmáticos.

1.1.7 Tratamiento de la obesidad

La intervención en la modificación del estilo de vida para los pacientes obesos, combina recomendaciones específicas sobre la dieta y el ejercicio con los procedimientos y las estrategias conductuales y cognitivas.

La orientación terapéutica de los nuevos tratamientos farmacológicos hacia la disminución de la ingesta calórica y el aumento del gasto energético total, en el contexto de una regulación neurohormonal muy compleja del balance energético, pueden hacer de ellos una herramienta útil para lograr la pérdida de peso en el tratamiento global de la obesidad.

La dieta está asociada con una modesta pérdida de peso que no es representativa para este tipo de pacientes. Además, en la mayoría de casos la pérdida de peso no se mantiene en el tiempo y es fácilmente recuperado (Kraschnewski y cols., 2010). El tratamiento farmacológico consigue pérdidas de peso alrededor del 10% a medio plazo (Padwal y cols., 2003). Sin embargo, a largo plazo la práctica totalidad de los que han intentado perder peso vuelve a recuperarlo en un plazo inferior a 5 años.

Debido a los fracasos en el tratamiento dietético y la limitada eficacia de los tratamientos farmacológicos, la cirugía bariátrica es el único tratamiento que puede mejorar las expectativas a largo plazo, más de cinco años, y reducir las comorbilidades severas asociadas en pacientes con obesidad mórbida.

1.1.8 Cirugía de la Obesidad Mórbida

La cirugía de la obesidad mórbida o cirugía bariátrica es una cirugía gastrointestinal que representa el último recurso en pacientes en quienes han fracasado otros tratamientos de tipo conservador, como la dieta, el ejercicio físico o el tratamiento farmacológico.

Se ha establecido que un paciente con obesidad debería ser candidato a cirugía bariátrica cuando el IMC fuese superior a 40 kg/m², o superior a 35 kg/m² con comorbilidades asociadas (NIH, 1996).

Se considera que la evolución de las enfermedades asociadas a la obesidad mórbida es paralela a la pérdida de peso. Apenas con pérdidas del 10-20% de peso, podemos observar mejoría, cuando no curación, de alguna o de todas las enfermedades asociadas hasta en un 90% de los pacientes.

Son muchas las técnicas que se han desarrollado en los últimos años, quizás debido a que no hay ninguna técnica eficaz en todos los pacientes y a que ninguna de ellas está exenta de complicaciones. El abordaje laparoscópico en estas cirugías también ha tenido un gran impacto dentro de este campo, ofreciendo claras ventajas como son la reducción de la estancia hospitalaria, menor dolor y una recuperación postoperatoria más temprana.

La cirugía de la obesidad cuenta con una serie de técnicas que han ido evolucionando a lo largo de los años. Se pueden clasificar en tres grandes grupos:

- De procesos malabsortivos: Reducen el acceso del alimento ingerido a aquellas partes del intestino delgado donde la absorción de nutrientes tiene lugar.
- De procesos restrictivos: Tienen por objetivo limitar la ingestión de alimentos mediante la reducción de la cavidad gástrica a menos de 30 ml, provocando así la sensación de saciedad.
- De procesos mixtos: malabsortivos/restrictivos.

1.1.8.1 Procedimientos malabsortivos

a. Bypass yeyunocólico/yeyunoileal

Son el primer tipo de intervención de cirugía bariátrica que se ideó. Dentro de sus variantes están el bypass yeyunocólico y el yeyunoileal y en ambas se produce un síndrome de intestino corto extremo. La cirugía consiste en seccionar el yeyuno proximal y anastomosarlo al íleon terminal o al colon transversal dejando como asa ciega prácticamente todo el intestino delgado. Aunque la pérdida de peso era muy efectiva acarrea graves consecuencias metabólicas: alteraciones electrolíticas,

deshidratación, diarrea y fallo hepático, entre otras, lo que finalmente requería deshacer el bypass. Estas consecuencias llevaron al abandono de esta técnica en los años ochenta y a la búsqueda de otras alternativas.

b. Derivación biliopancreática

En 1976, Scopinaro inició trabajos experimentales en perros con la intervención que él denominó bypass biliopancreático, que aun conservando la esencia del bypass yeyunoileal resolviese sus problemas.



Figura 6: Derivación biliopancreática

La técnica quirúrgica inicial consiste en una resección parcial del estómago, y la pequeña bolsa remanente se conecta directamente al segmento final del intestino delgado, evitando completamente el paso a través de la parte superior del intestino. La pérdida de peso se produce porque la mayoría de las calorías y nutrientes son dirigidos al colon donde no son absorbidos (Figura 6).

Esta técnica ha superado la prueba del tiempo. En lo referente a la pérdida de peso, los resultados son excelentes, pero no es una técnica exenta de complicaciones. Las secuelas inmediatas más comunes son flatulencia postprandial y esteatorrea. A medio y largo plazo son bien conocidas la ferropenia, el déficit en la absorción de calcio

con incremento de la reabsorción ósea, anemia, elevación de paratirina o déficit de vitaminas liposolubles (A, K, D).

1.1.8.2 Procedimientos restrictivos

a. Gastroplastia vertical

En 1981 Fabito introduce el concepto de gastroplastia vertical y, ese mismo año, Laws fue quizás el primero en asociar al grapado en continuidad gástrico un anillo de silastic para calibrar el orificio de salida y así impedir que su dilatación facilitase el vaciamiento del reservorio. Mason modificó la técnica asociando un orificio que atravesaba todo el estómago y facilitaba la colocación del grapado y la anilla.

Este tipo de técnica es menos agresiva al respetar la fisiología de la digestión y la absorción de nutrientes; sin embargo en cuanto a la pérdida de peso tiene una menor efectividad.

b. Banda gástrica

Es la técnica menos agresiva de las restrictivas y además es totalmente reversible. En 1985, Kuzmak coloca la primera banda ajustable, con un anillo de silicona dotado con una cámara interior expansible conectada a un reservorio subcutáneo que permite ajustar el calibre de la banda y, por tanto, el orificio gástrico. El diseño de bandas para colocación laparoscópica, junto con el perfeccionamiento técnico y las bajas complicaciones ha expandido el uso de esta técnica.

Las complicaciones intraoperatorias son escasas y las secuelas metabólicas prácticamente inexistentes.

c. Gastrectomía tubular

Esta técnica es la primera parte del cruce duodenal y consiste en la extirpación del 80% del estómago. Se comenzó a utilizar como un primer tiempo del cruce duodenal, para adelgazar al paciente antes de proceder a la segunda parte y se vio que tenía muy buenos resultados a corto plazo, por lo que se empezó a utilizar como técnica única.

Este tipo de técnica no produce las complicaciones de la malabsorción. Además permite una segunda operación para completar el bypass biliopancreático si fuera necesario. Otra de las ventajas es que aunque no sea reversible, el estómago se distiende con el tiempo y permite una comida casi normal sin consecuencias serias a largo plazo.

1.1.8.3 Procedimientos mixtos

a. Bypass gástrico

Mason fue el pionero y precursor de las diferentes variantes de bypass gástrico y, posteriormente de las gastroplastias.

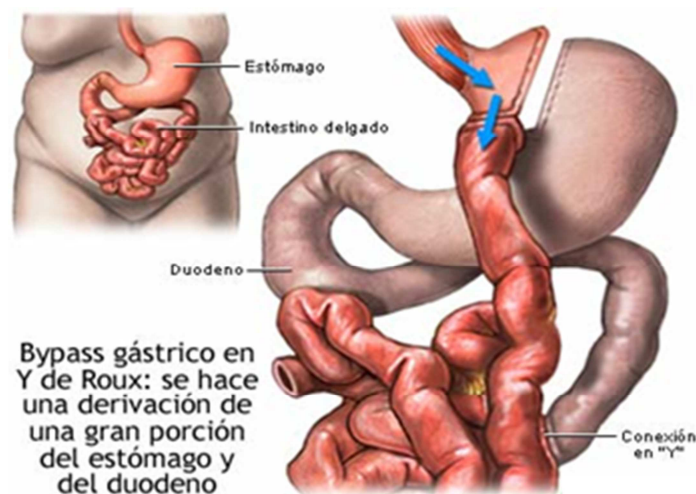


Figura 7: Bypass gástrico

El procedimiento de bypass gástrico en Y de Roux (RYGB, del inglés “*Roux-en-Y gastric bypass*”) consiste en la creación de un reservorio gástrico a partir de una pequeña porción de estómago y su unión directa al intestino delgado, evitando así el paso de alimentos a través de una gran parte del estómago y del duodeno. El reservorio gástrico resultante es demasiado pequeño para albergar grandes cantidades de alimento. Además, la absorción de grasa se reduce sustancialmente al evitarse el paso por el duodeno (Figura 7).

Las complicaciones son mucho menores que las de la derivación biliopancreática y se deben a la exclusión del duodeno y del yeyuno proximal de la absorción de nutrientes. Entre ellas destaca la anemia y el déficit de calcio. El dumping o síndrome de vaciado rápido es un efecto secundario que puede ser “beneficioso”, ya que limita la ingesta de azúcares refinados en los pacientes. A pesar de ello, son más las ventajas que los inconvenientes que de ella se derivan. Comorbilidades como hipertensión, DM2, apnea obstructiva del sueño, reflujo y asma se resuelven o mejoran en el 80-100% de los casos. La calidad de vida a corto plazo mejora en todos los pacientes, sobre todo en mujeres con DM2. Por todo ello, el bypass gástrico se ha consolidado en nuestros días como una técnica de referencia.

1.1.9 Cirugía metabólica

Más del 60% de los sujetos con DM2 son obesos (Kramer y cols., 2010) y la frecuencia se incrementa de manera desproporcionada en aquellos sujetos con un mayor grado de obesidad (Gregg y cols., 2007). El tratamiento de la DM2 hasta ahora se ha basado en modificaciones del estilo de vida y la dieta, asociadas a tratamiento farmacológico con hipoglicemiantes orales o insulinas. La pérdida de peso debería ser el principal objetivo del tratamiento en individuos obesos con DM2, pero sin embargo, con los tratamientos convencionales difícilmente se consigue. De hecho, la ganancia de peso es una de las principales complicaciones del tratamiento con sulfonilureas, insulina o tiazolidinedionas. La falta de un tratamiento farmacológico, junto a las modificaciones del estilo de vida y la dieta que traten el exceso de peso en pacientes con obesidad

severa, hacen de la cirugía bariátrica una alternativa para el tratamiento de la obesidad y la resolución de las comorbilidades asociadas.

La cirugía bariátrica fue inicialmente ideada para tratar la obesidad mórbida y se consideraba adecuada para sujetos con un IMC superior a 40 kg/m², o para individuos con un IMC superior a 35 kg/m² y con comorbilidades asociadas a la obesidad, tales como la DM2, la hipertensión o la enfermedad cardiovascular (NIH, 1996). Numerosos son los estudios que evalúan la pérdida de peso con la cirugía bariátrica, así como la resolución de las distintas comorbilidades asociadas a la obesidad. Diversos estudios caso-control que incluyen pacientes con DM2 y un IMC de al menos 35 kg/m² han demostrado una mejora sustancial en el control metabólico e incluso la remisión de diabetes. Además, la cirugía bariátrica puede prevenir de manera eficaz la progresión de la tolerancia alterada a la glucosa hacia DM2 en individuos obesos mórbidos. Un reciente meta-análisis que incluía 621 estudios realizados entre el 1 de enero de 1990 y el 30 de abril de 2006, y un total de 135.246 pacientes con una media de IMC de 47.9 kg/m², de los cuales el 80% eran mujeres, estima una pérdida de peso general de 38.5 kg o del 55.9%. En un 78.1% de los casos, la DM2 remitió y más de dos años después de la intervención, en un 62% se mantuvo esta remisión; los niveles de insulina disminuyeron significativamente después de la intervención, así como los de hemoglobina glicosilada (HbA1c) y la glucosa en ayunas (Buchwald y cols., 2009). La cirugía bariátrica también está asociada a una mejora del síndrome de apnea obstructiva del sueño (Fritscher y cols., 2007), así como a una reducción de la mortalidad global (Pontiroli y Morabito, 2011), siendo reducida la mortalidad específica asociada a DM2 en más de un 90% (Adams y cols., 2007).

Una revisión Cochrane de 2009 que incluye estudios realizados con pacientes con y sin DM2 concluye que la pérdida de peso es mayor con los procedimientos de cirugía bariátrica que con los tratamientos convencionales en sujetos obesos con un IMC superior a 30 kg/m², y que está acompañada de una mejoría en las comorbilidades como la DM2, hipertensión y una mejoría en la calidad de vida. En este estudio se estimó que la tasa de remisión de la DM2 osciló entre el 57% y el 95% dependiendo del procedimiento quirúrgico así como de la definición de remisión empleada (Colquitt y cols., 2009).

La comparación directa entre estudios resulta compleja debido a inconsistencias metodológicas, la duración y la severidad de la DM2, así como la propia definición de remisión de diabetes. La Asociación Americana de Diabetes incluye en su definición de remisión de diabetes un valor de HbA1c $\leq 6\%$, así como unos niveles de glucosa en ayunas normales con una ausencia de medicación de al menos un año.

1.1.9.1 Cirugía metabólica versus tratamiento médico intensivo

A pesar de que son numerosos los estudios que muestran los efectos beneficiosos de la cirugía bariátrica sobre la remisión de la DM2, pocos estudios evalúan la eficacia de la cirugía bariátrica frente a los tratamientos médicos convencionales en pacientes con obesidad mórbida y DM2.

Un estudio aleatorio controlado, recientemente publicado, evalúa la remisión de la DM2 en 60 sujetos con un IMC ≥ 35 kg/m², una duración de la DM2 de al menos cinco años y un valor de HbA1c $\geq 7\%$. Estos sujetos fueron asignados de manera aleatoria a tres grupos: uno recibió tratamiento médico convencional, otro se sometió a bypass gástrico y otro a diversión biliopancreática. A los dos años se evaluó la remisión de la DM2 que se definió como una glucosa en ayunas inferior a 100 mg/dl y una valor de HbA1c menor de 6.5% en ausencia de tratamiento farmacológico. En el grupo que recibió tratamiento médico ningún caso de remisión fue descrito, mientras que en el 75% de los pacientes que fueron sometidos a bypass gástrico y en el 95% de los que fueron sometidos a diversión biliopancreática la DM2 remitió (Mingrone y cols., 2012). Un estudio de similares características observó un mejor control glucémico y un aumento de la sensibilidad a la insulina en los pacientes sometidos a bypass gástrico con respecto a los pacientes obesos sometidos a tratamiento médico intensivo. Además, la pérdida de peso fue similar en los pacientes sometidos a bypass gástrico y a gastrectomía, aunque solo en el caso del bypass gástrico la función de la célula β pancreática se restauró (Kashyap y cols., 2013).

1.1.9.2 Cirugía bariátrica en pacientes con $IMC < 35 \text{ kg/m}^2$ y con DM2

Estudios recientes muestran que la cirugía bariátrica también es efectiva para la remisión de la DM2 en pacientes con un IMC entre 30 y 35 kg/m^2 (Cohen y cols., 2012). La cirugía metabólica para este tipo de pacientes está contemplada por la Federación Internacional de Diabetes (Dixon y cols., 2011) y por el grupo de trabajo de Obesidad de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición (Lecube y cols., 2012) para pacientes con un pobre control glucémico y con factores de riesgo cardiometabólico asociados en los que los tratamientos alternativos no han tenido éxito.

Un reciente meta-análisis de 13 estudios con pacientes diabéticos y con IMC inferior a 35 kg/m^2 y con un seguimiento entre 6 y 18 meses, muestra además de la resolución de las distintas comorbilidades asociadas a la diabetes, que un 80% de los pacientes lograron un adecuado control glucémico ($HbA1c < 7\%$) sin medicación para la DM2. Además, la tasa de complicaciones producidas por la cirugía fue baja (3.2%) sin registrarse ningún caso de mortalidad (Li y cols., 2012). El mejor control glucémico después de la cirugía metabólica no solo previene o disminuye las complicaciones microvasculares de la DM2, sino que también contribuye a la disminución del riesgo macrovascular (Shah y cols., 2010).

1.1.9.3 Posibles mecanismos que contribuyen a la remisión de la DM2

Los mecanismos por los cuales la cirugía bariátrica produce una rápida mejoría de la hiperglucemia, una reducción de la resistencia a la insulina hepática y una mejora de la secreción de insulina son poco conocidos, aunque la pérdida de peso tiene un papel muy importante en la mejora de la DM2. Hay evidencias que muestran efectos beneficiosos de la cirugía bariátrica en el control glucémico de sujetos con $IMC < 35 \text{ kg/m}^2$ y con DM2 (Reis y cols., 2012), por lo que otros mecanismos aparte de la pérdida de peso están implicados en la mejoría de la DM2.

Diversos mecanismos se han propuesto para explicar la mejoría en el metabolismo de la glucosa después de la cirugía bariátrica. El cerebro, el tejido adiposo, el páncreas y el tracto gastrointestinal son muy importantes en la regulación de las

respuestas anabólicas y catabólicas que dan lugar a la tasa metabólica. El intestino ha ganado atención en los últimos años y su importante papel en la patofisiología de diversas enfermedades metabólicas como la obesidad, la resistencia a la insulina y la DM2 está siendo objeto de estudio. Es por ello que diversos mecanismos que posiblemente influyan en la remisión de la DM2 están vinculados al intestino.

a. Disminución de la ingesta calórica

La restricción en la ingesta calórica que presentan los pacientes inmediatamente después de haber sido sometidos a cirugía bariátrica afecta de manera determinante al metabolismo de la glucosa. Si la restricción calórica fuera el mecanismo principal que regulase la homeostasis de la glucosa después de la cirugía bariátrica, entonces la tasa de remisión de la DM2 sería la misma para todos los tipos de cirugía. Pero este mecanismo explica sólo en parte la remisión de la DM2, ya que a pesar de ser constante en todos los procedimientos bariátricos, con similares ingestas calóricas se produce una disminución en los niveles de glucosa plasmática más rápida y pronunciada en los procedimientos que involucran un bypass intestinal en comparación con los procedimientos puramente restrictivos (Gumbs y cols., 2005).

b. Gluconeogénesis intestinal

La gluconeogénesis intestinal juega un papel muy importante en el control del hambre y de la saciedad, y también en la producción endógena de glucosa a través de la modulación de la sensibilidad a la insulina en el hígado (Mithieux, 2010). La gluconeogénesis intestinal es inducida principalmente en condiciones de ayuno o DM2 con bajos niveles de insulina. En ratones sometidos a cirugía RYGB, la privación de alimentos en el intestino delgado distal conduce a la inducción de los genes de la ruta de la gluconeogénesis, genes que débilmente son expresados en el estado anterior a la cirugía, por lo que la gluconeogénesis cobra importancia en la homeostasis glucémica (Troy y cols., 2008). La activación de esta vía conlleva la liberación de glucosa a la vena porta, glucosa que puede ser detectada por un sensor portal de glucosa que envía la

señal al cerebro a través de las vías vagales aferentes, promoviendo la disminución de la ingesta de comida y la supresión de la producción de glucosa hepática por la insulina (Troy y cols., 2008).

c. Cambios en la resistencia a la insulina

La pérdida de peso está asociada a la reducción de la resistencia a la insulina. En este sentido, la cirugía bariátrica es el método más efectivo para conseguir una disminución del peso que se mantenga en el tiempo. Aunque los procedimientos que conllevan una mayor pérdida de peso son los que a su vez consiguen un mayor efecto sobre la resistencia a la insulina (Buchwald y cols., 2009), también es cierto que hay otros factores que son alterados con la intervención quirúrgica. Esto queda reflejado en un estudio en el que pacientes obesos que fueron sometidos a una cirugía RYGB presentaron una mayor sensibilidad a la insulina al año de haber sido intervenidos quirúrgicamente, que aquellos sujetos obesos o con sobrepeso que perdieron peso mediante otras vías, siendo la sensibilidad a la insulina similar a los individuos con IMC normal incluso en aquellos casos en los que los individuos aún mantenían un $IMC > 30$ kg/m^2 al año de haber sido sometidos a la cirugía (Bikman y cols., 2008). Los cambios que se producen en la secreción de las hormonas intestinales parecen ser los responsables en parte de la remisión de la DM2, independientemente de la pérdida de peso. El eje enteroinsular es un sistema regulatorio en el que la secreción de insulina por parte de la células β pancreáticas está en parte regulado por las hormonas secretadas por el tracto gastrointestinal. Este sistema participa en la rápida mejoría en el metabolismo de la glucosa que se ha observado tras la cirugía bariátrica. El péptido insulínotropo dependiente de la glucosa (GIP, del inglés “*glucose-dependent insulintropic peptide*”) y el péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1, del inglés “*glucagon like peptide 1*”) son dos hormonas gastrointestinales secretadas por las células endocrinas de la mucosa intestinal en respuesta a la ingesta de alimentos y son responsables de alrededor del 70% de la secreción de insulina postprandial (Meier y Nauck, 2010). Este es el denominado efecto incretina, el cual se encuentra reducido en pacientes con DM2 hasta el 30% (Nauck y cols., 1986).

GLP-1 es producido a partir del glucagón en las células enteroendocrinas L localizadas en la región distal del intestino delgado (íleon y colon). GLP-1 actúa disminuyendo la glucosa en sangre postprandial mediante el aumento de la secreción de insulina por parte de las células β pancreáticas, la disminución del apetito, el retraso del vaciado gástrico y la supresión de la secreción de glucagón (Campbell y Drucker, 2013).

El tratamiento con agonistas de GLP1 en pacientes con DM2 produce una reducción de los valores de HbA1c así como de peso corporal (Shyangdan y cols., 2011). Estudios *in vitro* han mostrado que los agonistas de GLP1 estimulan el crecimiento y diferenciación de las células β pancreáticas, teniendo efectos crioprotectores y anti-apoptóticos en dichas células (Egan y cols., 2003).

GIP se produce predominantemente en las células K del duodeno y yeyuno en respuesta a la ingesta de alimento que contiene glucosa o grasas. Al igual que GLP1, potencia la secreción de insulina inducida por glucosa. Los resultados de los estudios que evalúan las diferencias de los niveles de GIP en pacientes diabéticos tras la ingesta de glucosa o alimento, así como en obesos son contradictorios (Deacon y Ahren, 2011, Holst y cols., 2011).

Estudios que evalúan los cambios en los niveles de incretinas tras la cirugía bariátrica demuestran que cuatro semanas después de la cirugía RYGB, el aumento de la sensibilidad a la insulina y de la secreción de insulina se asociaron con un incremento considerable de GLP-1 (Kashyap y cols., 2010). Otros estudios no muestran cambios en los niveles de GIP en sujetos no diabéticos o en pacientes diabéticos después de la cirugía bariátrica, lo que indica que el eje enteroinsular no es el único mecanismo implicado en los efectos de la cirugía bariátrica sobre el metabolismo de la glucosa (Whitson y cols., 2007).

d. Hipótesis del intestino proximal

Hickey y cols. (Hickey y cols., 1998) y Pories y cols. (Pories y Albrecht, 2001) fueron los primeros en señalar directamente la posible función de la exclusión del

intestino proximal en la remisión de la DM2 después del bypass gástrico en pacientes obesos. La hipótesis del intestino proximal mantiene que la exclusión de la parte proximal del intestino delgado reduce o suprime la secreción de factores diabetogénicos, hasta ahora no identificados, que son inducidos por la ingesta de alimentos. Cuando el alimento no pasa a través del duodeno y del yeyuno proximal después de la cirugía bariátrica del tipo malabsortiva parcial o total, la secreción de estos factores denominados anti-incretinas, es inhibida, con lo que la resistencia a la insulina se reduce y la tolerancia a la glucosa se restaura (Rubino y cols., 2006). En el trabajo realizado por Rubino y cols. utilizando un modelo animal de ratas diabéticas no obesas, *Goto Kakizaky*, se demostró con éxito esta hipótesis al inducir quirúrgicamente una remisión de la DM2 mediante la exclusión del intestino proximal y luego revertir los cambios al restablecer el paso normal de los alimentos en este segmento (Rubino y cols., 2006). En humanos se ha comprobado esta hipótesis con la exclusión temporal del duodeno mediante la implantación de un tubo de plástico flexible en el duodeno que conduce el alimento desde el píloro hasta el comienzo del duodeno sin que haya contacto con la mucosa duodenal. Esta técnica provoca una disminución de peso muy pequeña o nula pero mejora de manera significativa la tolerancia a la glucosa (Rodríguez-Grunert y cols., 2008). Recientemente, se ha propuesto al glucagón intestinal y al GIP como los posibles factores anti-incretinas (Knop, 2009).

e. **Hipótesis del intestino distal**

La hipótesis del intestino distal propuesta por Cummings y cols. sugiere que la llegada de nutrientes a segmentos más distales del intestino debido al bypass del duodeno y del yeyuno proximal, da lugar al aumento de la secreción de péptidos antidiabetógenos, como GLP-1 y PYY que contribuyen a la reversión de la hiperglucemia (Cummings y cols., 2004). Ambas hormonas tienen actividad anoréxica y están implicadas en los cambios metabólicos y los efectos provocados por la pérdida de peso que se producen tras la cirugía (Karra y Batterham, 2010). Además, ambos péptidos y en particular GLP-1 tienen propiedades glucoregulatorias; así GLP-1 estimula la liberación de insulina en respuesta a la ingestión de nutrientes, mejorando

todos los pasos de la biosíntesis de insulina e inhibiendo la secreción de glucagón (Karra y cols., 2010).

Las evidencias que apoyan esta hipótesis vienen de las observaciones realizadas en aquellos casos en los que la cirugía empleada implica un incremento de la llegada de nutrientes a la zona distal del intestino, tales como la diversión biliopancreática, el bypass yeyuno-ileal y el RYGB, procesos que dan lugar a una rápida mejoría y remisión de la DM2 (Buchwald y cols., 2009). Aunque la mayor evidencia la aportan los estudios realizados en modelos animales donde se realiza la transposición ileal, en estas intervenciones, un segmento del íleon, con su aporte neural y vascular intacto, es interpuesto en el intestino proximal. De este modo la longitud total del intestino no sufre modificación pero la exposición de nutrientes no digeridos en el íleon aumenta de manera importante. En estos animales, se vio una mejora del control glucémico a los 30 días de la cirugía, y los resultados se mantuvieron a los 6 meses, presentando una mayor tolerancia a la glucosa y una mayor expresión de proglucagón (Patrity y cols., 2007).

1.2 INTESTINO DELGADO

1.2.1 Morfología del intestino delgado

1.2.1.1 Estructura macroscópica

El intestino delgado se extiende desde el píloro hasta la unión del ciego con el colon ascendente. Su longitud media es de 6-7 metros y se encuentra dividido en duodeno, yeyuno e íleon.

El duodeno tiene unos 25 cm de longitud y se sitúa rodeando la cabeza del páncreas. Se extiende desde el píloro hasta la flexura duodenal, donde se encuentra el ligamento de Treitz que fija esta parte del intestino a la pared posterior del abdomen. El duodeno se relaciona con el estómago, el hígado y el páncreas, recibe el quimo del estómago y las secreciones del páncreas y la bilis del hígado. Con fines descriptivos el duodeno se divide en cuatro porciones. El colédoco y el conducto pancreático principal desembocan juntos en la segunda porción del duodeno, en la ampolla de Vater o papila duodenal, donde se encuentra el esfínter de Oddi que está relacionado con el control del flujo del jugo pancreático al duodeno ya que el flujo de bilis hacia el duodeno está controlado por el esfínter del colédoco situado en el extremo distal de este conducto biliar.

Tanto en el yeyuno como en el duodeno, los pliegues, descritos más adelante, son prominentes y numerosos. Estos pliegues gradualmente disminuyen en número y tamaño a lo largo del yeyuno y están ausentes en el íleon distal. También hay una disminución progresiva del calibre luminal y del grosor de la pared del yeyuno hacia el íleon.

1.2.1.2 Estructura microscópica

La pared del intestino delgado está formada por cuatro capas: serosa peritoneal, capa muscular, submucosa y mucosa.

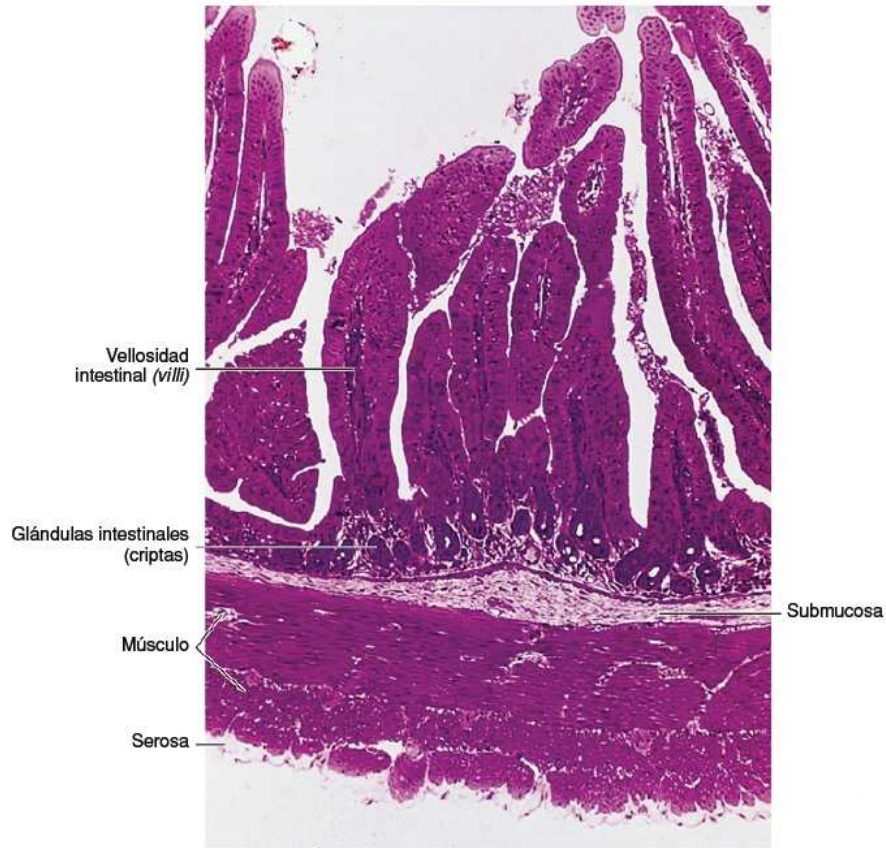


Figura 8: Microfotografía del intestino delgado. Se observan las vellosidades, las glándulas intestinales, la submucosa, la capa muscular y la serosa. Tinción de pararosanilina y azul de toluidina. Pequeño aumento (Junqueira LC, 2005).

La capa serosa es una extensión del peritoneo que cubre completamente el yeyuno y el íleon, pero que sólo lo hace con la porción anterior del duodeno. Está formada por células mesoteliales que descansan sobre el tejido conjuntivo. La capa muscular está compuesta por dos capas de músculo liso, una longitudinal, externa, cuyas fibras se disponen paralelas al eje mayor de la luz intestinal, y otra circular, interna, más gruesa, cuyas fibras tienden a rodear el intestino. Entre las dos capas se hallan las células ganglionares y las fibras nerviosas del plexo mientérico de Auerbach.

La mucosa y la submucosa del intestino delgado están dispuestas en forma de pliegues circulares que se extienden sobre toda la superficie interna proyectándose hacia la luz intestinal, son las llamadas válvulas conniventes de Kerckring. En el duodeno y

yeyuno estas válvulas son más pronunciadas y sobresalen hasta 8 mm en la luz del tubo. Estos pliegues, a su vez, están cubiertos en su totalidad de minúsculas proyecciones de la mucosa de una longitud de 0.5 a 1 mm, llamadas vellosidades intestinales o villi. La superficie de estos villi está formada por un epitelio columnar simple con las células unidas fuertemente entre sí, cada una de las cuales presenta en su superficie apical un borde en cepillo formado por unas 600 prolongaciones citoplasmáticas de aproximadamente 1 μm de largo, llamadas microvellosidades.

Las vellosidades intestinales tienen un aspecto diferente en las distintas partes del intestino delgado, así en el duodeno son más anchas, en el yeyuno más delgadas y en el íleon más cortas. Entre una vellosidad y otra, en la parte basal, se sitúan glándulas tubulares simples llamadas criptas de Lieberkühn, cuya secreción líquida recubre a las vellosidades, proporcionando un medio acuoso para la absorción de sustancias desde el quimo cuando entra en contacto con las vellosidades. Además de las criptas, en el duodeno se encuentran las glándulas de Brunner que segregan un líquido alcalino rico en mucina para proteger a la mucosa duodenal.

En las paredes del yeyuno-íleon se encuentran acumulaciones de tejido linfoide, son las denominadas placas de Peyer, que forman parte del tejido linfoide asociado a mucosa que se encuentra a nivel de los tubos digestivo y respiratorio.

Las válvulas conniventes, las vellosidades y las microvellosidades aumentan unas 600 veces el área de absorción de la mucosa intestinal originando una superficie total de unos 250 m^2 aproximadamente.

En los seres humanos el epitelio del intestino delgado se renueva en un plazo aproximado de 3-5 días. Las células epiteliales se forman por proliferación de células madre indiferenciadas situadas en el interior de las criptas, que migran hacia el extremo distal de la vellosidad desde donde se desprenden a la luz intestinal y son expulsadas al exterior. Conforme las células van migrando y abandonan las criptas, maduran y se desarrolla el borde en cepillo.

1.2.1.3 Tipos celulares de la mucosa intestinal

Las células madre pluripotenciales ocupan sobre todo el tercio inferior de las criptas, donde constituyen el tipo principal. Hay cinco tipos de células epiteliales las cuales derivan de las células madre de las criptas:

- Los enterocitos son las células absortivas especializadas en el transporte de sustancias desde la luz del intestino hacia el torrente circulatorio. Son las células más abundantes del epitelio intestinal, representando entorno al 80-90% de las células epiteliales del intestino delgado. Se caracterizan por ser células cilíndricas altas con núcleo de localización basal, que presentan un borde en cepillo en la superficie apical formado por unas 3000 microvellosidades aproximadamente, lo que aumenta la superficie de absorción unas 20 veces. En los cortes para microscopía óptica los enterocitos se reconocen en su conjunto por su borde celular apical irregular que se denomina borde en cepillo o chapa estriada, compuesto por microvellosidades paralelas muy juntas de 1 μm de largo y 0.1 μm de espesor. Los enterocitos poseen numerosas proteínas transportadoras tanto en su membrana apical como en la basal, lo que permite el transporte activo y pasivo de nutrientes desde el intestino.
- Células calciformes que son glándulas unicelulares secretoras de moco y otras glicoproteínas, las cuales lubrican y protegen la superficie de la mucosa. Su cantidad aumenta desde el duodeno hasta el final del íleon.
- Células enteroendocrinas: secretan hormonas las cuales realizan su acción endocrina y paracrina. Las hormonas secretadas varían a lo largo del intestino (colecistoquinina, secretina, somatostatina,...). Se localizan entre los enterocitos y las células calciformes, fundamentalmente en la base de las vellosidades intestinales. Por lo general aumenta el número de células en el duodeno y el yeyuno, y disminuye en el íleon y aun más en el colon.
- Células Paneth: Localizadas en la base de las criptas donde se visualizan como células piramidales, con núcleo basal. Son células granuladas que

secretan péptidos y enzimas antimicrobianas, por lo que se ha sugerido que poseen un papel en el control de la flora bacteriana intestinal. También se ha sugerido su posible papel en la regulación de la composición iónica luminal, inflamación intestinal y digestión (Porter y cols., 2002).

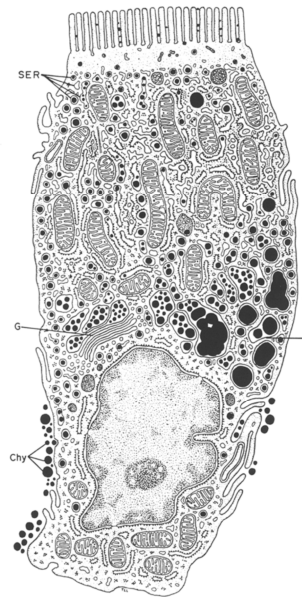


Figura 9: Esquema de un enterocito. SER: retículo endoplasmático liso, G: aparato de Golgi y Chy: quilomicrones (Lentz, 1971).

- Células M: Se localizan sobre las placas de Peyer o nódulos linfoides grandes. Presentan invaginaciones de la membrana basolateral que son ocupadas por linfocitos. Actúan presentando microorganismos y antígenos que son captados en el lumen intestinal a los linfocitos, participando por tanto en la respuesta inmunológica.

La lámina propia se encuentra sustentando el epitelio intestinal. Contiene diferentes tipos celulares: fibroblastos, fibrocitos, miofibroblastos..., que secretan

diferentes factores de crecimiento esenciales para la proliferación y diferenciación celular.

El epitelio de la mucosa intestinal tiene una gran capacidad regenerativa que depende de la actividad de las células madre intestinales que se encuentran en la base de las criptas epiteliales. Las divisiones de las células madre dan lugar a una célula hija y a una célula madre, la cual sigue manteniendo la cadena original de ADN. Las células hijas proliferan, se dividen y se diferencian para producir las diferentes líneas celulares del epitelio intestinal. Los enterocitos, las células calciformes y las células enteroendocrinas sufren el proceso de diferenciación a la vez que van migrando hacia el extremo apical de la microvellosidad, donde o bien se desprenden al lumen intestinal o bien sufren apoptosis, con lo cual la producción de células es compensada por la descamación que se produce en la zona apical de la vellosidad. Las células Paneth en cambio, se diferencian en la base de las criptas (Shaker y Rubin, 2010).

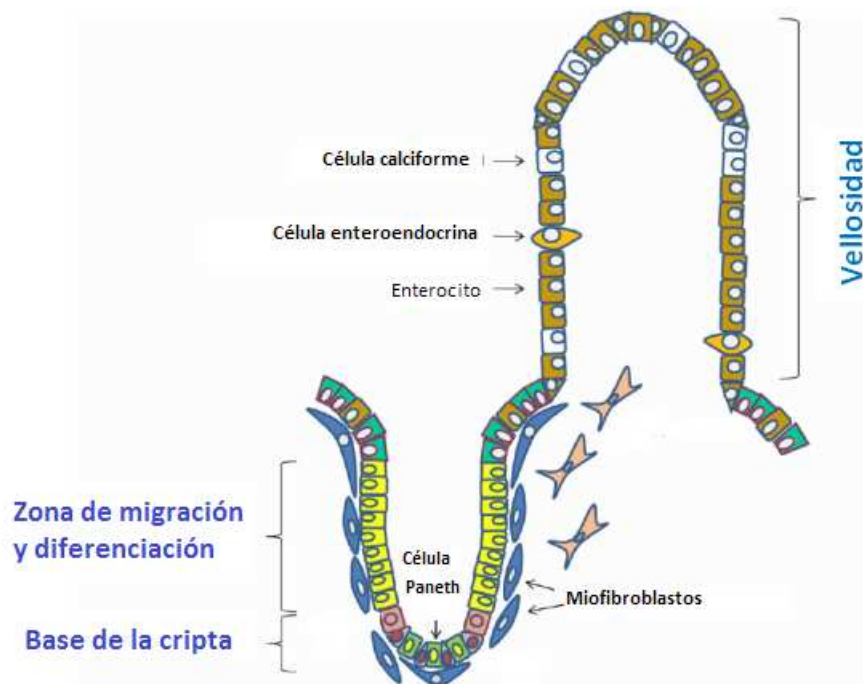


Figura 10: Esquema de microvellosidad intestinal. Adaptado de Shaker y cols. (Shaker y Rubin, 2010).

1.2.2 Absorción, síntesis y secreción de triglicéridos

Con respecto al metabolismo lipídico, la principal función del intestino es la digestión, absorción, formación y secreción de las grasas de la dieta, con una gran capacidad de respuesta rápida y eficiente a la ingesta de grandes cantidades de alimento. La formación de lipoproteínas intestinales es esencial para la absorción de las grasas y las vitaminas liposolubles de la dieta. La absorción se define como el transporte de grasas y vitaminas liposolubles desde el lumen del intestino hacia el plasma y consiste en tres pasos fundamentales. Primero, las grasas de la dieta son emulsionadas e hidrolizadas en el lumen del intestino. Segundo, los productos hidrolizados son tomados por los enterocitos. Tercero, las grasas son re-sintetizadas en los enterocitos y almacenadas en lipoproteínas que son secretadas al torrente sanguíneo.

La digestión de los lípidos comienza en la cavidad oral con la acción de las lipasas linguales y continúa en el estómago con la acción de la lipasa gástrica. En el estómago, los lípidos forman grandes gotas de grasas y cuando llegan al duodeno las sales biliares recubren estas gotas y las rompen, dividiéndose en gotas más pequeñas aumentándose miles de veces la superficie de actuación de las enzimas lipolíticas del páncreas. Este proceso se denomina emulsión de las grasas, y permite el acceso de la lipasa pancreática a los triglicéridos, que actúa sobre las posiciones sn-1 y sn-3 de los triglicéridos dando lugar a dos moléculas de ácidos grasos libres y una de 2-monoacilglicerol (2-MAG) por cada triglicérido. Aunque se puede producir la isomerización desde sn-2-MAG hacia sn-1-MAG, esta reacción es lenta. El MAG, ya sea sn-2 o sn-1 puede ser hidrolizado en el lumen intestinal por la colesterol esterasa dando lugar a glicerol y ácidos grasos. Si el grupo acil-sn-2 ha migrado a la posición sn-1, puede ser hidrolizado por la lipasa pancreática. A pesar de estas posibles vías de hidrólisis, la mayor parte de 2-MAG permanece sin hidrolizar siendo la forma predominante en la que el MAG es absorbido por los enterocitos.

1.2.2.1 Absorción de lípidos

Las sales biliares desempeñan un papel fundamental en el proceso de transporte luminal y de absorción de los productos de la digestión mediante la formación de micelas que los solubilizan. Las micelas son agregados lipídicos que contienen ácidos biliares, ácidos grasos monoglicéridos, colesterol y fosfolípidos. Debido a que las micelas son solubles, permiten que los productos de la digestión sean transportados a través del medio acuoso de la luz intestinal hasta el borde en cepillo de las células de la mucosa donde son absorbidos al interior del epitelio intestinal.

Cuando su concentración es alta, ambos pueden atravesar la membrana del enterocito por difusión, aunque también existen moléculas que facilitan el transporte en contra de gradiente. No se han descrito proteínas específicas para el transporte de monoglicéridos. Para los ácidos grasos se han descrito tres categorías de proteínas transportadoras: proteínas que unen a ácidos grasos de membrana plasmática FABPpm (FABPpm, del inglés “*plasma membrane fatty acid-binding protein*”), las translocasas de ácidos grasos FAT/CD36 (FAT, del inglés “*fatty acid transporter*”) y las proteínas transportadoras de ácidos grasos FATP (FATP, del inglés “*fatty acid transport protein*”). Además de éstas, otras proteínas intracelulares y de la membrana plasmática facilitan el transporte de los ácidos grasos.

FABPpm es una proteína de 40 kDa localizada en la periferia de la membrana plasmática que se expresa en órganos con alto requerimiento lipídico. En el intestino delgado su expresión es mayor en el yeyuno e íleon (Masson y cols., 2010). Es idéntica a la enzima aspartato aminotransferasa mitocondrial por lo que se ha propuesto su posible papel en la transferencia de ácidos grasos de cadena larga (Stump y cols., 1993).

FATP es una familia de seis proteínas altamente conservada durante la evolución. Cada una de ellas tiene un patrón específico de expresión, siendo FATP4 la que se localiza principalmente en el intestino. Su localización en el intestino correlaciona bastante bien con aquellas zonas de absorción de grasas, de hecho su nivel de expresión es muy alta en el yeyuno y en menor medida en el duodeno, e inexistente en el colon (Stahl y cols., 1999).

FAT/CD36 es una proteína transmembrana altamente glicosilada de 75-88 kDa. Su expresión es ubicua, siendo abundante en el corazón, músculo esquelético, tejido adiposo, intestino y endotelio microvascular. En el intestino, es más abundante en el tercio proximal y prácticamente ausente en íleon y colon. Presenta diversas funciones relacionadas con la absorción de grasas así como en la percepción del sabor de las grasas y la regulación de la ingesta de alimento (Abumrad y Davidson, 2012).

1.2.2.2 Transporte intracelular de ácidos grasos hacia el retículo endoplasmático

Una vez en el interior del enterocito, los productos de la hidrólisis de los triglicéridos deben atravesar el citoplasma para llegar al retículo endoplasmático donde son usados para la síntesis de lípidos complejos. Este transporte intracelular hacia el retículo endoplasmático es realizado por las proteínas de unión a ácidos grasos FABP (FABP, del inglés “*fatty acid binding protein*”) presentes en el citoplasma. Esta familia incluye nueve miembros de FABPs y a la proteína celular de unión al retinol. Existe una gran conservación inter-especie de las secuencias peptídicas de los distintos miembros de la familia FABP, existiendo un 80% de homología entre FABP1 también denominada L-FABP (L-FABP, del inglés “*liver fatty acid binding protein*”) de humano y de ratón. Sin embargo, hay menos del 39% de homología entre FABP2, también denominada I-FABP (I-FABP, del inglés “*intestinal fatty acid binding protein*”) y L-FABP dentro de la misma especie. A pesar de las diferencias en las secuencias peptídicas, los miembros de la familia FABP presentan una estructura terciaria similar.

En los enterocitos del intestino delgado se expresan I-FABP y L-FABP. El intestino delgado es un ejemplo único de órgano en el que dos miembros de la familia FABP son altamente co-expresados. La I-FABP es exclusiva de intestino, mientras que L-FABP se expresa en otros órganos como pulmón, páncreas, hígado y riñón. Aunque la función de ambas FABPs aún no es bien conocida, los estudios publicados indican que poseen diferentes funciones. En un estudio en ratones genéticamente modificados, mostraron que I-FABP dirige a los ácidos grasos hacia la síntesis de triglicéridos,

mientras que L-FABP dirige a los ácidos grasos hacia rutas oxidativas y a los MAGs hacia rutas anabólicas (Lagakos y cols., 2011). También se ha descrito el papel de L-FABP en la formación de las vesículas transportadoras de pre-quilomicrones que se originan desde el retículo endoplasmático de los enterocitos (Neeli y cols., 2007).

1.2.2.3 Síntesis de triglicéridos

En los enterocitos, los ácidos grasos y los MAG son utilizados para la síntesis de triglicéridos en el retículo endoplasmático liso a través de la ruta sn-2-monoacilglicerol. Los ácidos grasos y los MAGs se unen covalentemente para sintetizar diacilglicerol (DAG) por la acil-coenzima-A monoacilglicerol aciltransferasa (MGAT). Hay tres isoformas de MGAT en el retículo endoplasmático: MGAT1, MGAT2 y MGAT3. MGAT1 se expresa en la mayoría de tejidos pero no en el intestino. MGAT2 de expresión más ubicua es la de mayor actividad en el intestino y la que más contribuye a la síntesis de DAG. MGAT2 incrementa su actividad hasta tres veces en respuesta a dietas ricas en grasas, aunque los niveles de expresión no varían, lo que sugiere su regulación a través de procesos post-traduccionales (Cao y cols., 2004). Su patrón de expresión sigue un gradiente desde la zona proximal hasta la distal que correlaciona tanto con la actividad enzimática de la proteína como con el patrón de absorción a lo largo del intestino delgado (Cao y cols., 2004). MGAT3 se expresa en el tracto gastrointestinal siendo en el íleon su expresión hasta cinco veces superior que en el intestino proximal (Cheng y cols., 2003). MGAT3 presenta una alta homología de secuencia con acil Coa:diacilglicerol-acil-transferasa 2 (DGAT2) más que el resto de MGATs, por lo que en presencia de MAG, MGAT3 cataliza la formación de triglicéridos (Cao y cols., 2007).

Posteriormente el DAG es acilado por la DGAT1, DGAT2 y por la MGAT3 con actividad DGAT para dar lugar a los triglicéridos.

La primera enzima con actividad DGAT que se secuenció fue DGAT1. En ratones carentes de esta enzima, se vio que la producción de quilomicrones disminuía sustancialmente pero no desaparecía (Buhman y cols., 2002), lo que sugirió la presencia de otra enzima que participaba en este proceso. Así posteriormente se describió la

DGAT2 que aunque no tiene homología en la secuencia con DGAT1, si que realiza funciones similares. Así se comprobó en un estudio en ratones carentes DGAT2, donde los niveles circulantes de triglicéridos, ácidos grasos y glucosa se redujeron severamente tras el nacimiento, los ratones presentaron bajo peso al nacer y murieron al poco de nacer (Stone y cols., 2004).

DGAT1 se expresa principalmente en la zona proximal del intestino delgado, donde representa el 85-90% de la actividad DGAT, mientras que DGAT2 se encuentra principalmente en el tejido adiposo e hígado. DGAT2 se ha localizado en la cara citosólica de la membrana del retículo endoplasmático, mientras que DGAT1 se ha localizado en el lumen del retículo endoplasmático (Niot y cols., 2009).

Los enterocitos también pueden sintetizar DAG a partir de la glucosa a través de la ruta del glicerol fosfato que incluye la conversión de glicerol-3-fosfato a DAG mediante la acción de diversas enzimas. Posteriormente este DAG es convertido a triglicéridos por acción de las enzimas DGAT. Se estima que en el intestino, el 75-80% de los triglicéridos son sintetizados a partir de la ruta del MAG y el resto a través de la ruta del glicerol fosfato. Es importante reseñar que el DAG sintetizado a partir de la ruta del MAG y de la ruta del glicerol-3-fosfato no son metabólicamente equivalentes. Así, el DAG sintetizado a partir de MAG es dirigido hacia la síntesis de triglicéridos de manera exclusiva, mientras que el DAG derivado del glicerol-3-fosfato puede ser usado para sintetizar o bien triglicéridos o bien fosfolípidos (Mansbach y Gorelick, 2007), siendo en el intestino más predominante la síntesis de triglicéridos que la de fosfolípidos.

1.2.2.4 Formación de quilomicrones

Los quilomicrones son sintetizados exclusivamente por el intestino durante la fase postprandial para transportar los lípidos obtenidos de la ingesta, principalmente triglicéridos, y las vitaminas liposolubles hacia los tejidos. Los quilomicrones son partículas esféricas, de muy baja densidad (densidad $<0.93\text{g/ml}$) y heterogéneas en tamaño (diámetro 75-450 nm); tienen un gran componente lipídico, muy enriquecido en triglicéridos (85-92%), también contienen fosfolípidos (6-12%), colesterol (1-2%),

proteínas (1-2%), vitamina E y vitamina A. En el centro se sitúan los triglicéridos, los ésteres de colesterol y las vitaminas liposolubles, mientras que en la superficie se encuentran las apolipoproteínas, el colesterol libre y los fosfolípidos. La cantidad de fosfolípidos presente en estas partículas es suficiente para cubrir entorno al 80% de la superficie de los quilomicrones.

Aunque las apolipoproteínas constituyen menos del 1% del total de las partículas de quilomicrones, son esenciales para la formación y secreción de los mismos. Estas proteínas asociadas a los quilomicrones son la apolipoproteína B-48 (apo B-48), apolipoproteína A-IV (apo A-IV), apolipoproteína A-I (apo A-I) y apolipoproteína C (apo C). Además, realizan otras funciones como la emulsión de las partículas lipídicas en los ambientes acuosos de la linfa y la sangre, mantenimiento de la integridad estructural de los quilomicrones y unión a los receptores de las superficies celulares en los tejidos periféricos diana.

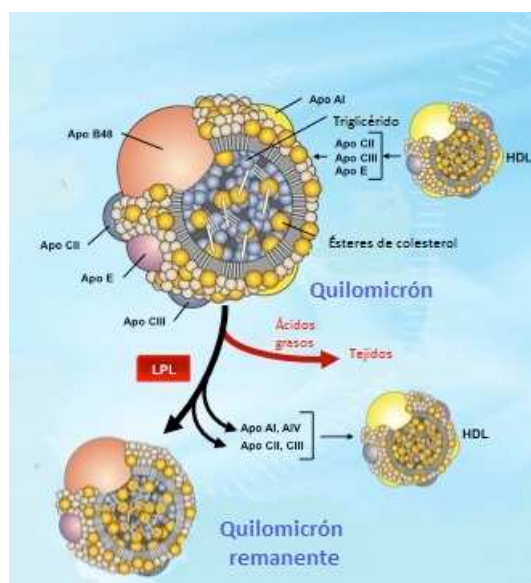


Figura 11: Esquema de un quilomicrón.

En humanos, la apo B-48 es una proteína necesaria tanto para la estructura como para la función de los quilomicrones, y además es un marcador proteico específico de este tipo de lipoproteínas.

Hasta hace relativamente poco tiempo, se consideraba que los quilomicrones se sintetizaban para transportar la grasa de origen exógeno. Hay evidencias que indican que el intestino también es capaz de sintetizar lipoproteínas en los estados de ayuna; en modelos animales se ha demostrado que la contribución intestinal de lipoproteínas ricas en triglicéridos a los niveles de triglicéridos plasmáticos en el estado de ayunas es elevada (Haidari y cols., 2002). La cantidad de lípidos transportados durante los periodos postprandiales es varias veces mayor que la transportada durante los periodos de ayuno. Así, en lugar de incrementar el número de quilomicrones, los enterocitos expanden el tamaño de las partículas sintetizadas, pudiendo así aumentar el transporte de grasa durante los periodos postprandiales (Hayashi y cols., 1990a). Esta distinción de tamaño hace que se hable de quilomicrones y VLDL intestinales y se utilice el índice de flotación en unidades Svedberg para distinguirlos. Cuando este índice supera los 400 se denominan quilomicrones y VLDL intestinal cuando el índice se encuentra entre 20 y 400.

Un elemento estructural clave de los quilomicrones es la apo-B48, que es integrada co-traduccionalmente, al menos de manera transitoria en la membrana del retículo endoplasmático. En la síntesis de quilomicrones, la proteína de transferencia microsomal (MTP, del inglés “*microsomal transference protein*”) tiene un papel fundamental, uniéndose a los lípidos y dirigiéndolos en la membrana del retículo endoplasmático. La MTP transfiere estos lípidos a la apo B-48, mientras ésta va penetrando en la luz del retículo endoplasmático rugoso. Además de lípidos complejos, sobre todo triglicéridos, también le son transferidos fosfolípidos y colesterol esterificado. Se postula que la MTP es necesaria para un adecuado plegamiento de la apo B-48 y para la correcta formación de la partícula lipoproteica. Además MTP protege a la apo B-48 recién formada de la proteólisis por parte del complejo ubiquitin-proteosoma (Hussain y cols., 2003). La lipidación de la apo B-48 conlleva la liberación de la apo B-48 de la membrana del retículo plasmático y la formación de lipoproteínas ricas en triglicéridos denominadas “lipoproteínas nacientes“, “quilomicrones nacientes” o “partículas primordiales” (Pan y Hussain, 2012). Estos “quilomicrones nacientes” aumentan su tamaño en un proceso denominado “expansión del núcleo” por dos posibles mecanismos: por la adición continua de lípidos, proceso llevado a cabo por la enzima MTP (Tso y Balint, 1986), o bien por la fusión con gotas lipídicas citosólicas

previamente formadas (Hussain, 2000). Además de los lípidos, otras apolipoproteínas son añadidas. En este proceso de “expansión del núcleo” se ha descrito que apo A-IV juega un papel fundamental manteniendo la tensión interfacial y la elasticidad de estas grandes partículas (Weinberg y cols., 2000).

Las gotas lipídicas están formadas por un núcleo de triglicéridos y ésteres de colesterol rodeadas por una monocapa de fosfolípidos, colesterol y una variedad de proteínas. Estas gotas lipídicas se forman en el lumen del retículo endoplasmático durante el estado postprandial y su síntesis ocurre de manera independiente a la síntesis de apoB (Hamilton y cols., 1998). Las gotas lipídicas observadas en estado postprandial son mas grandes (Hussain, 2000). La inhibición de secreción de quilomicrones provoca una acumulación de gotas lipídicas de mayor tamaño. La heterogeneidad en el tamaño de las gotas lipídicas da lugar a lipoproteínas de diferentes tamaños. De hecho el tamaño de los quilomicrones secretados es muy heterogéneo (Hayashi y cols., 1990a).

a. Apolipoproteína B (apo B)

Se expresa principalmente en el intestino e hígado. Participa en la síntesis y secreción de lipoproteínas ricas en triglicéridos y sirve como proteína estructural principal para el ensamblaje.

En mamíferos existen dos formas de apo B codificadas por el mismo gen pero que sufren modificaciones post-transcripcionales diferentes dependiendo del tejido donde se exprese. Así en el hígado el ARN mensajero (ARNm) de la apo B no sufre proceso post-transcripcional y da lugar a un polipéptido de 4536 aminoácidos. En el intestino, por acción de la enzima Apobec-1, el ARNm de la apo B sufre un proceso post-transcripcional en el que la desaminación de un nucleótido provoca un codón de terminación, lo que da lugar a un polipéptido de 2152 aminoácidos denominado apo B-48. La apo B-48 posee dos hélices α y la primera de las dos hojas β presentes en la apo B-100.

Apo B-48 es una proteína constitutiva de los quilomicrones, cuyos niveles varían debido a mecanismos co- y post-traduccionales. No puede ser secretada por el intestino

sin ser unida antes a triglicéridos por la acción de la MTP. Hay una molécula de apo B-48 por cada quilomicrón. Por lo tanto, la medida de apo B-48 plasmática es un indicador de la tasa de producción de quilomicrones intestinales. Esto ocurre en humanos y en especies animales como hámster *Syrian Golden*. Sin embargo, en otras especies como en ratones y ratas, la apo B-100 es producida tanto en el hígado como el intestino, por lo que no se puede distinguir la producción de lipoproteínas hepáticas de las intestinales.

Tabla 3: Diferencias entre las apolipoproteínas codificadas por apoB en el intestino e hígado.

	Intestino	Hígado
Tamaño del ARNm (kb)	15 aprox.	15 aprox.
Edición post-transcripcional del ARNm	Si	No
Producto de la traducción	Apo B-48	Apo B-100
Tamaño de la proteína (kDa)	260 aprox.	550 aprox.
Aminoácidos	2152	4536
Lipoproteína	Quilomicrones	VLDL, ILD, LDL, Lp(a)
Diámetro de la lipoproteína (nm)	75-450	35-80
Densidad de flotación (g/ml)	<0.93	<1.006
Unidades de flotación Svedberg (Sf)	400	20-400
Niveles plasmáticos en ayuna	Muy bajo	Alto
Vida media en plasma	10 min aprox.	Horas-días
Presencia de vitamina A	Si	No
Requiere apo E para el aclaramiento	Si	No
Secreción de lipoproteína en abetalipoproteinemia	No	No
Secreción de lipoproteína en la enfermedad de retención de quilomicrones	No	Si

b. Proteína de transferencia microsomal (MTP)

Se expresa principalmente en hígado e intestino, aunque también se ha encontrado en otros tejidos como riñón, corazón, páncreas, tejido adiposo, ovario, testículos, retina y placenta. Es un heterodímero formado por dos subunidades, la subunidad mayor denominada M con un peso aproximado de 97 kDa, que pertenece a la familia de proteínas de transferencia de lípidos, y la subunidad P de 58 kDa, una enzima ubicua identificada como proteína disulfuro isomerasa. La subunidad M contiene tres dominios funcionales que permiten la asociación de la MTP con las membranas del retículo endoplasmático, la absorción de lípidos neutros (triglicéridos y ésteres de colesterol) y la unión a la apo B-48. La actividad isomerasa de la subunidad P está inactiva en el complejo MTP. Esta actividad isomerasa no es necesaria ni para su asociación con la subunidad M ni para la actividad del complejo MTP. La subunidad P no participa en el proceso de transferencia de lípidos, y más que actuar como una subunidad activa, su función está relacionada con la estabilización del complejo, su correcto plegamiento, su retención en el retículo endoplasmático y sus propiedades de unión. Estas dos subunidades se unen de forma no covalente y, una vez que se forma el complejo MTP, las dos subunidades no se separan. Por lo tanto, la MTP actúa como una chaperona facilitando el correcto plegamiento de la apo B-48, además de prevenir la degradación de la apo B-48 mediante la adición de lípidos (Jiang y cols., 2008b). La expresión de MTP varía a lo largo del intestino, es mayor en el duodeno y el yeyuno proximal, y disminuye hacia el íleon siendo prácticamente inexistente en el colon (Hussain y cols., 2012).

Mutaciones en el gen *MTP* dan lugar a una proteína no funcional y a abetalipoproteinemia, caracterizada por la ausencia de lipoproteínas plasmáticas que contienen apo B (Khatun y cols., 2013). Se postuló que los inhibidores de la proteína MTP podrían ser beneficiosos para bajar los niveles de lípidos plasmáticos. Sin embargo, la inhibición de MTP está asociada con diversos efectos adversos, que incluyen problemas en la absorción intestinal de grasas, esteatorrea, esteatosis hepática (Cuchel y cols., 2007).

La expresión del gen *MTP* puede verse modificada según el tipo de dieta. En modelos animales, dietas ricas en sacarosa incrementan los niveles de ARNm de MTP

en el hígado pero no en riñón (Lin y cols., 1994), mientras que una dieta rica en fructosa aumenta sus niveles tanto en hígado como en riñón (Qiu y cols., 2005). Una dieta rica en grasas saturadas (Lin y cols., 1994) y colesterol (Iqbal y cols., 2008) aumentan la expresión de MTP en el intestino.

c. Apolipoproteína A-IV (apo A-IV)

Es una glicoproteína de 46 kDa sintetizada por los enterocitos y cuya producción es estimulada por la absorción de lípidos. Es la principal lipoproteína producida en el intestino, representando más del 21% del contenido apolipoproteico secretado por el mismo. Es incorporada a los quilomicrones en una etapa temprana de la formación de los mismos en el retículo endoplasmático, y es secretada en la superficie de los quilomicrones en la membrana basolateral. Una vez en el plasma, entorno al 25% de la apo A-IV asociada a los quilomicrones se puede encontrar como una fracción libre lipoproteica en el plasma así como en las HDL.

El papel de la apo A-IV en la formación de los quilomicrones se ha sugerido que es facilitar la incorporación adicional de lípidos promoviendo así la formación de grandes quilomicrones en el intestino (Lu y cols., 2006). Su síntesis y secreción es hasta 2-3 veces superior cuando se produce una absorción activa de lípidos en el intestino delgado (Kalogeris y cols., 1997). Esta estimulación está ligada a la formación de quilomicrones. Cuando la formación de quilomicrones es inhibida, también lo es la síntesis de apo A-IV (Hayashi y cols., 1990b). También se ha descrito que puede tener un papel importante en el aclaramiento de los quilomicrones, ya que en ratones A-IV KO, se encontró ralentizada la tasa de aclaramiento de quilomicrones en el plasma (Kohan y cols., 2012).

1.2.2.5 Maduración de los quilomicrones

Las partículas formadas reciben el nombre de prequilomicrones y son transportadas desde el retículo endoplasmático al aparato de Golgi. Estos prequilomicrones tienen un diámetro de 250 nm o más, mientras que las vesículas de

proteínas son más pequeñas (60-80 nm) (Siddiqi y cols., 2003). Debido a sus dimensiones, los quilomicrones requieren de una maquinaria de transporte especializada para su paso desde el retículo endoplasmático al cis del Golgi. El transporte de los quilomicrones se realiza en vesículas denominadas vesículas transportadoras de prequilomicrones (PCTVs, del inglés “*prechylomicron transport vesicles*”).

La formación de estas PCTVs desde el retículo endoplasmático es iniciada por la proteína L-FABP (Neeli y cols., 2007). CD36 es detectado en la membrana del retículo endoplasmático y es también necesaria para la formación de estas vesículas. Los quilomicrones son exportados desde el retículo endoplasmático en grandes vesículas por un mecanismo independiente del complejo proteico COPII (COPII, del inglés “*coatamer II protein*”), aunque este complejo proteico se ha encontrado en las PCTVs, y es que son necesarias para la posterior fusión con el complejo de Golgi (Siddiqi y cols., 2003).

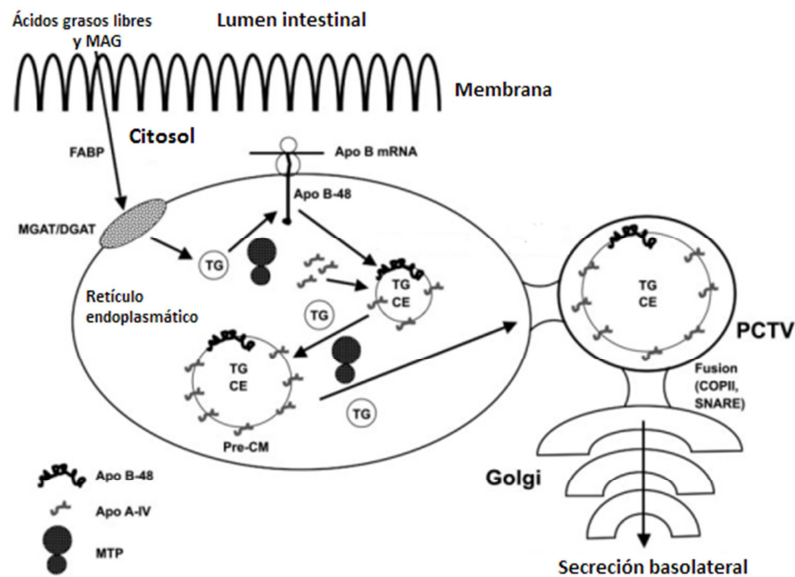


Figura 12: Formación y secreción de quilomicrones. Adaptado de Black (Black, 2007).

Las proteínas SNARE (SNARE, del inglés “*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*”) participan en el reconocimiento, el anclaje y la

fusión de las vesículas transportadoras con las membranas diana. Las proteínas SNARE son proteínas integrales de membrana tipo II las cuales están presentes tanto en la vesícula transportadora como en la membrana diana. Entre ellas cabe destacar la proteína VAMP7 (VAMP7, del inglés “*vesicle-associated membrane protein 7*”), que habitualmente se localiza en endosomas y en el Golgi, y está implicada en procesos de secreción al post-Golgi. Sin embargo, en el intestino únicamente se localiza en el retículo endoplasmático y es crucial para la fusión de la PCTVs con el aparato de Golgi.

Una vez que se fusiona con la membrana cis del Golgi, proceso que requiere de la presencia de proteínas COPII (Pan y Hussain, 2012), las PCTVs liberan su contenido en prequilomicrones en el lumen del Golgi, donde sufren un proceso de maduración por la adición de apo A-I y otros lípidos, y la glicosilación de la apo B-48. MTP se ha encontrado en el aparato de Golgi donde participa en la transferencia de lípidos que tiene lugar en él (Swift y cols., 2003). Los quilomicrones maduros son secretados a través de vesículas que emergen desde la zona trans Golgi y se fusionan con la membrana basolateral liberando los quilomicrones a la lámina propia.

1.2.2.6 Aclaramiento de los quilomicrones

Los quilomicrones secretados, al entrar en contacto con otras partículas, en especial las HDL, adquieren otras apolipoproteínas como la E (apo E), C-II (apo C-II) y CIII (apo C-III), a la vez que se desprenden de la apo I, apo A-IV y de fosfolípidos. Estos quilomicrones maduros son capaces de interactuar con proteoglicanos del endotelio. Aquí, la Apo C-II activa a la LPL a nivel endotelial, lo que permite la cesión de ácidos grasos a los tejidos periféricos, fundamentalmente al músculo y al tejido adiposo.

Estos quilomicrones parcialmente deslipidados interactúan con las HDL de nuevo, intercambiando fosfolípidos y triglicéridos por ésteres de colesterol. Este proceso se lleva a cabo por la proteína de transferencia de fosfolípidos (PLTP, del inglés “*phospholipid transfer protein*”) y por la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CEPT, del inglés “*cholesteryl ester transfer protein*”). Además, en este proceso también se ceden apolipoproteínas. Todo ello da lugar a los remanentes de los

quilomicrones, partículas de menor tamaño que contienen menos triglicéridos, fosfolípidos y apolipoproteínas y más colesterol esterificado. Estos quilomicrones remanentes se dirigen al hígado para su posterior eliminación. De esta manera los quilomicrones normalmente desaparecen del torrente circulatorio en un periodo de 12-14 horas después de la ingesta de alimento. Los mecanismos por los cuales el hígado lleva a cabo la eliminación de los quilomicrones no son del todo conocidos. Las primeras etapas del catabolismo de los quilomicrones remanentes han resultado más complejas de lo inicialmente postulado, incluyendo una unión inicial de los quilomicrones remanentes a otras moléculas de la superficie celular como son el proteoglicanos de heparán sulfato (HSPGs, del inglés “*heparin sulphate proteoglycans*”), considerándose a sindecan-1 el principal receptor HSPG para las lipoproteínas remanentes en el hígado (Williams y Chen, 2010), y apoE (Beisiegel y cols., 1989). El receptor scavenger clase B tipo I media también en la unión de los quilomicrones remanentes, para sufrir posteriormente un proceso de endocitosis mediante los receptores de LDL y por proteínas relacionadas con el receptor LDL (LRP, del inglés “*LDL receptor related protein*”) (Havel y Hamilton, 2004).

La apo B-48 carece del dominio de unión a los receptores de LDL, a diferencia de la apo B-100. Sin embargo, los quilomicrones remanentes durante su proceso de catabolismo toma apo E de las HDL. La presencia de apo E en los quilomicrones remanentes facilita su rápido aclaramiento por parte del hígado a través del receptor de LDL, al igual que ocurre con otras lipoproteínas ricas en triglicéridos. La ausencia de apo E tiene como consecuencia un retardo en el aclaramiento de los quilomicrones (Schaefer y cols., 1986).

Al igual que ocurre con las lipoproteínas hepáticas que contienen apo B-100, sólo hay una molécula de apo B-48 asociada con cada quilomicroón, y a diferencia de otras apolipoproteínas asociadas a los quilomicrones, ésta no es transferida a otras lipoproteínas en circulación. Así es posible en el hombre distinguir las lipoproteínas ricas en triglicéridos de origen hepático portadoras de la apo B-100 de las de origen intestinal portadoras de apo B-48. El contenido de apo B-48 es determinante del número de partículas de lipoproteínas ricas en triglicéridos intestinales y de sus remanentes. En cambio, el contenido en triglicéridos es un determinante del tamaño de la partícula.

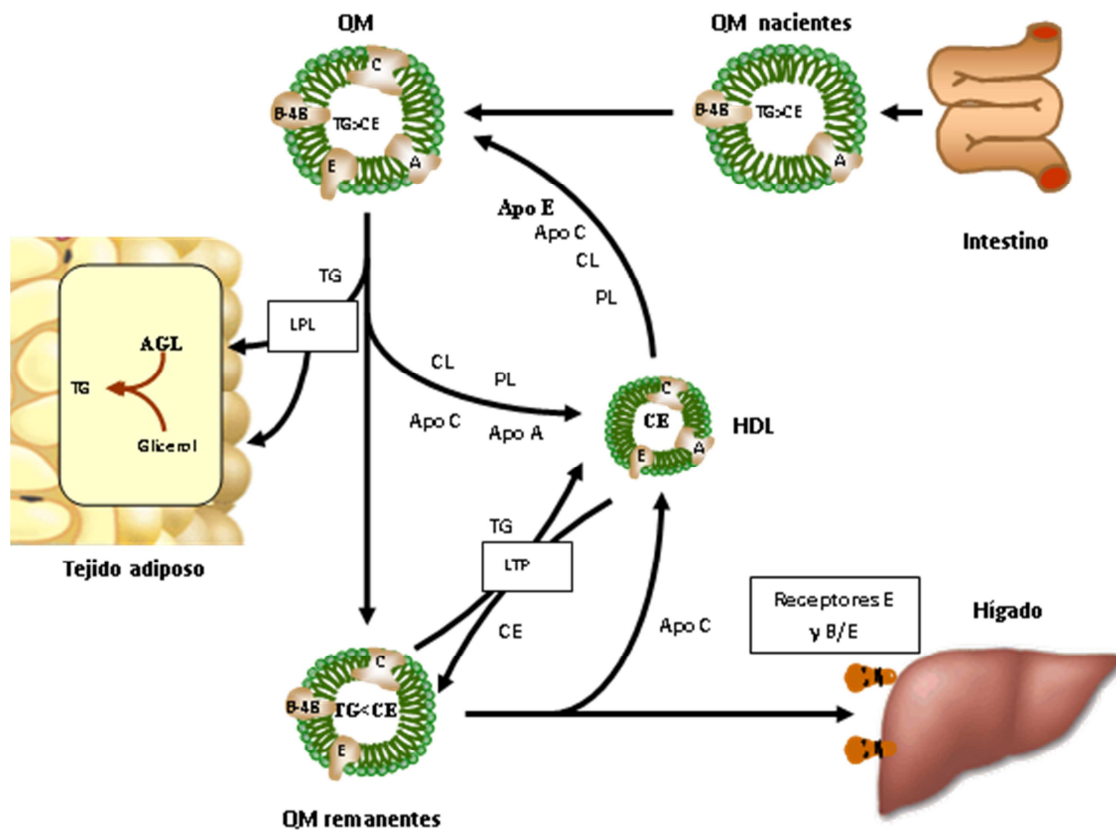


Figura 13: Esquema resumido del metabolismo de los quilomicrones.

Los quilomicrones remanentes pueden contribuir directamente a la aterosclerosis, ya que estas partículas pueden penetrar rápidamente en las paredes de las arterias y quedar retenidas en los vasos sanguíneos. Lo que incrementa el riesgo de padecer enfermedad cardiovascular es el incremento del número de quilomicrones y, por lo tanto, el número de quilomicrones remanentes y no el tamaño de los mismos, ya que el incremento en el tamaño de los quilomicrones facilita un mayor transporte de lípidos sin variar el número de partículas (Nakatani y cols., 2011). Y es que en situaciones normales, durante el proceso de absorción lipídica, para adecuarse al incremento en la cantidad de lípidos que tiene que transportar, el intestino produce quilomicrones de mayor tamaño, mientras que el número de quilomicrones no aumenta (Hayashi y cols., 1990a).

1.2.2.7 Regulación de la síntesis de quilomicrones a través de la alimentación

En los últimos años muchos de los estudios realizados sobre el metabolismo lipídico se han centrado en estado postprandial, puesto que el ser humano pasa la mayor parte del día en estado postprandial. La cantidad de grasa necesaria para incrementar de manera significativa los niveles plasmáticos de triglicéridos es de 30-50 gramos, aumentando de manera dosis dependiente la lipemia postprandial. Con cantidades superiores a 80 gramos el aumento es constante (López Miranda J, 2010).

Dietas ricas en carbohidratos pueden producir un incremento de los niveles plasmáticos de triglicéridos. Además de la cantidad, el tipo de carbohidratos puede alterar el metabolismo lipídico postprandial. Alimentos con alto índice glucémico incrementan la insulinemia postprandial así como los niveles de apo B-100 y apo B-48 (Harbis y cols., 2004). El consumo de fructosa también se ha relacionado con un aumento de la lipemia postprandial (Chong y cols., 2007).

Otro de los factores son los ácidos grasos poliinsaturados n-3 (omega-3) y n-6 (omega-6) cuyo consumo está relacionado con una reducción de la lipemia postprandial (Ooi y cols., 2013).

1.2.3 Papel del intestino en la dislipemia

La hiperglucemia es una característica asociada a la DM2, aunque también lo es la alteración del metabolismo lipídico, y es que el metabolismo de los ácidos grasos es un importante regulador de la resistencia a la insulina, elemento clave en la patogénesis de la DM2 (McGarry, 1992). La hipertrigliceridemia postprandial, característica común de la resistencia a la insulina, está atribuida a una sobreproducción por parte del hígado de VLDL (Sparks y cols., 2012). Esta hipertrigliceridemia postprandial es un factor de riesgo cardiovascular muy importante ya que contribuye de manera significativa al desarrollo de aterosclerosis, enfermedad inflamatoria crónica y multifactorial, caracterizada por la acumulación excesiva de colesterol en la capa íntima de la pared arterial y cuyo origen implica una disfunción endotelial, invasión de la pared arterial por

leucocitos y la subsecuente formación de células espumosas. Las partículas ricas en lipoproteínas están implicadas en varios de estos procesos inflamatorios, como la formación de radicales libres, la activación de los leucocitos, la disfunción endotelial y la formación de las células espumosas.

La dislipemia es en gran parte debida a la acumulación plasmática de partículas lipoproteicas hepáticas e intestinales ricas en triglicéridos. Esta acumulación es a su vez secundaria a la mayor producción hepática de VLDL, a un defecto en el aclaramiento de las partículas ricas en triglicéridos atribuido principalmente a la disminución de la actividad de la LPL, a una anomalía en la composición apoproteica de las lipoproteínas y al aumento de partículas ricas en triglicéridos en el plasma como resultado de la competencia que se crea entre las partículas ricas en triglicéridos de origen hepático y las de origen intestinal, ya que ambas utilizan la misma ruta catabólica.

Un mayor tiempo de permanencia en el plasma de las partículas lipoproteicas ricas en triglicéridos facilita la transferencia de triglicéridos desde estas partículas hacia las LDL y HDL, por acción de las enzimas PLTP y CEPT. Estas LDL y HDL enriquecidas en triglicéridos son sustrato de la lipasa hepática, cuya función es la formación de LDL pequeñas y densas y el incremento del catabolismo de las HDL (Adiels y cols., 2008). Como consecuencia aumenta el número de partículas de LDL pequeñas y densas y baja la concentración de HDL.

Los quilomicrones y sus partículas remanentes pueden tener efectos aterogénicos directos al causar daños en las paredes de las arterias, bien sea por la deposición de lípidos o por los efectos oxidativos, inflamatorios o tóxicos que pueden provocar. Además, la acumulación en el plasma de los remanentes de quilomicrones pueden tener efectos aterogénicos de manera indirecta debido a la alteración de las concentraciones plasmáticas de lipoproteínas y/o del metabolismo lipoproteico, a los efectos negativos sobre la sensibilidad a la insulina, a la posibilidad de causar trombosis y a los efectos oxidativos y/o proinflamatorios que de manera indirecta facilitan el desarrollo de aterosclerosis (Krauss, 1998).

La acumulación de partículas lipoproteicas ricas en triglicéridos en las paredes de las arterias es el inicio del proceso de aterosclerosis. Los quilomicrones por su

tamaño, no son capaces de atravesar las paredes de los vasos. Sin embargo, sus remanentes, partículas de menor tamaño, más densas y ricas en colesterol pueden penetrar la pared de los vasos sanguíneos y quedar retenidas en el espacio subendotelial (Proctor y Mamo, 2003). En los procesos de aterosclerosis también se encuentran involucrados los procesos de inflamación. Se ha demostrado que los quilomicrones remanentes están relacionados con esos procesos manteniendo un microambiente proinflamatorio, procoagulante y proaterogénico en la pared arterial, con sus consecuencias deletéreas (Alipour y cols., 2008). También se ha visto que los quilomicrones remanentes están asociados con la apoptosis de células endoteliales (Kawasaki y cols., 2000).

En macrófagos y monocitos se ha aislado e identificado un receptor específico de la apo B-48 que únicamente capta remanentes de quilomicrones (Brown y cols., 2000, Varela y cols., 2011). La apo B-48 ha sido aislada de placas aórticas de ateroma en el ser humano (Nakano y cols., 2008). La concentración de colesterol es cuarenta veces superior en las partículas lipoproteicas ricas en apo B-48 que en apo B-100, lo que otorga la posibilidad a estas partículas de liberar cuatro veces más colesterol en la pared vascular que las partículas ricas en apo B-100. De ahí la importancia de los quilomicrones y sus remanentes en los procesos de aterosclerosis (Proctor y cols., 2002).

En ayunas, la contribución del intestino a la producción total de triglicéridos por parte del organismo se ha estimado que oscila entre el 10 al 40% de la concentración global de triglicéridos en ratas (Ockner y cols., 1969, Risser y cols., 1978). La producción y secreción basal de lipoproteínas que contienen apo B-48 se encuentra incrementada en el intestino de individuos con DM2 (Curtin y cols., 1996). La contribución del intestino a la hipertrigliceridemia basal también se ha visto incrementada en modelos animales de DM2 (Risser y cols., 1978). Los niveles de apo B-48 en ayunas están asociados a la enfermedad arterial periférica sintomática en pacientes con DM2 (Lapice y cols., 2012), y correlacionan con la enfermedad coronaria arterial (Masuda y cols., 2012). Los niveles séricos de apo B-48 en ayunas correlacionan fuertemente con la lipemia postprandial, y es por esto por lo que se han propuesto como un marcador de lipemia postprandial (Masuda y cols., 2011). Los niveles de apo B-48

correlacionan con el grosor íntima-media carotídea en individuos con niveles normales de triglicéridos séricos (Nakatani y cols., 2011). Por esto, la concentración de apo B-48 en ayunas podría servir como marcador de riesgo de aterosclerosis, y la relación apo B-48/triglicéridos ha sido propuesta como un marcador para la detección temprana de la aterosclerosis, incluso cuando los niveles de triglicéridos no están elevados (Yuasa-Kawase y cols., 2012).

1.2.4 Papel del intestino en la resistencia a la insulina

La insulina, la hormona anabólica más importante, promueve la síntesis y almacenamiento de carbohidratos, lípidos y proteínas inhibiendo su degradación (Saltiel y Kahn, 2001). En los estados de resistencia a la insulina, los niveles normales circulantes de insulina son insuficientes para una adecuada regulación del metabolismo. Como resultado de la falta de supresión de la lipólisis en el tejido adiposo, se liberan más ácidos grasos a la circulación. Altos niveles de manera continuada de ácidos grasos en circulación, perpetúan el estado de resistencia a la insulina mediante la inhibición de la captación, almacenaje y oxidación de la glucosa, e incrementando la producción de glucosa hepática (Bergman y Ader, 2000).

El contenido de macronutrientes de la dieta puede influir en el desarrollo de la resistencia a la insulina. Así lo muestran estudios que indican que un consumo excesivo de carbohidratos y grasas pueden provocar el desarrollo de la misma (Uauy y Diaz, 2005). En concreto, dietas ricas en fructosa están asociadas al desarrollo de anomalías metabólicas como la hiperlipemia, hipertensión, ganancia de peso... (Khitan y Kim, 2013). El consumo de fructosa se ha incrementado en las últimas décadas. Una de las razones por las cuales contribuye al incremento de la incidencia de resistencia a la insulina es que es rápidamente absorbida y metabolizada por el hígado. La exposición del hígado a grandes cantidades de fructosa provoca una estimulación de la lipogénesis y una acumulación de triglicéridos, lo que conlleva a una menor sensibilidad a la insulina.

La dislipemia metabólica es la complicación más común de los estados de resistencia a la insulina y DM2, y se considera que está acentuada por la obesidad así como por factores ambientales como la dieta rica en grasas y el estilo de vida sedentario. Las recientes investigaciones se centran en los procesos fisiológicos en los que el intestino puede exacerbar la dislipemia en los estados de resistencia a la insulina y obesidad, y en cómo se producen estos procesos. El intestino ya no es considerado como un órgano pasivo sino que está activamente implicado en la regulación de la absorción, el transporte intracelular y el metabolismo lipídico, participando así de manera muy importante en el metabolismo lipoproteico.

El intestino es un órgano sensible a señales metabólicas. La insulina reduce la secreción de apo B-48 y de quilomicrones en cultivo de explantes fetales de yeyuno (Levy y cols., 1996). A nivel intestinal, los quilomicrones y las partículas remanentes se encuentran incrementados en los estados de resistencia a la insulina (Curtin y cols., 1996). Una de las razones es la sobreproducción de VLDL por parte del hígado y su competición con los quilomicrones por la ruta catabólica que comparten. También se ha descrito que la LPL, enzima necesaria para la lipólisis de los triglicéridos en circulación, y de cuya actividad depende la cantidad de ácidos grasos liberados de los quilomicrones y de VLDL, está estimulada por la insulina (Karpe y cols., 2011). En estados de resistencia a la insulina la actividad de LPL se encuentra disminuida, lo que implica una menor aclaramiento de partículas de quilomicrones y de sus remanentes (Kobayashi y cols., 2007).

Además, recientemente se ha descrito que la producción de lipoproteínas que contienen apo B-48 está incrementada tanto en ayunas como en el estado postprandial en modelos animales e individuos con resistencia a la insulina y en DM2 (Duez y cols., 2006, Guo y cols., 2005), encontrándose este aumento asociado con una disminución de la tasa catabólica de los quilomicrones remanentes en pacientes diabéticos (Hogue y cols., 2007).

Los mecanismos por los cuales la tasa de producción de lipoproteínas intestinales aumenta en estados de resistencia a la insulina no están aún bien establecidos. En los procesos de resistencia a la insulina y de DM2, los niveles plasmáticos de ácidos grasos libres se encuentran aumentados debido a la saturación de

la capacidad de almacenamiento del tejido adiposo y a la menor supresión por parte de la insulina de la lipólisis intracelular en los adipocitos (Lewis y cols., 2002). Esto provoca que los ácidos grasos libres sean redirigidos hacia otros tejidos que no son el adiposo, alterando así el metabolismo de los mismos. Se ha demostrado que la producción de lipoproteínas intestinales puede estar estimulada por un incremento agudo de los ácidos grasos libres en plasma, mostrando así que no simplemente la disponibilidad de grasa en el lumen intestinal influye en la producción de lipoproteínas intestinales, sino que también la disponibilidad de ácidos grasos libres puede participar en dicho proceso (Duez y cols., 2008). Los mecanismos moleculares que participan en este proceso no están aún descritos. Si los ácidos grasos libres plasmáticos son directamente incorporados a las recién sintetizadas lipoproteínas o si bien, estos ácidos grasos libres estimulan la incorporación de triglicéridos aún se desconoce.

En un estudio realizado con el modelo animal de hámster *Syrian Golden*, modelo de resistencia a la insulina debido a una alimentación rica en fructosa, se sugiere que la producción de partículas lipoproteicas ricas en triglicéridos por parte del intestino puede ser debida a la inducción de la lipogénesis *de novo*, a un aumento de la síntesis endógena de triglicéridos y de ésteres de colesterol, junto a una mayor estabilidad de apo-B48 intracelular y una mayor expresión de MTP y de apo A-IV. Todo ello contribuye a la formación y secreción de lipoproteínas intestinales de mayor tamaño (Haidari y cols., 2002). Este aumento en la producción de lipoproteínas ricas en triglicéridos de origen intestinal se ha observado en otros modelos animales de resistencia a la insulina (Zoltowska y cols., 2003). En individuos obesos, se ha comprobado que la lipogénesis *de novo* en el intestino se ve incrementada en los estados de resistencia a la insulina, junto con un incremento de la síntesis de apo B-48 y un aumento en la síntesis y secreción de lipoproteínas ricas en triglicéridos (Veilleux y cols., 2014).

1.3 LIPOGÉNESIS *DE NOVO*

La lipogénesis *de novo* es una ruta metabólica que sintetiza ácidos grasos cuando hay un exceso de carbohidratos. Estos ácidos grasos pueden ser incorporados a los triglicéridos para almacenar energía. La lipogénesis consta de una serie de reacciones mediante las cuales el acetil-CoA, producto intermediario del metabolismo de la glucosa, se convierte en ácidos grasos. Estas reacciones tienen lugar fuera de la mitocondria. El acetil-CoA es sintetizado en la mitocondria por descarboxilación oxidativa del piruvato y no puede atravesar la membrana mitocondrial. En su lugar, es el citrato el que atraviesa la membrana. Una vez en el citoplasma, la lipogénesis *de novo* se realiza por medio de dos sistemas enzimáticos ubicados en el citoplasma celular: la acetil-CoA carboxilasa (ACC), que convierte el acetil-CoA en malonil-CoA y la ácido graso sintetasa (FAS, del inglés “*fatty acid synthase*”), que cataliza la síntesis de palmitato a partir de una molécula de acetil-CoA y siete de malonil-CoA. El palmitato sintetizado *de novo* puede ser modificado por la elongasa Elovl-6 (Elovl-6, del inglés “*elongation of very long-chain fatty acid family member 6*”) y la esteaoril-CoA desaturasa-1 (SCD-1, del inglés “*stearoyl-CoA desaturase-1*”) para producir otras especies lipídicas. Elovl-6 cataliza la elongación de los ácidos grasos de 12, 14 o 16 carbonos, y para ello usa malonil-CoA como sustrato y NADPH como agente reductor. Mientras, la SCD-1 introduce un doble enlace en la posición $\Delta 9$ del ácido graso saturado.

Factores dietéticos como la cantidad y el tipo de carbohidratos, el contenido de fibra y el tipo de grasas pueden influir sobre el efecto de los carbohidratos en los lípidos plasmáticos (Frayn y Kingman, 1995). Los niveles de glucosa en sangre pueden estimular la lipogénesis a través de varios mecanismos (Kersten, 2001). Uno de ellos es que el metabolismo de la glucosa a través de la ruta glucolítica aporta la fuente de carbono necesaria para la síntesis de ácidos grasos (Strable y Ntambi, 2010). Otro mecanismo es que la glucosa induce la expresión de los enzimas implicados en la ruta lipogénica (Kersten, 2001), uno de los motivos es porque induce la liberación de insulina, la cual ejerce su regulación sobre los genes lipogénicos a través de la

activación de la proteína de unión a elementos regulados por esteroides-1 (SREBP-1, del inglés “*sterol regulatory element-binding protein-1*”) (Kersten, 2001, Strable y Ntambi, 2010).

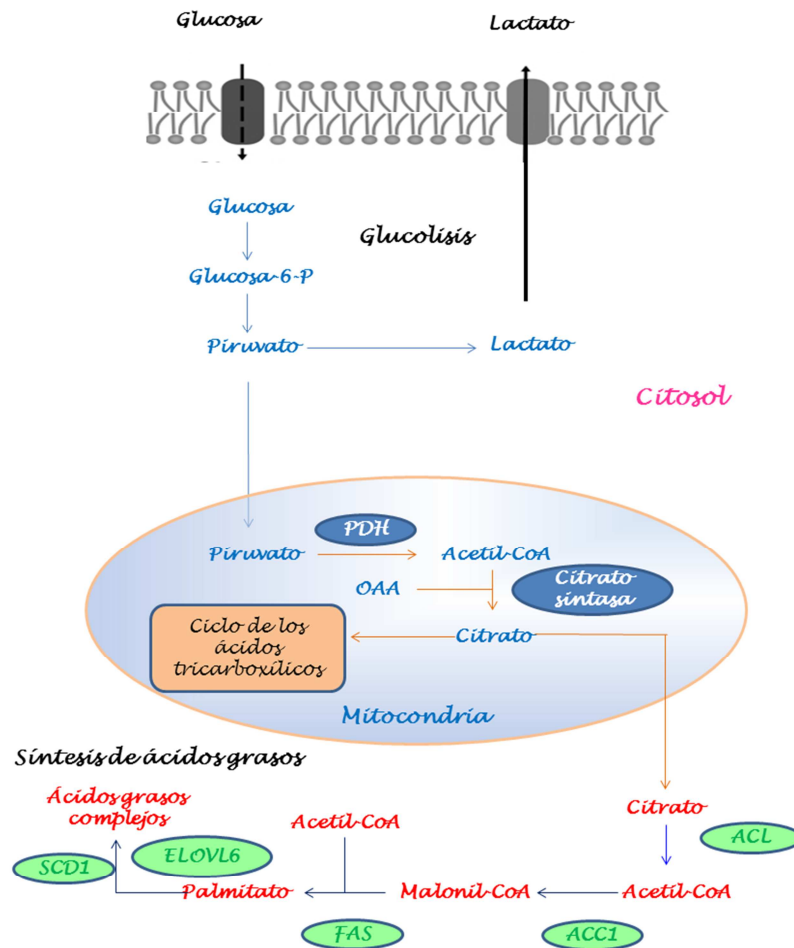


Figura 14: Lipogénesis *de novo*.

La lipogénesis *de novo* se lleva a cabo principalmente en el tejido adiposo y en el hígado, siendo el hígado cuantitativamente más importante en este aspecto. Alteraciones en la lipogénesis *de novo* en tejidos lipogénicos pueden alterar la homeostasis lipídica del organismo. Además, los tejidos no lipogénicos, donde la lipogénesis *de novo* se encuentra suprimida en condiciones normales, pueden mostrar

un aumento de esta ruta en determinadas condiciones fisiológicas. Se ha comprobado que el intestino posee los enzimas necesarios para poder sintetizar triglicéridos a partir de glucosa (Stifel y cols., 1969). Evidencias de la existencia de esta lipogénesis *de novo* en el intestino ha sido descrita en modelos animales de resistencia a la insulina inducida a través de la alimentación como en el hámster *Syrian Golden* y en *Psammomys obesus* (Haidari y cols., 2002, Zoltowska y cols., 2003). En hámster se ha visto que la inducción de la resistencia a la insulina a través de la alimentación con fructosa produce la activación de la proteína de unión a elementos regulados por esteroides-1c (SREBP-1c del inglés “*sterol regulatory element binding protein-1c*”) que tiene un papel muy importante en la lipogénesis (Federico y cols., 2006), siendo la isoforma SREBP-1c la principal isoforma localizada en el intestino de hámster, y cuyo nivel de ARNm se correlaciona con los niveles de expresión de los enzimas FAS, ACC y ATP citrato liasa (ACL) (Field y cols., 2003).

A continuación, se describen algunas de las enzimas que participan en la lipogénesis *de novo*, las cuales son objeto del presente estudio.

1.3.1 Complejo piruvato deshidrogenasa (PDH)

El complejo piruvato deshidrogenasa (PDH) está localizado en la matriz mitocondrial. Sirve como punto de unión entre la glicolisis (metabolismo aeróbico) y el ciclo del ácido cítrico. Por ello su regulación es un punto clave para la selección del sustrato energético en los tejidos. Cataliza la descarboxilación oxidativa del piruvato para formar acetil-CoA. El complejo PDH está formado por múltiples subunidades de tres componentes catalíticos: piruvato deshidrogenasa (subunidad E1), dihidrolipoamida acetiltransferasa (subunidad E2) y dihidrolipoamida deshidrogenasa (subunidad E3). La subunidad E1 es un tetrámero formado por dos subunidades α y dos subunidades β , de 41kDa y 36 kDa respectivamente. El complejo PDH consta de aproximadamente 20-30 copias de la subunidad E1, 60 copias de la subunidad E2, seis copias de la subunidad E3. Consta además de dos enzimas reguladoras, una proteína quinasa que inactiva el complejo mediante la fosforilación y otra fosfatasa la cual lo activa.

En circunstancias donde se incrementa el flujo glicolítico y por tanto la oxidación de la glucosa, se produce la supresión de la actividad del complejo PDH, para así conservar la glucosa cuando este sustrato escasea, como en situaciones de ayuno o cuando hay un alto consumo de grasas en la dieta. De esta manera se favorece el uso de los lípidos como sustrato metabólico (Harris y cols., 2002) y así se maximiza la disponibilidad de sustratos para la gluconeogénesis (Huang y cols., 2002).

La activación del complejo PDH está regulado por la insulina (Randle, 1986). Esta activación en los tejidos lipogénicos (Johnson y Denton, 2003) es de gran importancia ya que junto con la activación del transporte de glucosa y de la enzima ACC, representa el mecanismo por el cual la insulina incrementa la conversión de glucosa a ácidos grasos.

En modelos animales de diabetes inducida los niveles de actividad del complejo piruvato deshidrogenasa son menores (Mondon y cols., 1992).

1.3.2 ATP citrato liasa (ACL)

La ACL es un punto de unión entre el metabolismo de la glucosa y la síntesis de ácidos grasos. La ACL es una enzima citosólica responsable de la síntesis de acetil-CoA. Esta proteína está formada por cuatro subunidades idénticas, cada una de las cuales está formada por 1101 residuos aminoacídicos. Cataliza la formación de acetil-CoA y oxaloacetato a partir de citrato y CoA con la hidrólisis simultánea de ATP a ADP y fosfato. El producto, acetil-CoA, está implicado en numerosas rutas de biosíntesis, incluyendo la lipogénesis y la colesterogénesis (Chypre y cols., 2012). Se expresa de manera abundante en hígado y tejido adiposo blanco, mientras que sus niveles de expresión en cerebro, corazón, intestino delgado y músculo son menores (Fukuda y cols., 1992).

La expresión de ACL está regulada principalmente por el factor de transcripción SREBP-1 (Bauer y cols., 2005). Se ha postulado que la ruta PI3K/Akt estimula la actividad de la ACL principalmente a través de su fosforilación más que por un aumento de su transcripción (Chypre y cols., 2012).

1.3.3 Acetil-CoA carboxilasa (ACC)

La enzima ACC es una enzima dependiente de biotina que cataliza la carboxilación de la acetil-CoA para producir malonil-CoA a través de sus dos actividades catalíticas, biotina carboxilasa y carboxiltransferasa. Hay dos isoformas de esta enzima en mamíferos codificadas por distintos genes: acetil-CoA carboxilasa-1 o acetil-CoA carboxilasa- α (ACC1) y la acetil-CoA carboxilasa-2 o acetil-CoA carboxilasa- β (ACC2). La ACC1 se localiza principalmente en el citosol y su producto malonil-CoA es utilizado en la síntesis de ácidos grasos. Se expresa principalmente en tejidos lipogénicos como el hígado y el tejido adiposo (Kreuz y cols., 2009). Mientras que ACC2 se localiza principalmente en la mitocondria y su producto sirve como inhibidor de la β -oxidación de ácidos grasos. Se expresa principalmente en tejidos oxidativos como el músculo esquelético y el corazón (Kreuz y cols., 2009).

La insulina aumenta los niveles de expresión de acetil-CoA y en estados de resistencia a la insulina los niveles se encuentran significativamente reducidos (Iritani, 1992). Factores de transcripción como SREBP-1c, receptor hepático X, receptor retinoide X, PPARs, FOXO y PGC participan en su regulación (Brownsey y cols., 2006).

1.3.4 Ácido graso sintetasa (FAS)

Cataliza la biosíntesis de ácidos grasos saturados a partir de precursores simples. El producto principal de la reacción es el palmitato (C16:0). Utiliza como sustrato acetil-CoA, malonil-CoA y NADPH. El ácido graso es elongado desde el acetil-CoA por una serie de ciclos de condensación con malonil-CoA, el cual dona dos carbonos en cada uno de los ciclos. Así, para la síntesis de palmitato son necesarios siete ciclos y por lo tanto siete moléculas de malonil-CoA que donen sus átomos de carbono al acetil-CoA para dar lugar al ácido graso saturado de 16 carbonos.

La enzima FAS está formada por dos monómeros idénticos de 270 kDa cada uno y sólo es enzimáticamente activa cuando se encuentra en forma de dímero. Cada una de las subunidades contiene múltiples dominios funcionales. Estos dominios poseen

distintas actividades enzimáticas las cuales son necesarias para la síntesis y elongación de los ácidos grasos: acetil transferasa, β -cetoacil sintetasa, malonil transferasa, β -cetoacil reductasa, β -hidroxiacil deshidratasa y enol reductasa.

Es una proteína soluble que se expresa en numerosos tejidos presentando unos niveles mayores en hígado, tejido adiposo y pulmones (Semenkovich y cols., 1995). FAS se encuentra regulada a nivel hormonal y nutricional, y es regulada principalmente por la insulina a través de mecanismos transcripcionales (Goodridge, 1986), aunque se ha visto que otros mecanismos y otros nutrientes y hormonas regulan su expresión (Semenkovich, 1997).

La expresión del gen FAS y su actividad se ha visto incrementada por la insulina en adipocitos humanos (Claycombe y cols., 1998). En tejido adiposo, los niveles de expresión de FAS son mayores en individuos obesos (Berndt y cols., 2007), correlacionando sus niveles con el tamaño del adipocito (Bluher y cols., 2004). En individuos con DM2 también se ha observado una mayor expresión de este gen (Berndt y cols., 2007).

1.3.5 SREBP-1c

SREBP tiene un papel muy importante en la regulación intracelular de colesterol y en general, en la homeostasis lipídica. SREBP estimula la expresión de genes codificantes para proteínas que participan en la síntesis de colesterol y ácidos grasos (Brown y Goldstein, 1997). SREBP juega un papel importante en el desarrollo de ciertas patologías asociadas con la obesidad y el síndrome metabólico como son la esteatosis hepática y la hiperlipidemia (Moon y cols., 2012).

SREBP es una familia de factores de transcripción que se unen a elementos de respuesta a esteroides. La familia SREBP está formada por tres miembros: SREBP-1a, SREBP-1c y SREBP-2. SREBP-1a y SREBP-1c están codificados por el mismo gen pero difieren en sus primeros exones debido a la utilización de diferentes sitios de inicio de transcripción. En humanos, SREBP-1c está implicado en el metabolismo de los ácidos grasos (Brown y Goldstein, 1997, Horton y cols., 2002) y SREBP-2 participa en

la homeostasis del colesterol (Moore y cols., 2010), mientras que SREBP-1a está implicado en ambas rutas (Brown y Goldstein, 1997, Horton y cols., 2002). SREBP-1c se expresa en la mayoría de tejidos en humanos, siendo mayor en hígado, tejido adiposo blanco, glándula adrenal y cerebro (Shimomura y cols., 1997). Por el contrario, SREBP-1a se expresa en tejidos con alta capacidad de proliferación celular como el intestino y bazo (Shimomura y cols., 1997). La expresión de SREBP-2 es ubicua (Sato, 2010).

SREBP-1c tiene un papel muy importante en la activación de la síntesis de ácidos grasos en respuesta a la insulina (Ducluzeau y cols., 2001). SREBP está implicado en la regulación de genes relacionados con la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos como ACL, ACC, FAS y SCD (Horton y cols., 2002). En la diabetes se ha visto que los niveles de expresión de SREBP-1c son menores, y que se incrementan de manera significativa tras el tratamiento con insulina (Ducluzeau y cols., 2001).

1.4 GLUCONEOGÉNESIS

La producción endógena de glucosa es una función crucial que permite al organismo mantener una concentración de glucosa en plasma en niveles normales en aquellas situaciones en las cuales la captación de glucosa a partir de los alimentos se encuentra ausente, como por ejemplo durante la noche. La glucosa es la principal fuente de energía para el metabolismo de la mayoría de tejidos. El mantenimiento de la concentración de glucosa en sangre en un rango adecuado es importante principalmente por dos razones. Primero, el requerimiento de glucosa por parte del cerebro como fuente de energía; en estado postprandial el cerebro utiliza glucosa casi exclusivamente, requiriendo ~117-142 g/día (Institute of Medicine, 2005). El segundo motivo por el cual se produce esta cuidadosa regulación de la concentración de glucosa es porque la glucosa puede llegar a ser tóxica llegando a provocar modificación de proteínas (Degenhardt y cols., 1998) o daño oxidativo (Huebschmann y cols., 2006), así como otros efectos adversos producidos por un exceso de glucosa que se han demostrado en pacientes con DM2 mal controlada (Skyler, 1996).

La producción endógena de glucosa se produce principalmente en el hígado, donde la glucosa se produce a partir de la rotura del glucógeno almacenado (glucogenolisis), o bien, *de novo* (gluconeogénesis). La gluconeogénesis es un proceso en el cual precursores no carbohidratados (piruvato, lactato, glicerol, alanina y glutamina) son convertidos en glucosa. Es el proceso reverso de la glicolisis y tiene lugar en su mayor parte en el citoplasma de la célula.

En estado postprandial, el glucógeno se almacena en el hígado y en el músculo esquelético. Esto, junto con la glucosa que se absorbe en el intestino constituye la principal fuente de glucosa para los tejidos periféricos para las siguientes horas. El periodo entre comidas y especialmente durante la noche, cuando no hay ingesta de alimentos, la glucogenolisis libera la glucosa almacenada en forma de glucógeno, de manera que el glucógeno se va agotando. Cuando esto ocurre, la glucosa es sintetizada a través de la ruta gluconeogénica. Por tanto, la función de la gluconeogénesis es proporcionar al organismo glucosa en aquellas condiciones fisiológicas en las cuales los

depósitos de glucógeno están agotados y no hay absorción de glucosa por parte del intestino.

Una de las alteraciones asociadas a la DM2 es el incremento de producción de glucosa endógena, la cual contribuye a la hiperglicemia característica de la enfermedad (Woerle y cols., 2006). Se ha demostrado que la gluconeogénesis se ve incrementada en el hígado durante el ayuno y en la DM2 (Pilkis y cols., 1988), así como en la corteza del riñón durante ayuno prolongado, DM2 y en acidosis metabólica (Adroque, 1992). En pacientes con DM2 se ha observado un incremento de la gluconeogénesis a partir de diversos sustratos como el lactato, la alanina, el piruvato y el glicerol (Puhakainen y cols., 1992, Stumvoll y cols., 1996). En modelos animales de obesidad, resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa se ha observado un incremento en los niveles de las enzimas implicadas en la gluconeogénesis (Song y cols., 2001, Andrikopoulos y Proietto, 1995).

La mayoría de las reacciones de la gluconeogénesis son catalizadas por las mismas enzimas de la ruta glucolítica y proceden a la inversa de los pasos utilizados en la glucolisis. Sin embargo, hay tres pasos irreversibles que son llevados a cabo por enzimas exclusivas de la gluconeogénesis. Estas reacciones son la formación de fosfoenolpiruvato, la formación de fructosa 6-fosfato y la formación de glucosa.

Síntesis de fosfoenolpiruvato: Comienza en la mitocondria con la conversión de piruvato a oxalacetato por la piruvato carboxilasa (PC) que usa biotina como coenzima. La ruta continúa en el citoplasma, para lo cual el oxalacetato tiene que atravesar la membrana mitocondrial. Al no poder atravesarla por difusión, es transportado al citoplasma a través de dos mecanismos: o bien, la conversión a fosfoenolpiruvato, reacción llevada a cabo por la PEPCK; o bien, mediante la reducción a malato a expensas de NADH por la malato deshidrogenasa. El malato atraviesa la membrana mitocondrial y es reconvertido a oxalacetato en el citoplasma por la malato deshidrogenasa citosólica usando NADPH₂ como coenzima. El oxalacetato es fosforilado a fosfoenolpiruvato por la PEPCK. Posteriormente, el fosfoenolpiruvato se convierte en fructosa 1,6-bifosfato siguiendo, en sentido contrario las reacciones reversibles de la glucolisis.

Conversión de fructosa 1,6-bifosfato en fructosa 6-fosfato: Es una reacción hidrolítica por la cual se elimina el grupo fosfato en posición 1 de la fructosa por acción de la enzima fructosa 1,6-bifosfatasa (FBPasa). La fructosa 6-fosfato se convierte en glucosa 6-fosfato por la reacción reversible de la glucolisis.

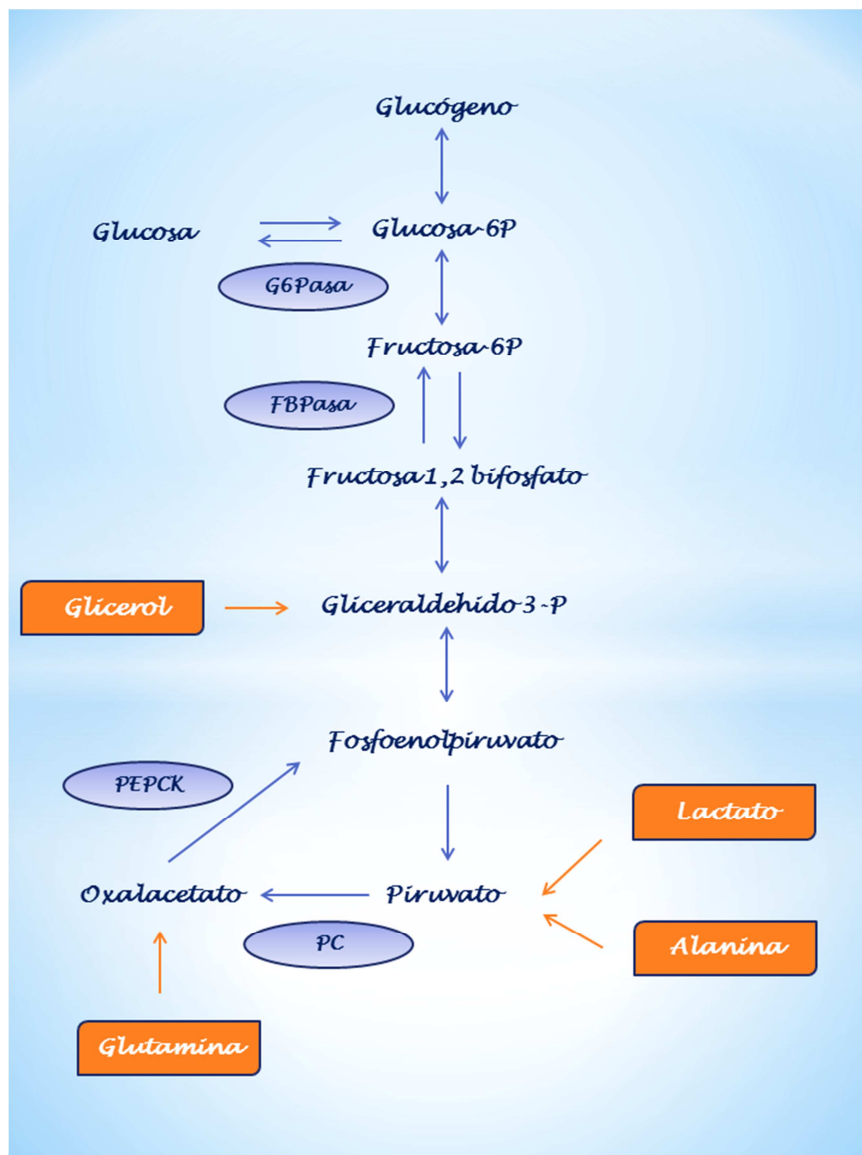


Figura 15: Gluconeogénesis.

Formación de glucosa a partir de glucosa 6-fosfato: En esta reacción se libera el grupo fosfato en posición 6 de la glucosa por acción de la G6Pasa.

A continuación se describen algunas de las enzimas que participan en la gluconeogénesis, las cuales son objeto del presente estudio.

1.4.1 Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK)

La PEPCK es una enzima monomérica de 69 kDa que cataliza la reacción de conversión de oxalacetato en fosfoenolpiruvato. Se expresa principalmente en el hígado y riñón y también en tejido adiposo, glándula mamaria durante la lactancia e intestino delgado (Chakravarty y cols., 2005). Su función en tejidos no gluconeogénicos no está aún muy definida. En el tejido adiposo, por ejemplo participa en la gliceroneogénesis, la formación de glicerol-3-fosfato necesario para la síntesis de los triglicéridos (Hanson y Reshef, 2003).

En mamíferos se han descrito dos isoformas, una citosólica y otra mitocondrial, codificadas por genes distintos pero homólogos. La isoenzima citosólica está codificada por el gen *PCK1* localizado en humanos en el cromosoma 20q.13.13. La isoenzima mitocondrial está codificada por el gen *PCK2* localizado en humanos en el cromosoma 14q.11.2. Ambas isoenzimas son proteínas de 622 y 640 aminoácidos respectivamente, teniendo un 68% de identidad y un 82% de similitud en sus secuencias (Beale y cols., 2007).

PEPCK es considerada una enzima clave en la gluconeogénesis, aunque también participa en otras rutas como son la gliceroneogénesis, la síntesis de serina y en la cataplerosis de los intermediarios del ciclo del ácido cítrico (retirada de los aniones del ciclo del ácido cítrico). Los principales factores que incrementan la expresión de la enzima PEPCK son el AMP cíclico, los glucocorticoides y las hormonas tiroideas, mientras que la insulina ejerce un efecto inhibitorio (Hanson y Reshef, 1997).

La mayoría de los estudios se han realizado sobre la isoforma citosólica de la PEPCK, siendo considerada un marcador virtual de la gluconeogénesis hepática, si bien en la mayoría de mamíferos, incluyendo humanos, el 50% de la actividad total de la enzima PEPCK corresponde a la isoforma mitocondrial (Hanson, 2009). Tras años de estudio de la isoforma citoplasmática, el consenso general es que alteraciones en la

transcripción del gen que codifica para PEPCK citosólica regulan la actividad total de esta enzima.

En modelos animales genéticamente modificados carentes de la enzima PEPCK citosólica en el hígado y que sobreexpresaban la enzima PEPCK mitocondrial, se demostró que la enzima PEPCK mitocondrial contribuía a la producción hepática de glucosa (Mendez-Lucas y cols., 2013), concluyendo que a pesar de su potencial gluconeogénico, coopera con la enzima PEPCK citosólica ajustando los flujos gluconeogénicos a los cambios en los sustratos y energía disponible.

Ratas con diabetes inducida por estreptozotocina presentan niveles elevados de ARNm y de actividad de la enzima PEPCK, tanto en el duodeno como en el yeyuno. El tratamiento con insulina durante 10 horas provoca una disminución en los niveles de ARNm, lo cual muestra el efecto inhibitorio de la insulina sobre los niveles de expresión génica de la enzima PEPCK en el intestino delgado de ratas (Rajas y cols., 2000). En ratones transgénicos que sobreexpresaban PEPCK en el hígado se ha descrito una resistencia a la insulina hepática y una tolerancia alterada a la glucosa (Valera y cols., 1994, Sun y cols., 2002). En ratas que sobreexpresaban PEPCK en los riñones se ha mostrado una tolerancia alterada a la glucosa, resistencia a la insulina hepática, así como resistencia a la insulina en músculo y tejido adiposo (Lamont y cols., 2003).

1.4.2 Fructosa 1,6-bifosfatasa (FBPasa)

Cataliza la conversión irreversible de fructosa 1,6-bifosfato a fructosa 6-fosfato y fosfato inorgánico. Esta enzima está activada por diversos cationes monovalentes e inhibida competitivamente por fructosa 2,6-bifosfato y alostéricamente por adenosin 5-monofosfato y nicotinamida adenina dinucleótido. En mamíferos existen dos genes *FBP1* y *FBP2* que codifican para dos isoenzimas. *FBP1* codifica la FBPasa hepática, que se expresa principalmente en órganos gluconeogénicos. La isoforma codificada por *FBP2* se expresa en el músculo estriado y es ampliamente expresada en células no gluconeogénicas. Ambas isoformas comparten un 77% de identidad a nivel proteico.

En modelos animales de obesidad y resistencia a la insulina se ha mostrado un incremento de la actividad hepática de la enzima FBPasa (Andrikopoulos y cols., 1993, Song y cols., 2001). En ratones que sobreexpresan la enzima FBPasa hepática humana, se ha observado un incremento de la gluconeogénesis a partir de glicerol como resultado de la sobreexpresión de la FBPasa hepática humana (Lamont y cols., 2006).

En humanos, un incremento de FBPasa hepática se ha relacionado con un incremento de la producción endógena de glucosa, ya que en pacientes obesos con DM2 se ha observado un incremento de la gluconeogénesis a partir de glicerol (Puhakainen y cols., 1992), sustrato que entra en la ruta gluconeogénica justo antes de la reacción catalizada por la FBPasa.

1.4.3 Glucosa 6-fosfatasa (G6Pasa)

La enzima G6Pasa es una enzima crucial en el control de la homeostasis de la glucosa. Cataliza la última reacción bioquímica de la ruta de la gluconeogénesis y glucogenolisis, consistente en la hidrólisis de la glucosa 6-fosfato en glucosa y fosfato inorgánico. La G6Pasa se encuentra embebida en la membrana del retículo endoplasmático. Es un sistema formado por diversas proteínas integrales de membrana, una subunidad catalítica y transportadores de glucosa 6-fosfato, fosfato inorgánico y glucosa. Existen distintas isoformas de la subunidad catalítica que están codificadas por distintos genes: *G6PC*, *G6PC2* y *G6PC3*.

El gen *G6PC* se expresa principalmente en hígado y riñones, y a niveles mas bajos en intestino e islotes pancreáticos (van de Werve y cols., 2000). En islotes pancreáticos también se expresa el gen *G6PC2*, codificante para la subunidad catalítica de la G6Pasa específica de islotes pancreáticos (IGRP, del inglés “*islet glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein*”) llamada así por su expresión selectiva en este tejido (Arden y cols., 1999). Esta subunidad catalítica codificada por *G6PC2* es similar en tamaño, 355 aminoácidos, topología y secuencia (alrededor del 50% de identidad a nivel de aminoácido) a la subunidad catalítica codificada por *G6PC*. Su sobreexpresión *in vitro* no incrementa la hidrólisis de la glucosa-6-fosfato, y por lo

tanto su papel aún no está bien definido (Arden y cols., 1999). *G6PC3* codifica para la isoforma denominada glucosa-6-fosfatasa expresada ubicuamente (UGRP, del inglés “*ubiquitously expressed glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein*”) que aunque se expresa principalmente en cerebro, músculo y riñón, se ha detectado en todos los tejidos estudiados.

La G6Pasa está regulada por la insulina en hígado y riñones (Mithieux y cols., 1996) así como en el intestino delgado (Rajas y cols., 1999). En modelos animales se ha descrito que tanto sus niveles de expresión como sus niveles de actividad enzimática están incrementados durante el ayuno y en la DM2 (Rajas y cols., 1999, Mithieux y cols., 2004b).

La G6Pasa está considerada como la enzima crucial para el inicio de la gluconeogénesis en el intestino (Mithieux y cols., 2004b). Un estudio en un modelo animal muestra que durante las primeras horas de ayuno, la inducción del gen de la PEPCK no es suficiente para desencadenar una producción de glucosa detectable en el intestino delgado, a pesar de que su actividad enzimática alcanza los niveles máximos a las 24 horas de ayuno, momento en el cual la actividad de la enzima G6Pasa aún no se ha incrementado (Mithieux y cols., 2004a). Sin embargo, la producción de glucosa por parte del intestino se ha situado entorno al 20% de la producción endógena de glucosa total a las 48 horas de ayuno, momento en el cual ambas enzimas muestran un incremento de su actividad (Mithieux y cols., 2004a, Croset y cols., 2001). Esto ha llevado a sugerir que la enzima G6Pasa es más importante que la enzima PEPCK para la iniciación de la gluconeogénesis intestinal.

1.4.4 Glutaminasa

La glutaminasa es una enzima mitocondrial que cataliza la hidrólisis de glutamina a glutamato, amonio y agua. La glutamina es el aminoácido más común en el organismo y juega un papel fundamental en procesos metabólicos como el transporte de nitrógeno, el estado redox celular y en el metabolismo energético. La glutamina también sirve como precursor de la síntesis de proteínas, aminoácidos y/o ácidos nucleicos.

Hay descritas dos isoformas de la enzima glutaminasa, que provienen de genes relacionados pero diferentes. La glutaminasa hepática se encuentra en el hígado y participa en la regulación de la gluconeogénesis en el hígado y en la síntesis de urea. La otra isoforma, es conocida como glutaminasa renal y no solo se localiza en los riñones, sino que también se encuentra en el intestino y en otros tejidos extra-hepáticos.

En el hígado, los principales precursores gluconeogénicos son la alanina y el lactato. Sin embargo, la glutamina no es utilizada como sustrato gluconeogénico debido a la baja afinidad que muestra la glutaminasa hepática por su sustrato, a diferencia de la alta afinidad que muestra la glutaminasa expresada en el intestino (Windmueller, 1984). La principal función de la glutaminasa en el intestino es la regulación del metabolismo del enterocito, ya que la glutamina es la principal fuente de energía del enterocito.

1.4.5 Regulación de la gluconeogénesis

La regulación de la gluconeogénesis ocurre a múltiples niveles como la expresión génica, la regulación alostérica por pequeños metabolitos y modificaciones post-traduccionales. Los niveles de expresión de G6Pasa y PEPCK están regulados por hormonas como la insulina (Rajas y cols., 1999, Rajas y cols., 2000), factores de transcripción como SREBP-1c y por enzimas transductores de señales como PI3K (Dickens y cols., 1998). La leptina, es otra hormona implicada en la homeostasis de la glucosa que podría estar implicada en la regulación de la gluconeogénesis.

1.4.5.1 PI3K

La PI3K es necesaria para la supresión de la expresión de la G6Pasa por la insulina (Dickens y cols., 1998). Se ha descrito que la activación de PI3K por la insulina se encuentra fuertemente reducida en el hígado de ratones diabéticos (Folli y cols., 1993). En ratones transgénicos se ha mostrado como la sobreexpresión de la subunidad catalítica de PI3K es suficiente para reducir considerablemente la expresión de los genes PEPCK y G6Pasa. Además, la sobreexpresión en un mutante de la subunidad

reguladora p85- α de PI3K, el cual carece de sitio de unión para subunidad catalítica, incrementa la expresión de PEPCK y G6Pasa, así como la producción de glucosa hepática *in vivo* (Miyake y cols., 2002). En hepatocitos, la activación de PI3K por la insulina juega un papel importante en la síntesis de glucógeno y en la inhibición de la expresión de PEPCK (Sutherland y cols., 1995). Es por ello por lo que la activación de PI3K por la insulina se considera fundamental para la regulación de la gluconeogénesis.

1.4.5.2 SREBP-1c

Como hemos comentado anteriormente, SREBP es una familia de factores de transcripción que regulan la expresión de genes que participan en el metabolismo de ácidos grasos, triglicéridos y colesterol (Horton y cols., 2002). Estudios previos también han mostrado que SREBP-1 está involucrado en la regulación de genes que participan en el metabolismo de los carbohidratos, como la G6Pasa y la PEPCK (Yamamoto y cols., 2004). La expresión de SREBP-1c está inducida por la insulina, mientras que el glucagón ejerce el efecto contrario (Foretz y cols., 1999). En hepatocitos de rata, se ha demostrado que la ruta de señalización que implica IRS1-PI3K es esencial para la expresión de SREBP1c inducida por insulina (Matsumoto y cols., 2002).

El efecto de la insulina sobre la SREBP-1c podría estar mediado a través de IRS1, ya que en modelos animales de resistencia a la insulina donde la expresión de IRS2 está ausente o disminuida, se induce la expresión tanto de SREBP-1c como de sus genes diana (Shimomura y cols., 2000). Además, la inhibición de la fosforilación de IRS1 anula la inducción de la expresión de SREBP-1c por insulina en hepatocitos de rata *in vitro* (Matsumoto y cols., 2002). El efecto de la insulina sobre la expresión y síntesis de SREBP-1c implica principalmente a la ruta mediada por PI3K (Matsumoto y cols., 2002).

Los genes que codifican para las enzimas gluconeogénicas están regulados negativamente por la insulina. En ratones con diabetes inducida por estreptozotocina, la sobreexpresión de SREBP-1c mediante adenovirus en el hígado dio como resultado el incremento en la expresión de enzimas lipogénicos como FAS y una disminución de la

expresión de PEPCK (Becard y cols., 2001), mimetizando perfectamente el efecto de la administración de insulina. Las consecuencias fisiológicas de esta sobreexpresión de SREBP-1c hepático fueron un incremento en el contenido hepático de glucógeno y triacilglicerol y un marcado descenso de la hiperglicemia en los ratones diabéticos (Becard y cols., 2001).

El papel de SREBP-1c en la inhibición de la expresión de PEPCK por insulina se ha puesto de manifiesto en modelos animales modificados genéticamente carentes de SREBP-1c. En estos animales en condiciones post-absortivas, los niveles de ARNm de PEPCK son tres veces mayores (Liang y cols., 2002).

1.4.5.3 Leptina

La leptina es una hormona peptídica de bajo peso molecular (16 kDa) codificada por el gen *lep*, cuya secuencia se encuentra altamente conservada en mamíferos. Originalmente fue descrita como una proteína secretada por el tejido adiposo blanco que actuaba sobre el hipotálamo participando en la regulación de la ingesta de alimento y en el gasto energético. Posteriormente, se ha descrito que otros tejidos como el estómago, placenta, cerebro, músculo esquelético y epitelio mamario secretan leptina (Margetic y cols., 2002). Esta hormona también ejerce sus efectos en numerosos tejidos y órganos periféricos, como muestra la amplia distribución de su receptor *lepR* (*lep-R*, del inglés “*leptin receptor*”) (Baratta, 2002), entre ellos se encuentra el intestino delgado (Hansen y cols., 2008). Se han descrito seis isoformas de *lepR*, que son generadas por splicing alternativo del gen *lepr*. Estas isoformas comparten un dominio de unión a la leptina común pero difieren en sus dominios intracelulares.

El intestino presenta receptores *lepR* tanto en la membrana apical como en la basolateral (Barrenetxe y cols., 2002). La mucosa gástrica secreta leptina tanto de forma endocrina como exocrina. Se une al receptor *lepR* soluble, lo cual facilita que la leptina permanezca estable frente a los jugos gástricos, ya que la unión a su receptor protege a la leptina del pH ácido y de la actividad proteolítica del estómago, favoreciendo así la llegada de la leptina al intestino delgado (Guilmeau y cols., 2004). De esta forma

exocrina, la leptina se une a los receptores lepR situados en las células epiteliales intestinales apicales. Alternativamente, y de manera endocrina, la leptina secretada por la mucosa gástrica o por otro tejido/órgano puede llegar al epitelio intestinal por el torrente sanguíneo y unirse a los receptores lepR localizados en la membrana basolateral. La leptina en el intestino participa en la regulación de la absorción, asimilación y utilización de los nutrientes, la motilidad intestinal y la secreción de hormonas intestinales así como en la proliferación celular y la función de la barrera intestinal (Yarandi y cols., 2011).

Además de su papel en la homeostasis del peso corporal, la leptina está implicada en numerosos procesos fisiológicos como la angiogénesis, hematopoyesis, formación de hueso, regulación del metabolismo de los carbohidratos y lípidos (Baratta, 2002, Fruhbeck, 2002), así como en la absorción de nutrientes a nivel intestinal (Fanjul y cols., 2012).

En estados de ayuna, los niveles circulantes de leptina son bajos, mientras que en estado postprandial y en individuos con obesidad los niveles de leptina circulantes se encuentran elevados (Ahima y cols., 2000). Los individuos obesos se suelen caracterizar por tener altos niveles circulantes tanto de insulina como de leptina (Caro y cols., 1996), presentando resistencia a los efectos biológicos producidos tanto por la insulina como la leptina (Myers y cols., 2010). Los mecanismos que llevan a esta resistencia a la leptina aún no son bien conocidos (Sainz y cols., 2015).

Se ha demostrado que la ruta de señalización que media el efecto directo de la leptina interactúa en diversos puntos con los mecanismos de transducción de la señal de la insulina (Szanto y Kahn, 2000, Carvalheira y cols., 2003). La ruta de señalización a través de IRS/PI3K es necesaria para la acción de la leptina (Jiang y cols., 2008a). Se ha comprobado que la leptina activa la ruta IRS/PI3K tanto en el hipotálamo como en tejidos sensibles a insulina como el músculo y el hígado (Xu y cols., 2005).

El hecho de que la leptina contribuya directamente a la homeostasis de la glucosa se puso de manifiesto en estudios realizados en ratones ob/ob con una mutación en el gen *lep* que les hace deficientes en leptina. Estos ratones se caracterizan por hiperglicemia, hiperinsulinemia e intolerancia a la glucosa. Sin embargo, la

hiperglicemia se vio normalizada tras una infusión de leptina en el cerebro (Liu y cols., 1998), lo que demuestra el efecto de la leptina en la homeostasis de la glucosa a través del sistema nervioso central.

La información disponible sobre el efecto de la leptina sobre la producción de glucosa es confusa, ya que los estudios realizados en modelos animales muestran tanto un incremento (Rossetti y cols., 1997) como una disminución de la gluconeogénesis hepática (Ceddia y cols., 1999).

1.4.6 Gluconeogenesis intestinal

Tradicionalmente se ha considerado que solo el hígado y el riñón eran los únicos órganos capaces de llevar a cabo la gluconeogénesis. En condiciones fisiológicas, la producción de glucosa es llevada a cabo principalmente por el hígado, mientras que el riñón realiza esta función solo en condiciones de acidosis metabólica o durante un ayuno prolongado. Así de numerosos estudios publicados en la década de los años 90, se puede concluir que la producción de glucosa por parte de los riñones varía desde aproximadamente el 0% en condiciones postprandiales hasta el 25% del total de la glucosa producida por el organismo durante el ayuno prolongado o en DM2 (Meyer y cols., 1998, Cersosimo y cols., 2000).

La posibilidad de que otros órganos además del riñón e hígado pudieran contribuir a la producción endógena de glucosa surgió a raíz de la detección de enzimas gluconeogénicos en otros tejidos, pero estos tejidos no han sido considerados gluconeogénicos al no poseer todos los enzimas necesarios para llevar a cabo la gluconeogénesis. Este es el caso de la PEPCK expresada en tejido adiposo donde participa en la ruta de la gliceroneogénesis (Hanson y Reshef, 2003).

Así para llevar a cabo la gluconeogénesis son necesarias cuatro enzimas: G6Pasa, FBPasa, PC y PEPCK.

El hecho de que el intestino pueda participar en la regulación de la homeostasis de la glucosa debido a su alta captación de la misma y a su actividad glicolítica se conoce desde hace mucho tiempo (Krebs, 1972). Estudios en modelos animales han

mostrado la presencia de enzimas gluconeogénicas en la mucosa del intestino delgado durante el periodo neonatal. Pero la mayoría de dichos estudios muestran una disminución drástica tras el destete (Westbury y Hahn, 1984, Hahn y Wei-Ning, 1986), por lo que la gluconeogénesis intestinal no se había considerado fisiológicamente importante en el adulto.

Diversos estudios en ratas han mostrado un nivel de expresión suficiente de las enzimas involucradas en la gluconeogénesis durante el ayuno o en la diabetes inducida por estreptozotocina como para considerar al intestino como un órgano gluconeogénico (Mithieux y cols., 2004a, Rajas y cols., 2000). Usando metodología basada en el empleo de trazadores se ha estimado que el porcentaje de glucosa liberada por el intestino representa entre el 20% y el 35% del total de la glucosa producida en el organismo durante el ayuno o en diabetes inducida por estreptozotocina (Croset y cols., 2001, Mithieux y cols., 2004a). Los estudios realizados durante el ayuno en animales muestran que la liberación de glucosa intestinal tiene lugar muy lentamente, no siendo detectable en el periodo postabsortivo (6 horas de ayuno) e incluso a las 24 horas de ayuno (Mithieux y cols., 2004a, Rajas y cols., 2000). La producción de glucosa por parte del intestino se detectó a las 48 horas de ayuno, contribuyendo aproximadamente en un 20% a la producción endógena de glucosa total, llegando a alcanzar un tercio de la producción endógena de glucosa a las 72 horas de ayuno (Mithieux y cols., 2004a). Bien es cierto que estos datos hay que considerarlos con cierta precaución, ya que existe dificultad en la precisión de los análisis en este tipo de estudios (Ekberg y cols., 1999, Croset y cols., 2001).

Más recientemente se ha mostrado que G6Pasa, PEPCK y FBPasa se expresan en el intestino humano (Rajas y cols., 1999, Yanez y cols., 2003). La coexpresión de estas enzimas en el intestino delgado pone de manifiesto su capacidad de síntesis de glucosa, participando de esta manera en la producción de glucosa endógena en humanos.

Por otro lado, desde los trabajos de Windmueller y cols., la glutamina se ha considerado esencial para la integridad de las funciones de la mucosa intestinal (Windmueller y Spaeth, 1980). Recientemente se ha puesto de manifiesto el importante papel de la glutaminasa en el metabolismo de la glucosa (Mithieux, 2001), debido a que

la glutamina es el principal sustrato para la gluconeogenesis intestinal (Croset y cols., 2001, Mithieux, 2001). Aproximadamente el 60% de la glutamina capturada por el intestino es procesada por la ruta gluconeogénica para la formación de glucosa. Por el contrario, alanina y lactato, los dos sustratos gluconeogénicos principales en otros órganos no son precursores en el intestino delgado (Croset y cols., 2001), siendo en el intestino delgado la glutamina el sustrato principal, entorno al 80%, constituyendo el glicerol el 20% restante (Croset y cols., 2001).

2. Hipótesis y Objetivos

2.1 Hipótesis y objetivos

El papel del intestino en la absorción de nutrientes y en el metabolismo de la glucosa a través de la captación de la glucosa y su actividad glucolítica es bien conocido. Sin embargo, en los últimos años, diversos estudios muestran que el intestino es un órgano metabólicamente activo, recibiendo informaciones de la periferia y siendo capaz de modular sus procesos de síntesis y secreción de lípidos en relación a los sustratos, las hormonas y otras sustancias endógenas o exógenas.

Este trabajo nace con el objetivo de estudiar el papel del intestino delgado en la regulación de la homeostasis de la glucosa y lipídica en un grupo de obesos mórbidos (OM) sometidos a un intervención de cirugía bariátrica. En dicha intervención, se tomaron muestras de yeyuno con el fin de investigar la relación entre la resistencia a la insulina y el metabolismo de la glucosa y de los lípidos y lipoproteínas en el yeyuno en un modelo humano de obesidad.

2.1.1 Hipótesis

- En paciente OM con alta resistencia a la insulina puede existir una alteración de la lipogénesis *de novo* intestinal y de la producción de quilomicrones.
- El intestino puede participar en la regulación de la homeostasis de la glucosa a través de la gluconeogénesis, pudiendo estar ésta modificada por la presencia de una alta resistencia a la insulina.
- La metformina podría modificar los niveles de lípidos y de glucosa en el intestino al alterar la lipogénesis y la gluconeogénesis respectivamente.
- La glucosa, la insulina y la leptina pueden participar en la regulación de la homeostasis de la glucosa y lipídica a nivel intestinal.

2.1.2 Objetivos

- Evaluar la relación existente entre la resistencia a la insulina/DM2 y la lipogénesis *de novo* y la síntesis de lipoproteínas en el yeyuno de pacientes OM.
- Estudiar el efecto de la glucosa, la insulina y la leptina sobre la lipogénesis *de novo* y la síntesis de lipoproteínas en células epiteliales intestinales (IECs) aisladas de pacientes OM con baja resistencia a la insulina.
- Evaluar la relación existente entre resistencia a la insulina/DM2 y la gluconeogénesis en el yeyuno de pacientes OM.
- Estudiar el efecto de la glucosa, la insulina y la leptina sobre la gluconeogénesis en IECs aisladas de pacientes OM con baja resistencia a la insulina.
- Evaluar la relación existente entre la resistencia a la insulina/DM2 y la vía de señalización de la insulina en el yeyuno de pacientes OM.
- Estudiar el efecto de la glucosa, la insulina y la leptina sobre la vía de señalización de la insulina en IECs aisladas de pacientes OM con baja resistencia a la insulina.
- Evaluar el efecto de la metformina sobre la restitución de la homeostasis de la glucosa y lipídica en el yeyuno de pacientes OM.

3. Material y Métodos

3.1 Diseño y sujetos del estudio

3.1.1 Diseño del estudio

El presente trabajo está realizado en un grupo de pacientes con obesidad mórbida que fueron sometidos a una intervención de cirugía bariátrica por la técnica de RYGB. Consta de un estudio transversal para evaluar los niveles de expresión de ARNm genes implicados en la producción endógena de glucosa y en el metabolismo lipídico del yeyuno, su asociación con la resistencia a la insulina y DM2, así como de un estudio *in vitro* realizado en IECs donde se evalúa la regulación de los niveles de expresión de genes implicados en la producción endógena de glucosa y del metabolismo lipídico por la glucosa, la insulina y la leptina.

3.1.2 Sujetos del estudio

Se consideraron OM a aquellos individuos con un $IMC \geq 40 \text{ kg/m}^2$ según la clasificación propuesta por la OMS (Tabla 1).

El estudio se llevó a cabo en 45 OM que fueron sometidos a una intervención de cirugía bariátrica por la técnica de RYGB.

Fueron excluidos del estudio aquellos individuos con enfermedad cardiovascular, inflamación aguda o enfermedad infecciosa o aquellos que estaban recibiendo tratamiento que podía alterar el perfil lipídico. También fueron excluidos los OM con DM2 que estaban recibiendo tratamiento con insulina u otro antidiabético oral.

Todos los pacientes siguieron una dieta similar baja en calorías durante dos semanas antes de someterse a la cirugía, independientemente de su estado de obesidad y resistencia a la insulina (630 Kcal/día, Optisource, Novartis Consumer Health S.A.).

Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado y el estudio fue aprobado por el comité de ética del Hospital Regional Universitario de Málaga.

Los OM que formaron parte del estudio se clasificaron en tres grupos en función de su resistencia a la insulina medida a través del modelo de evaluación homeostática para determinar la resistencia a insulina (HOMA-IR, del inglés “*homeostasis model assesment of insulin resistance*”), tomando como punto de corte el percentil 50 de la distribución de frecuencias del HOMA-IR de aquellos OM sin tratamiento con metformina, y en función de la presencia de DM2 en tratamiento con metformina:

- OM con un índice HOMA-IR bajo ($\text{HOMA-IR} \leq 4.7$) (OM-baja IR)
- OM con un índice HOMA-IR alto ($\text{HOMA-IR} > 4.7$) (OM-alta IR)
- OM con DM2 que estaban recibiendo tratamiento con metformina (OM-DM2-met).

3.1.3 Variables de estudio

3.1.3.1 Variables antropométricas

A todos los individuos del estudio se les midieron una serie de variables antropométricas las cuales se encuentran recogidas en la siguiente tabla (Tabla 4):

Tabla 4: Datos clínicos y antropométricos medidos en los obesos mórbidos

Variable	Unidades
Edad	Años
Peso	Kg
Talla	m
Índice de masa corporal	Kg/m^2
Cintura	cm
Cadera	cm

3.1.3.2 Variables bioquímicas

La medida de los parámetros bioquímicos en el suero se realizó por duplicado en todas las muestras. Las muestras de sangre se tomaron antes de comenzar con la dieta baja en calorías a la que son sometidos los pacientes antes de la cirugía y después de 10-12 horas de ayuno. El suero y plasma fueron separados y congelados inmediatamente a -80°C. Una alícuota de plasma sin congelar se usó para el aislamiento de lipoproteínas.

La glucosa, el colesterol, HDL-c, triglicéridos (Randox Laboratories Ltd, Antrium, Reino Unido) y ácidos grasos libres (Wako Chemicals USA, Inc, Richmond, Virginia, EE.UU.) se midieron por métodos enzimáticos estándar.

El LDL-c se calculó por la fórmula de Friedewald (Friedewald y cols., 1972):

$$\text{LDL-c} = \text{colesterol total} - \text{HDL-c} - (\text{triglicéridos} / 5).$$

La insulina fue analizada por radioinmunoensayo (BioSource International, Camarillo, California, EE.UU.) con una reacción cruzada de proinsulina del 0.3%. El coeficiente de variación inter-ensayo e intra-ensayo fue del 1.9% y 6.3% respectivamente.

La apo B-48 fue analizada por inmunoensayo enzimático (ELISA) (Shibayagi Co. Ltd., Shibukawa, Japón). La reacción cruzada con la apo B-100 humana es menor que el límite de detección inferior. El coeficiente de variación intra-ensayo e inter-ensayo fue de 3.5% y 5.7% respectivamente. La sensibilidad de la técnica fue de 2.5 ng/ml.

La apo A-IV fue analizada por ELISA (Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts, EE.UU.). El coeficiente de variación intra-ensayo e inter-ensayo fue de 4.6% y 12.2% respectivamente. La sensibilidad de la técnica fue de 0.078 µg/ml.

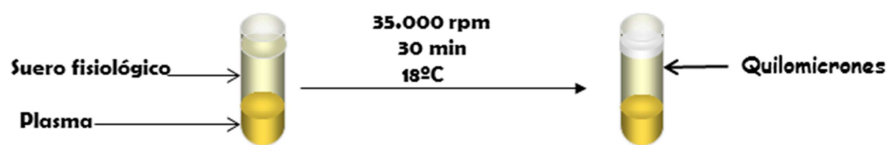
El índice HOMA-IR fue calculado con la siguiente fórmula (Matthews y cols., 1985):

$$\text{HOMA-IR} = \text{insulina en ayunas } (\mu\text{IU/ml}) \times \text{glucosa en ayunas } (\text{mmol/l}) / 22.5.$$

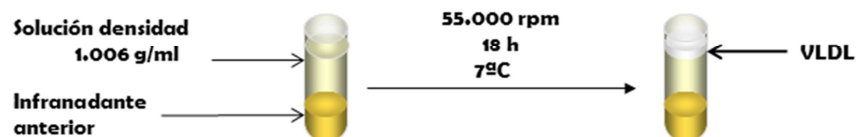
3.1.3.3 Separación de lipoproteínas plasmáticas

Las lipoproteínas fueron separadas en el plasma por ultracentrifugación (Cardona y cols., 2003):

- A 1.5 ml de plasma se le añadió sin mezclar, 1 ml de suero fisiológico salino. La fracción correspondiente a los quilomicrones fue separada del plasma por flotación mediante centrifugación a 35000 rpm en un rotor de 45° (Beckman TLA 100.3) durante 30 minutos a 18°C sin freno.

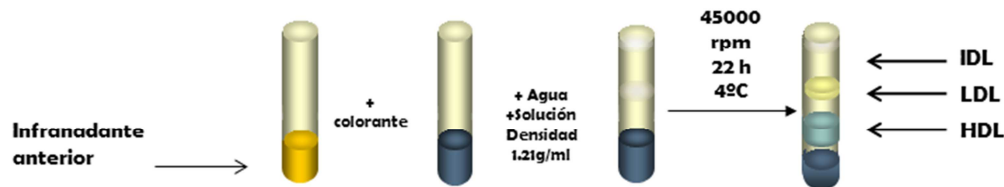


- Del infranadante de la centrifugación anterior, tomamos 1 ml y le añadimos sin mezclar 1ml de solución densidad 1.006 g/ml. La fracción correspondiente a VLDL fue separada del plasma por flotación mediante centrifugación a 55000 rpm en un rotor de 45° (Beckman TLA 100.3) durante 18 horas a 7°C sin freno.



- Después de la separación de las VLDL, al infranadante se le añadió 0.385 g de bromuro de potasio y 0.025 g de sacarosa. Se disolvió sin formar espuma y se le añadió 25 µl de una solución saturada de azul de Coomassie (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EE.UU.) para la visualización de las bandas correspondiente a cada uno de los tipos de lipoproteínas restantes.
- Posteriormente, y sin mezclar, se le añadió 1 ml de solución de densidad 1.210 g/ml y 2 ml de agua destilada.

- El resto de lipoproteínas IDL, LDL y HDL, se separaron mediante centrifugación en gradiente de densidad a 45000 rpm en un rotor basculante (Beckman SW.60Ti), durante 22h a 7°C, sin freno.



- La concentración de colesterol y triglicéridos se midió en cada una de las fracciones por métodos enzimáticos estándar.

3.1.3.4 Preparación de soluciones para la separación de lipoproteínas

Todos los reactivos empleados provenían de Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EE.UU.).

- Solución de densidad 1.006 g/ml: 11.6 g de ClNa, 0.5 g de Azida Na, EDTA Na 0.41 g, gentamicina sulfato 0.08 g, cloranfenicol 5 g. Completar hasta un litro con agua destilada y ajustar el pH a 7.4.
- Solución de densidad 1.21 g/ml: Tomar 100 ml de la solución de densidad 1.006 g/ml y añadir 32.5 g de KBr.
- Solución de densidad 1.063 g/ml: Tomar 100 ml de solución de densidad 1.006 g/ml y añadir 8.5 g de KBr.

3.1.4 Obtención de las muestras de yeyuno

Las muestras de yeyuno fueron obtenidas durante la cirugía bariátrica por la técnica de RYGB, a 40 cm del ligamento de Treitz. Las muestras fueron lavadas en solución salina de Hank (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EE.UU.), fraccionadas y preparadas para los ensayos histoquímicos e inmunohistoquímicos, la cuantificación del

contenido de triglicéridos, extracción de ARNm y aislamiento de IECs para posteriores incubaciones.

3.1.4.1 Estudio histoquímico

- Para el estudio histoquímico las muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido.
- Una vez congeladas, las muestras fueron incluidas en el compuesto OCT (optimum cutting temperature compound) (Tissue-Tek® O.C.T. Compound, Sakura® Finetek, Inc. Torrance, California, EE.UU.).
- Se obtuvieron secciones transversales en serie de 4 μm de grosor usando el criostato a -20°C (Micron HM 550, Thermo Fisher Scientific Inc., Boston, Massachusetts, EE.UU.).
- Los cortes se secaron a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- Posteriormente se fijaron en formaldehído al 10% durante 10 minutos.
- Se secaron nuevamente a temperatura ambiente durante 30-60 minutos.
- Los cortes se tiñeron en una solución de rojo oleoso (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EE.UU.) al 5% en isopropanol (Merck, Darmstadt, Alemania) al 60% durante 20 minutos en una cubeta de tinción Coplin tapada.
- Se realizaron varios lavados con agua destilada hasta que el agua salga clara.
- Luego se realizó una tinción de contraste con hematoxilina de Harris durante 1-2 minutos.
- Se realizaron varios lavados con agua destilada hasta que el agua salió clara.
- Finalmente las tinciones fueron montadas con el medio acuoso Aquatex (Merck, Darmstadt, Alemania).

3.1.4.2 Estudio inmunohistoquímico

- Para el estudio inmunohistoquímico las muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido.
- Una vez congeladas, las muestras fueron incluidas en OCT.
- Se obtuvieron secciones transversales en serie de 4 μm de grosor usando el criostato a -20°C .
- Para el estudio inmunohistoquímico, los cortes se fijaron en formaldehído (Merck, Darmstadt, Alemania) al 10% durante 30 minutos.
- Se realizaron tres lavados en tampón fosfato salino 0.1M (Biowest LLC, Kansas City, Missouri, EE.UU.) de cinco minutos de duración cada uno.
- Posteriormente se incubó durante 30 minutos en oscuridad con H_2O_2 /metanol (Merck, Darmstadt, Alemania) al 3% en tampón fosfato salino para inactivar la peroxidasa endógena.
- Tras esta incubación se realizaron tres lavados en tampón fosfato salino 0.1M de cinco minutos de duración cada uno.
- Los cortes se expusieron al anticuerpo primario durante toda la noche (ab7616, goat anti-human apolipoprotein B) (dilución 1:5000) (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, California, EE.UU.).
- Tras la incubación, se realizaron tres lavados en tampón fosfato salino 0.1M de cinco minutos de duración cada uno.
- Los cortes fueron incubados con el anticuerpo secundario durante una hora (biotin-conjugated rabbit anti-goat immunoglobulin) (dilución 1:1000) (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca).
- Tras la incubación, se realizaron tres lavados en tampón fosfato salino 0.1M de cinco minutos de duración cada uno.

- La señal del anticuerpo-antígeno se amplificó con extravidina en tampón fosfato salino 0.1M (Sigma, St Louis, Missouri, EE.UU.) incubando durante 30 minutos a 4°C.
- Tras la incubación, se realizaron tres lavados en tampón fosfato salino 0.1M de cinco minutos de duración cada uno.
- Para la visualización de la señal, se empleó como sustrato 3,3'-diaminobencidina (Sigma, St Louis, Missouri, EE.UU.) incubando los cortes durante 5-10 minutos; tras este tiempo, se lavó durante 5 minutos con agua para parar la reacción.
- Posteriormente los cortes se incluyeron en hematoxilina durante unos segundos para teñir los núcleos.
- Se lavó con agua abundantemente antes de proceder a su montaje en Aquatex.
- La visualización se realizó con el microscopio Olympus BX41 (Olympus, Reino Unido) y las imágenes se tomaron con una cámara digital Olympus DP70 (Olympus, Reino Unido).
- El análisis de las imágenes y la cuantificación se realizó con el programa ImageJ 1.32j.

3.1.4.3 Cuantificación del contenido de triglicéridos del intestino delgado

Se realizó siguiendo el protocolo de Folch J y cols. (Folch y cols., 1957) modificado:

- Tomamos 0.1 g de yeyuno y homogeneizamos con una mezcla cloroformo:metanol 2:1 (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Agitamos en un agitador mecánico durante 2-3 minutos durante fracciones de 30 segundos.
- Posteriormente centrifugamos a 2500 rpm durante 10 minutos.

- Se extrajo la fase clorofórmica (fase inferior) y se puso en un tubo aparte.
- Realizamos una segunda extracción sobre la fase acuosa restante añadiendo de nuevo cloroformo:metanol 2:1.
- Agitamos en un agitador mecánico durante 2-3 minutos durante fracciones de 30 segundos.
- Posteriormente se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos.
- Se extrajo la fase clorofórmica y se mezcló con la primera fase clorofórmica que obtuvimos.
- Llevamos a sequedad ambas fases clorofórmicas en corriente de nitrógeno.
- Los extractos fueron resuspendidos en isopropanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EE.UU.).
- Tomamos una alícuota de 25 μ l y se determinó el contenido de triglicéridos mediante un kit comercial (Randox Laboratories Ltd., Antrium, Reino Unido).
- Los resultados se expresan como mmol de triglicéridos/g de tejido de yeyuno.

3.1.5 Aislamiento e incubación de IECs

El aislamiento de las IECs se realizó siguiendo el protocolo descrito por Cartwright IJ y cols. (Cartwright y Higgins, 1999). Todos los reactivos empleados provenían de Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EE.UU.).

- Las biopsias de yeyuno procedentes de seis pacientes con un índice HOMA-IR bajo fueron tomadas durante la cirugía bariátrica y lavadas en una solución compuesta por 115mM NaCl, 5.4mM KCl, 0.96mM NaH₂PO₄, 26.19mM NaHCO₃, 5.4mM glucosa y 1% penicilina/estreptomicina; pH ajustado a 7.4.
- Posteriormente las biopsias fueron incubadas a 37°C en agitación durante 15 minutos en una solución compuesta por 67.5mM NaCl, 1.5mM KCl, 0.96mM

NaH₂PO₄, 26.19mM NaHCO₃, 27 mM C₆H₅Na₃O₇·2H₂O, 5.4mM glucosa y 1% penicilina/estreptomicina; pH ajustado a 7.4.

- Después de la incubación, la solución fue descartada y las biopsias fueron incubadas a 37°C en agitación durante 15 minutos en una solución compuesta por 67.5mM NaCl, 1.5mM KCl, 0.96mM NaH₂PO₄, 26.19mM NaHCO₃, 27mM C₆H₅Na₃O₇·2H₂O, 3mM ácido etildiaminotetraacético, 2mM ditiotreitól, 5.4mM glucosa y 1% penicilina/estreptomicina; pH ajustado a 7.4.
- Después de la incubación, las biopsias se retiraron y el sobrenadante se centrifugó a 400 g durante 2 minutos en una centrífuga de mesa.
- Tras la centrifugación el sobrenadante se descartó y el precipitado se resuspendió en medio Eagle modificado por Dulbecco libre de calcio (DMEM, del inglés “*Dulbecco’s modified Eagle’s medium*”).
- Posteriormente se procedió a realizar el conteo celular empleado una cámara de Neubauer para determinar el número total de células aisladas.
- Una fracción de las células obtenidas se empleó para realizar un análisis fenotípico a través de citometría de flujo y otra para determinar la viabilidad de las IECs aisladas.
- Posteriormente, se sembraron 200.000 células por pocillo en placas de 24 pocillos en medio DMEM suplementado con 1% de suero fetal bovino, 1% de L-glutamina, 1% de penicilina /estreptomicina a 37°C y 5% CO₂ durante 3 horas.
- Se llevaron a cabo distintas condiciones de cultivo: 5.5mM glucosa, 5.5mM glucosa+100nM insulina, 25mM glucosa, 25mM glucosa+100nM insulina, leptina 50 ng/ml y leptina 150 ng/ml.
- Transcurrido el periodo de incubación las suspensiones celulares fueron centrifugadas a 800 g durante 3 minutos, el sobrenadante se descartó y el precipitado se congeló a -80°C hasta una posterior extracción de ARN.

3.1.5.1 Análisis fenotípico de marcadores de superficie de IECs

Una muestra de las IECs aisladas según el apartado anterior se empleó para su análisis fenotípico. Para el estudio fenotípico de las IECs a través de citometría de flujo, se siguió el siguiente protocolo clásico de marcaje de células de superficie que se describe a continuación:

- Se incubaron un mínimo de 100.000 células durante 30 minutos en 100 μ l de PBS, a 4°C y oscuridad añadiendo 5 μ l de cada uno de los anticuerpos monoclonales siguientes:
 - IgG1 e IgG2a: los cuales se utilizan como controles isotípicos, es decir como controles de fluorescencia que permite estimar la cantidad de unión inespecífica, así como la unión mediada por la interacción con receptores Fc.
 - CD45 (clon HI30) marcador de la serie leucocitaria, presente en todos los leucocitos incluyendo, linfocitos, monocitos, granulocitos, eosinófilos y timocitos pero ausentes en eritrocitos circulantes, plaquetas, médula ósea o tejidos no hematopoyéticos.
 - Anti-Human A33-Alexa Fluor®488 (clon 402104) marcador antigénico de membrana que se expresa en el epitelio del intestino delgado y del colon.
- Tras las incubaciones, el anticuerpo sobrante se eliminó añadiendo 3 ml de PBS y centrifugando 300 xg durante 5 min.
- La lectura de fluorescencia se realizó en un citómetro de flujo FACS CANTO II (Becton-Dickinson Biosciences, San Jose, California, EE.UU.) dotado de dos láseres, un laser azul y otro rojo.
- Las células se adquirieron y analizaron empleando el programa FACS DIVA 6.0 (Becton-Dickinson Biosciences, San Jose, California, EE.UU.), atendiendo a los siguientes parámetros: tamaño (FSC), granularidad o complejidad celular (SSC),

e intensidad de fluorescencia para los dos fluorocromos empleados (Alexa Fluor 488 y APC).

- Brevemente, se estableció una primera ventana en función del tamaño y granularidad celular. A partir de aquí, se seleccionaron aquellas células que eran CD45-. Tras ello se seleccionaron aquellas que expresaban el antígeno A33 (A33+).
- Se analizó tanto el porcentaje de células que expresaban esta molécula de superficie, como la intensidad de fluorescencia mostrada (Shapiro, 2003).

3.1.5.2 Viabilidad de las IECs aisladas

Para determinar el número de células viables se realizó un test de exclusión con azul de tripán (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EE.UU.). Este método está basado en que las células viables no captan el azul de tripán mientras que las células muertas si lo hacen, por lo tanto se cuentan como muertas las células teñidas de azul y como vivas las refringentes.

También se utilizó el kit comercial de luminiscencia CellTiter-Glo® (Promega, Southampton, Reino Unido) que consiste en la adición de un único reactivo a las células en cultivo, que da lugar a la lisis de las células y la generación de una señal luminiscente que es proporcional a la cantidad de ATP liberado por las células viables. Se añade la misma cantidad de reactivo CellTiter-Glo® que de medio hay presente en el pocillo. Se incuba durante dos minutos en agitación a temperatura ambiente y se determina su luminiscencia en el luminómetro (Sinergy Mx, Bio Tek Instruments, Inc. Winooski, Vermont, EE.UU.).

3.1.6 Determinación de los niveles de expresión de los genes candidatos

3.1.6.1 Extracción de ARN de los tejidos y de las IECs aisladas e incubados

La extracción de ARN se realizó con el kit comercial de Qiagen Rneasy Mini Kit y Rnase-free DNase Set (Qiagen Science, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante:

- Antes de comenzar el protocolo añadimos 10 μ l de β -mercaptoetanol (BME) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EEUU) por cada ml de tampón RLT y preparamos el tampón RPE con etanol (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Todas las centrifugaciones se realizaron a temperatura ambiente en una centrífuga de mesa.
- La mucosa del tejido fue raspada suavemente. A este raspado se le añadió 350 μ l de tampón RLT con BME y se homogenizó bien con la ayuda de una pipeta.
- Centrifugamos el lisado durante 3 minutos a máxima velocidad. Pasamos el sobrenadante a un nuevo tubo y descartamos el precipitado.
- Añadimos 350 μ l de etanol al 70% y pipeteamos bien.
- Transferimos todo la muestra (700 μ l) a una columna del RNeasy kit y centrifugamos 15 segundos a 11000 rpm. Descartamos el filtrado.
- Añadimos 350 μ l de tampón RW1 a la columna y centrifugamos durante 15 segundos a 11000 rpm. Descartamos el filtrado.

Para la eliminación de los restos de ADN continuamos con el kit Rnase-free DNase Set (Qiagen Science, Hilden, Alemania):

- Preparamos una solución compuesta por 10 μ l de solución stock de DNase I y 70 μ l de tampón RDD para cada una de las muestras. Mezclamos suavemente por inversión.
- Añadimos los 80 μ l de la mezcla a la membrana de la columna e incubamos durante 15 minutos a 20-30°C.

- Añadimos 350 μ l de tampón RW1 a la columna y centrifugamos 15 segundos a 11000 rpm. Descartamos el filtrado.
- Añadimos 500 μ l de tampón RPE (con etanol) y centrifugamos durante 15 segundos a 11000 rpm. Descartamos el filtrado.
- Añadimos 500 μ l de tampón RPE (con etanol) y centrifugamos durante 2 minutos a 11000 rpm. Descartamos el filtrado.
- Realizamos una nueva centrifugación a máxima velocidad durante un minuto para eliminar cualquier posible resto de los tampones empleados.
- Colocamos la columna en un tubo de 1.5 ml y añadimos 40 μ l de agua a la membrana de la columna. Dejamos reposar la columna un par de minutos.
- Centrifugamos durante un minuto a 11000 rpm. Volvemos a cargar el eluido en la columna y repetimos la centrifugación.

3.1.6.2 Cuantificación del ARN

La concentración de ARN se midió en un espectrofotómetro NanoDrop ND-2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Boston, Massachusetts, EE.UU.). Además de la concentración nos da información sobre la pureza de la muestra. La relación de absorbancia 260/280 debe de estar cercano a 1.8-2, si el valor es menor, puede indicar la presencia de proteínas, fenoles u otros contaminantes que absorben fuertemente cerca de 280 nm. La relación de absorbancia 260/230 es una medición secundaria que también indica la pureza del ARN. Si el valor es más bajo esto puede indicar la presencia de contaminantes co-purificados que absorben a 230 nm, como solventes y sales.

3.1.6.3 Reversotranscripción

En este paso el ARN es convertido a ADNc con el fin de poder estudiar los niveles de expresión de los genes incluidos en el estudio.

Para ello se tomó el volumen correspondiente a 250 µg de ARN y se completó hasta 10 µl con agua libre de ARNasas (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EE.UU.). A esto se le añadió 4 µl de tampón M-MLV RT 5X (Promega Corporation, Madison, EE.UU.), 2.5 µl de dinucleótidos trifosfato (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, EE.UU.) provenientes de un stock 10mM, 0.5 µl de cebadores al azar de una concentración de 0.1 µg/ µl (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, EE.UU.) y 1 µl de agua libre de ARNasas.

Esta mezcla se introdujo en el termociclador (Eppendorf Instruments, Hamburgo, Alemania) durante 10 minutos a 65°C. Tras este ciclo, se añadió 1 µl de enzima reversotranscriptasa M-MLV a 100U/ µl (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, EE.UU.) y se sometió a un ciclo de una hora a 37°C.

Para cada reacción de reversotranscripción se hicieron dos tipos de blancos, uno de muestra y otro de enzima.

3.1.6.4 PCR a tiempo real

El estudio de los niveles de expresión de los genes seleccionados se realizó a través de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-PCR, del inglés “*real time-polymerase chain reaction*”) empleando un termociclador a tiempo real (ABI 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, California, EE.UU.)). Para estos ensayos se usó el sistema de detección por fluorescencia basado en agentes intercalantes (fluorocromos que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen a ADN de doble hélice), concretamente utilizamos el KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (Kapa biosystems, Boston, Massachusetts, EE.UU.) que emplea un colorante de referencia pasiva (ROX) para normalizar las variaciones entre los distintos pocillos.

Las mezclas empleadas para la RT-PCR se prepararon como se detalla en la Tabla 5.

Tabla 5: Relación de reactivos y volúmenes empleados para la mezcla de RT-PCR.

Reactivo	Volumen por muestra (µl)
Agua libre de ARNasas y ADNasas	6.8
Cebador sentido 10 mM	0.4
Cebador antisentido 10 mM	0.4
Kapa SYBR Fast	10
ROX	0.4
cADN	2

Todos los cebadores utilizados fueron diseñados con ayuda del software Primer3, disponible en Internet de forma gratuita (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi).

Para llevar a cabo las RT-PCR se empleó el termociclador ABI 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, California, EE.UU.) con el siguiente protocolo de temperaturas que se especifica en la Tabla 6.

La expresión de cada uno de los genes estudiados fue relativizada a la expresión del gen 18S utilizando el método del $\Delta\Delta Ct$ (Livak y Schmittgen, 2001).

Tabla 6: Protocolo empleado para la realización de RT-PCR

Paso	Temperatura	Duración
Activación de la enzima	95°C	20 segundos
Desnaturalización	95°C	3 segundos
Alineamiento	Específica para cada gen	30 segundos
Disociación	Gradiente de 60°C a 95°C	

Los genes que fueron objeto de estudio de expresión, los cebadores, el tamaño de amplificado, los tejidos estudiados y la temperatura de alineamiento de cada uno se detallan en la Tabla 7.

En base a la bibliografía disponible y a la función que llevan a cabo se seleccionaron para este estudio los genes que se describen en la tabla Tabla 8.

3.1.7 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se hicieron con el programa SPSS versión 11.5 para Windows (SPSS, Chicago, Illinois, EE.UU.).

Las comparaciones de los resultados entre los diferentes grupos se hicieron mediante el test de Mann-Whitney. Para el estudio de las diferencias entre las distintas condiciones de incubación de las IECs se utilizó un análisis de la varianza de una vía (ANOVA) de medidas repetidas. El coeficiente de correlación de Spearman se empleó para estimar las correlaciones lineales existentes entre las variables. Modelos de regresión lineal múltiple se usaron para determinar la asociación entre las distintas variables. Los valores se consideraron estadísticamente significativos para una $p \leq 0.05$.

Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar (DE) o media \pm error estándar de la media (EEM).

Tabla 7: Cebadores, tamaños de los amplificadores, número de acceso y temperatura de alineamiento de los genes estudiados.

Gen	Cebadores	Tamaño del amplificado (pb)	Número de acceso	Temperatura alineamiento (°C)
18S	Sentido: AGAGAATTTGCCCTCCGACT	150	NM_014473.2	60
	Antisentido: AACACTGGATTCCACCTTGG			
Apo A-IV	Sentido: CTGCAGAAGTCACTGGCAGA	200	NM_000482.3	59
	Antisentido: ACCTTGTCCTCAGGTCCTT			
MTP	Sentido: ACCTCAGGACTGCGAAGAAA	208	NM_000253	60
	Antisentido: TTGGGATGAGAAGCAAATCC			
DGAT2	Sentido: CATCCTGAACTGGTGTGTGG	168	NM_012079.4	60
	Antisentido: AAGACATTGGCCGCAATAAC			
ACL	Sentido: GAAGCTGACCTTGCTGAACC	237	NM_001096.2	60
	Antisentido: CTGCCTCCAATGATGAGGAT			
PDHB	Sentido: GACCAATGGACATGGAAACC	170	NM_000925.3	60
	Antisentido: AGCACCAGTGACACGAACAG			
ACC1	Sentido: ACCACCAATGCCAAAGTAGC	150	NM_133439.2	59
	Antisentido: CTGCAGGTTCTCAATGCAAA			
SREBP-1c	Sentido: TGCATTTTCTGACACGCTTC	171	NM_001005291	60
	Antisentido: CCAAGCTGTACAGGCTCTCC			
FAS	Sentido: CTTTAGTGGCAGGCTGAAGG	194	NM_004104.4	60
	Antisentido: GCAATTTCCCTGCATCTTA			
PEPCK	Sentido: GAGAGAACTCCAGGGTGCTG	156	NM_002591	60
	Antisentido: CCTTGGAGATGCTGAAAAGC			
G6Pasa	Sentido: CTGGAGAAAGCCAGAGGTG	203	NM_001270397.1	60
	Antisentido: AGGACGAGGGAGGCTACAAT			
FBPasa	Sentido: CACTCTGGTCTACGGAGGGA	225	NM_006717005.1	60
	Antisentido: TTCAGGAACTCGAGCACGTC			
GLS	Sentido: TTCAGTCCCGATTTGTGGGG	181	NM_014905.4	60
	Antisentido: GTCCACTCGGCTCTTTTCCA			
IRS1	Sentido: CAAGACCATCAGCTTCGTGA	163	NM_005544.2	60
	Antisentido: AGAGTCATCCACCTGCATCC			
p85 α	Sentido: ACCCCAGTTTTTGTGCTTG	229	NM_181524.1	58
	Antisentido: ACTGCCCAACAAAACCGTCC			
p110 β	Sentido: GGATGTTGCCTTATGGCTGT	179	NM_001256045.1	60
	Antisentido: CAGGTCATCCCCAGAGTTGT			

Tabla 8: Resumen de los genes seleccionados en el estudio.

Abreviatura	Nombre	Ruta metabólica	Función
DGAT2	Diacilglicerol-acil-transferasa 2	Síntesis de triglicéridos	Cataliza el paso final en la síntesis de triglicéridos, Esta reacción consiste en la adición de un acil-Coa a un DAG para obtener un triglicérido
Apo A-IV	Apolipoproteína A-IV	Síntesis de quilomicrones	Lipoproteína intestinal que forma parte de los quilomicrones. Facilita la incorporación de lípidos a los quilomicrones.
MTP	Proteína de transferencia microsomal	Síntesis de quilomicrones	Facilita la adición de lípidos a apo B-48 para formar los quilomicrones
ACL	ATP citrato liasa	Lipogénesis y colesterogénesis	Síntesis de acetil-CoA en el citosol
PDHB	Piruvato deshidrogenasa subunidad β	Lipogénesis y colesterogénesis	Síntesis de acetil-CoA en la mitocondria
ACC1	Acetil-CoA carboxilasa 1	Lipogénesis	Produce malonil-CoA a partir de acetil-CoA
SREBP-1c	Proteína de unión a elementos regulados por esteroides-1c	Homeostasis lipídica	Factor de transcripción que participa en la regulación de genes implicados en la síntesis de colesterol y ácidos grasos
FAS	Ácido graso sintetasa	Lipogénesis	Síntesis de ácidos grasos a partir de acetil-Coa y malonil-CoA
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa	Gluconeogénesis	Cataliza la conversión de oxalacetato en fosfoenolpiruvato
G6Pasa	Glucosa-6-fosfatasa	Gluconeogénesis	Cataliza la conversión de glucosa 6-fosfato a glucosa
FBPasa	Fructosa-1,6-bifosfatasa	Gluconeogénesis	Cataliza la conversión de fructosa 1,6-bifosfato a fructosa 6-fosfato
GLS	Glutaminasa	Gluconeogénesis	Cataliza la conversión de glutamina en glutamato
IRS1	Sustrato del receptor de insulina 1	Señalización de insulina	Su activación provoca la activación de PI3K
p85- α	Subunidad reguladora del complejo PI3K	Señalización de insulina	Estabiliza la subunidad catalítica p110. Su unión con IRS1 provoca la activación de p110
p110- β	Subunidad catalítica del complejo PI3K	Señalización de insulina	Participa en la formación de segundos mensajeros implicados en la regulación del metabolismo de la glucosa y lipídico

4. Resultados

4.1 Características generales

Las características generales de los individuos incluidos en el estudio se recogen en la Tabla 9.

El peso, el IMC y la circunferencia de la cintura fueron significativamente mayores en el grupo de OM-alta IR que en el grupo OM-baja IR. En el grupo OM-DM2-met tanto el peso como la circunferencia de la cadera fueron significativamente menores que en el grupo OM-alta IR. En el resto de variables estudiadas no se encontraron diferencias significativas. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre el grupo OM-baja IR y el grupo OM-DM2-met en ninguna de las variables estudiadas que se recogen en la Tabla 9.

Tabla 9: Características generales de los individuos OM incluidos en el estudio.

	OM-baja IR	OM-alta IR	OM-DM2-met
N (hombres/mujeres)	15 (6/9)	15 (5/10)	15 (5/10)
Edad (años)	40.3 ± 9.8	42.2 ± 5.1	44.2 ± 12.9
Peso (kg)	129.3 ± 16.8	159.3 ± 35.5*	126.7 ± 12.8 ¹
IMC (Kg/m ²)	46.8 ± 6.1	54.1 ± 8.0*	47.9 ± 6.3
Circunferencia de la cintura (cm)	131.6 ± 13.6	151.7 ± 17.2*	133.5 ± 10.6
Circunferencia de la cadera (cm)	146.4 ± 7.6	157.7 ± 13.1	139.2 ± 14.5 ¹
Ratio cintura/cadera	0.89 ± 0.05	0.96 ± 0.08	0.96 ± 0.05
Presión arterial sistólica (mm Hg)	111.8 ± 50.6	142.9 ± 25.2	141.0 ± 21.0
Presión arterial diastólica (mm Hg)	75.3 ± 10.8	77.7 ± 10.9	95.0 ± 19.0

Los datos están expresados como media ± DE.

*p<0.05 entre el grupo OM-baja IR y OM-alta IR.

¹p<0.05 entre OM-alta IR y OM- DM2-met.

4.2 Variables bioquímicas

Los valores de glucosa, insulina, HOMA-IR, leptina, apo A-IV, apo B-48, así como los niveles de triglicéridos de los quilomicrones y de VLDL y los niveles de triglicéridos totales fueron significativamente mayores en el grupo de OM-alta IR que en el grupo OM-baja IR, mientras que los niveles de adiponectina fueron significativamente menores en el grupo de OM-alta IR (Tabla 10).

Los valores de glucosa, insulina, HOMA-IR, apo A-IV, triglicéridos, así como los niveles de triglicéridos de quilomicrones y VLDL y los niveles de colesterol de VLDL, fueron significativamente mayores en el grupo de OM-DM2-met que en el grupo OM-baja IR (Tabla 10).

En el grupo OM-DM2-met los niveles de insulina fueron significativamente menores que en el grupo OM-alta IR, mientras que los valores de apo A-IV y el contenido de colesterol de VLDL fueron significativamente mayores en el grupo OM-DM2-met que en el grupo OM-alta IR (Tabla 10).

En el resto de variables estudiadas no se encontraron diferencias significativas entre los distintos grupos (Tabla 10).

4.3 Contenido lipídico del yeyuno

En el grupo OM-DM2-met, el contenido de triglicéridos del yeyuno fue significativamente menor que en el grupo OM-baja IR ($p=0.032$) (Tabla 11). Esta disminución del contenido de triglicéridos se corroboró mediante la tinción de rojo oleoso en los grupos OM-alta IR y OM-DM2-met (Figura 16A, B y C). Para determinar si estos lípidos estaban en forma de lipoproteínas se realizó una tinción inmunohistoquímica con el anticuerpo contra apo B; la señal obtenida en el grupo OM-alta IR y OM-DM2-met fue significativamente menor que la del grupo OM-baja IR ($p=0.028$ y $p=0.032$, respectivamente) (Figura 16D, E y F) (Tabla 11).

Tabla 10: Variables bioquímicas de los individuos OM incluidos en el estudio.

	OM-baja IR	OM-alta IR	OM-DM2-met
Glucosa (mg/dl)	88.3 ± 8.8	116.3 ± 50.9 [#]	136.5 ± 51.6 ^b
Insulina (μIU/ml)	13.1 ± 1.9	28.6 ± 9.1 [†]	18.5 ± 7.6 ^{a,1}
Ácidos grasos libres (mmol/l)	0.67 ± 0.29	0.55 ± 0.10	0.61 ± 0.30
HOMA-IR	2.83 ± 0.50	8.26 ± 3.09 [†]	6.21 ± 2.10 ^c
Adiponectina (μg/ml)	9.8 ± 4.0	6.0 ± 1.8 [*]	10.1 ± 4.6
Leptina (ng/ml)	49.2 ± 15.6	101.6 ± 49.1 [*]	57.9 ± 32.7
Apo A-IV (mg/dl)	16.2 ± 6.5	24.0 ± 5.6 [†]	27.8 ± 4.0 ^{c,1}
Apo B-48 (μg/ml)	3.8 ± 3.0	12.9 ± 17.0 [#]	10.6 ± 8.8
QM triglicéridos (mg/dl)	29.2 ± 16.7	69.7 ± 101.3 [*]	66.1 ± 30.7 ^c
VLDL triglicéridos (mg/dl)	30.0 ± 12.3	47.9 ± 25.2 [#]	51.2 ± 18.2 ^c
IDL triglicéridos (mg/dl)	9.2 ± 2.8	10.3 ± 7.5	9.6 ± 6.1
LDL triglicéridos (mg/dl)	23.5 ± 8.6	22.7 ± 5.9	24.9 ± 9.9
HDL triglicéridos (mg/dl)	14.0 ± 5.2	15.6 ± 7.4	13.8 ± 4.7
Triglicéridos totales (mg/dl)	106.5 ± 31.2	175.1 ± 82.4 [*]	166.5 ± 52.7 ^a
QM colesterol (mg/dl)	16.5 ± 8.5	21.6 ± 21.8	21.9 ± 9.4
VLDL colesterol (mg/dl)	13.6 ± 8.9	16.3 ± 9.4	25.1 ± 11.7 ^{b,1}
IDL colesterol (mg/dl)	7.1 ± 4.2	7.0 ± 4.3	6.4 ± 4.1
LDL colesterol (mg/dl)	130.81 ± 51.72	117.17 ± 33.30	106.40 ± 22.78
HDL colesterol (mg/dl)	47.85 ± 13.48	41.91 ± 11.17	44.47 ± 16.26
Colesterol total (mg/dl)	215.42 ± 62.29	209.32 ± 30.52	208.75 ± 20.58

Los datos están expresados como media ± DE.

Diferencias significativas entre los grupos OM-baja IR y OM-alta IR: *p<0.05, #p<0.01, †p<0.001.

Diferencias significativas entre los grupos OM-baja IR y OM-DM2-met: ^ap<0.05, ^bp<0.01, ^cp<0.001.

Diferencias significativas entre los grupos OM-alta IR y OM-DM2-met: ¹p<0.05, ²p<0.01, ³p<0.001.

Tabla 11: Contenido lipoproteico del yeyuno.

	OM-baja IR	OM-alta IR	OM-DM2-met
Contenido de triglicéridos del yeyuno (mg/g)	8.0±3.4	4.9±3.5	2.9±0.8 ^a
Apo B intestino	161.5±6.5	145.7±9.0*	141.4±8.7 ^a

Los datos están expresados como media ± DE. * $p < 0.05$ entre el grupo OM-baja IR y OM-alta IR. ^a $p < 0.05$ entre los grupos OM-baja IR y OM-DM2-met.

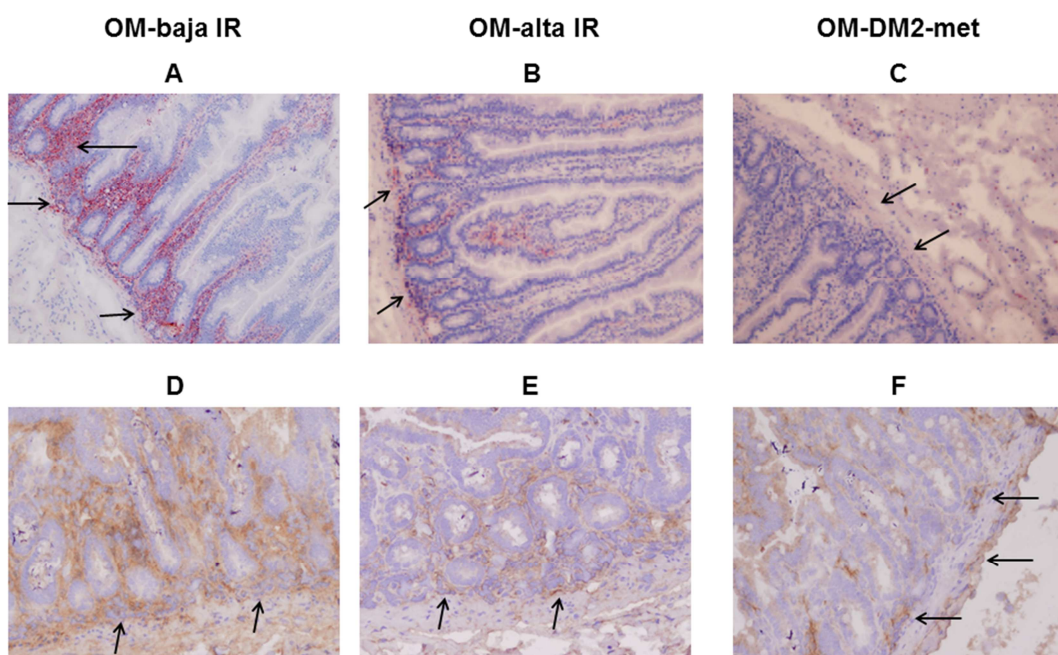


Figura 16: A, B y C: Tinción rojo oleoso del yeyuno procedente de los individuos OM (aumento x10). D, E y F: Intensidad de la señal de apo B del yeyuno procedente de los individuos OM (aumento x20).

4.4 Niveles de expresión relativa de los genes implicados en el metabolismo hidrocarbonado y lipídico

4.4.1 Lipogénesis *de novo* y síntesis de triglicéridos y quilomicrones

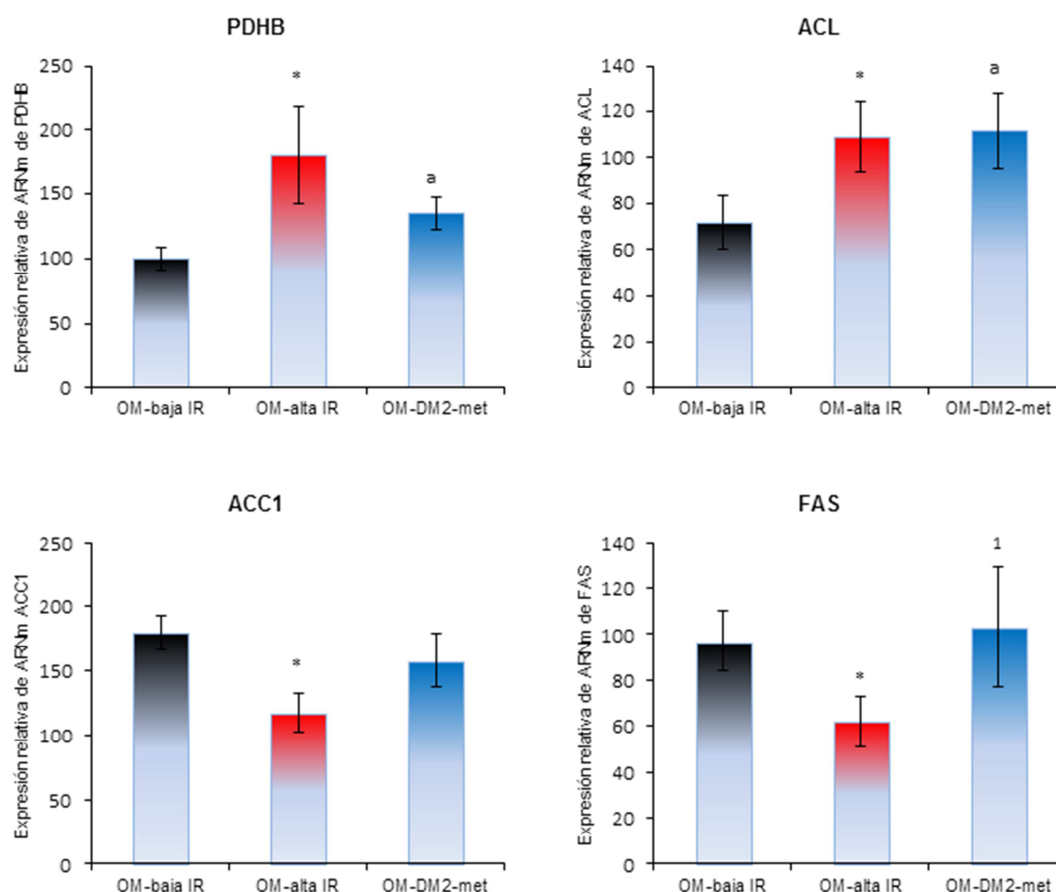


Figura 17: Niveles de expresión relativa de ARNm de los genes implicados en la síntesis de quilomicrones. Los niveles de expresión fueron relativizados a la expresión de ARNm del gen 18S. Los resultados están expresados como media \pm EEM. * $p < 0.05$ entre los grupos OM-alta IR y OM-baja IR. ^a $p < 0.05$ entre los grupos OM-baja IR y OM-DM2-met. ¹ $p < 0.05$ entre los grupos OM-alta IR y OM-DM2-met.

En el grupo MO-alta IR, los niveles de expresión relativa de ARNm de PDHB ($p=0.043$) y ACL ($p=0.045$) fueron significativamente mayores que en el grupo OM-baja IR (Figura 17A y Figura 17B), mientras que los niveles de expresión relativa de

ARNm de ACC1 ($p=0.011$) y FAS ($p=0.042$) fueron significativamente menores que en el grupo OM-baja IR (Figura 17C y Figura 17D).

Los niveles de expresión relativa de ARNm de PDHB ($p=0.042$) y ACL ($p=0.043$) fueron significativamente mayores en el grupo de OM-DM2-met que en el grupo OM-baja IR (Figura 17A y Figura 17B).

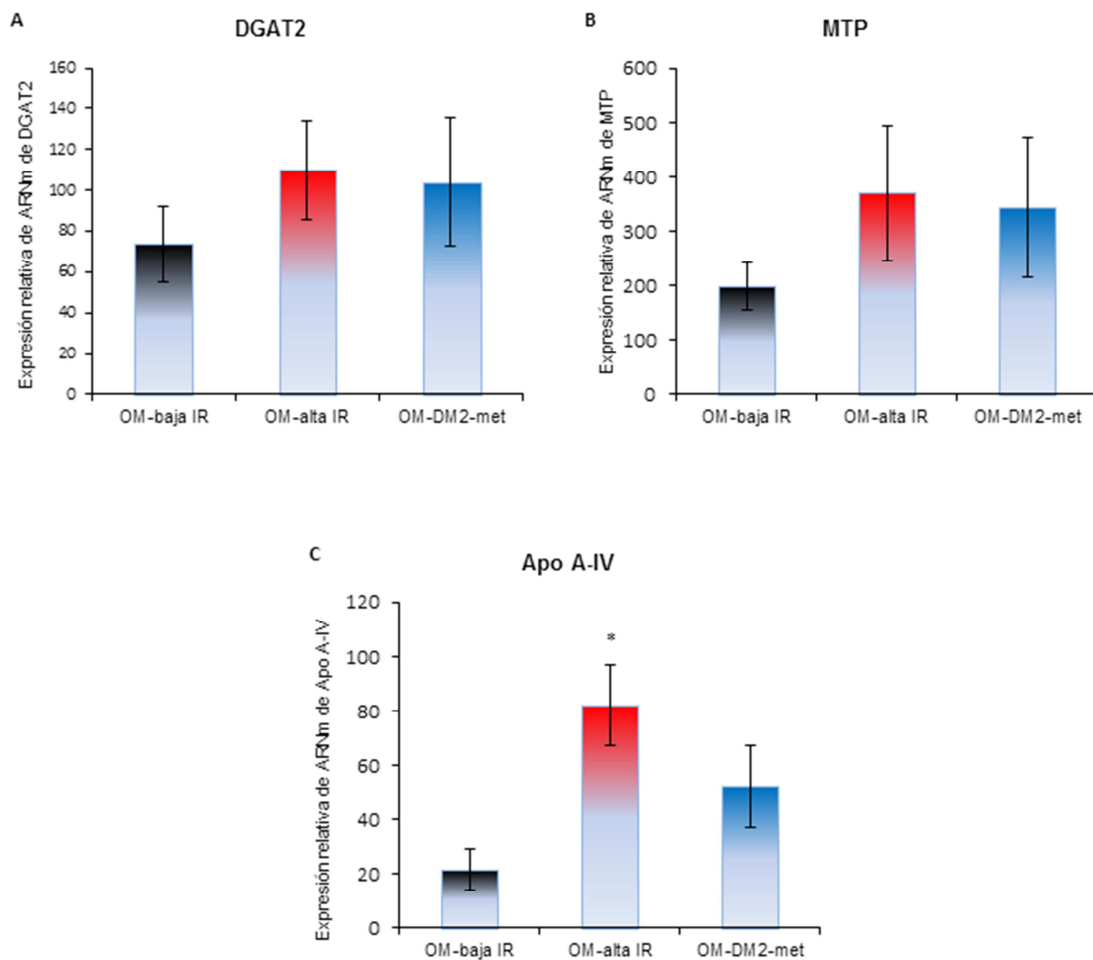


Figura 18: Niveles de expresión relativa de ARNm de los genes implicados en la síntesis de quilomicrones. Los niveles de expresión fueron relativizados a la expresión de ARNm del gen 18S. Los resultados están expresados como media \pm EEM. * $p < 0.05$ entre los grupos OM-alta IR y OM-baja IR.

Entre el grupo OM-DM2-met y OM-alta IR solo se encontraron diferencias en la expresión relativa de ARNm de FAS, que fue mayor en el grupo OM-DM2 ($p=0.049$) (Figura 17D).

Los niveles de expresión relativa de apo A-IV fueron significativamente mayores en el grupo de OM-alta IR en comparación con el grupo OM-baja IR ($p=0.016$) (Figura 18C). No se encontraron diferencias significativas con el grupo de OM-T2D-met ni tampoco en el resto de genes estudiados que están implicados en la síntesis de quilomicrones (Figura 18A y Figura 18B).

Los niveles de expresión relativa de ARNm de SREBP-1c fueron significativamente mayores en el grupo OM-alta IR que en el grupo OM-baja IR ($p=0.019$) (Figura 19). No se encontraron diferencias significativas entre el grupo OM-DM2-met y los otros grupos estudiados.

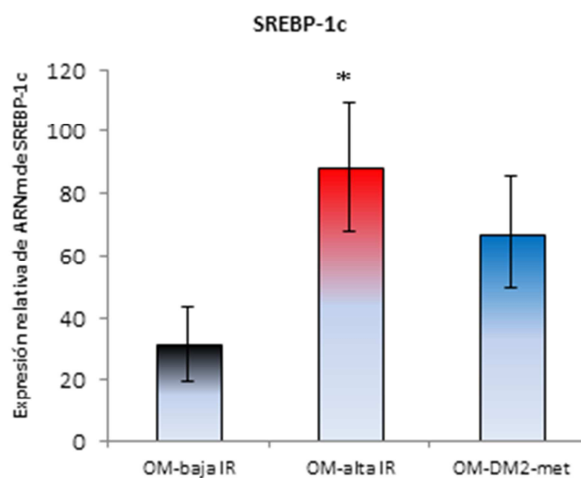


Figura 19: Niveles de expresión relativa de ARNm de SREBP-1c. Los niveles de expresión fueron relativizados a la expresión de ARNm del gen 18S. Los resultados están expresados como media \pm EEM. * $p<0.05$ entre el grupo OM-alta IR y OM-baja IR.

4.4.1.1 Asociaciones con otras variables estudiadas

Con respecto al contenido de triglicéridos de los quilomicrones y a las variables contenido de triglicéridos e intensidad de la señal de apo B en el yeyuno, se encontraron diversas asociaciones con algunas de las variables bioquímicas y con los niveles de expresión relativa de los genes implicados en la síntesis de quilomicrones (Tabla 12).

Tabla 12: Coeficientes de correlación significativos (p) entre las variables triglicéridos de los quilomicrones, contenido de triglicéridos del yeyuno e intensidad de la señal de apo B en el yeyuno con variables bioquímicas y expresión relativa de genes implicados en la síntesis de quilomicrones.

	QM triglicéridos	Triglicéridos del yeyuno	Intensidad de apo B en el yeyuno
Glucosa	0.875 (0.001)	-0.786 (0.001)	-0.675 (0.006)
Insulina	0.521 (0.046)	-0.632 (0.011)	-0.625 (0.013)
QM colesterol	0.670 (0.009)	-0.596 (0.025)	-0.771 (0.001)
Triglicéridos	0.836 (<0.001)	-0.692 (0.003)	-0.661 (0.005)
QM triglicéridos		-0.791 (<0.001)	-0.724 (0.002)
Apo B-48	0.774 (<0.001)	-0.768 (0.001)	-0.674 (0.004)
HOMA-IR	0.700 (0.003)	-0.774 (0.001)	-0.747 (0.001)
Triglicéridos del yeyuno	-0.791 (<0.001)		0.776 (<0.001)
ARNm DGAT2	-0.098 (0.648)	-0.327 (0.119)	-0.321 (0.126)
ARNm apo A-IV	-0.171 (0.541)	-0.587 (0.027)	-0.275 (0.342)
ARNm MTP	-0.564 (0.028)	0.116 (0.692)	0.451 (0.106)

En la Tabla 13 se muestran las diversas correlaciones significativas encontradas entre las variables antropométricas y bioquímicas estudiadas con los niveles de

expresión relativa de los genes implicados en la lipogénesis *de novo* y en la síntesis de quilomicrones. No se encontraron correlaciones significativas con el resto de variables bioquímicas y antropométricas estudiadas.

Tabla 13: Coeficientes de correlación significativos (p) encontrados entre las variables bioquímicas y los niveles de expresión relativa de los genes implicados en el metabolismo lipídico.

	Cintura	IMC	Glucosa	Insulina	HOMA-IR	Leptina
PDHB	0.306 (0.249)	0.238 (0.287)	0.384 (0.048)	0.342 (0.120)	0.495 (0.019)	0.318 (0.340)
ACL	0.248 (0.415)	0.512 (0.025)	0.633 (0.004)	0.161 (0.509)	0.605 (0.006)	0.127 (0.709)
ACC1	-0.444 (0.050)	-0.275 (0.156)	-0.143 (0.467)	-0.237 (0.226)	-0.302 (0.118)	-0.089 (0.752)
DGAT2	0.310 (0.197)	0.354 (0.070)	0.327 (0.049)	0.569 (0.001)	0.411 (0.033)	-0.293 (0.289)
MTP	0.201 (0.409)	0.212 (0.287)	-0.171 (0.395)	0.187 (0.351)	0.065 (0.746)	-0.561 (0.030)
Apo A-IV	0.419 (0.046)	0.326 (0.097)	0.487 (0.010)	0.445 (0.020)	0.530 (0.004)	0.204 (0.467)
SREBP-1c	0.233 (0.310)	0.212 (0.270)	0.326 (0.049)	0.569 (0.001)	0.540 (0.002)	0.100 (0.713)

Entre los niveles de expresión relativa de ARNm de los genes estudiados implicados en la lipogénesis *de novo* y quilomicrones se encontraron varias asociaciones significativas que se detallan en la Tabla 14.

No se encontraron correlaciones significativas entre los niveles de expresión relativa de ARNm de MTP y los niveles de expresión relativa de ARNm del resto de genes estudiados.

Tabla 14: Coeficientes de correlación significativos (p) encontrados entre los niveles de expresión relativa de ARNm de los genes implicados en la lipogénesis *de novo* y quilomicrones.

	ACL	ACC1	FAS	DGAT2	Apo A-IV	SREBP-1c
PDHB	0.570 (0.011)	-0.407 (0.050)	0.293 (0.211)	0.468 (0.038)	0.388 (0.091)	0.217 (0.331)
ACL		-0.046 (0.853)	0.029 (0.906)	0.319 (0.213)	0.445 (0.046)	0.212 (0.383)
ACC1			0.482 (0.013)	0.133 (0.517)	0.090 (0.662)	0.104 (0.598)
FAS				0.495 (0.012)	0.416 (0.043)	0.363 (0.049)
DGAT2					0.599 (0.002)	0.684 (0.001)
Apo A-IV						0.665 (<0.001)

Para evaluar la fuerza de estas asociaciones como posibles predictores de los niveles de expresión relativa de los genes estudiados que participan en el metabolismo lipídico, se realizaron diversos modelos de regresión lineal múltiple para cada uno de estos genes. Cada uno de los modelos fue ajustado por las siguientes variables independientes: glucosa, insulina, ácidos grasos libres, peso, circunferencia de la cintura, leptina y niveles de expresión relativa de ARNm de SREBP-1c.

Las variables que mejor explicaron los niveles de expresión relativa de ARNm de los distintos genes fueron principalmente la glucosa, la insulina y los niveles de ARNm de SREBP1-c (Tabla 15).

Tabla 15: Modelos de regresión lineal múltiple para los niveles de expresión relativa de ARNm de cada uno de los genes estudiados en relación al metabolismo lipídico.

Variable dependiente	R ²	Variables independientes significativas
PDHB	0.545	➤ Insulina ($\beta=0.370$, $p=0.037$)
ACL	0.604	➤ Glucosa ($\beta=1.366$, $p=0.050$) ➤ Ácidos grasos libres ($\beta=0.906$, $p=0.048$)
ACC1	0.326	➤ Insulina ($\beta=-0.692$, $p=0.039$) ➤ Circunferencia de la cintura ($\beta=-0.979$, $p=0.048$) ➤ Niveles de expresión relativa de ARNm de SREBP-1c ($\beta=0.499$, $p=0.036$)
FAS	0.696	➤ Insulina ($\beta=-0.707$, $p=0.046$)
DGAT2	0.267	➤ Niveles de expresión relativa de ARNm de SREBP-1c ($\beta=0.488$, $p=0.048$)
MTP	0.129	➤ Insulina ($\beta=-0.746$, $p=0.047$) ➤ Niveles de expresión relativa de ARNm de SREBP-1c ($\beta=-0.532$, $p=0.042$)
Apo A-IV	0.543	➤ Glucosa ($\beta=0.567$, $p=0.004$) ➤ Insulina ($\beta=0.380$, $p=0.048$)
SREBP-1c	0.106	➤ Insulina ($\beta=0.696$, $p=0.031$)

Variables independientes: glucosa, insulina, ácidos grasos libres, peso, circunferencia de la cintura, leptina y niveles de expresión relativa de ARNm de SREBP-1c.

4.4.2 Gluconeogénesis intestinal

Los niveles de expresión relativa de ARNm de GLS ($p=0.034$), PEPCK ($p=0.027$) y G6Pasa ($p=0.024$) fueron significativamente mayores en el grupo OM-alta IR que en el grupo OM-baja IR (Figura 20A, B y D).

En el grupo OM-DM2-met, los niveles de expresión relativa de GLS ($p=0.050$) y G6Pasa ($p=0.014$) (Figura 20A y D) fueron significativamente mayores que en el grupo

OM-baja IR, mientras que los niveles de expresión relativa de PEPCK fueron significativamente menores en el grupo OM-DM2-met ($p=0.041$) (Figura 20B).

En el grupo OM-DM2-met, los niveles de expresión relativa de PEPCK fueron significativamente menores que en el grupo OM-alta IR ($p=0.001$) (Figura 20B).

No se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión relativa de FBPasa entre los diferentes grupos.

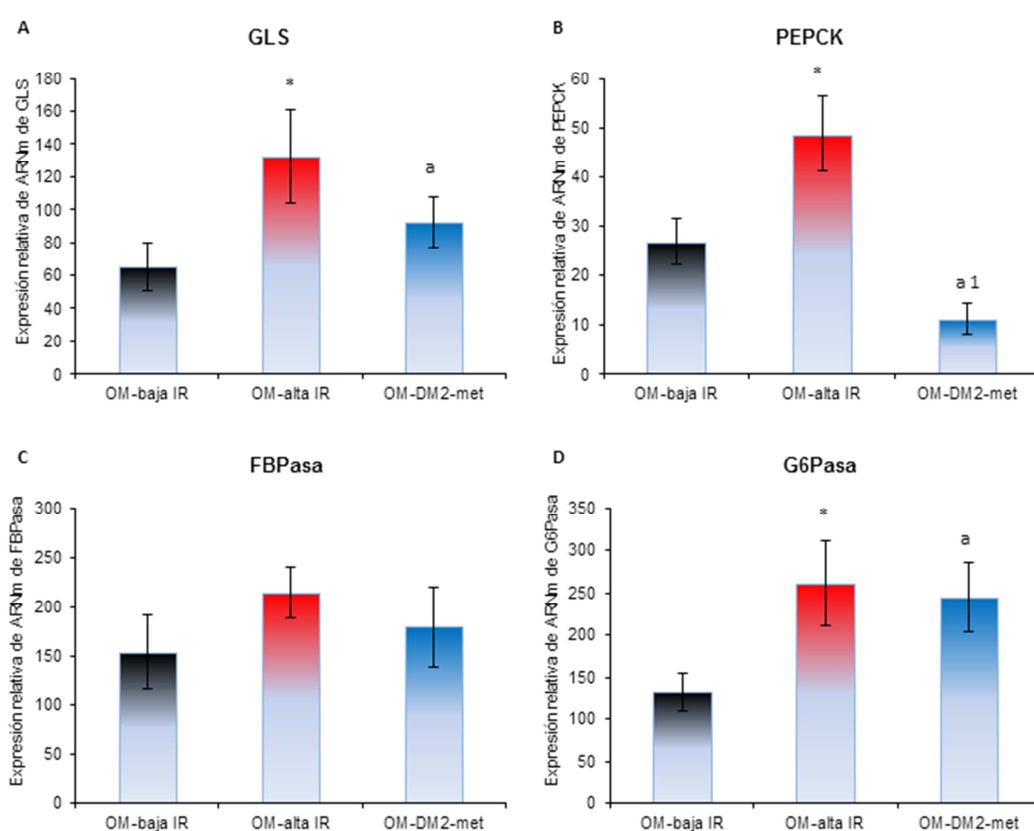


Figura 20: Niveles de expresión relativa de ARNm de los genes implicados en la gluconeogénesis. Los niveles de expresión fueron relativizados a la expresión de ARNm del gen 18S. Los resultados están expresados como media \pm EEM.

* $p < 0.05$ entre los grupos OM-alta IR y OM-baja IR.

^a $p < 0.05$ entre los grupos OM-baja IR y OM-DM2-met.

¹ $p < 0.05$ entre los grupos OM-alta IR y OM-DM2-met.

4.4.2.1 Asociaciones con otras variables estudiadas

Se encontraron diversas asociaciones significativas entre los niveles de expresión relativa de los genes implicados en gluconeogénesis intestinal y las variables antropométricas y bioquímicas estudiadas (Tabla 16). No se encontraron correlaciones significativas con los niveles de expresión relativa de ARNm de GLS ni con el resto de variables bioquímicas y antropométricas estudiadas.

Tabla 16: Coeficientes de correlación significativos (p) encontrados entre las variables antropométricas y bioquímicas y los niveles de expresión relativa de los genes implicados en la gluconeogénesis.

	PEPCK	FBPasa	G6Pasa
Peso	0.416 (0.025)	0.216 (0.221)	0.044 (0.798)
Cintura	0.446 (0.043)	0.289 (0.136)	0.067 (0.736)
IMC	0.398 (0.033)	0.182 (0.310)	0.087 (0.618)
PAS	0.318 (0.230)	-0.253 (0.255)	-0.431 (0.045)
Insulina	0.347 (0.048)	0.319 (0.050)	0.461(0.005)
HOMA-IR	0.249 (0.192)	0.140 (0.259)	0.424 (0.010)

PAS: presión arterial sistólica

Diversas asociaciones significativas se encontraron entre los niveles de expresión relativa de los genes implicados en la gluconeogénesis intestinal. Así, los niveles de expresión relativa de ARNm de GLS correlacionaron positivamente con los niveles de expresión relativa de ARNm de FBPasa ($r=0.683$, $p<0.001$) y G6Pasa ($r=0.703$, $p<0.001$), mientras que los niveles de expresión relativa de ARNm de FBPasa correlacionaron positivamente con los niveles de expresión relativa de ARNm de G6Pasa ($r=0.654$, $p<0.001$).

No se encontraron asociaciones significativas entre los niveles de expresión relativa de ARNm de PEPCK y los niveles de expresión relativa del resto de genes implicados en la gluconeogénesis intestinal.

También se encontraron correlaciones significativas entre los niveles de expresión relativa de ARNm de los genes implicados en la lipogénesis *de novo* y la síntesis de quilomicrones y los genes implicados en la gluconeogénesis que se recogen en la Tabla 17.

Tabla 17: Coeficientes de correlación significativos (p) encontrados entre los niveles de expresión relativa de los genes implicados en la lipogénesis *de novo* y la síntesis de quilomicrones con los niveles de expresión relativa de los genes implicados en la gluconeogénesis.

	GLS	PEPCK	FBPasa	G6Pasa
PDHB	0.482 (0.023)	0.030 (0.895)	0.356 (0.135)	0.619 (0.003)
ACL	0.454 (0.051)	-0.153 (0.533)	0.356 (0.176)	0.598 (0.009)
DGAT2	0.305 (0.122)	0.397 (0.037)	0.380 (0.047)	0.430 (0.028)
MTP	0.400 (0.043)	-0.178 (0.375)	0.367 (0.078)	0.578 (0.002)
Apo A-IV	0.376 (0.048)	0.340 (0.083)	0.433 (0.039)	0.435 (0.030)
SREBP-1c	0.345 (0.072)	0.525 (0.003)	0.342 (0.095)	0.403 (0.037)

No se encontraron asociaciones significativas de los niveles de expresión de ARNm de ACC1 y FAS con el resto de genes estudiados.

Para evaluar la fuerza de estas asociaciones como posibles predictores de los niveles de expresión relativa de los genes estudiados que participan en la gluconeogénesis intestinal, se realizaron diversos modelos de regresión lineal múltiple para cada uno de estos genes. En la mayoría de los casos, los niveles de expresión relativa de ARNm estuvieron asociados a la insulina o a los niveles de expresión relativa de ARNm de SREBP-1c (Tabla 18).

Tabla 18: Modelos de regresión lineal múltiple para los genes implicados en la gluconeogénesis intestinal.

	Variable dependiente	R ²	Variables independientes significativas
Modelo 1	PEPCK	0.090	Insulina ($\beta=0.387$; $p=0.041$)
	G6Pasa	0.084	Insulina ($\beta=0.370$; $p=0.029$)
Modelo 2	GLS	0.745	SREBP-1c ($\beta=1.053$; $p=0.019$)
	G6Pasa	0.512	Insulina ($\beta=0.771$; $p=0.046$)

Modelo 1: Variables independientes: glucosa, insulina e IMC.

Modelo 2: Variables independientes: glucosa, insulina, IMC, leptina y SREBP-1c.

4.4.3 Señalización de la insulina

En el grupo OM-alta IR los niveles de expresión relativa de ARNm de IRS1 ($p=0.037$) y p110 β ($p=0.049$) (Figura 21A y C) fueron significativamente mayores que en el grupo OM-baja IR.

En el grupo OM-baja IR los niveles de expresión relativa de ARNm del ratio p85 α /p110 β fueron significativamente mayores que en el grupo OM-alto IR ($p<0.001$) y que en el grupo OM-DM2 ($p=0.010$) (Figura 21D).

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos OM-alta IR y OM-DM2-met en los niveles de expresión relativa de los genes estudiados.

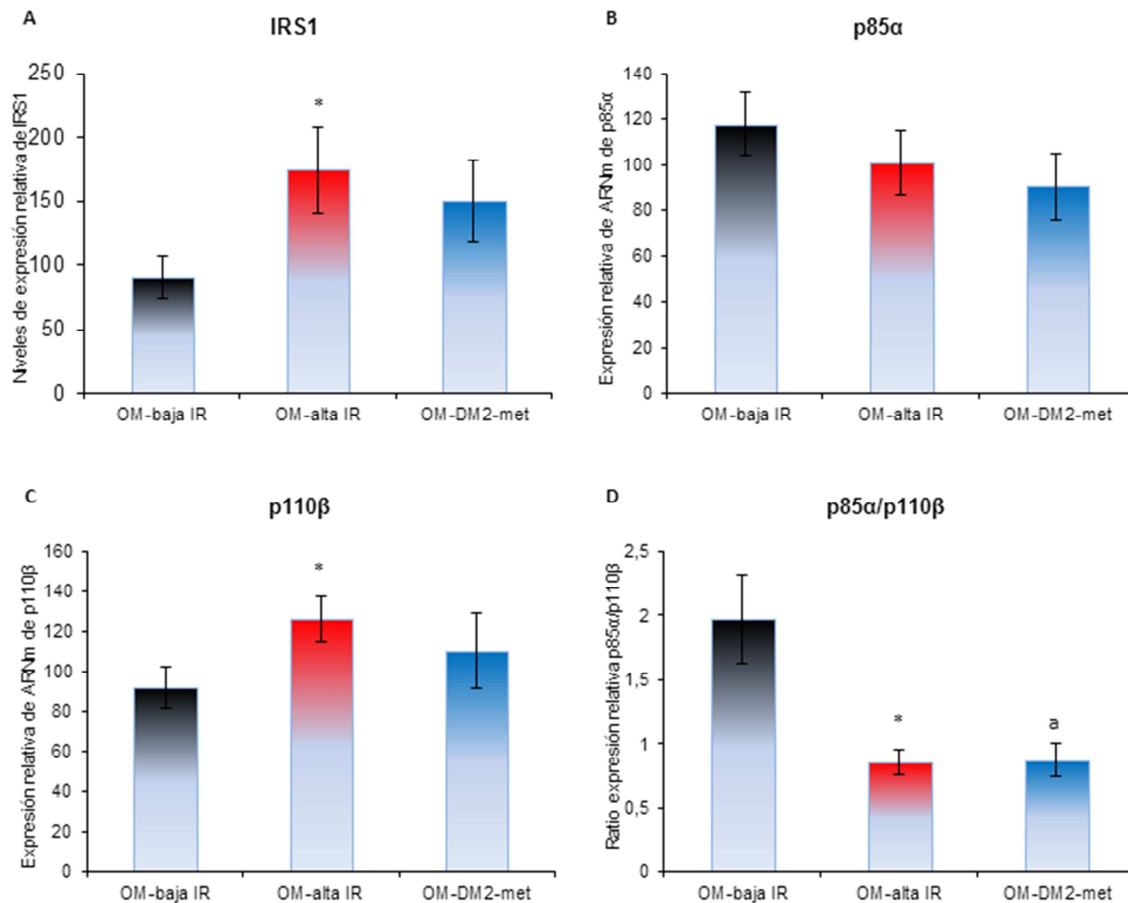


Figura 21: Niveles de expresión relativa de ARNm de los genes implicados en la señalización de la insulina. Los niveles de expresión fueron relativizados a la expresión de ARNm del gen 18S. Los resultados están expresados como media \pm EEM.

* $p < 0.05$ entre los grupos OM-alta IR y OM-baja IR.

^a $p < 0.05$ entre los grupos OM-baja IR y OM-DM2-met.

4.4.3.1 Asociaciones con otras variables estudiadas

Se encontraron diversas asociaciones significativas entre los niveles de expresión relativa de los genes estudiados y las variables antropométricas y bioquímicas (Tabla 19). No se encontraron correlaciones significativas con el resto de variables bioquímicas y antropométricas estudiadas.

Tabla 19: Coeficientes de correlación significativos (p) encontrados entre las variables antropométricas y bioquímicas y los niveles de expresión relativa de los genes implicados en la señalización de la insulina.

	IRS1	p85α	p110β	p85α/ p110β
Peso	-0.008 (0.964)	-0.214 (0.266)	0.299 (0.115)	-0.464 (0.001)
Cintura	0.187 (0.351)	-0.325 (0.151)	0.252 (0.270)	-0.687 (0.001)
Cadera	-0.022 (0.914)	-0.062 (0.788)	0.302 (0.184)	-0.507 (0.019)
Cintura/cadera	0.268 (0.185)	-0.503 (0.020)	-0.022 (0.924)	-0.417 (0.050)
IMC	0.039 (0.828)	-0.503 (0.020)	0.289 (0.128)	-0.476 (0.009)
Triglicéridos	0.229 (0.200)	-0.186 (0.354)	0.273 (0.168)	-0.411 (0.033)
Insulina	0.487 (0.003)	-0.113 (0.560)	0.370 (0.048)	-0.558 (0.002)
HOMA-IR	0.443 (0.008)	-0.230 (0.231)	0.379 (0.043)	-0.628 (<0.001)

Los niveles de expresión relativa de la relación p85 α /p110 β correlacionaron negativamente con los niveles de expresión relativa de ARNm de IRS1 ($r=-0.385$, $p=0.049$) y p110 β ($r=-0.547$, $p=0.002$).

También se encontraron asociaciones significativas entre los niveles de expresión relativa de ARNm de los genes implicados en la cascada de señalización de la insulina y los implicados en la lipogénesis *de novo* y la gluconeogénesis que se detallan en la Tabla 20. Para el resto de genes estudiados no se encontraron correlaciones significativas.

Tabla 20: Coeficientes de correlación significativos (p) encontrados entre los niveles de expresión relativa de los genes implicados en la cascada de señalización de la insulina, la lipogénesis *de novo*, la síntesis de quilomicrones y la gluconeogénesis.

	IRS1	p110 β	p85 α /p110 β
DGAT2	0.452 (0.023)	0.331 (0.085)	-0.504 (0.006)
MTP	0.306 (0.146)	0.646 (<0.001)	-0.385 (0.047)
Apo A-IV	0.180 (0.400)	0.709 (<0.001)	-0.507 (0.007)
PDHB	0.195 (0.385)	0.459 (0.032)	-0.487 (0.021)
ACL	0.251 (0.300)	0.498 (0.030)	-0.544 (0.016)
SREBP-1c	0.522 (0.006)	0.375 (0.045)	-0.425 (0.022)
GLS	0.479 (0.004)	0.599 (0.001)	-0.420 (0.026)
FBPasa	0.628 (<0.001)	0.492 (0.013)	-0.414 (0.040)
G6Pasa	0.463 (0.006)	0.642 (<0.001)	-0.572 (0.002)

Tabla 21: Modelos de regresión lineal múltiple para los genes implicados en la cascada de señalización de la insulina.

	Variable dependiente	R ²	Variables independientes significativas
Modelo 1	p85 α	0.212	IMC (β =-0.406; p=0.046)
	p110 β	0.091	Insulina (β =0.376; p=0.047)
	p85 α / p110 β	0.208	Insulina (β =-0.448; p=0.013)
Modelo 2	IRS1	0.812	Insulina (β =0.574; p=0.042) Leptina (β =0.528; p=0.042)

Modelo 1: Variables independientes: glucosa, insulina e IMC.

Modelo 2: Variables independientes: glucosa, insulina, IMC, leptina y SREBP-1c.

Para evaluar la fuerza de estas asociaciones como posibles predictores de los niveles de expresión relativa de los genes estudiados que participan en la cascada de señalización de la insulina, se realizaron diversos modelos de regresión lineal múltiple para cada uno de estos genes. En la mayoría de los casos, los niveles de expresión relativa de ARNm estuvieron asociados a la insulina o a la leptina (Tabla 21).

4.5 Caracterización fenotípica y viabilidad de las IECs aisladas

4.5.1 Caracterización fenotípica de las IECs

El análisis de dichas características fenotípicas se llevó a cabo mediante citometría de flujo. Los resultados se analizaron a partir del porcentaje de células que presentaba cada marcador, y a partir de la intensidad media de fluorescencia, dato que describe la densidad con la que una molécula se expresa en la superficie de una célula.

Las IECs fueron identificadas como células A33+CD45- entre las células vivas obtenidas del yeyuno de los pacientes obesos mórbidos. La frecuencia media de las células A33+CD45- fue de $74.8 \pm 5.6\%$ del total de la fracción celular aislada, presentando una intensidad media de fluorescencia de $35.2 \pm 4.8\%$. Además, la frecuencia media de células CD45+ fue de $14.2 \pm 3.4\%$.

4.5.2 Viabilidad de las IECs aisladas

El recuento de células vivas íntegras después de las incubaciones es del 88.3%, medida realizada mediante el test de exclusión de azul tripán, y del $80.1 \pm 4.6\%$ medido por el kit CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay.

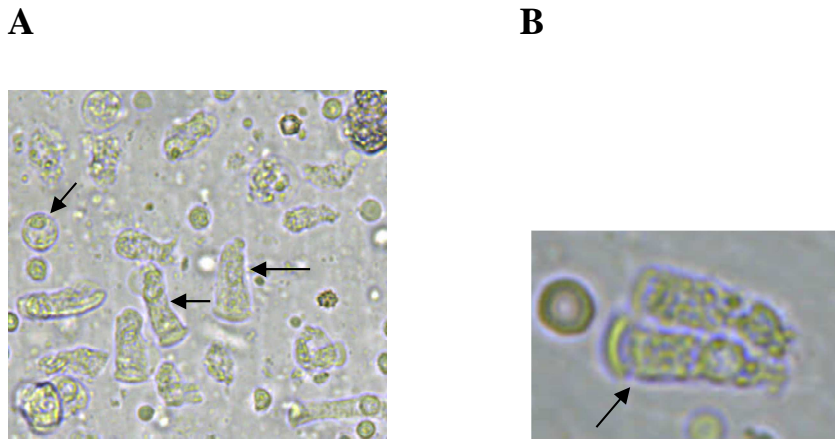


Figura 22: A. IECs aisladas a partir de muestras de yeyuno según la técnica descrita en el apartado Material y Métodos. B. Detalle de las IECs aisladas.

4.6 Efecto de la glucosa e insulina sobre la expresión relativa de los genes estudiados

Dada las asociaciones significativas encontradas entre la glucosa, la insulina, la leptina con la expresión relativa de ARNm, quisimos comprobar si la insulina y/o glucosa, así como la leptina podían modificar la expresión de dichos genes.

4.6.1 Efecto de la insulina y glucosa sobre los niveles de expresión relativa de los genes implicados en la lipogénesis *de novo* y la síntesis de quilomicrones

Con respecto a las IECs incubadas con 5.5 mM de glucosa, en las IECs incubadas con altas dosis de insulina (5.5 mM de glucosa + 100 nM de insulina) se produjo un incremento significativo de la expresión relativa de ARNm de PDHB ($p=0.020$) y un descenso significativo de la expresión relativa de ARNm de ACL ($p=0.026$) (Figura 23A y B).

En las IECs incubadas con altas dosis de glucosa e insulina (25 mM de glucosa + 100 nM de insulina) los niveles de expresión relativa de PDHB y ACC1 fueron significativamente mayores que en las IECs incubadas con 5.5 mM de glucosa ($p=0.045$ y $p=0.043$ respectivamente) (Figura 23A y C).

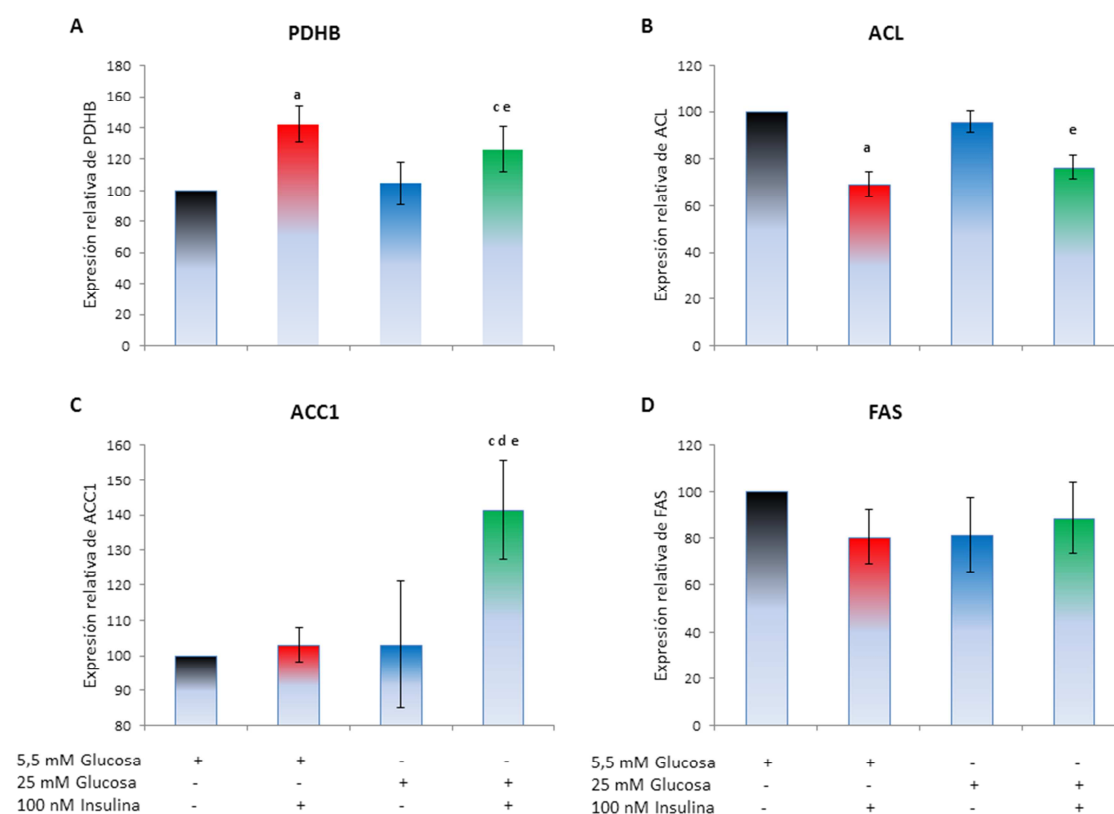


Figura 23: Niveles de expresión relativa de ARNm de los genes implicados en la lipogénesis *de novo* en las IECs aisladas. Los niveles de expresión fueron relativizados a la expresión de ARNm del gen 18S. Los resultados están expresados como porcentaje considerando las condiciones de incubación de 5.5mM de glucosa como el 100%. Los resultados están expresados como porcentaje \pm EEM.

^a $p < 0.05$ Diferencias significativas entre 5.5 mM glucosa y 5.5 mM glucosa + 100 nM insulina.

^b $p < 0.05$ Diferencias significativas entre 5.5 mM glucosa y 25 mM glucosa.

^c $p < 0.05$ Diferencias significativas entre 5.5 mM glucosa y 25 mM glucosa + 100 nM de insulina.

^d $p < 0.05$ Diferencias significativas entre 5.5 mM glucosa + 100 nM insulina y 25 mM glucosa + 100 nM insulina.

^e $p < 0.05$ Diferencias significativas entre 25 mM glucosa y 25 mM glucosa + 100 nM insulina.

En las IECs incubadas con altas dosis de glucosa e insulina (25 mM de glucosa + 100 nM de insulina), los niveles de expresión relativa de ARNm de ACC1 fueron

significativamente mayores que en las IECs incubadas con solo una alta dosis de insulina (5.5 mM de glucosa + 100 nM de insulina) (Figura 23C).

En las IECs incubadas con altas dosis de glucosa e insulina (25 mM de glucosa + 100 nM de insulina), los niveles de expresión relativa de ARNm de PDHB y ACC1 fueron significativamente mayores que los niveles de expresión relativa en las IECs incubadas con alta dosis de glucosa (25 mM) ($p=0.043$ y $p=0.043$ respectivamente), mientras que los niveles de expresión relativa de ARNm de ACL fueron significativamente menores ($p=0.043$) (Figura 23A, B y C).

No se encontraron diferencias significativas entre las condiciones de incubación de 5.5 mM de glucosa y 25 mM de glucosa.

Con respecto a las IECs incubadas con 5.5 mM de glucosa, tanto la incubación con altas dosis de insulina (5.5mM de glucosa + 100 nM de insulina) como la incubación con altas concentración de glucosa (25 mM) produjo un incremento significativo de los niveles de expresión relativa de ARNm de apo A-IV ($p=0.038$ y $p=0.006$ respectivamente) (Figura 24C).

En las IECs incubadas con altas dosis de glucosa e insulina (25mM de glucosa + 100 nM de insulina), los niveles de expresión relativa de ARNm de DGAT2, MTP y apo A-IV fueron significativamente mayores que en las IECs incubadas solo con 5.5mM de glucosa ($p<0.001$, $p<0.001$ y $p<0.001$, respectivamente) (Figura 24 A, B y C), y que en las IECs incubadas con altas dosis de insulina (5.5 mM de glucosa + 100 nM de insulina) ($p=0.043$, $p=0.028$ y $p=0.043$, respectivamente) (Figura 24A, B y C).

En las IECs incubadas con altas dosis de glucosa e insulina (25mM de glucosa + 100 nM de insulina), los niveles de expresión relativa de ARNm de DGAT2 ($p=0.043$) y apo A-IV ($p=0.043$) fueron significativamente mayores que en las IECs incubadas solo con altas dosis de glucosa (25 mM de glucosa) (Figura 24A y C).

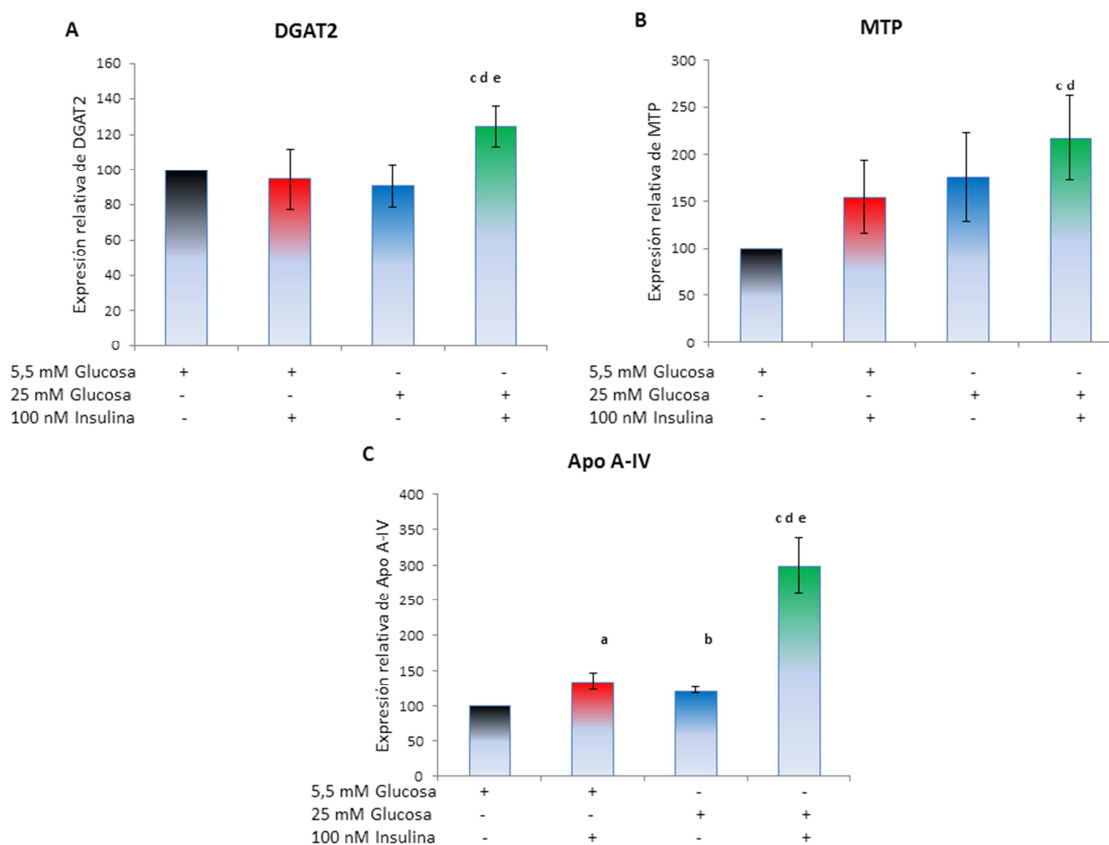


Figura 24: Niveles de expresión relativa de ARNm de los genes implicados en la síntesis de quilomicrones en las IECs aisladas. Los niveles de expresión fueron relativizados a la expresión de ARNm del gen 18S. Los resultados están expresados como porcentaje considerando las condiciones de incubación de 5.5mM de glucosa como el 100%. Los resultados están expresados como porcentaje \pm EEM.

^a $p < 0.05$ Diferencias significativas entre 5.5 mM glucosa y 5.5 mM glucosa + 100 nM insulina.

^b $p < 0.05$ Diferencias significativas entre 5.5 mM glucosa y 25 mM glucosa.

^c $p < 0.05$ Diferencias significativas entre 5.5 mM glucosa y 25 mM glucosa + 100 nM de insulina.

^d $p < 0.05$ Diferencias significativas entre 5.5 mM glucosa + 100 nM insulina y 25 mM glucosa + 100 nM insulina.

^e $p < 0.05$ Diferencias significativas entre 25 mM glucosa y 25 mM glucosa + 100 nM insulina.

4.6.2 Efecto de la insulina y glucosa sobre los niveles de expresión relativa SREBP-1c

Con respecto a las IECs incubadas con 5.5 mM de glucosa, la incubación con altas dosis de insulina (5.5 mM de glucosa + 100 nM de insulina), con altas dosis de glucosa (25 mM), y con altas dosis de glucosa e insulina (25 mM de glucosa + 100 nM de insulina) produjeron un incremento significativo de la expresión relativa de ARNm

de SREBP-1c ($p=0.040$, $p=0.034$ y $p<0.001$, respectivamente) (Figura 25). No se encontraron diferencias significativas entre el resto de condiciones estudiadas.

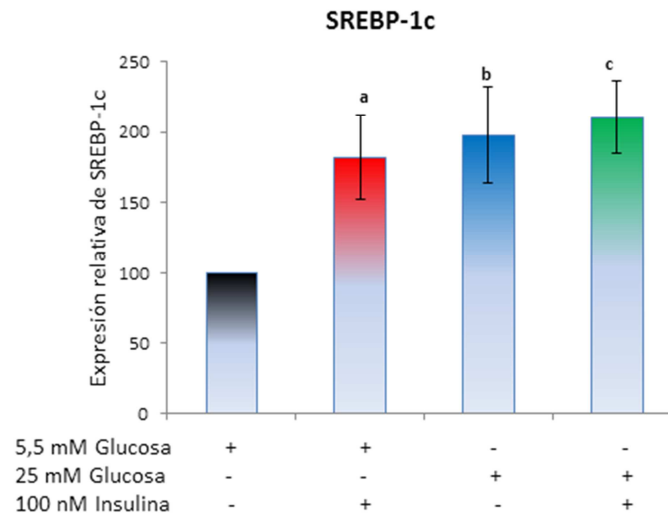


Figura 25: Niveles de expresión relativa de ARNm de SREBP-1c en las IECs aisladas. Los niveles de expresión fueron relativizados a la expresión de ARNm del gen 18S. Los resultados están expresados como porcentaje considerando las condiciones de incubación de 5.5mM de glucosa como el 100%. Los resultados están expresados como porcentaje \pm EEM.

^a $p<0.05$ Diferencias significativas entre 5.5 mM glucosa y 5.5 mM glucosa + 100 nM insulina.

^b $p<0.05$ Diferencias significativas entre 5.5 mM glucosa y 25 mM glucosa.

^c $p<0.05$ Diferencias significativas entre 5.5 mM glucosa y 25 mM glucosa + 100 nM de insulina.

4.6.3 Efecto de la insulina y glucosa sobre los niveles de expresión relativa de los genes implicados en la gluconeogénesis intestinal

En las IECs incubadas con alta dosis de insulina (5.5 mM de glucosa + 100 nM de insulina) los niveles de expresión relativa de ARNm de FBPasa ($p=0.050$) fueron significativamente mayores que en las IECs incubadas con solo 5.5 mM de glucosa (Figura 26C).

En las IECs incubadas con alta dosis de glucosa (25 mM), los niveles de expresión relativa de ARNm de PEPCK ($p=0.012$) fueron significativamente mayores que en las IECs incubadas con solo 5.5 mM de glucosa (Figura 26B).

En las IECs incubadas con alta dosis de glucosa e insulina (25 mM de glucosa + 100 nM de insulina), los niveles de expresión relativa de ARNm de PEPCK ($p=0.022$)

fueron significativamente mayores que en las IECs incubadas con 5.5 mM de glucosa (Figura 26B) mientras que los niveles de expresión relativa de GLS ($p=0.045$) y FBPasa ($p=0.047$) fueron significativamente menores (Figura 26A y C).

En las IECs incubadas con alta dosis de glucosa e insulina (25 mM de glucosa + 100 nM de insulina) los niveles de expresión relativa de ARNm de PEPCK ($p=0.028$) fueron significativamente mayores que en las IECs incubadas con alta dosis de insulina (5.5 mM de glucosa + 100 nM de insulina) (Figura 26B), mientras que los niveles de expresión relativa de ARNm de FBPasa y GLS fueron significativamente menores ($p=0.025$ y $p=0.046$ respectivamente) (Figura 26A y C).

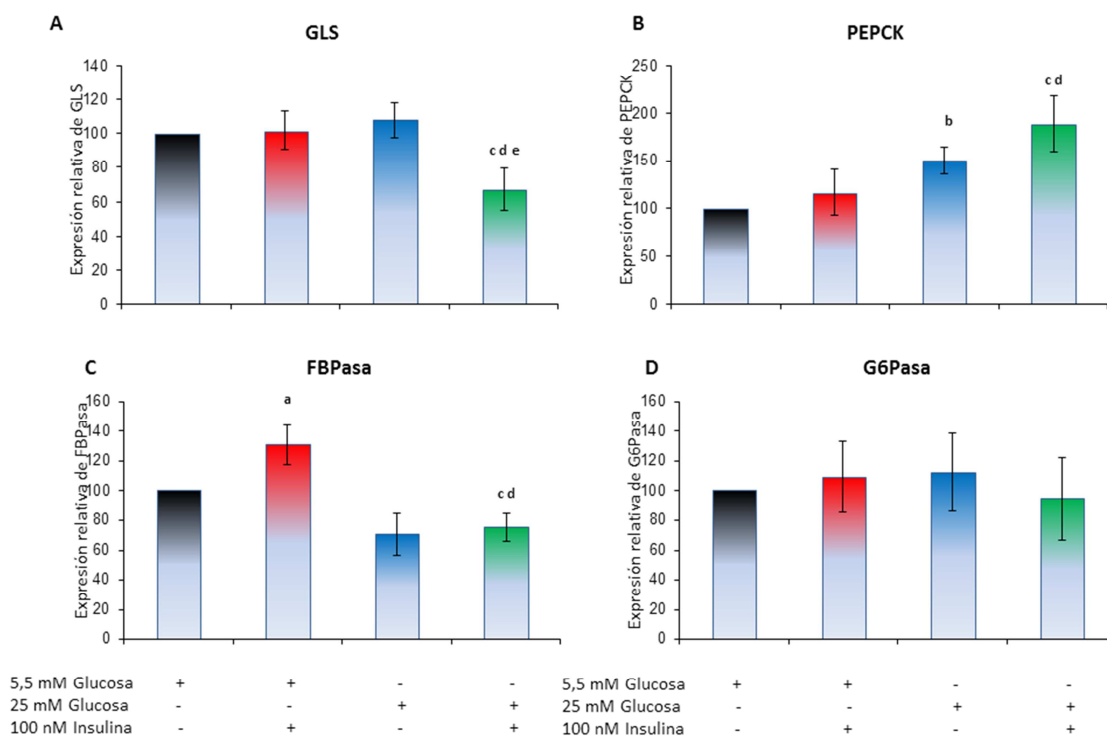


Figura 26: Niveles de expresión relativa de ARNm de los genes implicados en la gluconeogénesis en las IECs aisladas. Los niveles de expresión fueron relativizados a la expresión de ARNm del gen 18S. Los resultados están expresados como porcentaje considerando las condiciones de incubación de 5.5mM de glucosa como el 100%. Los resultados están expresados como porcentaje \pm EEM.

^a $p<0.05$ Diferencias significativas entre 5.5 mM glucosa y 5.5 mM glucosa + 100 nM insulina.

^b $p<0.05$ Diferencias significativas entre 5.5 mM glucosa y 25 mM glucosa.

^c $p<0.05$ Diferencias significativas entre 5.5 mM glucosa y 25 mM glucosa + 100 nM de insulina.

^d $p<0.05$ Diferencias significativas entre 5.5 mM glucosa + 100 nM insulina y 25 mM glucosa + 100 nM insulina.

^e $p<0.05$ Diferencias significativas entre 25 mM glucosa y 25 mM glucosa + 100 nM insulina.

En las IECs incubadas con alta dosis de glucosa e insulina (25 mM de glucosa + 100 nM de insulina) los niveles de expresión relativa de ARNm de GLS fueron significativamente menores ($p=0.046$) que en las IECs incubadas con alta dosis de glucosa (25 mM) (Figura 26A).

4.6.4 Efecto de la insulina y glucosa sobre los niveles de expresión relativa de los genes implicados en la señalización de la insulina

En las IECs incubadas con alta dosis de insulina (5.5 mM de glucosa + 100 nM de insulina) los niveles de expresión relativa de ARNm de p85 α /p110 β ($p=0.021$) fueron significativamente mayores que en las IECs incubadas con solo 5.5 mM de glucosa (Figura 27 D).

En las IECs incubadas con alta dosis de glucosa (25 mM), los niveles de expresión relativa de ARNm de p110 β ($p=0.046$) fueron significativamente mayores que en las IECs incubadas con solo 5.5 mM de glucosa (Figura 27 C).

En las IECs incubadas con alta dosis de glucosa e insulina (25 mM de glucosa + 100 nM de insulina), los niveles de expresión relativa de ARNm de p85 α ($p=0.030$) (Figura 27B) y p110 β ($p=0.003$) (Figura 27 C) fueron significativamente mayores que en las IECs incubadas con 5.5 mM de glucosa.

En las IECs incubadas con alta dosis de glucosa e insulina (25 mM de glucosa + 100 nM de insulina) los niveles de expresión relativa de ARNm de p110 β ($p=0.018$) fueron significativamente mayores que en las IECs incubadas con alta dosis de insulina (5.5 mM de glucosa + 100 nM de insulina) (Figura 27 C).

En las IECs incubadas con alta dosis de glucosa e insulina (25 mM de glucosa + 100 nM de insulina), los niveles de expresión relativa de ARNm de p85 α ($p=0.018$), p110 β ($p=0.028$) y p85 α /p110 β ($p=0.043$) fueron significativamente mayores que en las IECs incubadas con alta dosis de glucosa (25 mM) (Figura 27 B, C y D).

No se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión relativa de ARNm de IRS1 en las distintas condiciones de incubación realizadas.

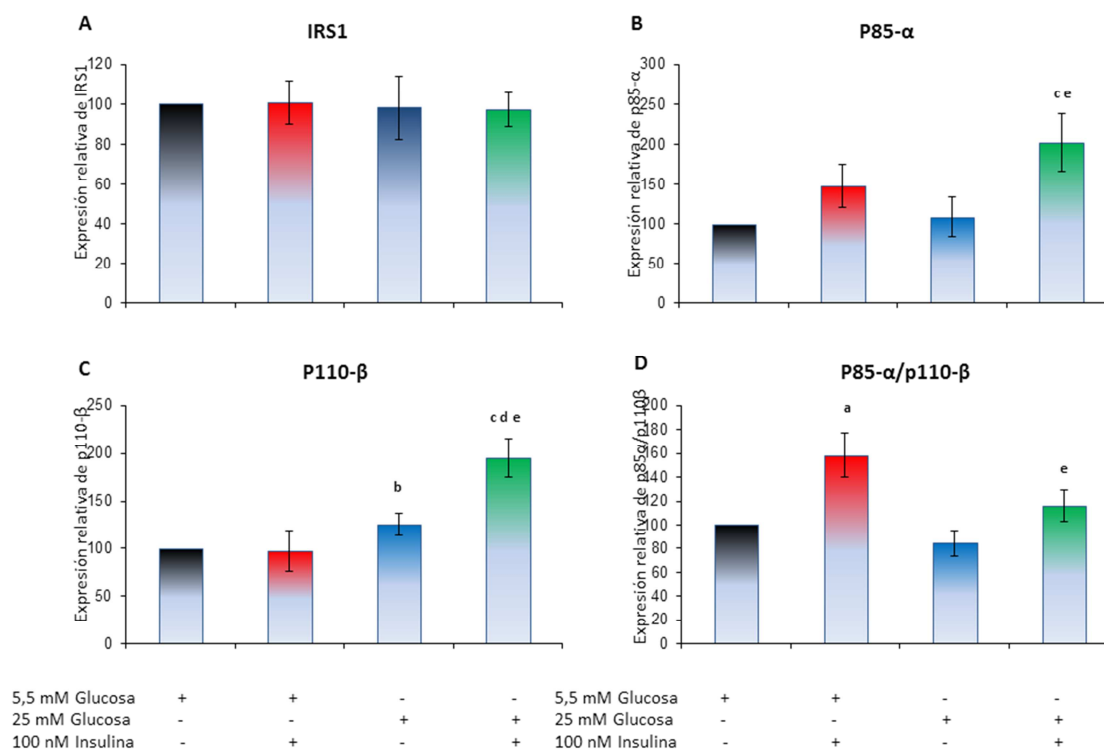


Figura 27: Efecto de la glucosa e insulina sobre los niveles de expresión relativa de ARNm de los genes implicados en la señalización de la insulina en las IECs aisladas. Los niveles de expresión fueron relativizados a la expresión de ARNm del gen 18S. Los resultados están expresados como porcentaje considerando las condiciones de incubación de 5.5mM de glucosa como el 100%. Los resultados están expresados como porcentaje \pm EEM.

^a $p < 0.05$ Diferencias significativas entre 5.5 mM glucosa y 5.5 mM glucosa + 100 nM insulina.

^b $p < 0.05$ Diferencias significativas entre 5.5 mM glucosa y 25 mM glucosa.

^c $p < 0.05$ Diferencias significativas entre 5.5 mM glucosa y 25 mM glucosa + 100 nM de insulina.

^d $p < 0.05$ Diferencias significativas entre 5.5 mM glucosa + 100 nM insulina y 25 mM glucosa + 100 nM insulina.

^e $p < 0.05$ Diferencias significativas entre 25 mM glucosa y 25 mM glucosa + 100 nM insulina.

4.7 Efecto de la leptina sobre la expresión relativa de los genes estudiados

Dadas las asociaciones significativas encontradas entre la leptina y la expresión relativa de ARNm, quisimos comprobar si la leptina podría modificar la expresión de dichos genes. Las IECs aisladas procedentes de muestras de yeyuno de seis sujetos pertenecientes al grupo OM-baja IR fueron incubadas con leptina en dos concentraciones diferentes (50 ng/ml y 150 ng/ml).

4.7.1 Efecto de la leptina sobre la expresión relativa de los genes implicados en la lipogénesis *de novo* y la síntesis de quilomicrones

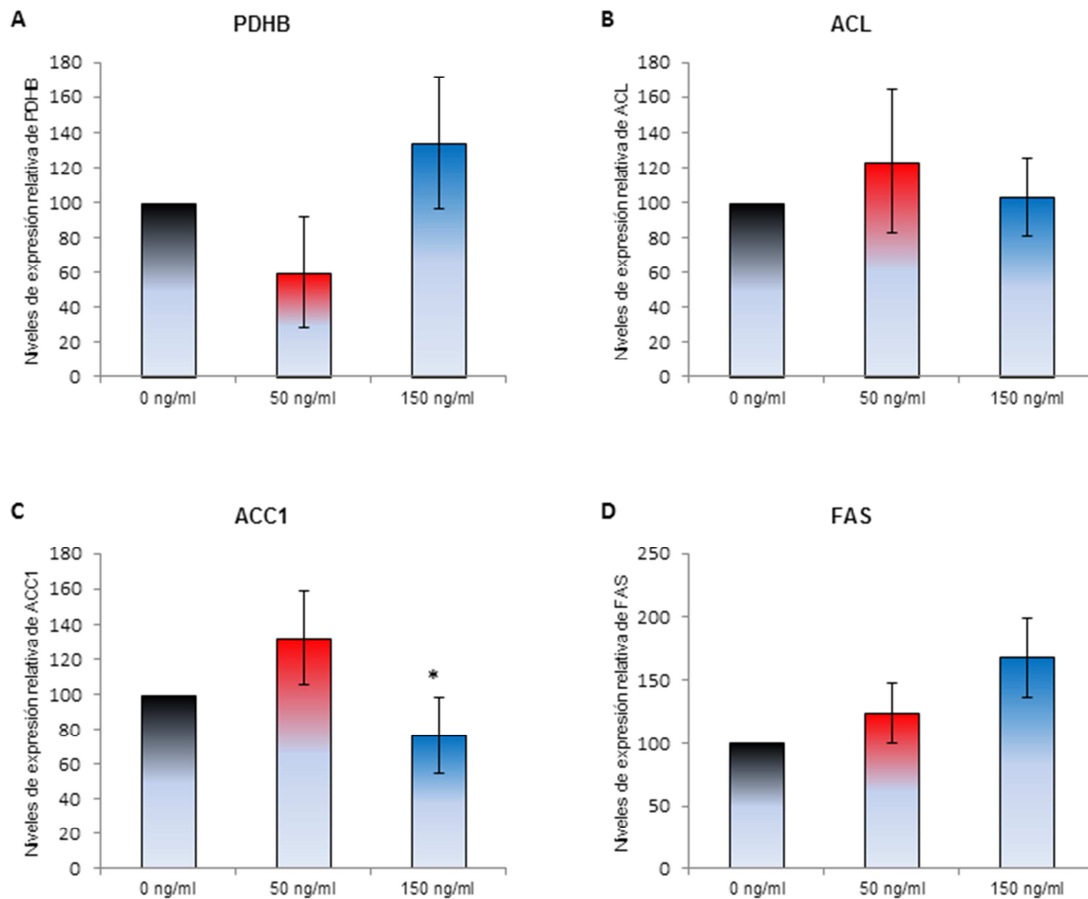


Figura 28: Efecto de la leptina sobre los niveles de expresión relativa de los genes implicados en la lipogénesis *de novo* en las IECs aisladas. Los niveles de expresión fueron relativizados a la expresión de ARNm del gen 18S. Los resultados están expresados como porcentaje considerando la condición de incubación sin leptina como el 100%. Los resultados están expresados como porcentaje \pm EEM. * $p < 0.05$ Diferencia significativa encontrada entre las condiciones de incubación de 150 ng/ml y 50 ng/ml.

En las IECs incubadas con alta concentración de leptina (150 ng/ml) los niveles de expresión relativa de ARNm de ACC1 fueron menores que en las IECs incubadas con baja concentración de leptina (50 ng/ml) ($p = 0.043$) (Figura 28A). No se

encontraron diferencias significativas en la expresión relativa del resto de genes estudiados implicados en la lipogénesis *de novo*.

En las IECs incubadas con alta concentración de leptina (150 ng/ml), los niveles de expresión relativa de ARNm de apo A-IV fueron significativamente mayores que en las IECs incubadas con baja concentración de leptina (50 ng/ml) ($p=0.028$) (Figura 29C), no encontrándose diferencias significativas en la expresión relativa del resto de genes estudiados implicados en la síntesis de triglicéridos y quilomicrones.

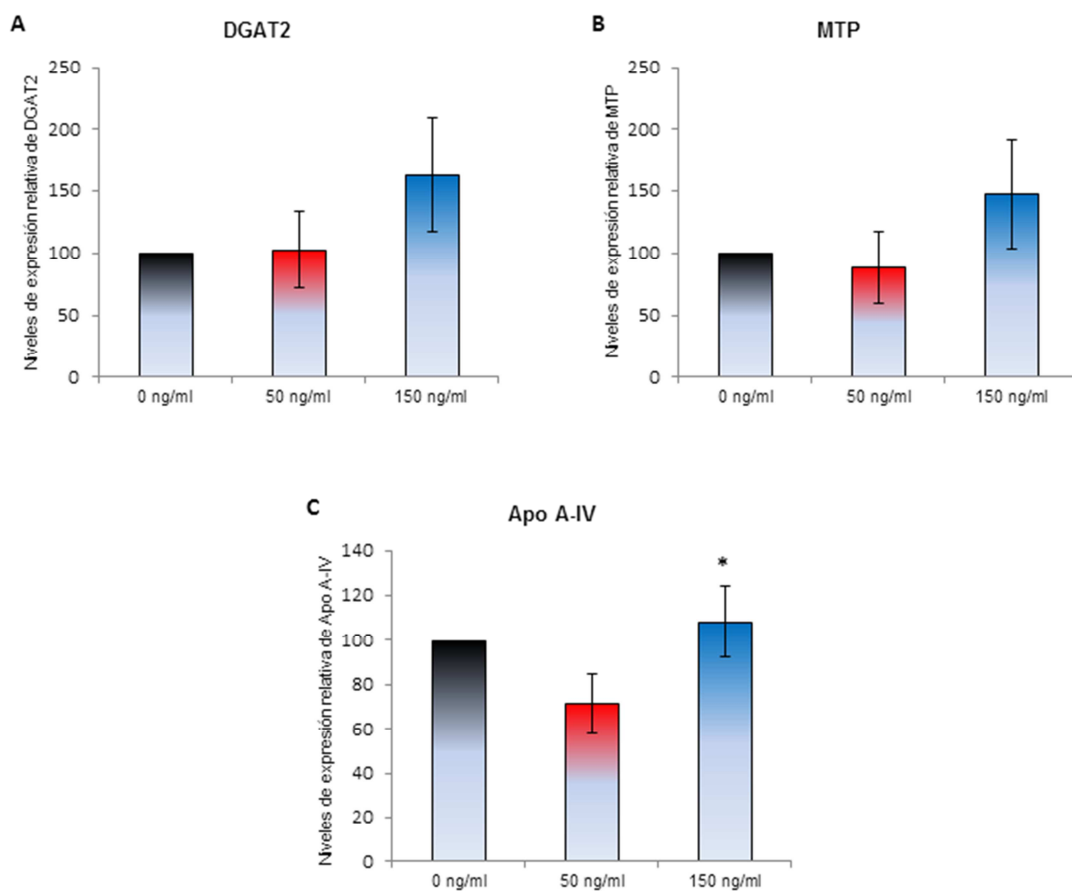


Figura 29: Efecto de la leptina sobre los niveles de expresión relativa de los genes implicados en la síntesis de triglicéridos y quilomicrones en las IECs aisladas. Los niveles de expresión fueron relativizados a la expresión de ARNm del gen 18S. Los resultados están expresados como porcentaje considerando la condición de incubación sin leptina como el 100%. Los resultados están expresados como porcentaje \pm EEM. * $p<0.05$ Diferencia significativa encontrada entre las condiciones de incubación de 150 ng/ml y 50 ng/ml.

4.7.2 Efecto de la leptina sobre la expresión relativa de SREBP-1c

La incubación con distintas concentraciones de leptina no produjo cambios significativos en los niveles de expresión relativa de ARNm de SREBP-1c (Figura 30).

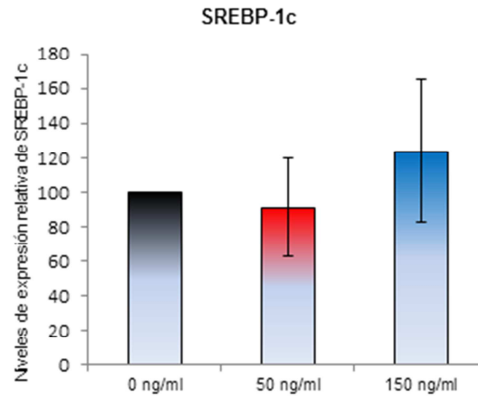


Figura 30: Efecto de la leptina sobre los niveles de expresión relativa de SREBP-1c en las IECs aisladas. Los niveles de expresión fueron relativizados a la expresión de ARNm del gen 18S. Los resultados están expresados como porcentaje considerando la condición de incubación sin leptina como el 100%.

4.7.3 Efecto de la leptina sobre la expresión relativa de los genes implicados en la gluconeogénesis

En las IECs incubadas con alta concentración de leptina (150 ng/ml) los niveles de expresión relativa de ARNm fueron significativamente mayores en el caso de G6Pasa ($p=0.043$) (Figura 31D), no encontrándose diferencias significativas en la expresión relativa de los otros genes estudiados.

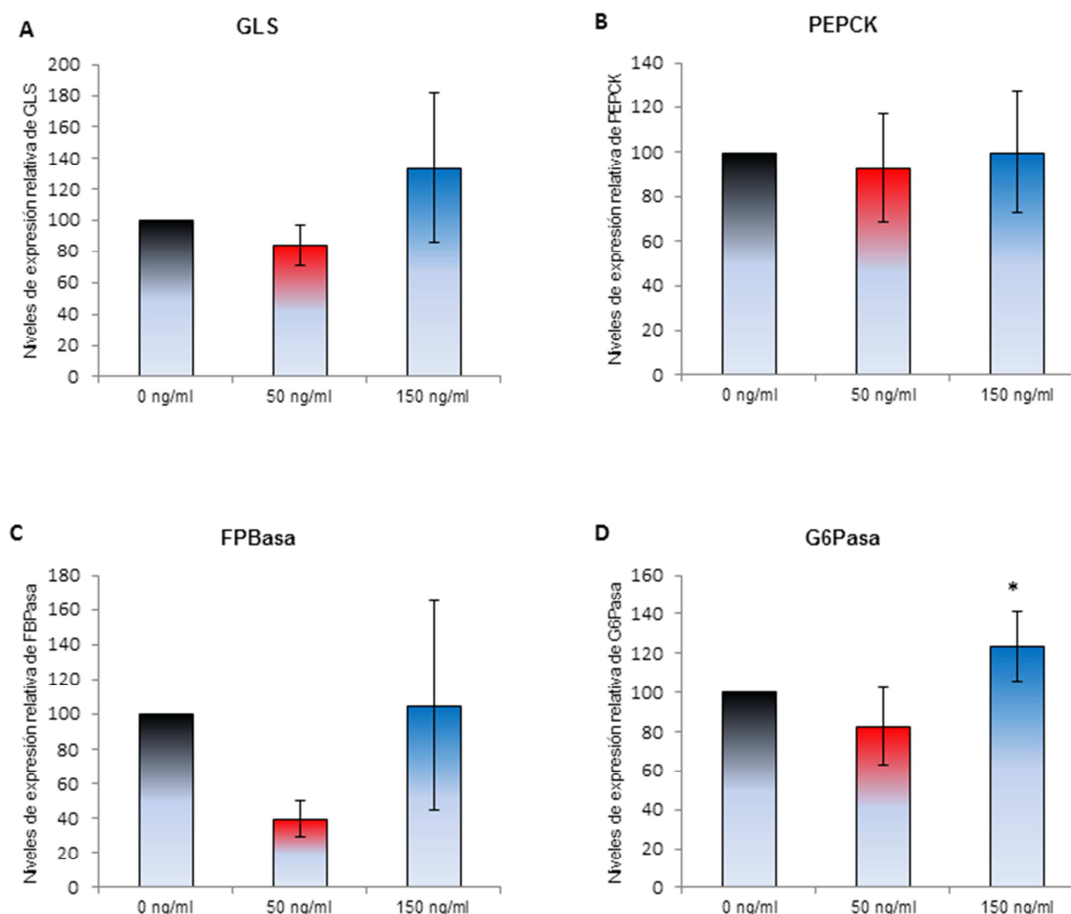


Figura 31: Efecto de la leptina sobre los niveles de expresión relativa de los genes implicados en la gluconeogénesis en las IECs aisladas. Los niveles de expresión fueron relativizados a la expresión de ARNm del gen 18S. Los resultados están expresados como porcentaje considerando la condición de incubación sin leptina como el 100%. Los resultados están expresados como porcentaje \pm EEM. * $p < 0.05$ Diferencia significativa encontrada entre las condiciones de incubación de 150 ng/ml y 50 ng/ml.

4.7.4 Efecto de la leptina sobre los genes implicados en la ruta de señalización de la insulina

En las IECs incubadas con alta concentración de leptina (150 ng/ml) los niveles de expresión relativa de ARNm fueron significativamente mayores en el caso de IRS1 ($p=0.022$), p85- α ($p=0.047$) y p110- β ($p=0.040$) (Figura 32A, B y C).

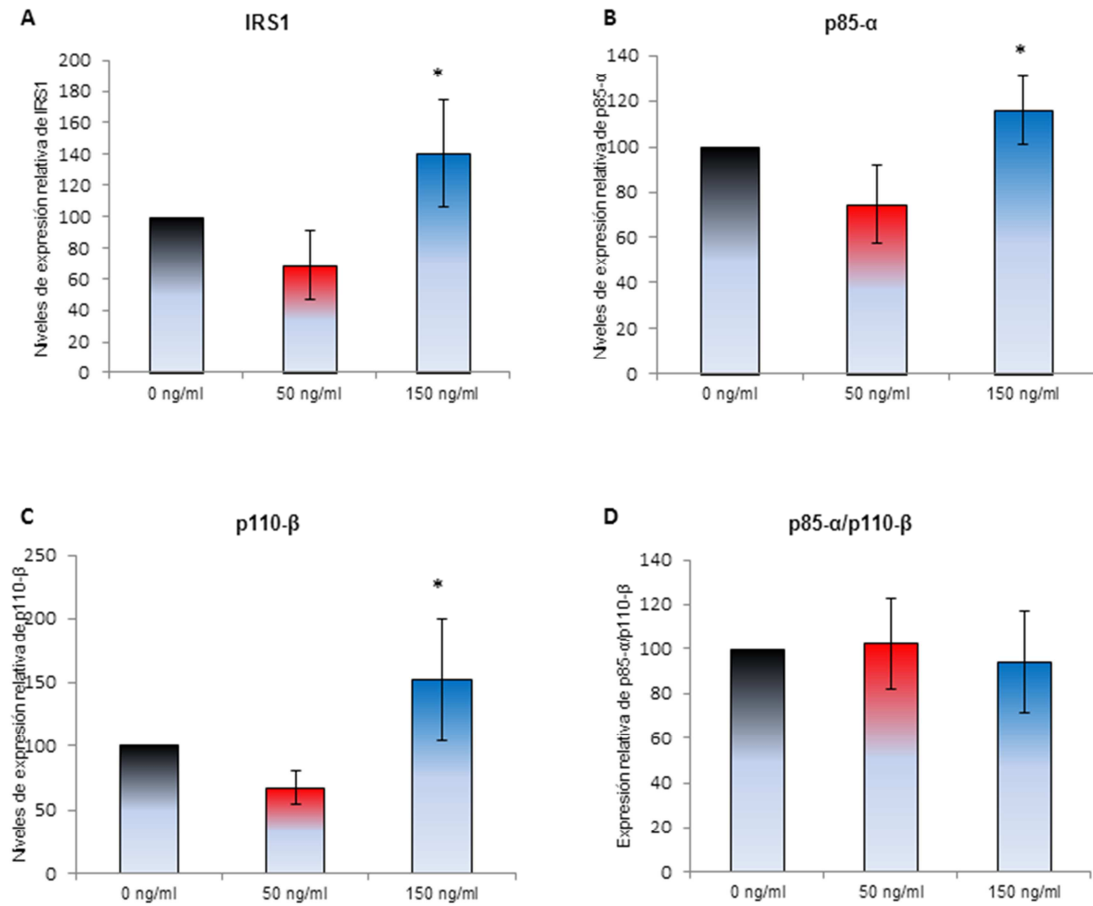


Figura 32: Efecto de la leptina sobre los niveles de expresión relativa de los genes implicados en la señalización de la insulina en las IECs aisladas. Los niveles de expresión fueron relativizados a la expresión de ARNm del gen 18S. Los resultados están expresados como porcentaje considerando la condición de incubación sin leptina como el 100%. Los resultados están expresados como porcentaje \pm EEM. * $p < 0.05$ Diferencia significativa encontrada entre las condiciones de incubación de 150 ng/ml y 50 ng/ml.

5. Discusión

En el presente estudio hemos descrito alteraciones del contenido lipídico, los niveles de expresión relativa de genes implicados en la lipogénesis *de novo*, la síntesis de lipoproteínas y la gluconeogénesis en el yeyuno de obesos mórbidos con alta resistencia a la insulina. Estas alteraciones se encuentran atenuadas en aquellos pacientes obesos mórbidos que reciben tratamiento con metformina. Además los niveles de expresión relativa de muchos de los genes estudiados se encuentran regulados por los niveles de glucosa, insulina y/o leptina.

5.1 Lipogénesis *de novo* y síntesis de quilomicrones

En el presente estudio hemos encontrado que los obesos mórbidos con alta resistencia a la insulina así como los que reciben tratamiento con metformina presentan unos niveles superiores de triglicéridos en los quilomicrones en suero, que correlacionan positivamente con el índice HOMA-IR y con los niveles de apo B-48 en suero. Sin embargo, no podemos concluir que este incremento de quilomicrones sea resultado de un incremento de su síntesis. Aunque diversos estudios han mostrado un incremento en la producción de lipoproteínas intestinales que contienen apo B-48 (Haidari y cols., 2002), otros han indicado que este incremento en el plasma de apo B-48 en estados de resistencia a la insulina podrían ser la consecuencia de una menor tasa de aclaramiento de las partículas remanentes de quilomicrones (Haffner y cols., 1984).

Mediante una tinción realizada con rojo oleoso en las muestras de yeyuno obtenidas en estado de ayunas, hemos observado una mayor acumulación de lípidos neutros en la lámina propia del yeyuno procedente de los sujetos obesos mórbidos con baja resistencia a la insulina. Mediante la técnica inmunohistoquímica hemos confirmado que el yeyuno procedente de obesos mórbidos con baja resistencia a la insulina presentan una señal más intensa correspondiente a apo B en el mismo lugar donde los lípidos neutros fueron detectados mediante la tinción de rojo oleoso. Esto sugiere que estas gotas lipídicas corresponden a lipoproteínas intestinales. Si los

triglicéridos estuvieran en los vasos sanguíneos, estos serían el reflejo de los niveles de triglicéridos en plasma en ayunas. Sin embargo, el nivel de triglicéridos en plasma en los obesos mórbidos con alta resistencia a la insulina y en los medicados con metformina fue mayor, mientras que el contenido de triglicéridos en el yeyuno fue menor. Apoyando estos resultados, hemos encontrado una correlación negativa entre el contenido de triglicéridos del yeyuno y los niveles en plasma de apo B-48 y el contenido de triglicéridos de los quilomicrones, así como una correlación negativa entre la intensidad de la señal de apo B en el yeyuno y los niveles en plasma de apo B-48 y el contenido de triglicéridos de los quilomicrones.

Una vez sintetizados los quilomicrones, éstos son secretados al sistema linfático del mesenterio. En ratas, se ha descrito que durante la absorción activa de lípidos, los triglicéridos pueden seguir al menos dos vías (Nevin y cols., 1995). Unos forman parte de los quilomicrones, que van a ser liberados a la linfa, mientras que otros parecen que no son transportados desde las células intestinales hacia la linfa, sino que salen de la mucosa a través de la vena porta (Mansbach y cols., 1991). Poco más se conoce sobre esto.

Una hipótesis para explicar esto podría ser que las lipoproteínas intestinales son transferidas más rápidamente hacia los vasos sanguíneos en el caso de los pacientes con alta resistencia a la insulina. El menor tamaño de estas lipoproteínas en estado de ayunas en estos pacientes con alta resistencia a la insulina podría explicar su menor acumulación en el intestino (Haidari y cols., 2002, Guo y cols., 2005). Estas lipoproteínas son transportadas más fácilmente ya que atraviesan la barrera endotelial con mayor facilidad y por lo tanto no son retenidas en la lámina propia.

Diversos estudios en modelos animales han puesto de manifiesto la presencia de alteraciones en el metabolismo lipídico en estados de resistencia a la insulina y/o diabetes (Haidari y cols., 2002, Federico y cols., 2006). La inducción de resistencia a la insulina en modelos animales está asociada a un aumento significativo de la expresión de genes implicados en el metabolismo lipídico y lipoproteico a nivel intestinal (Lally y cols., 2007). Aunque el aumento de la expresión a nivel intestinal de genes implicados en el metabolismo lipoproteico puede jugar un papel muy importante en la

sobreproducción de lipoproteínas intestinales en individuos con resistencia a la insulina, este fenómeno está poco estudiado en humanos.

En el presente estudio hemos observado que el yeyuno de obesos mórbidos con alta resistencia a la insulina presenta alteraciones en la expresión de genes involucrados en el metabolismo lipídico, como son una disminución de la expresión de genes involucrados en la síntesis de ácidos grasos (FAS y ACC), un incremento en la expresión de genes implicados en la síntesis de acetil-CoA (ACL y PDHB) y un incremento en la expresión de apo A-IV, que participa en la síntesis y secreción de quilomicrones.

Estudios llevados a cabo tanto en humanos (Duez y cols., 2006) como en diversos modelos animales (Haidari y cols., 2002, Zoltowska y cols., 2003) se han centrado en el papel que juega el aumento de producción de lipoproteínas intestinales como uno de los causantes de la dislipemia característica de la obesidad y la resistencia a la insulina.

Hay pocos estudios realizados en humanos sobre la producción de lipoproteínas intestinales en estados de resistencia a la insulina y/o diabetes (Duez y cols., 2006, Duez y cols., 2008); la información disponible sobre los mecanismos intracelulares involucrados en la síntesis, formación y secreción de las lipoproteínas intestinales en los estados de resistencia a la insulina y/o diabetes en humanos es escasa (Couture y cols., 2014, Veilleux y cols., 2014).

Está descrito que en estados de resistencia a la insulina la secreción de lipoproteínas intestinales se encuentra elevada (Duez y cols., 2006, Federico y cols., 2006), aunque los mecanismos por los cuales tiene lugar no son bien conocidos. En un estudio realizado en el modelo animal de resistencia a la insulina, hámster alimentado con fructosa, se sugiere que el incremento en la producción de lipoproteínas intestinales puede ser debido a diversos factores como la inducción de la lipogénesis *de novo*, la mayor biodisponibilidad de lípidos, el aumento de la estabilidad intracelular de apo B-48 y abundancia de MTP y apo A-IV, todo lo cual conlleva a una mayor producción y secreción de lipoproteínas intestinales (Haidari y cols., 2002).

En nuestro estudio, la síntesis *de novo* de ácidos grasos en los sujetos obesos mórbidos con alta resistencia a la insulina parece estar disminuida, ya que los niveles de expresión relativa de ACC1 y FAS son significativamente menores, lo cual concuerda con lo observado en tejido adiposo en humanos (Ortega y cols., 2010). Sin embargo, en hígado se ha visto que la lipogénesis *de novo* se encuentra aumentada en los individuos obesos con alta resistencia a la insulina (Eissing y cols., 2013). ACC1 cataliza la carboxilación de acetil-CoA a malonil-CoA, un paso limitante en la síntesis de ácidos grasos. Una menor concentración de malonil-CoA como consecuencia de una menor expresión de ACC1 puede dar lugar a un descenso en la síntesis lipídica *de novo*.

En humanos hay poca información disponible sobre la lipogénesis *de novo* en el intestino delgado. Un reciente estudio realizado en duodeno, muestra una expresión relativa de ARNm de ACC1 significativamente menor en individuos obesos con alta resistencia a la insulina, sin embargo, no se encontraron diferencias en el caso de FAS (Couture y cols., 2014), aunque determinan un incremento en la lipogénesis *de novo* medida por incorporación de acetato marcado en los individuos obesos con alta resistencia a la insulina. Este incremento en la lipogénesis *de novo* medido por la incorporación de acetato marcado también se ha observado en el intestino de modelos animales de resistencia a la insulina (Haidari y cols., 2002).

Por otra parte, la síntesis de acetil-CoA, precursor de ácidos grasos y colesterol, parece estar incrementada en los individuos obesos mórbidos con alta resistencia a la insulina, ya que nuestros resultados muestran unos niveles de expresión relativa de ARNm de ACL y PDHB significativamente mayores en estos individuos. Estas enzimas participan en la síntesis de acetil-CoA citosólico y mitocondrial respectivamente. ACL cataliza la generación de acetil-CoA en el citosol a partir de citrato y es la ruta principal de síntesis de acetil-CoA en las células de mamíferos (Ruderman y cols., 1999). El aumento de expresión relativa de ACL podría ser causado por un exceso de citrato que se produce en situaciones con altos niveles de glucosa y ácidos grasos libres (Ruderman y cols., 1999), como ocurre en los sujetos obesos mórbidos con alta resistencia a la insulina (Soriguer y cols., 2009b). Este incremento en los niveles de citrato también puede estar asociado con la disminución de la concentración de malonil-CoA (Ruderman y cols., 1999), tal y como nuestros resultados sugieren al mostrar unos

niveles menores de expresión relativa de ARNm de ACC1 en los sujetos obesos mórbidos con alta resistencia a la insulina.

En nuestros resultados no encontramos un aumento significativo de la expresión relativa de los genes implicados en la síntesis de triglicéridos (DGAT2) ni en la transferencia de lípidos a las lipoproteínas (MTP) en los sujetos obesos mórbidos con alta resistencia a la insulina o diabéticos medicados con metformina, en comparación con aquellos sujetos mórbidos con baja resistencia a la insulina. Estudios previos realizados en tejido adiposo de sujetos obesos no encontraron diferencias en los niveles de actividad de DGAT en función de la presencia o no de diabetes (Hou y cols., 2009). Sin embargo, en modelos animales de resistencia a la insulina y diabetes se ha descrito un aumento de la actividad de DGAT a nivel intestinal (Zoltowska y cols., 2003, Uchida y cols., 2013). Sobre la expresión de MTP a nivel intestinal en modelos animales los resultados son contradictorios (Haidari y cols., 2002, Zoltowska y cols., 2003).

Los estudios realizados en intestino de humanos que evalúen la expresión relativa de DGAT2 y MTP son escasos. En biopsias de duodeno de individuos obesos se ha observado un menor nivel de ARNm de DGAT2 y MTP en individuos con alta resistencia a la insulina (Couture y cols., 2014), aunque otro reciente estudio muestra que en individuos obesos con alta resistencia a la insulina los niveles de proteína MTP se encuentran elevados (Veilleux y cols., 2014).

En nuestro estudio, los niveles de expresión relativa de ARNm de apo A-IV fueron significativamente mayores en individuos obesos mórbidos con alta resistencia a la insulina. Apo A-IV es una proteína de unión a lípidos que es incorporada a los quilomicrones durante su formación. El incremento de su expresión se ha propuesto que facilita la secreción de lípidos aumentando el tamaño de la partícula lipoproteica secretada (Lu y cols., 2006), aunque este experimento fue realizado en una línea celular de enterocitos de cerdo recién nacidos, IPEC-1, incubados con ácido oleico. Nuestras condiciones de estudio son muy diferentes; las muestras fueron tomadas en ayunas en pacientes obesos mórbidos. En estas circunstancias los enterocitos producen en su mayoría lipoproteínas más pequeñas con menor contenido en triglicéridos que los quilomicrones producidos después de la ingesta de alimentos (Ockner y Manning, 1974).

Este incremento de expresión de apo A-IV en los sujetos obesos mórbidos con alta resistencia a la insulina encontrado en nuestro estudio va en la misma línea que aquellos que muestran un incremento en la formación y secreción de lipoproteínas intestinales en humanos con alta resistencia a la insulina (Duez y cols., 2006, Hogue y cols., 2007). Este incremento en los niveles de expresión relativa de apo A-IV en los individuos obesos mórbidos con alta resistencia a la insulina, pero sin diferencias significativas en los niveles de expresión relativa de MTP entre los grupos estudiados, podrían indicar que en estados de resistencia a la insulina los enterocitos son capaces de producir una mayor cantidad de lipoproteínas pero con un menor contenido en triglicéridos. Resultados similares se han observado en modelos animales de resistencia a la insulina (Zoltowska y cols., 2003, Hayashi y cols., 2002).

Por el contrario, Haidari y cols. sugieren un papel importante de MTP en la dislipemia postprandial en modelos animales de resistencia a la insulina (Haidari y cols., 2002). Estas discrepancias pueden ser debidas a las diferencias existentes entre especies. Estudios *in vitro* realizados en hepatocitos sugieren que MTP podría no estar implicada en la transferencia de la mayoría de triglicéridos a apoB (Gordon y Jamil, 2000, Kulinski y cols., 2002), proponiéndose un modelo en el que se sugiere que cuando MTP es inhibida, la acumulación de triglicéridos independientes de apoB en el lumen del retículo endoplasmático se ve comprometida dando como resultado que haya menos triglicéridos disponibles para ser unidos a apoB (Kulinski y cols., 2002). Son necesarios futuros trabajos donde se estudie el papel de MTP en la formación de lipoproteínas, especialmente en situaciones de resistencia a la insulina y/o diabetes.

SREBP-1c es un factor de transcripción implicado en la regulación de la lipogénesis (Horton y cols., 2002). Nuestros resultados muestran un incremento de los niveles de expresión relativa de SREBP-1c en el yeyuno de obesos mórbidos con alta resistencia a la insulina, lo que concuerda con los resultados previos observados en animales con resistencia a la insulina (Federico y cols., 2006). Este aumento en los niveles de expresión puede ser provocado por el incremento de la insulinemia (Hegarty y cols., 2005), como nuestros resultados sugieren. La insulina regula a nivel transcripcional los niveles de SREBP-1c (Eberle y cols., 2004), aumentando su expresión en los tejidos diana (Guillet-Deniau y cols., 2002). Esto concuerda con

nuestros resultados observados en yeyuno. Mediante el análisis de diferentes modelos de regresión múltiple, hemos encontrado que tanto la insulina como SREBP-1c podrían jugar un papel en la explicación de los niveles de expresión relativa de ACC1, MTP, DGAT2, PDHB, apo A-IV y FAS. Está descrito que SREBP-1c está implicado en la regulación de ACC1 (Zhao y cols., 2010), FAS (Horton y cols., 2002) y MTP (Sato y cols., 1999) y que la insulina juega un papel importante en la regulación de SREBP-1c (Hegarty y cols., 2005), FAS (Griffin y Sul, 2004), apo A-IV (Hanniman y cols., 2006) y DGAT2 (Meegalla y cols., 2002). Por lo tanto, la insulina podría estar implicada en la regulación de estos genes, bien sea directamente, o bien a través de la acción de SREBP-1c. Esto no descarta el hecho de que otros factores de transcripción puedan estar también involucrados en la regulación de los niveles de expresión estas enzimas.

Nuestro estudio muestra que la metformina modifica ligeramente los niveles de expresión relativa de apo A-IV, ACC1 y SREBP-1c. La metformina es un medicamento ampliamente utilizado para el tratamiento de la DM2. El tratamiento con metformina mejora los niveles de expresión relativa de estos genes hasta el punto de que desaparecen las diferencias significativas con respecto a los obesos mórbidos con baja resistencia a la insulina. Para nuestro conocimiento, no hay ningún estudio publicado que evalúe el efecto de la metformina en la expresión relativa de apo A-IV y SREBP-1c a nivel intestinal. Con respecto a SREBP-1c, y acorde a nuestros resultados, el tratamiento con metformina disminuye los niveles de expresión y proteína de SREBP-1c en células musculares L6 (Bi y cols., 2014). Sin embargo, con respecto a ACC1, nuestros resultados difieren de las investigaciones realizadas en adipocitos 3T3-L1 en los que la metformina reduce los niveles de proteína de ACC1 (Boyle y cols., 2011). Estas diferencias pueden ser debidas a que la regulación del metabolismo puede variar entre distintos tejidos, y en función de las condiciones ambientales en las que se encuentran las células.

Nuestros resultados muestran que la expresión de los genes estudiados que participan en la lipogénesis *de novo* y en la síntesis de lipoproteínas se encuentran regulados por la glucosa y/o insulina en el yeyuno de los individuos obesos mórbidos con baja resistencia a la insulina. Hemos encontrado unos niveles de expresión relativa de ARNm de DGAT2, MTP y apo A-IV mayores en las IECs procedentes del yeyuno

de individuos obesos mórbidos con baja resistencia a la insulina cuando son incubados con altas concentraciones de glucosa e insulina, situación similar al estado postprandial, lo que sugiere que podría tener lugar una mayor síntesis de lipoproteínas intestinales. La síntesis y secreción de apo A-IV en el tracto gastrointestinal es estimulada por la insulina (Hanniman y cols., 2006) y los niveles de expresión relativa de ARNm de DGAT2 se incrementan por la insulina (Meegalla y cols., 2002). Un incremento en la lipogénesis *de novo* podría estar provocado por el incremento de los niveles de expresión relativa de ARNm de ACC1, aunque los niveles de expresión relativa de FAS no se han visto incrementados. ACC1 es un gen cuya expresión se encuentra inducida en respuesta a la insulina (Brownsey y cols., 2006). Aunque en las condiciones de incubación a alta concentración de glucosa o insulina, solo se incrementa de manera significativa los niveles de expresión relativa de apo A-IV, lo que sugiere un incremento en la síntesis de lipoproteínas ricas en triglicéridos, pero sin un incremento del contenido en triglicéridos, debido a la ausencia de incremento significativo en los niveles de expresión relativa de DGAT2, MTP y ACC1. Por otro lado, PDHB, SREBP-1c y ACL han presentado un comportamiento distinto frente a la insulina; mientras que los niveles de expresión relativa de ARNm de PDHB y SREBP-1c se han visto incrementados a alta concentración de insulina, los niveles de expresión relativa de ACL han disminuido. Tanto PDHB como SREBP-1c son estimuladas por la insulina (Hegarty y cols., 2005, Wieland, 1983). SREBP-1c está implicada en el efecto lipogénico que produce la hiperinsulinemia crónica (Horton y cols., 2002), y la activación del complejo PDH favorece la oxidación de la glucosa y la mejora del control de la glucosa en sangre (Mayers y cols., 2003). Mientras, la ACL representa el nexo de unión entre el metabolismo de la glucosa y la síntesis de ácidos grasos, ya que transforma el citrato derivado de la glucosa en acetil-CoA (Chypre y cols., 2012).

Nuestros resultados muestran que la leptina, en concentraciones similares a las que se encuentran en los pacientes obesos mórbidos con alta resistencia a la insulina, produce una disminución en los niveles de expresión de ARNm de ACC1 en las IECs aisladas de individuos obesos mórbidos con baja resistencia a la insulina. Mientras, los niveles de expresión de ARNm de apo A-IV se vieron incrementados con respecto a los niveles encontrados en la incubación con baja concentración de leptina, similar a la que presentan los pacientes obesos mórbidos con baja resistencia a la insulina. Hay poca

información disponible sobre el efecto de la leptina sobre el metabolismo lipídico en el intestino delgado. En ratones carentes de leptina (ob/ob), una inyección intravenosa de leptina 90 minutos después de una sobrecarga de grasa produjo una reducción en los niveles de transcripción de apo A-IV en el yeyuno (Morton y cols., 1998). En células Caco-2 diferenciadas a enterocitos, la biosíntesis y secreción de apo A-I, apo A-IV y apo E se vio inducida por la leptina, mientras que la secreción de triglicéridos y la biosíntesis de apo B-48 se vio inhibida (Stan y cols., 2001).

La administración de leptina a nivel central, inhibe la expresión de genes implicados en la síntesis de ácidos grasos como ACC y FAS tanto en hígado como en tejido adiposo, mientras que los niveles de expresión de SREBP-1c se encuentran disminuidos en hígado pero no en el tejido adiposo (Gallardo y cols., 2007).

5.2 Gluconeogénesis

Los resultados de nuestro estudio muestran que los sujetos obesos mórbidos con alta resistencia a la insulina presentan alteraciones en los niveles de expresión relativa de los genes implicados en la gluconeogénesis y en su regulación. Comparando con el grupo de obesos mórbidos con alta resistencia a la insulina, el tratamiento con metformina hace que estas diferencias disminuyan ligeramente, llegando a desaparecer dichas diferencias significativas en alguno de los genes estudiados.

El papel del intestino como órgano que participa de manera dinámica en la producción endógena de glucosa a través de la gluconeogénesis se ha puesto de manifiesto en diversos estudios realizados en modelos animales y en humanos (Mithieux y cols., 2004b, Rajas y cols., 2000, Rajas y cols., 1999, Yanez y cols., 2003). En modelos animales la producción de glucosa a nivel intestinal no se ha detectado en el estado postabsortivo (Croset y cols., 2001). Sin embargo, el hecho de que el intestino sea capaz de producir glucosa en estados de resistencia a la insulina, representa una

posible fuente adicional de glucosa que podría influir en el aumento de producción endógena de glucosa descrito en los estados de resistencia a la insulina.

La medida de la gluconeogénesis *in vivo* ha sido objeto de controversia debido principalmente a la inexactitud de la metodología empleada (Previs y cols., 2009), además del hecho de que el flujo sanguíneo a lo largo del intestino es muy elevado, lo que hace más complicado determinar con exactitud las posibles diferencias en el flujo de la glucosa.

Nuestros resultados muestran que en los individuos obesos mórbidos con alta resistencia a la insulina, los niveles de expresión relativa de los genes que participan en la gluconeogénesis intestinal GLS, PEPCK y G6Pasa se encuentran elevados. Estudios previos realizados a nivel hepático, en modelos animales de resistencia a la insulina y en humanos, muestran un incremento en los niveles de actividad y/o expresión relativa de ARNm de PEPCK, FBPasa y G6Pasa (Andrikopoulos y Proietto, 1995, Clore y cols., 2000, Creutzfeldt y cols., 1970, Liu y cols., 1994). Sin embargo, hay muy poca información disponible sobre la gluconeogénesis intestinal en estados de resistencia a la insulina, y los pocos estudios que hay están realizados en modelos animales (Croset y cols., 2001, Mithieux y cols., 2004a).

FBPasa es una de las enzimas claves de la gluconeogénesis y cataliza la conversión irreversible de fructosa-1,6-bifosfato a fructosa-6-fosfato. En modelos animales de obesidad y resistencia a la insulina (Andrikopoulos y cols., 1993, Andrikopoulos y Proietto, 1995), así como en biopsias hepáticas de pacientes obesos con DM2, se ha descrito un incremento de la actividad de FBPasa (Creutzfeldt y cols., 1970). Con respecto a los niveles de expresión relativa de FBPasa, en nuestro estudio no encontramos diferencias entre los distintos grupos estudiados. Se ha descrito que FBPasa se encuentra altamente expresada en el intestino delgado de diferentes especies estudiadas, no siendo este paso un factor limitante (Anderson, 1974, Bismut y cols., 1993). En modelos animales, un incremento en la actividad hepática de FBPasa se ha relacionado con un incremento de la tasa de gluconeogénesis a partir de glicerol (Lamont y cols., 2006), el cual entra en la ruta gluconeogénica justo antes de la reacción catalizada por la FBPasa. De hecho, en sujetos obesos con DM2, la tasa de gluconeogénesis hepática a partir de glicerol se encuentra incrementada (Puhakainen y

cols., 1992). Pero en el intestino, el precursor principal de la gluconeogénesis es la glutamina (Croset y cols., 2001). Por lo tanto el hecho de que no hayamos encontrado diferencias en los niveles de expresión relativa de FBPasa entre los distintos grupos puede ser debido a la diferencia existente en los precursores principales de la gluconeogénesis en hígado e intestino en condiciones de resistencia a la insulina. De hecho, nuestros resultados muestran unos niveles de expresión relativa de GLS significativamente mayores en el grupo de obesos mórbidos con alta resistencia a la insulina. GLS cataliza la hidrólisis de glutamina a glutamato y amoniaco, lo cual la convierte en uno de los enzimas claves en el control de la gluconeogénesis intestinal (Mithieux, 2001). Nuestros resultados son consistentes con los datos conocidos sobre los flujos metabólicos existentes en el hígado e intestino. La glutamina es captada y metabolizada por el intestino delgado (Windmueller y Spaeth, 1980), mientras que la alanina y lactato, principales precursores de la gluconeogénesis en el hígado, son liberados por el intestino delgado al torrente circulatorio para posteriormente ser captados por el hígado (Remesey y cols., 1978, Owen y cols., 1981).

G6Pasa es una enzima crucial en el control de la homeostasis de la glucosa, ya que cataliza la última reacción bioquímica de la ruta de la gluconeogénesis y la glucogenolisis, esta es la hidrólisis de la glucosa-6-fosfato a glucosa y fosfato inorgánico. En modelos animales de diabetes, se ha demostrado un incremento en la actividad y la expresión de la G6Pasa (Barzilai y Rossetti, 1993, Liu y cols., 1994). En pacientes obesos mórbidos con DM2 se ha visto un incremento en la actividad de esta enzima a nivel hepático (Clare y cols., 2000). Nuestros resultados apoyan lo descrito anteriormente, ya que en los obesos mórbidos con alta resistencia a la insulina y en los medicados con metformina, los niveles de expresión relativa de G6Pasa son mayores que en el grupo de obesos mórbidos con baja resistencia a la insulina. El hecho de que G6Pasa haya sido detectada en la parte apical de los enterocitos, sugiere que esta enzima podría participar en el transporte transepitelial de la glucosa (Santer y cols., 2003, Stumpel y cols., 2001). En estos estudios se propone un mecanismo de liberación de glucosa al torrente sanguíneo independiente de GLUT2 y dependiente de una fosforilación previa de la glucosa por parte de la hexoquinasa y una posterior desfosforilación por parte de G6Pasa.

El primer punto de regulación de la gluconeogénesis es la conversión de oxalacetato a fosfoenolpiruvato, reacción catalizada por la enzima PEPCK, considerada otra de las enzimas clave de la gluconeogénesis, a partir de piruvato, lactato y alanina (Hanson y Reshef, 1997). En el intestino de ratas con diabetes inducida por estreptozotocina se ha descrito un aumento de la actividad y de los niveles de ARNm de PEPCK en el intestino (Rajas y cols., 2000). En este sentido hemos encontrado un aumento en los niveles de expresión relativa de ARNm de PEPCK en el yeyuno de los obesos mórbidos con alta resistencia a la insulina. No hay que descartar otras posibles funciones que han sido propuestas para PEPCK en el intestino delgado, como es su posible contribución a los niveles de piruvato disponible (Watford, 1994, Windmueller, 1984), el cual puede contribuir a la producción de lactato y alanina para que puedan ser utilizados posteriormente en la gluconeogénesis hepática (Mithieux, 2001).

Diversos estudios han puesto de manifiesto el posible papel que SREBP-1c puede tener en la regulación del metabolismo de la glucosa. A nivel hepático se ha visto en modelos animales que SREBP-1c participa en la regulación de PEPCK y G6Pasa (Ruiz y cols., 2014, Yamamoto y cols., 2004). Sin embargo, no hay información disponible sobre el papel de SREBP-1c en la regulación de la gluconeogénesis a nivel intestinal. En nuestro estudio hemos encontrado una asociación positiva entre los niveles de expresión relativa de SREBP-1c y los niveles de expresión relativa de PEPCK y G6Pasa.

La metformina actúa disminuyendo los niveles de glucosa, suprimiendo la producción de glucosa por parte del hígado (Song y cols., 2001). Actualmente, no hay estudios que evalúen el efecto de la metformina sobre la gluconeogénesis intestinal. Estudios realizados en modelos animales indican que la metformina podría ralentizar la absorción de glucosa a nivel intestinal, y que ésta tenga lugar en zonas más distales del tracto intestinal (Wilcock y Bailey, 1991, Wilcock y Bailey, 1990). Otros estudios realizados en modelos animales animales indican que el efecto normoglucemiante de la metformina en el intestino delgado podría deberse a un incremento del consumo de glucosa intestinal (Bailey y cols., 1994, Mithieux y cols., 2006). En nuestro estudio, en el grupo de obesos mórbidos medicados con metformina hemos encontrado unos niveles de expresión relativa de ARNm de GLS y PEPCK menores que en el caso de los obesos

mórbidos con alta resistencia a la insulina, e incluso llegando a niveles significativamente menores que en los obesos mórbidos con baja resistencia a la insulina en el caso del PEPCK. Esto concuerda con los datos publicados en estudios previos realizados en cultivos *in vitro* de hepatocitos de ratas y ratones donde la metformina disminuye los niveles de expresión de ARNm de PEPCK (Aatsinki y cols., 2014, Yuan y cols., 2002).

Aunque en este estudio hemos mostrado la expresión de enzimas que participan en la gluconeogénesis intestinal en humanos y que sus niveles son mayores en pacientes con alta resistencia a la insulina, posteriores estudios son necesarios para evaluar los niveles de actividad de estas enzimas y el flujo gluconeogénico en el intestino así como su papel en los estados de alta resistencia a la insulina. Es posible también que parte de la glucosa producida por el intestino delgado provenga de la glucogenolisis, ya que una cantidad pequeña pero significativa de glucógeno se ha detectado tanto en el yeyuno de ratas (Anderson y Jones, 1974) como de humanos (Field y cols., 1965).

Nuestros resultados muestran que la expresión de varios de los genes estudiados que participan en la gluconeogénesis se encuentra regulada por la glucosa y/o insulina en el yeyuno de los individuos obesos mórbidos con baja resistencia a la insulina. Está descrito que tanto en el hígado (Mithieux y cols., 1996, Minassian y cols., 1996) como en el intestino delgado (Rajas y cols., 2000, Rajas y cols., 1999), la insulina actúa inhibiendo la expresión de PEPCK y G6Pasa. En hepatocitos de rata se ha descrito que altas concentraciones de glucosa aumentan los niveles de expresión de ARNm de G6Pasa, mientras que los niveles de expresión de ARNm de PEPCK no se vieron afectados (Argaud y cols., 1997). En nuestro estudio no hemos encontrado que la G6Pasa vea afectada su expresión por altas concentraciones de glucosa y/o insulina. Sin embargo, la expresión de PEPCK aumenta de manera significativa con altas concentraciones de glucosa e insulina.

A altas concentraciones de glucosa e insulina, condiciones que se asemejan a la situación postprandial, hemos encontrado que los niveles de expresión relativa de GLS y FBPasa disminuyen de manera significativa. Hay estudios que muestran que en el intestino de rata, los niveles de ARNm de GLS son mayores en ayunas que en estado postabsortivo (Kong y cols., 2000), lo que concuerda con nuestros resultados, ya que la

condición de incubación con alta concentración de glucosa e insulina se asemeja al estado postprandial. En hepatocitos de rata, la glucosa incrementa los niveles de expresión de ARNm de FBPasa (Argaud y cols., 1997), mientras que la insulina disminuye su expresión (el-Maghrabi y cols., 1988). Sin embargo, nuestros resultados no muestran un incremento de la expresión de la FBPasa con altas dosis de glucosa. Más bien lo contrario, sobre todo cuando además existen altas dosis de insulina.

En nuestro estudio, la incubación con una concentración alta de leptina produjo un aumento significativo de los niveles de expresión relativa de ARNm de G6Pasa en comparación con la incubación realizada a baja concentración de leptina, no encontrando diferencias en el resto de genes estudiados. Los resultados que describen los efectos de la leptina sobre el metabolismo de la glucosa son contradictorios. Así, en modelos animales hay estudios que muestran un incremento en la gluconeogénesis hepática (Rossetti y cols., 1997) mientras otros muestran una disminución (Ceddia y cols., 1999). Las diferencias encontradas en la literatura publicada sobre el efecto de la leptina sobre el metabolismo de la glucosa pueden ser explicadas en parte por las diferencias en el diseño experimental; si el tratamiento con leptina es crónico o agudo, la dosis de leptina empleada o el grado de resistencia a la insulina y/o a la leptina del modelo animal empleado en el estudio. Todo esto contribuye a que la comparación entre los diferentes estudios publicados en esta área sea complicada.

En modelos animales, el tratamiento con leptina a concentraciones fisiológicas normales reduce de manera notable la producción de glucosa hepática, siendo incluso mucho más efectiva que la insulina (Anderwald y cols., 2002). Sin embargo, altas concentraciones de leptina, similares a las que se encuentran en estados de obesidad, inhiben este efecto, mostrando un incremento de la producción de glucosa hepática en comparación con los niveles de glucosa hepática que se producen con concentraciones de leptina similares a las fisiológicas (Rossetti y cols., 1997, Anderwald y cols., 2002).

5.3 Cascada de señalización de la insulina

Es bien conocido que alteraciones en la cascada de señalización de la insulina provocan resistencia a la insulina tanto *in vivo* como *in vitro*. En modelos animales de resistencia a la insulina se ha descrito en el hígado y en el músculo esquelético, una disminución de la unión de la insulina a su receptor, así como una menor actividad quinasa del receptor y unos niveles de expresión menores de los receptores de insulina y menor actividad PI3K (Kahn y cols., 1973, Folli y cols., 1993).

Estudios realizados en modelos animales e individuos con alta resistencia a la insulina muestran niveles de ARNm de IRS1 disminuidos en hígado, músculo y tejido adiposo (Anai y cols., 1998, Kovacs y cols., 2003). Sin embargo nuestros resultados difieren con lo publicado en otros tejidos, ya que en nuestro estudio los niveles de ARNm de IRS1 son mayores en el intestino de obesos mórbidos con alta resistencia a la insulina.

Por otro lado, en cuanto a las distintas subunidades que componen la PI3K, suele existir un exceso de subunidad reguladora (p85) sobre la subunidad catalítica (p110), lo que da como resultado un pool de monómeros de p85 libres que no se encuentran asociados a la subunidad catalítica. Sin embargo, existe un equilibrio entre la cantidad de monómero libre y la cantidad de heterodímero p85-p110, siendo este último el responsable de la actividad de PI3K (Mauvais-Jarvis y cols., 2002, Ueki y cols., 2003). Debido a que tanto el monómero p85 como el heterodímero p85-p110 compiten por el mismo sitio de unión a IRS1, una alteración de este equilibrio podría incrementar o disminuir la actividad de PI3K (Giorgino y cols., 1997). Diversos estudios realizados en humanos han señalado la posible relación existente entre la resistencia a la insulina y el incremento en la expresión de la subunidad p85 α en el músculo esquelético, ya que este exceso de p85 provocaría una disminución de la actividad PI3K (Bandyopadhyay y cols., 2005, Cornier y cols., 2006). Al igual que ocurría con IRS1, nuestros resultados no han sido los esperados. Hemos encontrado un aumento de p110 β en los pacientes con alta resistencia a la insulina, con lo cual la relación p85 α /p110 β ha sido significativamente menor en estos pacientes. Además, encontramos una correlación

negativa entre la relación p85 α /p110 β y la expresión de todos los genes estudiados implicados en la lipogénesis *de novo* y en la gluconeogénesis. Posteriores estudios son necesarios para evaluar el nivel de proteína de IRS1, así como su fosforilación en el intestino delgado en situaciones de resistencia a la insulina, ya que se ha propuesto una disminución de los niveles proteicos de IRS1 en situaciones de hiperinsulinemia como consecuencia de un aumento de su degradación (Araki y cols., 1995).

En modelos animales se ha descrito que la insulina posee importantes efectos fisiológicos en el desarrollo y maduración del intestino (Arsenault y Menard, 1984, Buts y cols., 1988, Buts y cols., 1997). Sin embargo, tras el destete, la mucosa intestinal deja de ser un tejido diana para la insulina, disminuyendo la concentración de receptores de la insulina, lo cual está asociado a una reducción de la respuesta por parte de los enterocitos maduros a esta hormona (Buts y cols., 1997). Sin embargo, estudios previos han mostrado la existencia de resistencia a la insulina en el intestino de sujetos obesos mórbidos (Honka y cols., 2013, Mäkinen y cols., 2015), donde se ha comprobado que el efecto estimulador de la insulina sobre la captación de glucosa intestinal no se produce en condiciones de resistencia a la insulina.

Se ha hipotetizado que el efecto de la insulina sobre SREBP-1c podría estar mediado a través de IRS1. En nuestro estudio hemos encontrado una asociación positiva entre los niveles de expresión relativa de SREBP-1c y los niveles de expresión relativa de IRS1 y p110 β . Previamente ya había sido descrita en el hígado graso de humanos una asociación positiva entre la expresión de SREBP-1c e IRS1 (Kohjima y cols., 2008).

Hasta donde conocemos, no hay estudios en humanos que evalúen el efecto de la glucosa e insulina sobre los niveles de expresión de ARNm de IRS1, p85 α y p110 β en el intestino. En las incubaciones con glucosa y/o insulina, hemos encontrado que los niveles de expresión relativa de IRS1 no se han visto afectados por las distintas condiciones de incubación, mientras que los niveles de expresión relativa de p85 α y p110 β se vieron incrementados de forma significativas cuando se incubaron con altas concentraciones de glucosa+insulina, al igual que la relación p85 α /p110 β . Estudios realizados en adipocitos de ratas muestran que condiciones de incubación con alta concentración de glucosa e insulina disminuye los niveles de proteína de IRS1, pero

este efecto no se ve cuando los niveles de glucosa son bajos (Buren y cols., 2003). En estos estudios, la disminución de los niveles de IRS1 se ha visto tras un periodo de incubación de 24h, no siendo detectado en las primeras horas de incubación. Hay que reseñar que en nuestro estudio las IECs fueron incubadas durante un periodo de tres horas, tiempo en el cual no hemos encontrado efecto alguno sobre los niveles de expresión de ARNm de IRS1.

En tejidos muy vascularizados, como es el caso del hígado, se ha propuesto la existencia de un mecanismo de resistencia a la insulina selectiva, donde la insulina no es capaz de suprimir la producción de glucosa pero sin embargo continúa promoviendo la síntesis de lípidos (Brown y Goldstein, 2008, Laplante y Sabatini, 2010). Esta resistencia a la insulina selectiva propone que hay un punto en la ruta de la señalización de la insulina en el cual la regulación de la lipogénesis y la gluconeogénesis divergen, teniendo estas dos rutas distinta sensibilidad a la acción de la insulina. Los intentos para resolver los mecanismos por los cuales el contenido de triglicéridos aumenta paradójicamente en el hígado en situaciones de resistencia a la insulina se han centrado en la regulación de la lipogénesis *de novo* por parte de SREBP-1c (Brown y Goldstein, 1997, Shimomura y cols., 1997). Evidencias de la importancia de la lipogénesis *de novo* en la síntesis de triglicéridos en el hígado en resistencia a la insulina se ha puesto de manifiesto en el aumento de la lipogénesis *de novo* en el hígado en humanos con resistencia a la insulina (Schwarz y cols., 2003). Se ha hipotetizado la existencia de un punto en el cual la cascada de señalización de la insulina separa su efecto anabólico en una ruta que controla la gluconeogénesis y otra la lipogénesis *de novo*. En nuestro estudio no hemos encontrado un incremento en los niveles de expresión de los genes implicados en la lipogénesis *de novo*, aunque estudios previos realizados tanto en humanos como en modelos animales con resistencia a la insulina (Couture y cols., 2014, Haidari y cols., 2002) han descrito un incremento en la lipogénesis *de novo* a nivel intestinal medida por la incorporación de acetato marcado. Posteriores estudios serían necesarios para comprobar si el intestino también muestra esta resistencia selectiva a la insulina.

Nuestros resultados muestran un incremento en los niveles de expresión de ARNm de IRS1, p85 α y p110 β en las IECs incubadas con altas dosis de leptina, en

comparación con los incubados con una dosis baja. Sin embargo, hasta donde conocemos, no hay ningún estudio que evalúe el efecto directo de la leptina sobre los niveles de expresión de los genes implicados en la señalización de la insulina en enterocitos. Tanto la leptina como la insulina comparten vía de señalización a través de IRS1 y PI3K. Sin embargo, aunque los resultados obtenidos en las incubaciones con altas dosis de insulina o leptina son parecidos, no son exactamente iguales, sobre todo a nivel de IRS1. Esto nos estaría indicando que puede existir un mecanismo regulador de la expresión de IRS1 por parte de la leptina, independientemente del posible efecto de la insulina. Esto podría explicar el incremento de los niveles de IRS1 observado en los obesos mórbidos con alta resistencia a la insulina. Diversos estudios han señalado que el proceso de señalización que media el efecto directo de la leptina interacciona en diversos puntos con los mecanismo de transducción de la señal de la insulina (Cohen y cols., 1996, Szanto y Kahn, 2000). En células HepG2 tratadas con concentraciones de leptina circulantes similares a las que se encuentran en pacientes obesos, se ha comprobado que no hay un efecto aditivo sobre esta vía de señalización cuando las células fueron tratadas con leptina e insulina (Cohen y cols., 1996). Otros estudios muestran alteraciones en la acción de la insulina tras un tratamiento con leptina en hepatocitos de rata (Muller y cols., 1997), en la líneas celulares hepáticas humanas (Cohen y cols., 1996) y en la línea celular L6 de rata (Sweeney y cols., 2001). Estudios realizados *in vivo* en ratas han puesto de manifiesto que el tratamiento crónico con leptina altera la vía de señalización de la insulina en el hígado. Tanto la leptina como la insulina provocan un aumento de la asociación de IRS1 con p85, la subunidad reguladora de PI3K, pero con el tratamiento crónico de leptina, tanto la acción de la leptina como la insulina sobre la asociación de IRS1 con p85 desapareció (Benomar y cols., 2005).

6. Conclusiones

6.1.1 Lipogénesis *de novo* y síntesis de quilomicrones

- Los niveles de quilomicrones en suero son mayores en los pacientes obesos mórbidos con alta resistencia a la insulina y en los medicados con metformina.
- En los obesos mórbidos con alta resistencia a la insulina y en los medicados con metformina, el nivel de triglicéridos en suero fue mayor mientras que el contenido de triglicéridos en el yeyuno fue menor.
- El yeyuno de obesos mórbidos con alta resistencia a la insulina presenta una disminución de la expresión de genes involucrados en la síntesis *de novo* de ácidos grasos, y un incremento en la expresión de los genes implicados en la síntesis de acetyl-CoA y lipoproteínas.
- El tratamiento con metformina mejora los niveles de expresión de muchos de estos genes hasta el punto de que desaparecen las diferencias significativas con respecto a los obesos mórbidos con baja resistencia a la insulina.
- En las IECs de obesos mórbidos con baja resistencia a la insulina incubadas con alta dosis de glucosa e insulina, situación similar al estado postprandial, se produjo un incremento en los niveles de expresión de genes relacionados con la síntesis de lipoproteínas intestinales.
- En estas mismas condiciones de incubación de las IECs, un incremento en la lipogénesis *de novo* podría estar provocado por el aumento en los niveles de expresión relativa de ACC1 y PDHB y del factor de transcripción regulador de la lipogénesis SREBP-1c.

6.1.2 Glucogenogénesis

- En los obesos mórbidos con alta resistencia a la insulina, los niveles de expresión relativa de los genes que participan en la gluconeogénesis intestinal (GLS, PEPCK y G6Pasa) se encuentran elevados.
- El tratamiento con metformina disminuye ligeramente este incremento, siendo más acusado en el caso de la PEPCK.
- SREBP-1c, además de ser un importante factor de regulación de la lipogénesis, podría participar en la regulación del metabolismo de la glucosa al correlacionar con los niveles de expresión de ARNm de PEPCK y G6Pasa.
- En las IECs de obesos mórbidos con baja resistencia a la insulina incubadas con alta dosis de glucosa e insulina, situación similar al estado postprandial, los niveles de expresión relativa de GLS y FBPasa disminuyeron mientras que los de PEPCK aumentaron, lo que pone de manifiesto la regulación de la gluconeogénesis por parte de la glucosa e insulina.
- La leptina, en concentraciones similares a las que encontramos en pacientes obesos mórbidos con alta resistencia a la insulina, produce un incremento en los niveles de expresión de genes implicados en la gluconeogénesis, lo cual puede contribuir al incremento de la producción endógena de glucosa.

6.1.3 Cascada de señalización de la insulina

- Los niveles de expresión relativa de IRS-1 y p110 β han sido mayores en los pacientes obesos mórbidos con alta resistencia a la insulina.
- Los niveles de expresión relativa de IRS1 no se han visto afectados por las distintas condiciones de incubación de glucosa y/o insulina, mientras que los niveles de expresión relativa de p85 α y p110 β , así como la relación p85 α /p110 β se vieron incrementados de forma significativas cuando las IECs se incubaron con altas concentraciones de glucosa e insulina, condiciones de incubación similares al estado postprandial.
- La incubación de IECs con dosis de leptina similares a las que se encuentran en los obesos mórbidos con alta resistencia a la insulina produjo un incremento en los niveles de expresión de ARNm de IRS1, p85 α y p110 β , pudiendo así la leptina alterar la vía de señalización de insulina en las IECs.
- Este efecto de altas concentraciones de leptina sobre la vía de señalización de la insulina podría explicar el incremento de los niveles de expresión relativa de IRS1 y p110 β observado en los obesos mórbidos con alta resistencia a la insulina.

7. Bibliografía

A

- Aatsinki SM, Buler M, Salomaki H y cols. 2014. Metformin induces PGC-1alpha expression and selectively affects hepatic PGC-1alpha functions. *Br J Pharmacol*, **171**: 2351-2363.
- Abumrad NA y Davidson NO. 2012. Role of the gut in lipid homeostasis. *Physiol Rev*, **92**; 1061-1085.
- Adams T D, Gress RE, Smith S, y cols. 2007. Long-term mortality after gastric bypass surgery. *N Engl J Med*, **357**; 753-761.
- Adiels M, Olofsson SO, Taskinen MR y cols. 2008. Overproduction of very low-density lipoproteins is the hallmark of the dyslipidemia in the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **28**; 1225-1236.
- Adroque HJ. 1992. Glucose homeostasis and the kidney. *Kidney Int*, **42**; 1266-1282.
- Aghamohammadzadeh R y Heagerty AM. 2012. Obesity-related hypertension: epidemiology, pathophysiology, treatments, and the contribution of perivascular adipose tissue. *Ann Med*, **44**; S74-S84.
- Ahima RS y Flier JS. 2000. Leptin. *Annu Rev Physiol*, **62**; 413-437.
- Alipour A, Elte JW, van Zaanen HC y cols. 2008. Novel aspects of postprandial lipemia in relation to atherosclerosis. *Atheroscler Suppl*, **9**; 39-44.
- Allison DB, Kaprio J, Korkeila M y cols. 1996. The heritability of body mass index among an international sample of monozygotic twins reared apart. *Int J Obes Relat Metab Disord*, **20**; 501-506.
- Anai M, Funaki M, Ogihara T y cols. 1998. Altered expression levels and impaired steps in the pathway to phosphatidylinositol 3-kinase activation via insulin receptor substrates 1 and 2 in Zucker fatty rats. *Diabetes*, **47**; 13-23.
- Anderson JW. 1974. Glucose metabolism in jejunal mucosa of fed, fasted, and streptozotocin-diabetic rats. *Am J Physiol*, **226**; 226-229.
- Anderson JW y Jones AL. 1974. Biochemical and ultrastructural study of glycogen in jejunal mucosa of diabetic rat. *Proc Soc Exp Biol Med*, **145**; 268-272.
- Anderwald C, Muller G, Koca G y cols. 2002. Short-term leptin-dependent inhibition of hepatic gluconeogenesis is mediated by insulin receptor substrate-2. *Mol Endocrinol*, **16**; 1612-1628.
- Andrikopoulos S y Proietto J. 1995. The biochemical basis of increased hepatic glucose production in a mouse model of type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*, **38**; 1389-1396.
- Andrikopoulos S, Rosella G, Gaskin E y cols. 1993. Impaired regulation of hepatic fructose-1,6-bisphosphatase in the New Zealand obese mouse model of NIDDM. *Diabetes*, **42**; 1731-1736.
- Araki E, Haag BL 3rd, Matsuda K y cols. 1995. Characterization and regulation of the mouse insulin receptor substrate gene promoter. *Mol Endocrinol*, **9**; 1367-1379.
- Arden SD, Zahn T, Steegers S y cols. 1999. Molecular cloning of a pancreatic islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein. *Diabetes*, **48**; 531-542.
- Argaud D, Kirby TL, Newgard CB y cols. 1997. Stimulation of glucose-6-phosphatase gene expression by glucose and fructose-2,6-bisphosphate. *J Biol Chem*, **272**; 12854-12861.

- Arsenault P y Menard D. 1984. Insulin influences the maturation and proliferation of suckling mouse intestinal mucosa in serum-free organ culture. *Biol Neonate*, **46**; 229-236.
- Astrup A. 2011. The relevance of increased fat oxidation for body-weight management: metabolic inflexibility in the predisposition to weight gain. *Obes Rev*, **12**; 859-865.

~~-B-~~

- Bailey CJ, Mynett KJ y Page T. 1994. Importance of the intestine as a site of metformin-stimulated glucose utilization. *Br J Pharmacol*, **112**; 671-675.
- Bandyopadhyay GK, Yu JG, Ofrecio J y cols. 2005. Increased p85/55/50 expression and decreased phosphatidylinositol 3-kinase activity in insulin-resistant human skeletal muscle. *Diabetes*, **54**; 2351-2359.
- Baratta M. 2002. Leptin--from a signal of adiposity to a hormonal mediator in peripheral tissues. *Med Sci Monit*, **8**; RA282-292.
- Barrenetxe J, Villaro AC, Guembe L y cols. 2002. Distribution of the long leptin receptor isoform in brush border, basolateral membrane, and cytoplasm of enterocytes. *Gut*, **50**; 797-802.
- Barzilai N y Rossetti L. 1993. Role of glucokinase and glucose-6-phosphatase in the acute and chronic regulation of hepatic glucose fluxes by insulin. *J Biol Chem*, **268**; 25019-25025.
- Bauer DE, Hatzivassiliou G, Zhao F y cols. 2005. ATP citrate lyase is an important component of cell growth and transformation. *Oncogene*, **24**; 6314-6322.
- Beale EG, Harvey BJ y Forest C. 2007. PCK1 and PCK2 as candidate diabetes and obesity genes. *Cell Biochem Biophys*, **48**; 89-95.
- Becard D, Hainault I, Azzout-Marniche D y cols. 2001. Adenovirus-mediated overexpression of sterol regulatory element binding protein-1c mimics insulin effects on hepatic gene expression and glucose homeostasis in diabetic mice. *Diabetes*, **50**; 2425-2430.
- Beisiegel U, Weber W, Ihrke G y cols. 1989. The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein. *Nature*, **341**; 162-164.
- Bellisari A. 2008. Evolutionary origins of obesity. *Obes Rev*, **9**; 165-180.
- Benomar Y, Wetzler S, Larue-Achagiotis C y cols. 2005. In vivo leptin infusion impairs insulin and leptin signalling in liver and hypothalamus. *Mol Cell Endocrinol*, **242**; 59-66.
- Bergman RN y Ader M. 2000. Free fatty acids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Trends Endocrinol Metab*, **11**; 351-356.
- Berndt J, Kovacs P, Ruschke K y cols. 2007. Fatty acid synthase gene expression in human adipose tissue: association with obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia*, **50**; 1472-1480.
- Bi Y, Wu W, Shi J y cols. 2014. Role for sterol regulatory element binding protein-1c activation in mediating skeletal muscle insulin resistance via repression of rat insulin receptor substrate-1 transcription. *Diabetologia*, **57**; 592-602.

- Bikman BT, Zheng D, Pories WJ y cols. 2008. Mechanism for improved insulin sensitivity after gastric bypass surgery. *J Clin Endocrinol Metab*, **93**; 4656-4663.
- Bismut H, Hers HG y Van Schaftingen E. 1993. Conversion of fructose to glucose in the rabbit small intestine. A reappraisal of the direct pathway. *Eur J Biochem*, **213**; 721-726.
- Blaak EE. 2009. *Energy balance in humans*. In: Obesity: Science to Practice. Wiley-Blackweel eds.
- Black DD. 2007. Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption. I. Development of intestinal lipid absorption: cellular events in chylomicron assembly and secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **293**; G519-G524.
- Bluher M, Patti ME, Gesta S y cols. 2004. Intrinsic heterogeneity in adipose tissue of fat-specific insulin receptor knock-out mice is associated with differences in patterns of gene expression. *J Biol Chem*, **279**; 31891-31901.
- Bollati V y Baccarelli A. 2010. Environmental epigenetics. *Heredity (Edinb)*, **105**; 105-112.
- Bournat JC y Brown CW. 2010. Mitochondrial dysfunction in obesity. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, **17**; 446-452.
- Boyle JG, Logan PJ, Jones GC y cols. 2011. AMP-activated protein kinase is activated in adipose tissue of individuals with type 2 diabetes treated with metformin: a randomised glycaemia-controlled crossover study. *Diabetologia*, **54**; 1799-1809.
- Brachmann SM, Ueki K, Engelman JA y cols. 2005. Phosphoinositide 3-kinase catalytic subunit deletion and regulatory subunit deletion have opposite effects on insulin sensitivity in mice. *Mol Cell Biol*, **25**; 1596-1607.
- Bray GA. 2010. Soft drink consumption and obesity: it is all about fructose. *Curr Opin Lipidol*, **21**; 51-57.
- Bray GA. 2004. *Historical framework for the development of ideas about obesity*. In: Handbook of Obesity: Etiology and Pathophysiology. Bray Ga, Bouchard C, eds. Second ed. New York.
- Brondel L, Romer MA, Nougues PM y cols. 2010. Acute partial sleep deprivation increases food intake in healthy men. *Am J Clin Nutr*, **91**; 1550-1559.
- Brown ML, Ramprasad MP, Umeda PK y cols. 2000. A macrophage receptor for apolipoprotein B48: cloning, expression, and atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**; 7488-7493.
- Brown MS y Goldstein JL. 1997. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*, **89**; 331-340.
- Brown MS y Goldstein JL. 2008. Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox. *Cell Metab*, **7**; 95-96.
- Brownsey RW, Boone AN, Elliott JE, y cols. 2006. Regulation of acetyl-CoA carboxylase. *Biochem Soc Trans*, **34**; 223-227.
- Buchwald H, Estok R, Fahrbach, K y cols. 2009. Weight and type 2 diabetes after bariatric surgery: systematic review and meta-analysis. *Am J Med*, **122**; 248-256.
- Buhman KK, Smith SJ, Stone SJ y cols. 2002. DGAT1 is not essential for intestinal triacylglycerol absorption or chylomicron synthesis. *J Biol Chem*, **277**; 25474-25479.

- Buren J, Liu HX, Lauritz J y cols. 2003. High glucose and insulin in combination cause insulin receptor substrate-1 and -2 depletion and protein kinase B desensitisation in primary cultured rat adipocytes: possible implications for insulin resistance in type 2 diabetes. *Eur J Endocrinol*, **148**; 157-167.
- Buts JP, De Keyser N y Dive C. 1988. Intestinal development in the suckling rat: effect of insulin on the maturation of villus and crypt cell functions. *Eur J Clin Invest*, **18**; 391-398.
- Buts JP, De Keyser N, Marandi S y cols. 1997. Expression of insulin receptors and of 60-kDa receptor substrate in rat mature and immature enterocytes. *Am J Physiol*, **273**; G217-G226.

-c-

- Campbell JE y Drucker DJ. 2013. Pharmacology, physiology, and mechanisms of incretin hormone action. *Cell Metab*, **17**; 819-837.
- Cao J, Cheng L y Shi Y. 2007. Catalytic properties of MGAT3, a putative triacylglycerol synthase. *J Lipid Res*, **48**; 583-591.
- Cao J, Hawkins E, Brozinick J y cols. 2004. A predominant role of acyl-CoA:monoacylglycerol acyltransferase-2 in dietary fat absorption implicated by tissue distribution, subcellular localization, and up-regulation by high fat diet. *J Biol Chem*, **279**; 18878-18886.
- Cappuccio FP, Taggart FM, Kandala NB y cols. 2008. Meta-analysis of short sleep duration and obesity in children and adults. *Sleep*, **31**; 619-626.
- Cardona F, Tinahones FJ, Collantes E y cols. 2003. The elevated prevalence of apolipoprotein E2 in patients with gout is associated with reduced renal excretion of urates. *Rheumatology (Oxford)*, **42**; 468-472.
- Caro JF, Sinha MK, Kolaczynski JW y cols. 1996. Leptin: the tale of an obesity gene. *Diabetes*, **45**; 1455-1462.
- Cartwright IJ y Higgins JA. 1999. Isolated rabbit enterocytes as a model cell system for investigations of chylomicron assembly and secretion. *J Lipid Res*, **40**; 1357-1365.
- Carvalho JB, Ribeiro EB, Folli F y cols. 2003. Interaction between leptin and insulin signaling pathways differentially affects JAK-STAT and PI 3-kinase-mediated signaling in rat liver. *Biol Chem*, **384**; 151-159.
- Ceddia RB, Lopes G, Souza HM y cols. 1999. Acute effects of leptin on glucose metabolism of in situ rat perfused livers and isolated hepatocytes. *Int J Obes Relat Metab Disord*, **23**; 1207-1212.
- Cersosimo E, Garlick P y Ferretti J. 2000. Renal substrate metabolism and gluconeogenesis during hypoglycemia in humans. *Diabetes*, **49**; 1186-1193.
- Claycombe KJ, Jones BH, Standridge MK y cols. 1998. Insulin increases fatty acid synthase gene transcription in human adipocytes. *Am J Physiol*, **274**; R1253-R1259.
- Clore JN, Stillman J y Sugerman H. 2000. Glucose-6-phosphatase flux in vitro is increased in type 2 diabetes. *Diabetes*, **49**; 969-974.

- Cohen B, Novick D y Rubinstein M. 1996. Modulation of insulin activities by leptin. *Science*, **274**; 1185-1188.
- Cohen RV, Pinheiro JC, Schiavon CA y cols. 2012. Effects of gastric bypass surgery in patients with type 2 diabetes and only mild obesity. *Diabetes Care*, **35**; 1420-1428.
- Colditz GA, Willett WC, Rotnitzky A y cols. 1995. Weight gain as a risk factor for clinical diabetes mellitus in women. *Ann Intern Med*, **122**; 481-486.
- Colquitt JL, Picot J, Loveman E y cols. J. 2009. Surgery for obesity. *Cochrane Database Syst Rev*, CD003641.
- Cornier MA, Bessesen DH, Gurevich I y cols. 2006. Nutritional upregulation of p85alpha expression is an early molecular manifestation of insulin resistance. *Diabetologia*, **49**; 748-754.
- Couture P, Tremblay AJ, Kelly I y cols. 2014. Key intestinal genes involved in lipoprotein metabolism are downregulated in dyslipidemic men with insulin resistance. *J Lipid Res*, **55**; 128-137.
- Creutzfeldt W, Mende D, Willms B y cols. 1970. Vascular basement membrane thickness in muscle of spiny mice and activities of glycolysis and gluconeogenesis in the liver of animals with spontaneous and experimental diabetes and of untreated human diabetics. *Diabetologia*, **6**; 356-360.
- Croset M, Rajas F, Zitoun C y cols. 2001. Rat small intestine is an insulin-sensitive gluconeogenic organ. *Diabetes*, **50**; 740-746.
- Cuchel M, Bloedon LT, Szapary PO y cols. 2007. Inhibition of microsomal triglyceride transfer protein in familial hypercholesterolemia. *N Engl J Med*, **356**; 148-156.
- Cummings DE, Overduin J y Foster-Schubert KE. 2004. Gastric bypass for obesity: mechanisms of weight loss and diabetes resolution. *J Clin Endocrinol Metab*, **89**; 2608-2615.
- Curtin A, Deegan P, Owens D y cols. 1996. Elevated triglyceride-rich lipoproteins in diabetes. A study of apolipoprotein B-48. *Acta Diabetol*, **33**; 205-210.
- Chakravarty K, Cassuto H, Reshef L y cols. 2005. Factors that control the tissue-specific transcription of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase-C. *Crit Rev Biochem*, **40**; 129-154.
- Chaput JP y Tremblay A. 2009. Obesity and physical inactivity: the relevance of reconsidering the notion of sedentariness. *Obes Facts*, **2**; 249-254.
- Cheng D, Nelson TC, Chen J y cols. 2003. Identification of acyl coenzyme A:monoacylglycerol acyltransferase 3, an intestinal specific enzyme implicated in dietary fat absorption. *J Biol Chem*, **278**; 13611-13614.
- Chong MF, Fielding BA y Frayn K. N. 2007. Mechanisms for the acute effect of fructose on postprandial lipemia. *Am J Clin Nutr*, **85**; 1511-1520.
- Chypre M, Zaidi N y Smans K. 2012. ATP-citrate lyase: a mini-review. *Biochem Biophys Res Commun*, **422**; 1-4.

-0-

- D'Agostino RB Jr., Hamman RF, Karter AJ y cols. Cardiovascular disease risk factors predict the development of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes Care*, **27**; 2234-2240.
- Dall'Asta C, Vedani P, Manunta P y cols. 2009. Effect of weight loss through laparoscopic gastric banding on blood pressure, plasma renin activity and aldosterone levels in morbid obesity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, **19**; 110-114.
- De Coster S y van Larebeke N. 2012. Endocrine-disrupting chemicals: associated disorders and mechanisms of action. *J Environ Public Health*, **2012**. 2012: 713696.
- Deacon CF y Ahren B. Physiology of incretins in health and disease. 2011. *Rev Diabet Stud*, **8**; 293-306.
- Degenhardt TP, Thorpe SR y Baynes JW. 1998. Chemical modification of proteins by methylglyoxal. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, **44**; 1139-1145.
- Deng Y y Scherer PE. 2010. Adipokines as novel biomarkers and regulators of the metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci*, **1212**; E1-E19.
- Dickens M, Svitek CA, Culbert AA y cols. 1998. Central role for phosphatidylinositide 3-kinase in the repression of glucose-6-phosphatase gene transcription by insulin. *J Biol Chem*, **273**; 20144-201449.
- Dixon JB, Zimmet P, Alberti KG y cols. 2011. Bariatric surgery: an IDF statement for obese Type 2 diabetes. *Diabet Med*, **28**; 628-642.
- Ducluzeau PH, Perretti N, Laville M y cols. 2001. Regulation by insulin of gene expression in human skeletal muscle and adipose tissue. Evidence for specific defects in type 2 diabetes. *Diabetes*, **50**; 1134-1142.
- Duez H, Lamarche B, Uffelman KD y cols. 2006. Hyperinsulinemia is associated with increased production rate of intestinal apolipoprotein B-48-containing lipoproteins in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **26**; 1357-1363.
- Duez H, Lamarche B, Valero R y cols. 2008. Both intestinal and hepatic lipoprotein production are stimulated by an acute elevation of plasma free fatty acids in humans. *Circulation*, **117**; 2369-2376.

-E-

- Eberle D, Hegarty B, Bossard P y cols. 2004. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie*, **86**; 839-848.
- Egan JM, Bulotta A, Hui H y cols. 2003. GLP-1 receptor agonists are growth and differentiation factors for pancreatic islet beta cells. *Diabetes Metab Res Rev*, **19**; 115-123.
- Eissing L, Scherer T, Todter K y cols. 2013. De novo lipogenesis in human fat and liver is linked to ChREBP-beta and metabolic health. *Nat Commun*, **4**; 1528.
- Ekberg K, Landau BR, Wajngot A y cols. 1999. Contributions by kidney and liver to glucose production in the postabsorptive state and after 60 h of fasting. *Diabetes*, **48**; 292-298.

el-Maghrabi MR, Pilkis J, Marker AJ y cols. 1988. cDNA sequence of rat liver fructose-1,6-bisphosphatase and evidence for down-regulation of its mRNA by insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**; 8430-8434.

-f-

Fanjul C, Barrenetxe J, Inigo C y cols. 2012. Leptin regulates sugar and amino acids transport in the human intestinal cell line Caco-2. *Acta Physiol (Oxf)*, **205**; 82-91.

Federico LM, Naples M, Taylor D y cols. 2006. Intestinal insulin resistance and aberrant production of apolipoprotein B48 lipoproteins in an animal model of insulin resistance and metabolic dyslipidemia: evidence for activation of protein tyrosine phosphatase-1B, extracellular signal-related kinase, and sterol regulatory element-binding protein-1c in the fructose-fed hamster intestine. *Diabetes*, **55**; 1316-1326.

Ferns G, Ketis V y Griffin B. 2008. Investigation and management of hypertriglyceridaemia. *J Clin Pathol*, **61**; 1174-1183.

Field FJ, Born E y Mathur SN. 2003. Fatty acid flux suppresses fatty acid synthesis in hamster intestine independently of SREBP-1 expression. *J Lipid Res*, **44**; 1199-1208.

Field JB, Epstein S y Egan T. 1965. Studies in Glycogen Storage Diseases. I. Intestinal Glucose-6-Phosphatase Activity in Patients with Von Gierke's Disease and Their Parents. *J Clin Invest*, **44**; 1240-1247.

Flegal KM, Kit BK, Orpana H y cols. 2013. Association of all-cause mortality with overweight and obesity using standard body mass index categories: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*, **309**; 71-82.

Folch J, Lees M y Sloane Stanley GH. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*, **226**; 497-509.

Folli F, Saad MJ, Backer JM y cols. 1993. Regulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity in liver and muscle of animal models of insulin-resistant and insulin-deficient diabetes mellitus. *J Clin Invest*, **92**; 1787-1794.

Fontaine KR, Redden DT, Wang C y cols. 2003. Years of life lost due to obesity. *JAMA*, **289**; 187-193.

Foretz M, Pacot C, Dugail I y cols. 1999. ADD1/SREBP-1c is required in the activation of hepatic lipogenic gene expression by glucose. *Mol Cell Biol*, **19**; 3760-3768.

Foster-Powell K, Holt SH y Brand-Miller JC. 2002. International table of glycemic index and glycemic load values. 2002. *Am J Clin Nutr*, **76**; 5-56.

Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN y cols. 2007. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science*, **316**; 889-894.

Frayn KN y Kingman SM. 1995. Dietary sugars and lipid metabolism in humans. *Am J Clin Nutr*, **62**; 250S-261S.

- Freedman DS, Khan LK, Serdula MK y cols. 2002. Trends and correlates of class 3 obesity in the United States from 1990 through 2000. *JAMA*, **288**; 1758-1761.
- Friedewald WT, Levy RI y Fredrickson DS. 1972. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*, **18**; 499-502.
- Fritscher LG, Mottin CC, Canani S y cols. 2007. Obesity and obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome: the impact of bariatric surgery. *Obes Surg*, **17**; 95-99.
- Fruhbeck G. 2002. Peripheral actions of leptin and its involvement in disease. *Nutr Rev*, **60**; S47-S55.
- Fukuda H, Katsurada A y Iritani N. 1992. Effects of nutrients and hormones on gene expression of ATP citrate-lyase in rat liver. *Eur J Biochem*, **209**; 217-222.

-4-

- Galgani J y Ravussin E. 2008. Energy metabolism, fuel selection and body weight regulation. *Int J Obes (Lond)*, **32**; S109-S119.
- Gallardo N, Bonzon-Kulichenko E, Fernandez-Agullo T y cols. 2007. Tissue-specific effects of central leptin on the expression of genes involved in lipid metabolism in liver and white adipose tissue. *Endocrinology*, **148**; 5604-5610.
- Geering B, Cutillas PR, Nock G y cols. 2007. Class IA phosphoinositide 3-kinases are obligate p85-p110 heterodimers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**; 7809-7814.
- Ghandehari H, Le V, Kamal-Bahl S y cols. 2009. Abdominal obesity and the spectrum of global cardiometabolic risks in US adults. *Int J Obes (Lond)*, **33**; 239-248.
- Giorgino F, Pedrini MT, Matera L y cols. 1997. Specific increase in p85 α expression in response to dexamethasone is associated with inhibition of insulin-like growth factor-I stimulated phosphatidylinositol 3-kinase activity in cultured muscle cells. *J Biol Chem*, **272**; 7455-7463.
- Goodridge AG. 1986. Regulation of the gene for fatty acid synthase. *Fed Proc*, **45**; 2399-2405.
- Gordon DA y Jamil H. 2000. Progress towards understanding the role of microsomal triglyceride transfer protein in apolipoprotein-B lipoprotein assembly. *Biochim Biophys Acta*, **1486**; 72-83.
- Gregg EW, Cheng YJ, Narayan KM y cols. 2007. The relative contributions of different levels of overweight and obesity to the increased prevalence of diabetes in the United States: 1976-2004. *Prev Med*, **45**; 348-352.
- Griffin MJ y Sul HS. 2004. Insulin regulation of fatty acid synthase gene transcription: roles of USF and SREBP-1c. *IUBMB Life*, **56**; 595-600.
- Grimmsmann T, Levin K, Meyer MM y cols. 2002. Delays in insulin signaling towards glucose disposal in human skeletal muscle. *J Endocrinol*, **172**; 645-651.
- Guh DP, Zhang W, Bansback N y cols. 2009. The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health*, **9**; 88.

- Guilmeau S, Buyse M y Bado A. 2004. Gastric leptin: a new manager of gastrointestinal function. *Curr Opin Pharmacol*, **4**; 561-566.
- Guillet-Deniau I, Mieulet V, Le Lay S y cols. 2002. Sterol regulatory element binding protein-1c expression and action in rat muscles: insulin-like effects on the control of glycolytic and lipogenic enzymes and UCP3 gene expression. *Diabetes*, **51**; 1722-1728.
- Gumbs AA, Modlin IM y Ballantyne GH. 2005. Changes in insulin resistance following bariatric surgery: role of caloric restriction and weight loss. *Obes Surg*, **15**; 462-473.
- Guo Q, Avramoglu RK y Adeli K. 2005. Intestinal assembly and secretion of highly dense/lipid-poor apolipoprotein B48-containing lipoprotein particles in the fasting state: evidence for induction by insulin resistance and exogenous fatty acids. *Metabolism*, **54**; 689-697.
- Gutiérrez-Repiso C, Sorigure F, Rubio-Martín E y cols. 2014. Night-time sleep duration and the incidence of obesity and type 2 diabetes. Findings from the prospective Pizarra study. *Sleep Med*, **15**; 1398-1404.

-#-

- Haffner SM, Foster DM, Kushwaha RS y cols. 1984. Retarded chylomicron apolipoprotein-B catabolism in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic subjects with lipaemia. *Diabetologia*, **26**; 349-354.
- Haghighatdoost F, Karimi G, Esmailzadeh A y cols. 2012. Sleep deprivation is associated with lower diet quality indices and higher rate of general and central obesity among young female students in Iran. *Nutrition*, **28**; 1146-1150.
- Hahn P y Wei-Ning H. 1986. Gluconeogenesis from lactate in the small intestinal mucosa of suckling rats. *Pediatr Res*, **20**; 1321-1323.
- Haidari M, Leung N, Mahbub F y cols. 2002. Fasting and postprandial overproduction of intestinally derived lipoproteins in an animal model of insulin resistance. Evidence that chronic fructose feeding in the hamster is accompanied by enhanced intestinal de novo lipogenesis and ApoB48-containing lipoprotein overproduction. *J Biol Chem*, **277**; 31646-31655.
- Hall KD, Heymsfield SB, Kemnitz JW y cols. 2012. Energy balance and its components: implications for body weight regulation. *Am J Clin Nutr*, **95**; 989-994.
- Hamilton RL, Wong JS, Cham CM y cols. 1998. Chylomicron-sized lipid particles are formed in the setting of apolipoprotein B deficiency. *J Lipid Res*, **39**; 1543-1557.
- Hanniman EA, Lambert G, Inoue Y y cols. 2006. Apolipoprotein A-IV is regulated by nutritional and metabolic stress: involvement of glucocorticoids, HNF-4 alpha, and PGC-1 alpha. *J Lipid Res*, **47**; 2503-2514.
- Hansen GH, Niels-Christiansen LL y Danielsen EM. 2008. Leptin and the obesity receptor (OB-R) in the small intestine and colon: a colocalization study. *J Histochem Cytochem*, **56**; 677-685.
- Hanson RW. 2009. Thematic minireview series: a perspective on the biology of phosphoenolpyruvate carboxykinase 55 years after its discovery. *J Biol Chem*, **284**; 27021-27023.

- Hanson RW y Reshef L. 1997. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. *Annu Rev Biochem*, **66**; 581-611.
- Hanson RW y Reshef L. 2003. Glyceroneogenesis revisited. *Biochimie*, **85**; 1199-1205.
- Harbis A, Perdreau S, Vincent-Baudry S y cols. 2004. Glycemic and insulinemic meal responses modulate postprandial hepatic and intestinal lipoprotein accumulation in obese, insulin-resistant subjects. *Am J Clin Nutr*, **80**; 896-902.
- Harris RA, Bowker-Kinley MM, Huang B y cols. 2002. Regulation of the activity of the pyruvate dehydrogenase complex. *Adv Enzyme Regul*, **42**; 249-259.
- Havel RJ y Hamilton RL. 2004. Hepatic catabolism of remnant lipoproteins: where the action is. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **24**; 213-215.
- Hayashi H, Fujimoto K, Cardelli JA y cols. 1990a. Fat feeding increases size, but not number, of chylomicrons produced by small intestine. *Am J Physiol*, **259**; G709-G719.
- Hayashi H, Nutting DF, Fujimoto K y cols. 1990b. Transport of lipid and apolipoproteins A-I and A-IV in intestinal lymph of the rat. *J Lipid Res*, **31**; 1613-1625.
- Hayashi H, Sato Y, Kanai S y cols. 2002. Increased lymphatic lipid transport in genetically diabetic obese rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **282**; G69-G76.
- Hegarty BD, Bobard A, Hainault I y cols. 2005. Distinct roles of insulin and liver X receptor in the induction and cleavage of sterol regulatory element-binding protein-1c. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**; 791-796.
- Hickey MS, Pories WJ, MacDonald KG Jr. y cols. 1998. A new paradigm for type 2 diabetes mellitus: could it be a disease of the foregut? *Ann Surg*, **227**; 637-643.
- Hogue JC, Lamarche B, Tremblay AJ y cols. 2007. Evidence of increased secretion of apolipoprotein B-48-containing lipoproteins in subjects with type 2 diabetes. *J Lipid Res*, **48**; 1336-1342.
- Holst JJ, Knop FK, Vilsboll T, y cols. 2011. Loss of incretin effect is a specific, important, and early characteristic of type 2 diabetes. *Diabetes Care*, **34**; S251-S257.
- Honka H, Makinen J, Hannukainen JC y cols. 2013. Validation of [18F] fluorodeoxyglucose and positron emission tomography (PET) for the measurement of intestinal metabolism in pigs, and evidence of intestinal insulin resistance in patients with morbid obesity. *Diabetologia*, **56**; 893-900.
- Hopkins PN, Heiss G, Ellison RC y cols. 2003. Coronary artery disease risk in familial combined hyperlipidemia and familial hypertriglyceridemia: a case-control comparison from the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study. *Circulation*, **108**; 519-523.
- Horton JD, Goldstein JL y Brown MS. 2002. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*, **109**; 1125-1131.
- Hou XG, Moser S, Sarr MG y cols. 2009. Visceral and subcutaneous adipose tissue diacylglycerol acyltransferase activity in humans. *Obesity (Silver Spring)*, **17**; 1129-1134.
- Huang B, Wu P, Bowker-Kinley MM y cols. 2002. Regulation of pyruvate dehydrogenase kinase expression by peroxisome proliferator-activated receptor-alpha ligands, glucocorticoids, and insulin. *Diabetes*, **51**; 276-283.

- Huebschmann AG, Regensteiner JG, Vlassara H y cols. 2006. Diabetes and advanced glycoxidation end products. *Diabetes Care*, **29**; 1420-1432.
- Hussain MM. 2000. A proposed model for the assembly of chylomicrons. *Atherosclerosis*, **148**, 1-15.
- Hussain MM, Rava P, Walsh M y cols. 2012. Multiple functions of microsomal triglyceride transfer protein. *Nutr Metab (Lond)*, **9**; 14.
- Hussain MM, Shi J y Dreizen P. 2003. Microsomal triglyceride transfer protein and its role in apoB-lipoprotein assembly. *J Lipid Res*, **44**; 22-32.

-/-

- Institute of Medicine. 2005. Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. *Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids*. Washington, DC: National Academies Press.
- Iqbal J, Dai K, Seimon T y cols. 2008. IRE1beta inhibits chylomicron production by selectively degrading MTP mRNA. *Cell Metab*, **7**; 445-455.
- Iritani N. 1992. Nutritional and hormonal regulation of lipogenic-enzyme gene expression in rat liver. *Eur J Biochem*, **205**; 433-442.

-/-

- Jiang L, You J, Yu X y cols. 2008a. Tyrosine-dependent and -independent actions of leptin receptor in control of energy balance and glucose homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **105**; 18619-18624.
- Jiang ZG, Liu Y, Hussain MM y cols. 2008b. Reconstituting initial events during the assembly of apolipoprotein B-containing lipoproteins in a cell-free system. *J Mol Biol*, **383**; 1181-1194.
- Jirtle RL y Skinner MK. 2007. Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat Rev Genet*, **8**; 253-262.
- Johnson SA y Denton RM. 2003. Insulin stimulation of pyruvate dehydrogenase in adipocytes involves two distinct signalling pathways. *Biochem J*, **369**; 351-356.
- Johnstone AM, Horgan GW, Murison SD y cols. 2008. Effects of a high-protein ketogenic diet on hunger, appetite, and weight loss in obese men feeding ad libitum. *Am J Clin Nutr*, **87**; 44-55.
- Junqueira LC, Carneiro J. 2005. *Histología Básica*. Sexta edición. Barcelona, Masson eds.

-/-

- Kahn CR. 1994. Banting Lecture. Insulin action, diabetogenesis, and the cause of type II diabetes. *Diabetes*, **43**; 1066-1084.

- Kahn CR, Neville DM Jr. y Roth J. 1973. Insulin-receptor interaction in the obese-hyperglycemic mouse. A model of insulin resistance. *J Biol Chem*, **248**; 244-250.
- Kaidar-Person O, Bar-Sela G y Person B. 2011. The two major epidemics of the twenty-first century: obesity and cancer. *Obes Surg*, **21**; 1792-1797.
- Kalogeris TJ, Rodriguez MD y Tso P. 1997. Control of synthesis and secretion of intestinal apolipoprotein A-IV by lipid. *J Nutr*, **127**; 537S-543S.
- Karpe F, Dickmann JR y Frayn KN. 2011. Fatty acids, obesity, and insulin resistance: time for a reevaluation. *Diabetes*, **60**; 2441-2449.
- Karra E y Batterham RL. 2010. The role of gut hormones in the regulation of body weight and energy homeostasis. *Mol Cell Endocrinol*, **316**; 120-128.
- Karra E, Youssef A y Batterham RL. 2010. Mechanisms facilitating weight loss and resolution of type 2 diabetes following bariatric surgery. *Trends Endocrinol Metab*, **21**; 337-344.
- Kashyap SR, Bhatt DL, Wolski K y cols. 2013. Metabolic effects of bariatric surgery in patients with moderate obesity and type 2 diabetes: Analysis of a randomized control trial comparing surgery with intensive medical treatment. *Diabetes Care*, **36**; 2175-2182.
- Kashyap SR, Daud S, Kelly KR y cols. 2010. Acute effects of gastric bypass versus gastric restrictive surgery on beta-cell function and insulinotropic hormones in severely obese patients with type 2 diabetes. *Int J Obes (Lond)*, **34**; 462-471.
- Kawasaki S, Taniguchi T, Fujioka Y y cols. 2000. Chylomicron remnant induces apoptosis in vascular endothelial cells. *Ann N Y Acad Sci*, **902**; 336-341.
- Kersten S. 2001. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Rep*, **2**; 282-286.
- Khatun I, Walsh MT y Hussain MM. 2013. Loss of both phospholipid and triglyceride transfer activities of microsomal triglyceride transfer protein in abetalipoproteinemia. *J Lipid Res*, **54**; 1541-1549.
- Khitan Z y Kim DH. 2013. Fructose: a key factor in the development of metabolic syndrome and hypertension. *J Nutr Metab*, **2013**; 682673.
- Kirwan JP, Varastehpour A, Jing M y cols. 2004. Reversal of insulin resistance postpartum is linked to enhanced skeletal muscle insulin signaling. *J Clin Endocrinol Metab*, **89**; 4678-4684.
- Knop FK. 2009. Resolution of type 2 diabetes following gastric bypass surgery: involvement of gut-derived glucagon and glucagonotropic signalling? *Diabetologia*, **52**; 2270-2276.
- Knowler WC, Pettitt DJ, Saad MF y cols. 1991. Obesity in the Pima Indians: its magnitude and relationship with diabetes. *Am J Clin Nutr*, **53**; 1543S-1551S.
- Kobayashi J, Nakajima K, Nohara A y cols. 2007. The relationship of serum lipoprotein lipase mass with fasting serum apolipoprotein B-48 and remnant-like particle triglycerides in type 2 diabetic patients. *Horm Metab Res*, **39**; 612-616.
- Kohan AB, Wang F, Li X y cols. 2012. Apolipoprotein A-IV regulates chylomicron metabolism-mechanism and function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **302**, G628-636.
- Kohjima M, Higuchi N, Kato M y cols. 2008. SREBP-1c, regulated by the insulin and AMPK signaling pathways, plays a role in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med*, **21**; 507-511.

- Kong SE, Hall JC, Cooper D y cols. 2000. Starvation alters the activity and mRNA level of glutaminase and glutamine synthetase in the rat intestine. *J Nutr Biochem*, **11**; 393-400.
- Kotchen TA. 2010. Obesity-related hypertension: epidemiology, pathophysiology, and clinical management. *Am J Hypertens*, **23**; 1170-1178.
- Kovacs P, Hanson RL, Lee YH y cols. 2003. The role of insulin receptor substrate-1 gene (IRS1) in type 2 diabetes in Pima Indians. *Diabetes*, **52**; 3005-3009.
- Kramer H, Cao G, Dugas L y cols. 2010. Increasing BMI and waist circumference and prevalence of obesity among adults with Type 2 diabetes: the National Health and Nutrition Examination Surveys. *J Diabetes Complications*, **24**; 368-374.
- Kraschnewski JL, Boan J, Esposito J y cols. 2010. Long-term weight loss maintenance in the United States. *Int J Obes (Lond)*, **34**; 1644-1654.
- Krauss RM. 1998. Atherogenicity of triglyceride-rich lipoproteins. *Am J Cardiol*, **81**; 13B-17B.
- Krebs HA. 1972. Some aspects of the regulation of fuel supply in omnivorous animals. *Adv Enzyme Regul*, **10**; 397-420.
- Kreuz S, Schoelch C, Thomas L y cols. 2009. Acetyl-CoA carboxylases 1 and 2 show distinct expression patterns in rats and humans and alterations in obesity and diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*, **25**; 577-586.
- Kulinski A, Rustaeus S y Vance JE. 2002. Microsomal triacylglycerol transfer protein is required for luminal accretion of triacylglycerol not associated with ApoB, as well as for ApoB lipidation. *J Biol Chem*, **277**; 31516-31525.

-/-

- Lagakos WS, Gajda AM, Agellon L y cols. 2011. Different functions of intestinal and liver-type fatty acid-binding proteins in intestine and in whole body energy homeostasis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **300**; G803-G814.
- Lally S, Owens D y Tomkin GH. 2007. Genes that affect cholesterol synthesis, cholesterol absorption, and chylomicron assembly: the relationship between the liver and intestine in control and streptozotocin diabetic rats. *Metabolism*, **56**; 430-438.
- Lamont BJ, Andrikopoulos S, Funkat A y cols. 2003. Peripheral insulin resistance develops in transgenic rats overexpressing phosphoenolpyruvate carboxykinase in the kidney. *Diabetologia*, **46**; 1338-1347.
- Lamont BJ, Visinoni S, Fam BC y cols. 2006. Expression of human fructose-1,6-bisphosphatase in the liver of transgenic mice results in increased glycerol gluconeogenesis. *Endocrinology*, **147**; 2764-2772.
- Lapice E, Cipriano P, Patti L y cols. 2012. Fasting apolipoprotein B48 is associated with asymptomatic peripheral arterial disease in type 2 diabetic subjects: a case-control study. *Atherosclerosis*, **223**; 504-506.

- Laplante M y Sabatini DM. 2010. mTORC1 activates SREBP-1c and uncouples lipogenesis from gluconeogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **107**; 3281-3282.
- Larson-Meyer DE, Newcomer BR, Ravussin E y cols. 2011. Intrahepatic and intramyocellular lipids are determinants of insulin resistance in prepubertal children. *Diabetologia*, **54**; 869-875.
- Lecube A, Burguera B y Rubio MA. 2012. Breaking therapeutic inertia: should metabolic surgery be considered one more option for the treatment of type 2 diabetes mellitus? *Endocrinol Nutr*, **59**; 281-283.
- Lentz T. 1971. *Cell Fine Structure: An Atlas of Drawings of Whole-Cell Structure*, W.B.Saunders Co Philadelphia.
- Levy E, Sinnott D, Thibault L y cols. 1996. Insulin modulation of newly synthesized apolipoproteins B-100 and B-48 in human fetal intestine: gene expression and mRNA editing are not involved. *FEBS Lett*, **393**; 253-258.
- Lewis GF, Carpentier A, Adeli K y cols. 2002. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr Rev*, **23**; 201-229.
- Li Q, Chen L, Yang Z y cols. 2012. Metabolic effects of bariatric surgery in type 2 diabetic patients with body mass index < 35 kg/m². *Diabetes Obes Metab*, **14**; 262-270.
- Liang G, Yang J, Horton JD y cols. 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**; 9520-9528.
- Lin MC, Arbeeny C, Bergquist K y cols. 1994. Cloning and regulation of hamster microsomal triglyceride transfer protein. The regulation is independent from that of other hepatic and intestinal proteins which participate in the transport of fatty acids and triglycerides. *J Biol Chem*, **269**; 29138-29145.
- Liu L, Karkanas GB, Morales JC y cols. 1998. Intracerebroventricular leptin regulates hepatic but not peripheral glucose fluxes. *J Biol Chem*, **273**; 31160-31167.
- Liu Z, Barrett EJ, Dalkin AC y cols. 1994. Effect of acute diabetes on rat hepatic glucose-6-phosphatase activity and its messenger RNA level. *Biochem Biophys Res Commun*, **205**; 680-686.
- Livak KJ y 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.
- Loos RJ, Lindgren CM, Li S y cols. 2008. Common variants near MC4R are associated with fat mass, weight and risk of obesity. *Nat Genet*, **40**; 768-775.
- López-Miranda J, Williams C y Lairon D. 2007. Dietary, physiological, genetic and pathological influences on postprandial lipid metabolism. *Br J Nutr*, **98**; 458-473.
- Lu S, Yao Y, Cheng X y cols. 2006. Overexpression of apolipoprotein A-IV enhances lipid secretion in IPEC-1 cells by increasing chylomicron size. *J Biol Chem*, **281**; 3473-3483.

-M-

- Makinen J, Hannukainen JC, Karmi A y cols. 2015. Obesity-associated intestinal insulin resistance is ameliorated after bariatric surgery. *Diabetologia*, **58**; 1055-1062.
- Mansbach CM 2nd y Gorelick F. 2007. Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption. II. Dietary lipid absorption, complex lipid synthesis, and the intracellular packaging and secretion of chylomicrons. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **293**; G645-G650.
- Mansbach CM II, Dowell RF y Pritchett D. 1991. Portal transport of absorbed lipids in rats. *Am J Physiol*, **261**; G530-G538.
- Mansbach CM y Siddiqi SA. 2010. The biogenesis of chylomicrons. *Annu Rev Physiol*, **72**; 315-333.
- Margetic S, Gazzola C, Pegg GG y cols. 2002. Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *Int J Obes Relat Metab Disord*, **26**; 1407-1433.
- Marshall SJ, Biddle SJ, Gorely T y cols. 2004. Relationships between media use, body fatness and physical activity in children and youth: a meta-analysis. *Int J Obes Relat Metab Disord*, **28**; 1238-1246.
- Martins C, Morgan LM, Bloom SR y cols. 2007. Effects of exercise on gut peptides, energy intake and appetite. *J Endocrinol*, **193**; 251-258.
- Masson CJ, Plat J, Mensink RP y cols. 2010. Fatty acid- and cholesterol transporter protein expression along the human intestinal tract. *PLoS One*, **5**; e10380.
- Masuda D, Sakai N, Sugimoto T y cols. 2011. Fasting serum apolipoprotein B-48 can be a marker of postprandial hyperlipidemia. *J Atheroscler Thromb*, **18**; 1062-1070.
- Masuda D, Sugimoto T, Tsujii K y cols. 2012. Correlation of fasting serum apolipoprotein B-48 with coronary artery disease prevalence. *Eur J Clin Invest*, **42**; 992-999.
- Matsumoto M, Ogawa W, Teshigawara K y cols. 2002. Role of the insulin receptor substrate 1 and phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway in insulin-induced expression of sterol regulatory element binding protein 1c and glucokinase genes in rat hepatocytes. *Diabetes*, **51**; 1672-1680.
- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS y cols. 1985. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, **28**; 412-419.
- Mauvais-Jarvis F, Ueki K, Fruman DA y cols. 2002. Reduced expression of the murine p85alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase improves insulin signaling and ameliorates diabetes. *J Clin Invest*, **109**; 141-149.
- Mayers RM, Butlin RJ, Kilgour E y cols. 2003. AZD7545, a novel inhibitor of pyruvate dehydrogenase kinase 2 (PDHK2), activates pyruvate dehydrogenase in vivo and improves blood glucose control in obese (fa/fa) Zucker rats. *Biochem Soc Trans*, **31**; 1165-1167.
- McAllister EJ, Dhurandhar NV, Keith SW, y cols. 2009. Ten putative contributors to the obesity epidemic. *Crit Rev Food Sci Nutr*, **49**; 868-913.
- McGarry JD. 1992. What if Minkowski had been ageusic? An alternative angle on diabetes. *Science*, **258**; 766-770.
- McLaren L. 2007. Socioeconomic status and obesity. *Epidemiol Rev*, **29**; 29-48.

- Meegalla RL, Billheimer JT y Cheng D. 2002. Concerted elevation of acyl-coenzyme A:diacylglycerol acyltransferase (DGAT) activity through independent stimulation of mRNA expression of DGAT1 and DGAT2 by carbohydrate and insulin. *Biochem Biophys Res Commun*, **298**; 317-323.
- Meier JJ y Nauck MA. 2010. Is the diminished incretin effect in type 2 diabetes just an epi-phenomenon of impaired beta-cell function? *Diabetes*, **59**; 1117-1125.
- Meigs JB, Cupples LA y Wilson PW. 2000. Parental transmission of type 2 diabetes: the Framingham Offspring Study. *Diabetes*, **49**; 2201-2207.
- Mendez-Lucas A, Duarte JA, Sunny NE y cols. 2013. PEPCK-M expression in mouse liver potentiates, not replaces, PEPCK-C mediated gluconeogenesis. *J Hepatol*, **59**; 105-113.
- Meyer C, Stumvoll M, Nadkarni V y cols. 1998. Abnormal renal and hepatic glucose metabolism in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest*, **102**; 619-624.
- Minassian C, Zitoun C y Mithieux G. 1996. Differential time course of liver and kidney glucose-6 phosphatase activity during long-term fasting in rat correlates with differential time course of messenger RNA level. *Mol Cell Biochem*, **155**; 37-41.
- Mingrone G, Panunzi S, De Gaetano A y cols. 2012. Bariatric surgery versus conventional medical therapy for type 2 diabetes. *N Engl J Med*, **366**; 1577-1585.
- Mithieux G. 2010. Brain, liver, intestine: a triumvirate to coordinate insulin sensitivity of endogenous glucose production. *Diabetes Metab*, **36**; S50-S53.
- Mithieux G. 2001. New data and concepts on glutamine and glucose metabolism in the gut. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, **4**; 267-271.
- Mithieux G, Bady I, Gautier A y cols. 2004a. Induction of control genes in intestinal gluconeogenesis is sequential during fasting and maximal in diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **286**; E370-E375.
- Mithieux G, Rajas F y Gautier-Stein A. 2004b. A novel role for glucose 6-phosphatase in the small intestine in the control of glucose homeostasis. *J Biol Chem*, **279**; 44231-44234.
- Mithieux G, Rajas F y Zitoun, C. 2006. Glucose utilization is suppressed in the gut of insulin-resistant high fat-fed rats and is restored by metformin. *Biochem Pharmacol*, **72**; 1757-1762.
- Mithieux G, Vidal H, Zitoun C y cols. 1996. Glucose-6-phosphatase mRNA and activity are increased to the same extent in kidney and liver of diabetic rats. *Diabetes*, **45**; 891-896.
- Miyake K, Ogawa W, Matsumoto M y cols. 2002. Hyperinsulinemia, glucose intolerance, and dyslipidemia induced by acute inhibition of phosphoinositide 3-kinase signaling in the liver. *J Clin Invest*, **110**; 1483-1491.
- Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA y cols. 2003. Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001. *JAMA*, **289**; 76-79.
- Mondon CE, Jones IR, Azhar S y cols. 1992. Lactate production and pyruvate dehydrogenase activity in fat and skeletal muscle from diabetic rats. *Diabetes*, **41**; 1547-1554.
- Moon YA, Liang G, Xie X y cols. 2012. The Scap/SREBP pathway is essential for developing diabetic fatty liver and carbohydrate-induced hypertriglyceridemia in animals. *Cell Metab*, **15**; 240-246.

- Moore KJ, Rayner KJ, Suarez Y y cols. 2010. microRNAs and cholesterol metabolism. *Trends Endocrinol Metab*, **21**; 699-706.
- Morton NM, Emilsson V, Liu YL y cols. 1998. Leptin action in intestinal cells. *J Biol Chem*, **273**; 26194-26201.
- Muller G, Ertl J, Gerl M y cols. 1997. Leptin impairs metabolic actions of insulin in isolated rat adipocytes. *J Biol Chem*, **272**; 10585-10593.
- Myers MG Jr., Leibel RL, Seeley RJ y cols. 2010. Obesity and leptin resistance: distinguishing cause from effect. *Trends Endocrinol Metab*, **21**; 643-651.

-//-

- Nakano T, Nakajima K, Niimi M y cols. 2008. Detection of apolipoproteins B-48 and B-100 carrying particles in lipoprotein fractions extracted from human aortic atherosclerotic plaques in sudden cardiac death cases. *Clin Chim Acta*, **390**; 38-43.
- Nakatani K, Sugimoto T, Masuda D y cols. 2011. Serum apolipoprotein B-48 levels are correlated with carotid intima-media thickness in subjects with normal serum triglyceride levels. *Atherosclerosis*, **218**; 226-232.
- Nauck M, Stockmann F, Ebert R y cols. 1986. Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia*, **29**; 46-52.
- Naukarinen J, Rissanen A, Kaprio J y cols. 2012. Causes and consequences of obesity: the contribution of recent twin studies. *Int J Obes (Lond)*, **36**; 1017-1024.
- Neel JV. 1962. Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? *Am J Hum Genet*, **14**; 353-362.
- Neeli I, Siddiqi SA, Siddiqi S y cols. 2007. Liver fatty acid-binding protein initiates budding of pre-chylomicron transport vesicles from intestinal endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, **282**; 17974-17984.
- Nevin P, Koelsch D y Mansbach CM 2nd. 1995. Intestinal triacylglycerol storage pool size changes under differing physiological conditions. *J Lipid Res*, **36**; 2405-2412.
- NIH consensus development conference. 1996. Gastrointestinal surgery for severe obesity. March 25-7, 1991. *Nutrition*, **12**; 397-404.
- Niot I, Poirier H, Tran TT y cols. 2009. Intestinal absorption of long-chain fatty acids: evidence and uncertainties. *Prog Lipid Res*, **48**; 101-115.

-0-

- Ockner RK, Hughes FB y Isselbacher KJ. 1969. Very low density lipoproteins in intestinal lymph: origin, composition, and role in lipid transport in the fasting state. *J Clin Invest*, **48**; 2079-2088.

- Ockner RK y Manning JA. 1974. Fatty acid-binding protein in small intestine. Identification, isolation, and evidence for its role in cellular fatty acid transport. *J Clin Invest*, **54**; 326-338.
- Olshansky SJ, Passaro DJ, Hershow RC y cols. 2005. A potential decline in life expectancy in the United States in the 21st century. *N Engl J Med*, **352**; 1138-1145.
- Ooi EM, Ng TW, Watts GF y cols. 2013. Dietary fatty acids and lipoprotein metabolism: new insights and updates. *Curr Opin Lipidol*, **24**; 192-197.
- Ortega FJ, Mayas D, Moreno-Navarrete JM y cols. 2010. The gene expression of the main lipogenic enzymes is downregulated in visceral adipose tissue of obese subjects. *Obesity (Silver Spring)*, **18**; 13-20.
- Owen OE, Reichle FA, Mozzoli MA y cols. 1981. Hepatic, gut, and renal substrate flux rates in patients with hepatic cirrhosis. *J Clin Invest*, **68**; 240-252.

-P-

- Padwal R, Li SK y Lau DC. 2003. Long-term pharmacotherapy for overweight and obesity: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Int J Obes Relat Metab Disord*, **27**; 1437-1446.
- Pan X y Hussain MM. 2012. Gut triglyceride production. *Biochim Biophys Acta*, **1821**; 727-735.
- Patel SR, Malhotra A, White DP y cols. 2006. Association between reduced sleep and weight gain in women. *Am J Epidemiol*, **164**; 947-954.
- Patrioti A, Aisa MC, Annetti C y cols. 2007. How the hindgut can cure type 2 diabetes. Ileal transposition improves glucose metabolism and beta-cell function in Goto-kakizaki rats through an enhanced Proglucagon gene expression and L-cell number. *Surgery*, **142**; 74-85.
- Pilkis SJ, el-Maghrabi MR y Claus TH. 1988. Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu Rev Biochem*, **57**; 755-783.
- Pontiroli AE y Morabito A. 2011. Long-term prevention of mortality in morbid obesity through bariatric surgery. a systematic review and meta-analysis of trials performed with gastric banding and gastric bypass. *Ann Surg*, **253**; 484-487.
- Pories WJ y Albrecht RJ. 2001. Etiology of type II diabetes mellitus: role of the foregut. *World J Surg*, **25**; 527-531.
- Porter EM, Bevins CL, Ghosh D y cols. 2002. The multifaceted Paneth cell. *Cell Mol Life Sci*, **59**; 156-170.
- Previs SF, Brunengraber DZ y Brunengraber H. 2009. Is there glucose production outside of the liver and kidney? *Annu Rev Nutr*, **29**; 43-57.
- Previs SF, Withers DJ, Ren JM y cols. 2000. Contrasting effects of IRS-1 versus IRS-2 gene disruption on carbohydrate and lipid metabolism in vivo. *J Biol Chem*, **275**; 38990-38994.

- Proctor SD y Mamo JC. 2003. Intimal retention of cholesterol derived from apolipoprotein B100- and apolipoprotein B48-containing lipoproteins in carotid arteries of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **23**; 1595-1600.
- Proctor SD, Vine DF y Mamo JC. 2002. Arterial retention of apolipoprotein B48 and B100 containing lipoproteins in atherogenesis. *Curr Opin Lipidol*, **13**; 461-470.
- Puhakainen I, Koivisto VA y Yki-Jarvinen H. 1992. Lipolysis and gluconeogenesis from glycerol are increased in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*, **75**; 789-794.

-2-

- Qiu W, Taghibiglou C, Avramoglu RK y cols. 2005. Oleate-mediated stimulation of microsomal triglyceride transfer protein (MTP) gene promoter: implications for hepatic MTP overexpression in insulin resistance. *Biochemistry*, **44**; 3041-3049.

-R-

- Rajas F, Bruni N, Montano S y cols. 1999. The glucose-6 phosphatase gene is expressed in human and rat small intestine: regulation of expression in fasted and diabetic rats. *Gastroenterology*, **117**; 132-139.
- Rajas F, Croset M, Zitoun C y cols. 2000. Induction of PEPCK gene expression in insulinopenia in rat small intestine. *Diabetes*, **49**; 1165-1168.
- Randle PJ. 1986. Fuel selection in animals. *Biochem Soc Trans*, **14**; 799-806.
- Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC y cols. 2006. The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity (Silver Spring)*, **14**; 529-644.
- Reis CE, Alvarez-Leite JJ, Bressan J y cols. 2012. Role of bariatric-metabolic surgery in the treatment of obese type 2 diabetes with body mass index $<35 \text{ kg/m}^2$: a literature review. *Diabetes Technol Ther*, **14**; 365-372.
- Remesy C, Demigne C y Aufrere J. 1978. Inter-organ relationships between glucose, lactate and amino acids in rats fed on high-carbohydrate or high-protein diets. *Biochem J*, **170**; 321-329.
- Risser TR, Reaven GM y Reaven EP. 1978. Intestinal contribution to secretion of very low density lipoproteins into plasma. *Am J Physiol*, **234**; E277-E281.
- Rodriguez-Grunert L, Galvao Neto MP, Alamo M y cols. 2008. First human experience with endoscopically delivered and retrieved duodenal-jejunal bypass sleeve. *Surg Obes Relat Dis*, **4**; 55-59.
- Rossetti L, Massillon D, Barzilai N y cols. 1997. Short term effects of leptin on hepatic gluconeogenesis and in vivo insulin action. *J Biol Chem*, **272**; 27758-27763.

- Rubino F, Forgione A, Cummings DE y cols. 2006. The mechanism of diabetes control after gastrointestinal bypass surgery reveals a role of the proximal small intestine in the pathophysiology of type 2 diabetes. *Ann Surg*, **244**; 741-749.
- Rubio M, Martínez C, Vidal O y cols. 2004. Documento de consenso sobre cirugía bariátrica. *Rev Esp Obes*, **4**; 223-249.
- Ruderman NB, Saha AK, Vavvas D y cols. 1999. Malonyl-CoA, fuel sensing, and insulin resistance. *Am J Physiol*, **276**; E1-E18.
- Ruiz R, Jideonwo V, Ahn M y cols. 2014. Sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1) is required to regulate glycogen synthesis and gluconeogenic gene expression in mouse liver. *J Biol Chem*, **289**; 5510-5517.

-8-

- Sainz N, Barrenetxe J, Moreno-Aliaga MJ y cols. 2015. Leptin resistance and diet-induced obesity: central and peripheral actions of leptin. *Metabolism*, **64**; 35-46.
- Saltiel AR. 2001. New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell*, **104**; 517-529.
- Saltiel AR y Kahn CR. 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, **414**; 799-806.
- Santer R, Hillebrand G, Steinmann B y cols. 2003. Intestinal glucose transport: evidence for a membrane traffic-based pathway in humans. *Gastroenterology*, **124**; 34-39.
- Sarwar N, Danesh J, Eiriksdottir G y cols. 2007. Triglycerides and the risk of coronary heart disease: 10,158 incident cases among 262,525 participants in 29 Western prospective studies. *Circulation*, **115**; 450-458.
- Sato R. 2010. Sterol metabolism and SREBP activation. *Arch Biochem Biophys*, **501**; 177-181.
- Sato R, Miyamoto W, Inoue J y cols. 1999. Sterol regulatory element-binding protein negatively regulates microsomal triglyceride transfer protein gene transcription. *J Biol Chem*, **274**; 24714-24720.
- Schaefer EJ, Gregg RE, Ghiselli G y cols. 1986. Familial apolipoprotein E deficiency. *J Clin Invest*, **78**; 1206-1219.
- Schienkiewitz A, Schulze MB, Hoffmann K y cols. 2006. Body mass index history and risk of type 2 diabetes: results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Am J Clin Nutr*, **84**; 427-433.
- Schmid SM, Hallschmid M, Jauch-Chara K y cols. 2009. Short-term sleep loss decreases physical activity under free-living conditions but does not increase food intake under time-deprived laboratory conditions in healthy men. *Am J Clin Nutr*, **90**; 1476-1482.
- Schwarz JM, Linfoot P, Dare D y cols. 2003. Hepatic de novo lipogenesis in normoinsulinemic and hyperinsulinemic subjects consuming high-fat, low-carbohydrate and low-fat, high-carbohydrate isoenergetic diets. *Am J Clin Nutr*, **77**; 43-50.

- Semenkovich CF. 1997. Regulation of fatty acid synthase (FAS). *Prog Lipid Res*, **36**; 43-53.
- Semenkovich CF, Coleman T y Fiedorek FT Jr. 1995. Human fatty acid synthase mRNA: tissue distribution, genetic mapping, and kinetics of decay after glucose deprivation. *J Lipid Res*, **36**; 1507-1521.
- Shah SS, Todkar JS, Shah PS y cols. 2010. Diabetes remission and reduced cardiovascular risk after gastric bypass in Asian Indians with body mass index <math><35\text{ kg/m}^2</math>. *Surg Obes Relat Dis*, **6**; 332-338.
- Shaker A y Rubin DC. 2010. Intestinal stem cells and epithelial-mesenchymal interactions in the crypt and stem cell niche. *Transl Res*, **156**; 180-187.
- Shapiro HM. 2003. Practical Flow Cytometry. Chapter 10; 443-542. 4th Edition, John Wiley & Sons, Inc. eds.
- Shen L, Kondo Y, Guo Y y cols. 2007. Genome-wide profiling of DNA methylation reveals a class of normally methylated CpG island promoters. *PLoS Genet*, **3**; 2023-2036.
- Shimomura I, Matsuda M, Hammer RE y cols. 2000. Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. *Mol Cell*, **6**; 77-86.
- Shimomura I, Shimano H, Horton JD y cols. 1997. Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells. *J Clin Invest*, **99**; 838-845.
- Shyangdan DS, Royle P, Clar C y cols. 2011. Glucagon-like peptide analogues for type 2 diabetes mellitus. *Cochrane Database Syst Rev*, CD006423.
- Siddiqi SA, Gorelick FS, Mahan JT y cols. 2003. COPII proteins are required for Golgi fusion but not for endoplasmic reticulum budding of the pre-chylomicron transport vesicle. *J Cell Sci*, **116**; 415-427.
- Sjostrom LV. 1992. Mortality of severely obese subjects. *Am J Clin Nutr*, **55**; 516S-523S.
- Skyler JS. 1996. Diabetic complications. The importance of glucose control. *Endocrinol Metab Clin North Am*, **25**; 243-254.
- Song S, Andrikopoulos S, Filippis C y cols. 2001. Mechanism of fat-induced hepatic gluconeogenesis: effect of metformin. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **281**; E275-E282.
- Soriguer F, Almaraz MC, Ruiz de Adana MS y cols. 2009a. Incidence of obesity is lower in persons who consume olive oil. *Eur J Clin Nutr*, **63**; 1371-1374.
- Soriguer F, Garcia-Serrano S, Garcia-Almeida JM y cols. 2009b. Changes in the serum composition of free-fatty acids during an intravenous glucose tolerance test. *Obesity (Silver Spring)*, **17**; 10-15.
- Soriguer F, Rojo Martínez g, Esteva I y cols. 2003. Physical activity and cardiovascular and metabolic risk factors in general population. *Med Clin (Barc)*, **121**; 565-569.
- Soriguer F, Rojo-Martínez G, Esteva de Antonio I y cols. 2004. Prevalence of obesity in south-east Spain and its relation with social and health factors. *Eur J Epidemiol*, **19**; 33-40.
- Sparks JD, Sparks CE y Adeli K. 2012. Selective hepatic insulin resistance, VLDL overproduction, and hypertriglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **32**; 2104-2112.

- Stahl A, Hirsch DJ, Gimeno RE y cols. 1999. Identification of the major intestinal fatty acid transport protein. *Mol Cell*, **4**; 299-308.
- Stan S, Levy E, Bendayan M y cols. 2001. Effect of human recombinant leptin on lipid handling by fully differentiated Caco-2 cells. *FEBS Lett*, **508**; 80-84.
- Stifel FB, Herman RH y Rosensweig NS. 1969. Dietary regulation of glycolytic enzymes. 3. Adaptive changes in rat jejunal pyruvate kinase, phosphofructokinase, fructose diphosphatase and glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta*, **184**; 29-34.
- Stone SJ, Myers HM, Watkins SM y cols. 2004. Lipopenia and skin barrier abnormalities in DGAT2-deficient mice. *J Biol Chem*, **279**; 11767-11776.
- Strable MS y Ntambi JM. 2010. Genetic control of de novo lipogenesis: role in diet-induced obesity. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **45**; 199-214.
- Stump DD, Zhou SL y Berk PD. 1993. Comparison of plasma membrane FABP and mitochondrial isoform of aspartate aminotransferase from rat liver. *Am J Physiol*, **265**; G894-G902.
- Stumpel F, Burcelin R, Jungermann K y cols. 2001. Normal kinetics of intestinal glucose absorption in the absence of GLUT2: evidence for a transport pathway requiring glucose phosphorylation and transfer into the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**; 11330-11335.
- Stumvoll M, Perriello G, Nurjhan N y cols. 1996. Glutamine and alanine metabolism in NIDDM. *Diabetes*, **45**; 863-868.
- Sun Y, Liu S, Ferguson S y cols. 2002. Phosphoenolpyruvate carboxykinase overexpression selectively attenuates insulin signaling and hepatic insulin sensitivity in transgenic mice. *J Biol Chem*, **277**; 23301-23307.
- Sutherland C, O'Brien RM y Granner DK. 1995. Phosphatidylinositol 3-kinase, but not p70/p85 ribosomal S6 protein kinase, is required for the regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) gene expression by insulin. Dissociation of signaling pathways for insulin and phorbol ester regulation of PEPCK gene expression. *J Biol Chem*, **270**; 15501-15506.
- Sweeney G, Keen J, Somwar R y cols. 2001. High leptin levels acutely inhibit insulin-stimulated glucose uptake without affecting glucose transporter 4 translocation in 16 rat skeletal muscle cells. *Endocrinology*, **142**; 4806-4812.
- Swift LL, Zhu MY, Kakkad B y cols. 2003. Subcellular localization of microsomal triglyceride transfer protein. *J Lipid Res*, **44**; 1841-1849.
- Szanto I y Kahn CR. 2000. Selective interaction between leptin and insulin signaling pathways in a hepatic cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**; 2355-2360.

-/-

- Taniguchi CM, Emanuelli B y Kahn CR. 2006. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**; 85-96.

- Troy S, Soty M, Ribeiro L y cols. 2008. Intestinal gluconeogenesis is a key factor for early metabolic changes after gastric bypass but not after gastric lap-band in mice. *Cell Metab*, **8**; 201-211.
- Tso P y Balint JA. 1986. Formation and transport of chylomicrons by enterocytes to the lymphatics. *Am J Physiol*, **250**; G715-G726.
- Tso P, Balint JA, Bishop MB y cols. 1981. Acute inhibition of intestinal lipid transport by Pluronic L-81 in the rat. *Am J Physiol*, **241**; G487-G497.
- Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA y cols. 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, **444**; 1027-1031.

-/-

- Uauy R y Diaz E. 2005. Consequences of food energy excess and positive energy balance. *Public Health Nutr*, **8**; 1077-1099.
- Uchida A, Slipchenko MN, Eustaquio T y cols. 2013. Intestinal acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase 2 overexpression enhances postprandial triglyceridemic response and exacerbates high fat diet-induced hepatic triacylglycerol storage. *Biochim Biophys Acta*, **1831**; 1377-1385.
- Ueki K, Fruman DA, Brachmann SM y cols. 2002. Molecular balance between the regulatory and catalytic subunits of phosphoinositide 3-kinase regulates cell signaling and survival. *Mol Cell Biol*, **22**; 965-977.
- Ueki K, Fruman DA, Yballe CM y cols. 2003. Positive and negative roles of p85 alpha and p85 beta regulatory subunits of phosphoinositide 3-kinase in insulin signaling. *J Biol Chem*, **278**; 48453-48466.

-/-

- Valera A, Pujol A, Pelegrin M y cols. 1994. Transgenic mice overexpressing phosphoenolpyruvate carboxykinase develop non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**; 9151-9154.
- Van de Werve G, Lange A, Newgard C y cols. 2000. New lessons in the regulation of glucose metabolism taught by the glucose 6-phosphatase system. *Eur J Biochem*, **267**; 1533-1549.
- Van Itallie TB. 1980. "Morbid" obesity: a hazardous disorder that resists conservative treatment. *Am J Clin Nutr*, **33**; 358-363.
- Vanhaesebroeck B, Leeyers SJ, Ahmadi K y cols. 2001. Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu Rev Biochem*, **70**; 535-602.
- Varela LM, Ortega A, Bermudez B y cols. 2011. A high-fat meal promotes lipid-load and apolipoprotein B-48 receptor transcriptional activity in circulating monocytes. *Am J Clin Nutr*, **93**; 918-925.

Vasan RS, Larson MG, Leip EP y cols. 2001. Assessment of frequency of progression to hypertension in non-hypertensive participants in the Framingham Heart Study: a cohort study. *Lancet*, **358**; 1682-1686.

Veilleux A, Grenier E, Marceau P y cols. 2014. Intestinal lipid handling: evidence and implication of insulin signaling abnormalities in human obese subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **34**; 644-653.

-W-

Watford M. 1994. Glutamine metabolism in rat small intestine: synthesis of three-carbon products in isolated enterocytes. *Biochim Biophys Acta*, **1200**; 73-78.

Wattigney WA, Harsha DW, Srinivasan SR y cols. 1991. Increasing impact of obesity on serum lipids and lipoproteins in young adults. The Bogalusa Heart Study. *Arch Intern Med*, **151**; 2017-2022.

Weinberg RB, Cook VR, DeLozier JA y cols. 2000. Dynamic interfacial properties of human apolipoproteins A-IV and B-17 at the air/water and oil/water interface. *J Lipid Res*, **41**; 1419-1427.

Westbury K y Hahn P. 1984. Fructose-1,6-biphosphatase activity in the intestinal mucosa of developing rats. *Am J Physiol*, **246**; G683-G686.

Whiteman EL, Cho H y Birnbaum MJ. 2002. Role of Akt/protein kinase B in metabolism. *Trends Endocrinol Metab*, **13**; 444-451.

Whitson BA, Leslie DB, Kellogg TA y cols. 2007. Entero-endocrine changes after gastric bypass in diabetic and nondiabetic patients: a preliminary study. *J Surg Res*, **141**; 31-39.

WHO. 2000. Obesity: Preventing and managing the global epidemic. Repor to a WHO Consultation. *Worl Health Organization Technical Report, Series 894, 1-253*. Geneve.

WHO. 2013. Cardiovascular diseases. Fact sheet n°317.

WHO. 2015. Obesity and Overweight. Fact sheet n°311.

Wieland, OH. 1983. The mammalian pyruvate dehydrogenase complex: structure and regulation. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, **96**; 123-170.

Wilcock C y Bailey CJ. 1990. Sites of metormin-stimulated glucose metabolism. *Biochem Pharmacol*, **39**; 1831-1834.

Wilcock C y Bailey CJ. 1991. Reconsideration of inhibitory effect of metformin on intestinal glucose absorption. *J Pharmacol*, **43**; 120-121.

Williams KJ y Chen K. 2010. Recent insights into factors affecting remnant lipoprotein uptake. *Curr Opin Lipidol*, **21**; 218-228.

Windmueller HG. 1984. *Metabolism of vascular and luminal glutamine by intestinal mucosa in vivo*. In: Glutamine metabolism in mammalian tissues. Springer-Verlag. Haüssinger D, S. H. (Ed.).

- Windmueller HG y Spaeth A. E. 1980. Respiratory fuels and nitrogen metabolism in vivo in small intestine of fed rats. Quantitative importance of glutamine, glutamate, and aspartate. *J Biol Chem*, **255**; 107-112.
- Woerle HJ, Szoke E, Meyer C y cols. 2006. Mechanisms for abnormal postprandial glucose metabolism in type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **290**; E67-E77.
- Wycherley TP, Moran LJ, Clifton PM y cols. 2012. Effects of energy-restricted high-protein, low-fat compared with standard-protein, low-fat diets: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr*, **96**; 1281-1298.

-X-

- Xu AW, Kaelin CB, Takeda K y cols. 2005. PI3K integrates the action of insulin and leptin on hypothalamic neurons. *J Clin Invest*, **115**; 951-958.

-Y-

- Yamamoto T, Shimano H, Nakagawa Y y cols. 2004. SREBP-1 interacts with hepatocyte nuclear factor-4 alpha and interferes with PGC-1 recruitment to suppress hepatic gluconeogenic genes. *J Biol Chem*, **279**; 12027-12035.
- Yanez AJ, Nualart F, Droppelmann C, y cols. 2003. Broad expression of fructose-1,6-bisphosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase provide evidence for gluconeogenesis in human tissues other than liver and kidney. *J Cell Physiol*, **197**; 189-197.
- Yarandi SS, Hebbar G, Sauer CG y cols. 2011. Diverse roles of leptin in the gastrointestinal tract: modulation of motility, absorption, growth, and inflammation. *Nutrition*, **27**; 269-275.
- Yu J, Zhang Y, McIlroy J y cols. 1998. Regulation of the p85/p110 phosphatidylinositol 3'-kinase: stabilization and inhibition of the p110alpha catalytic subunit by the p85 regulatory subunit. *Mol Cell Biol*, **18**; 1379-1387.
- Yuan L, Ziegler R y Hamann A. 2002. Inhibition of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression by metformin in cultured hepatocytes. *Chin Med J (Engl)*, **115**; 1843-1848.
- Yuasa-Kawase M, Masuda D, Kitazume-Taneike R y cols. 2012. Apolipoprotein B-48 to triglyceride ratio is a novel and useful marker for detection of type III hyperlipidemia after antihyperlipidemic intervention. *J Atheroscler Thromb*, **19**; 862-871.

-Z-

- Zhao LF, Iwasaki Y, Zhe W y cols. 2010. Hormonal regulation of acetyl-CoA carboxylase isoenzyme gene transcription. *Endocr J*, **57**; 317-324.

Zoltowska M, Ziv E, Delvin E y cols. 2003. Cellular aspects of intestinal lipoprotein assembly in *Psammomys obesus*: a model of insulin resistance and type 2 diabetes. *Diabetes*, **52**; 2539-2545.

8. Anexo

La presente tesis doctoral ha dado lugar a las siguientes publicaciones y comunicaciones a congresos:

- **Publicaciones**

Soriguer F, García Serrano S, Garrido Sánchez L, Gutiérrez Repiso C, Rojo Martínez G, García Escobar E, García Arnés J, Gallego Perales JL, Delgado V, García Fuentes E. Jejunal Wall triglyceride concentration of morbidly obese persons is lower in those with type 2 diabetes mellitus. *J Lipid Res.* 2010; **51**: 3516-3523.

Gutiérrez Repiso C, Rodríguez Pacheco F, García Arnés J, Valdés S, Gonzalo M, Soriguer F, Moreno Ruiz FJ, Rodríguez Cañete A, Gallego Perales JL, Alcaín Martínez G, Vázquez Pedreño L, García Serrano S, García Fuentes E. The expression of genes involved in the jejunal de novo lipogenesis and lipoproteins synthesis is altered in morbidly obese subjects with high insulin resistance. *Lab invest* (14-0675-RA) (2015, en revisión).

Gutiérrez Repiso C, García Serrano S, Soriguer F, Rodríguez Pacheco F, García Arnés J, Valdés S, Gonzalo M, Moreno Ruiz FJ, Rodríguez Cañete A, Gallego Perales JL, Alcaín Martínez G, Vázquez Pedreño L, García Fuentes E. The expression of genes involved in the jejunal gluconeogenesis and insulin signaling is altered in morbidly obese subjects with high insulin resistance. *Diabetes* (2015, enviado).

- **Comunicaciones a congresos**

García Escobar E, Gutiérrez Repiso C, García Serrano S, Soriguer F, García Arnés J, Valdés S, Gonzalo Marin M, Gallego Perales JL y García Fuentes E. *Intestinal lipogenesis in morbidly obese subjects is higher in those with high insulin resistance.* 49th

European Association for the Study of Diabetes Meeting. 23-27 de septiembre de 2013. Barcelona (poster).

Gutiérrez Repiso C, Rodríguez Pacheco F, García Arnés J, Valdés S, Gonzalo M, Moreno Ruiz FJ, Rodríguez Cañete A, Alcaín Martínez G, Vázquez Pedreño L, García Serrano S y García Fuentes E. *Jejunal de novo lipogenesis and lipoproteins synthesis is altered in morbidly obese subjects with high insulin resistance*. 75th American Diabetes Association Meeting. 5-9 de junio. Boston (poster).

Gutiérrez Repiso C, García Serrano S, Rodríguez Pacheco F, García Arnés J, Valdés S, Soriguer F, Moreno Ruiz FJ, Rodríguez Cañete A, Alcaín Martínez G, Vázquez Pedreño L y García Fuentes E. *The expression of genes involved in intestinal gluconeogenesis is altered in morbidly obese subjects with higher insulin resistance*. 51st European Association for the Study of Diabetes Meeting. 15-18 de septiembre de 2015. Estocolmo (comunicación oral).

