



Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación

**HIDROLIZADOS DE PROTEÍNAS DE HUEVO COMO
NUEVOS INGREDIENTES FUNCIONALES FRENTE AL
SÍNDROME METABÓLICO Y SUS COMPLICACIONES**



Marta Garcés Rimón
Madrid, 2013

CIAL

CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

UAM
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE MADRID

Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación

**EGG WHITE HYDROLYSATES AS FUNCTIONAL FOOD
INGREDIENTS TO CONTROL THE METABOLIC
SYNDROME AND RELATED DISORDERS**



Marta Garcés Rimón
Madrid, 2013



Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación

HIDROLIZADOS DE PROTEÍNAS DE HUEVO COMO NUEVOS INGREDIENTES FUNCIONALES FRENTE AL SÍNDROME METABÓLICO Y SUS COMPLICACIONES

Memoria presentada por:

Marta Garcés Rimón

Para optar al grado de Doctor

Directores:

Dra. Marta Miguel Castro

Dra. Rosina López Fandiño

Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CSIC-UAM)

MARTA MIGUEL CASTRO, CIENTÍFICO TITULAR DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN, DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y ROSINA LÓPEZ FANDIÑO PROFESORA DE INVESTIGACIÓN DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN, DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

HACEN CONSTAR:

Que el presente trabajo titulado **“Hidrolizados de proteínas de huevo como nuevos ingredientes funcionales frente al síndrome metabólico y sus complicaciones”**, que constituye la Memoria que presenta la Licenciada **Marta Garcés Rimón** para optar al grado de Doctor, se ha realizado bajo su dirección, en el Departamento de Bioactividad y Análisis de los Alimentos del Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Madrid, 18 de Septiembre de 2013

Fdo. Marta Miguel Castro

Fdo. Rosina López Fandiño

ÍNDICE

INDICE

	RESUMEN / SUMMARY	1
1	INTRODUCCIÓN	7
1.1	Síndrome metabólico. Concepto, definición y tratamiento	8
1.2	Principales alteraciones asociadas al síndrome metabólico. Mecanismos implicados en su desarrollo y mantenimiento	12
1.3	La rata Zucker como modelo animal para el estudio del síndrome metabólico	33
1.4	Componentes de los alimentos con actividad biológica. El huevo como fuente de péptidos bioactivos	36
2	HIPÓTESIS Y OBJETIVO	43
3	MATERIALES Y MÉTODOS	46
3.1	Obtención de hidrolizados de clara de huevo	48
3.2	Selección del hidrolizado en base a sus bioactividades <i>in vitro</i>	50
3.2.1	Medida de la actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina	50
3.2.2	Medida de la actividad antioxidante	52
3.2.3	Medida de la actividad hipocolesterolémica	54
3.2.4	Medida de la actividad inhibidora de la enzima dipeptidil-dipeptidasa IV	56
3.2.5	Determinación del contenido en proteínas	57
3.2.6	Análisis del proceso de hidrólisis mediante cromatografía de líquidos de alta eficacia a escala analítica	57
3.2.7	Análisis de los hidrolizados mediante cromatografía de líquidos de alta eficacia acoplado a espectrometría de masas	58

3.3	Protocolo general de estudio en ratas Zucker	60
3.4	Determinaciones y técnicas utilizadas	64
3.4.1	Medida de la presión arterial directa	64
3.4.2	Preparación de corazón aislado y perfundido de rata (preparación de Langendorff)	66
3.4.3	Estudios de reactividad vascular	70
3.4.3.1	Estudios en aorta	70
3.4.3.2	Estudios en arteria mesentérica	72
3.4.4	Grasa en heces. Método Soxhlet	75
3.4.5	Estudio de la neuropatía diabética. Método de Von Frey	76
3.4.6	Determinación de colesterol y triglicéridos en plasma	77
3.4.7	Determinación de ácidos grasos libres en plasma	79
3.4.8	Determinación de la actividad lipasa en plasma	80
3.4.9	Determinación de los niveles de adiponectina y factor de necrosis tumoral en plasma	81
3.4.10	Determinación de malonildialdehído en plasma	81
3.4.11	Medida de la capacidad antioxidante en plasma	82
3.4.12	Homogeneización y determinación de glutatión reducido en tejido hepático	82
3.4.13	Determinación de glucosa en plasma	83
3.4.14	Determinación de insulina en plasma	84
3.4.15	Medida de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina en plasma	86
3.4.16	Estudios histológicos	86
3.5	Análisis estadístico	87

4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	89
4.1	Obtención y selección de hidrolizados de clara de huevo. Estudios <i>in vitro</i>	90
4.2	Efectos del consumo de hidrolizados de proteínas de clara de huevo sobre la obesidad y el metabolismo lipídico en ratas Zucker obesas	108
4.3	Efectos del consumo de hidrolizados de proteínas de clara de huevo sobre la inflamación y el estrés oxidativo en ratas Zucker obesas	133
4.4	Efectos del consumo de hidrolizados de proteínas de clara de huevo sobre el metabolismo de la glucosa en ratas Zucker obesas	144
4.5	Efectos del consumo de hidrolizados de proteínas de clara de huevo sobre el sistema cardiovascular en ratas Zucker obesas	154
5	CONCLUSIONES / CONCLUSIONS	176
6	BIBLIOGRAFÍA	182

El objetivo global del presente trabajo ha consistido en la obtención de hidrolizados de proteínas de huevo que permitan controlar algunas de las patologías asociadas al síndrome metabólico (SM). Nuestra hipótesis de trabajo fue que la administración oral de un hidrolizado de clara de huevo, previamente seleccionado por su multiactividad biológica *in vitro*, podría mejorar y/o prevenir alteraciones cardiometabólicas tales como obesidad, dislipemia, diabetes e hipertensión.

La primera parte del trabajo consistió en la obtención de hidrolizados de clara de huevo utilizando enzimas de grado alimentario de diferentes orígenes (bacteriano -Neutrase 0.8L y Alcalase 2.4LFG-, vegetal -Promod 144P-, fúngico -Flavourzyme 1000L y Peptidase 433P- y digestivo -Pancreatin 4xNF, PTN 6.0 y BC Pepsin-). En cada uno de los hidrolizados se determinaron *in vitro* la actividad inhibidora de la ECA, las actividades antioxidante e hipocolesterolemica y, en algunos casos, la actividad inhibidora de la DPP IV, para seleccionar aquellos que presentaban el mejor potencial para combatir de forma conjunta las alteraciones características del SM, en concreto, la presión arterial, la concentración de lípidos plasmáticos y la glucemia.

A la vista de los resultados obtenidos, se seleccionaron los hidrolizados de clara de huevo con BC Pepsin durante 8 horas y con Peptidase 433P durante 24 horas, pues en ellos concurría más de una actividad biológica relevante. El hidrolizado de clara de huevo con pepsina presentó una elevada actividad inhibidora de la ECA, con un IC_{50} equivalente a, aproximadamente, 50 μ g de proteína/ml, e importante actividad neutralizadora de radicales peroxilo y de unión a ácidos biliares. El hidrolizado con aminopeptidasa destacó por sus actividad neutralizadora de radicales peroxilo, equivalente a 900-1100 μ mol de Trolox/g de proteína y comparable a la de antioxidantes muy potentes, e hipocolésterolemica. Además, ambos hidrolizados poseían moderada actividad inhibidora de la enzima DDP IV, con valores de IC_{50} entre 7 y 8 mg/ml.

A continuación, se evaluó el efecto de la administración de los hidrolizados de clara de huevo previamente seleccionados en un modelo experimental de SM. Para ello utilizamos ratas Zucker obesas, a las que se les administró durante 12 semanas cada uno de los hidrolizados a una dosis de 750 mg/kg/día en el agua de bebida. Durante el estudio se registraron parámetros como el peso corporal, la ingesta sólida y la ingesta líquida. Al finalizar el periodo experimental se evaluó en los animales la presión arterial y el desarrollo de neuropatía sensorial. Posteriormente, los animales se sacrificaron y se obtuvieron muestras de sangre y de diferentes órganos para determinar el efecto que producía cada uno de los hidrolizados en el metabolismo lipídico, el estrés oxidativo, la inflamación, el metabolismo de la glucosa y algunos parámetros cardiovasculares. Se emplearon como controles ratas Zucker obesas que tomaron exclusivamente agua como bebida y ratas Zucker delgadas.

De los dos hidrolizados seleccionados, los mejores resultados se obtuvieron con el hidrolizado de clara de huevo con pepsina. El consumo de este hidrolizado redujo el peso corporal de las ratas Zucker obesas durante las 4 primeras semanas del estudio. Además, el peso del tejido adiposo epididimal fue significativamente inferior en estos animales que en los animales obesos que bebieron únicamente agua. Por otra parte, la administración del hidrolizado de clara de huevo con pepsina mejoró significativamente la esteatosis hepática que desarrollan las ratas Zucker obesas y los niveles plasmáticos de ácidos grasos libres, así como el estado proinflamatorio, disminuyendo los niveles plasmáticos del factor de necrosis tumoral alfa. Este hidrolizado consiguió reducir el estrés oxidativo que también caracteriza a los animales obesos de esta raza, que mostraron una disminución de los niveles de peroxidación lipídica y un aumento en los sistemas antioxidantes. El consumo del hidrolizado disminuyó, además, los niveles de insulina en el plasma, y causó una clara mejora en los índices cuantitativos de resistencia a la insulina, de funcionalidad de las células β -pancreáticas y de sensibilidad a la insulina.

Los resultados también mostraron que el consumo de hidrolizados de clara de huevo y, en este caso especialmente del hidrolizado de clara de huevo con aminopeptidasa, mejoraron la función vascular en arterias mesentéricas de resistencia a través de un aumento de los niveles y/o de la biodisponibilidad de óxido nítrico. La diferencia en los efectos que se observaron tras el consumo de ambos hidrolizados puede ser atribuida a la presencia de péptidos con secuencias y actividades biológicas diferentes.

En conjunto, nuestros resultados indican una mejora en los parámetros cardiometabólicos de las ratas Zucker obesas que consumieron el hidrolizado de clara de huevo con pepsina, que mostraron una menor acumulación de grasa, un aumento en sus sistemas antioxidantes, una disminución del estado inflamatorio y una mayor sensibilidad a la insulina, así como una mejora en la función vascular, lo que demuestra la hipótesis de partida de esta Tesis Doctoral. Este trabajo abre la puerta a otros estudios experimentales con los hidrolizados de clara de huevo utilizados que permitan, en última instancia, que estos productos lleguen a utilizarse como ingredientes funcionales en alimentos dirigidos a pacientes con síndrome metabólico.

The overall objective of the present work consisted of the production of hydrolysed egg white that would allow the control some of the pathologies associated with the metabolic syndrome. Our working hypothesis was that the oral administration of egg white protein hydrolysates, previously selected on the basis of their *in vitro* biological multi-activity, could treat and/or prevent cardiometabolic disorders, such as obesity, dyslipidemia, diabetes and hypertension.

The first part of the work was the production of hydrolysed egg white using food-grade enzymes from different sources (bacterial - 0.8 I Neutrase and Alcalase 2.4LFG-, vegetable - Promod 144P-, fungal - Flavourzyme 1000L and Peptidase 433P - and digestive - Pancreatin 4xNF, PTN 6.0 and Pepsin - BC) and specificities. In each of the hydrolysates the angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity, the antioxidant and hypocholesterolemic activities and, in some cases, the dipeptidyl peptidase-IV (DPP IV) inhibitory activity were determined *in vitro* to select those which had the best potential to ameliorate more than one disease involved in the pathogenesis of metabolic syndrome, namely high blood pressure, dyslipidemia in insulin resistance.

In view of the results obtained, the hydrolysates of egg white with Pepsin BC for 8 hours and Peptidase 433P for 24 hours were selected, as they possessed more than one relevant biological activity. The hydrolysate of egg white with pepsin presented a high ACE inhibitory activity, with an IC_{50} equivalent to, approximately, 50 μ g protein/ml, as well as important peroxy radical-trapping and bile acid-binding activities. The hydrolysate with aminopeptidase stood out for its peroxy radical-trapping activity, equivalent to 900-1100 μ mol of Trolox/g of protein and comparable to that of very powerful antioxidants, and its hypocholesterolemic activity. Both hydrolysates also exhibited a moderate inhibitory activity towards the enzyme DPP IV, with IC_{50} values between 7 and 8 mg/ml.

We then evaluated the effect of the administration of the selected egg white hydrolysates on an experimental model of metabolic syndrome. We used obese

Zucker rats, which were fed for 12 weeks each of the hydrolysates, dissolved in the drinking water, at a dose of 750 mg/kg/day. During the study, body weight, solid and fluid intakes were measured. At the end of the experimental period, the blood pressure and the development of sensory neuropathy were assessed. Finally, the animals were killed and different organs and blood samples were collected to determine the effect of each of the hydrolysates on lipid metabolism, oxidative stress, inflammation, glucose metabolism and cardiovascular parameters. Obese Zucker rats that drank just water as a beverage and lean Zucker rats were used as controls.

The best results were obtained with the hydrolysate of egg white with pepsin. The consumption of this hydrolysate led to a significantly reduced body weight in the obese Zucker rats during the first 4 weeks of the study. In addition, the weight of the epididymal adipose tissue was lower in the animals that were fed this hydrolysate than in the obese animals that drank just water. On the other hand, the intake of the hydrolysate of egg white with pepsin significantly improved the hepatic steatosis, typical of obese Zucker rats and lowered the plasmatic concentration of free fatty acids. It also diminished the pro-inflammatory state, decreasing the plasma levels of tumor necrosis factor alpha. This hydrolysate was able to reduce the oxidative stress that also characterizes the obese animals of this breed, which showed a decrease in the levels of lipid peroxidation and an increase in the body's antioxidant status. The intake of this hydrolysate also lowered the plasma levels of insulin, causing a clear improvement in the quantitative indices of insulin resistance, insulin sensitivity and pancreatic β cells functionality.

The results also showed that the consumption of hydrolyzed egg white and, in this case, particularly of the hydrolysate produced with aminopeptidase, improved the vascular function in mesenteric resistance arteries through an increase in the levels and/or the bioavailability of nitric oxide. The different biological behaviour of both hydrolysates was attributable to the presence of peptides with different sequences and biological activities.

Overall, our results demonstrated a significant improvement of the cardio-metabolic abnormalities that affect obese Zucker rats in those who were fed the hydrolysate of egg white with pepsin, as they showed less fat accumulation, an increase in their antioxidant systems, a decrease in the inflammatory state and an improved insulin sensitivity, as well as an amelioration in their vascular function, which altogether prove the hypothesis of this work. This study paves the way to other experimental studies with the egg white hydrolysates that could ultimately prove their role in the management of metabolic syndrome.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Síndrome Metabólico. Concepto, definición y tratamiento

Durante los últimos cincuenta años, hemos experimentado cambios drásticos en nuestro entorno, comportamiento y estilo de vida. Estos cambios han derivado en un alarmante incremento de la prevalencia del denominado síndrome metabólico (SM). Aunque las condiciones genéticas influyen, la «occidentalización» en el estilo de vida está estrechamente relacionada con su aparición, pues el cambio en los hábitos de alimentación y el aumento del sedentarismo han ocasionado un rápido incremento del sobrepeso y la obesidad a edades cada vez más tempranas (de Ferranti et al., 2004; Groop y Orho-Melander, 2001). Además, las estimaciones mundiales son poco halagüeñas y se espera que, en un futuro inmediato, el número global de personas con SM aumente de manera importante. Hoy en día, el SM aparece incluso en áreas geográficas como España, Grecia o Francia, que antes, debido a sus dietas y estilos de vida saludables, no tenían este problema. Estos hechos explican en gran medida su frecuencia y prevalencia. Recientemente se han publicado las cifras de prevalencia de SM en nuestro país. Según estos estudios la prevalencia de este desorden asciende entre un 31 y un 38% en hombres y se sitúa alrededor del 29% en mujeres, prevalencia que aumenta con la edad (Marcuello et al., 2013; Fernández-Bergés et al., 2012). Su impacto en la sociedad es enorme, por lo que los expertos estiman que los gastos de asistencia sanitaria y social de los pacientes con SM aumentarán de forma considerable en Europa en los próximos años, lo que supone en la actualidad un auténtico reto para los sistemas de salud pública de prácticamente todo el mundo que continuará siéndolo en el futuro.

El SM constituye una entidad reconocida hace más de 90 años en la literatura médica. Los pacientes que lo padecen presentan distintas patologías frecuentes en nuestro entorno, tales como obesidad, hiperglucemia, dislipidemia e hipertensión arterial (HTA). El incremento de los principales factores de riesgo del

SM, obesidad, insulinoresistencia (IR) y dislipidemia es, además, el responsable de la actualmente considerada epidemia mundial de diabetes tipo 2 (DM2) (Ginter y Simko, 2012, Anderson y Critchle, 2001; Erkelens, 2001). El interés por este síndrome radica fundamentalmente en que aumenta en gran medida el riesgo de sufrir DM2 y enfermedades cardio- y cerebrovasculares, lo que puede provocar una muerte prematura (Solymoss et al., 2004; Stern et al., 2004; Alberti et al., 2006, Farias et al., 2010).

En la tabla 1 se describe de forma cronológica la evolución del concepto y la definición del SM y las distintas denominaciones atribuidas al mismo.

Tabla 1. Tabla cronológica de la evolución del concepto y definición del síndrome metabólico.

<p>1956 <i>Vague et al.</i>: Abdominal obesity may predispose to diabetes and cardiovascular disease.</p> <p>1981 <i>Rudermann et al.</i>: Metabolically obese normal-weight (MONW) individuals with hyperinsulinemia.</p> <p>1987 <i>Matsuzawa et al.</i>: visceral fat obesity: visceral fat area/ subcutaneous fat area > 0.4.</p> <p>1988 <i>Reaven</i>: Syndrome X: clustering around insulin resistance.</p> <p>1989 <i>Kaplan</i>: Deadly quartet: abdominal obesity, diabetes, hypertension, and hypertriglyceridemia.</p> <p>1994 <i>Nakamura, Matsuzawa et al.</i>: visceral fat syndrome visceral fat area \geq 127 cm² among Japanese men.</p> <p>1999 WHO: The first criteria of MetS based on insulin resistance.</p> <p>2001 National Cholesterol Education Program (NCEP) Criteria of MetS: The clustering of 3 or more of the following 5 components: abdominal obesity, high blood pressure, impaired fasting glucose, hypertriglyceridemia, and hypoHDL cholesterolemia.</p> <p>2005 International Diabetes Federation (IDF) Criteria of MetS: Abdominal obesity is necessary among the 5 components Japanese Criteria of MetS: visceral fat syndrome as Japanese MetS coordinating with the IDF Criteria</p> <p>American Heart Association (AHA)/National Heart, Lung, and Blood Institution (NHLBI): Revised NCEP Criteria</p> <p>American Diabetes Association (ADA)/ European Association for the Study of Diabetes: Do not label individuals with MetS.</p> <p>2007 ADA/Obesity Society/ American Society for Nutrition: The clinical usefulness of waist circumference is limited.</p> <p>2009 IDF/AHA/NHLBI/World Heart Federation/ International Atherosclerosis Society/ International Association for the Study of Obesity: Revised NCEP Criteria werer adopted as harmonizing worldwide criteria of MetS although cutoff points of waist circumference could not be determined for any particular ethnic group.</p>

Tomado de Eiji, 2012.

Una de las definiciones más comúnmente aceptadas es la propuesta por la Federación Internacional de Diabetes en el año 2005. En esta definición se establecían criterios más estrictos en lo referente a la obesidad abdominal y a los niveles de glucosa en plasma respecto a las definiciones anteriores. Según esta definición, la presencia de obesidad abdominal es necesaria para el diagnóstico del SM pero, además, sería necesaria la presencia de otros dos factores de los que figuran en la tabla 2. Recientemente se ha cuestionado la utilidad clínica del perímetro de la cintura, que se utiliza para el diagnóstico de obesidad abdominal, como factor de riesgo para el SM, y además se ha señalado que este parámetro no tiene en cuenta la variabilidad entre los distintos grupos étnicos.

Tabla 2. Factores de riesgo para la identificación clínica del síndrome metabólico, propuestos por la Federación Internacional de Diabetes (2005).

Factor de riesgo	Criterio
Obesidad abdominal	Circunferencia de la cintura > 94 cm hombre > 80 cm mujer
Bajo colesterol HDL	< 40 mg/dl hombre < 50 mg/dl mujer
Altos niveles de triglicéridos	≥ 150 mg/dl
Hiperglucemia postprandial	≥ 100 mg/dl
Hipertensión	PAS ≥ 130mm Hg PAD ≥ 85 mm Hg

Se sabe que en el SM están involucrados múltiples factores genéticos, endocrinos, psicológicos y de estilo de vida, y los pacientes con SM no presentan un órgano diana ni un blanco único sobre el cual dirigir una terapéutica específica. Por ello, habitualmente el tratamiento del SM debe basarse en el control de todas y cada una de las patologías asociadas que lo caracterizan para intentar revertirlo. Cada paciente tendrá una combinación de ellas, con distinto grado de severidad y por lo que se deben de individualizar prioridades y estrategias de intervención

(Alberti et al., 2009; Kahn et al., 2005). El sobrepeso y la obesidad juegan un papel central en la mayoría de los pacientes (Alberti et al., 2005) y, por lo tanto, su prevención y tratamiento es uno de los principales objetivos. Debido a esto, uno de los primeros enfoques en el tratamiento del SM debe pasar por una modificación drástica del estilo de vida, orientada principalmente a provocar una reducción del peso corporal y del sedentarismo lo que conlleva a incrementar la actividad física y disminuir las calorías de la dieta habitual, algo difícil de conseguir en la sociedad actual.

Esto hace que el tratamiento del SM vaya inevitablemente acompañado de un tratamiento farmacológico. Sin embargo, en la actualidad no existen tratamientos farmacológicos para el SM de alta efectividad en el mercado, y lo que se intenta es, en realidad, tratar por separado cada una de las complicaciones que caracterizan este síndrome. Esto hace inevitable tener que instaurar una polimedicación, aunque no siempre se consigue el objetivo global, pues la convivencia de varios problemas de salud asociados dificulta los tratamientos, que exigen la coordinación de varios especialistas (internistas, cardiólogos, endocrinos...etc.), algo difícil de lograr en la práctica médica habitual. En la actualidad la investigación en SM se esfuerza en hallar un medicamento que permita combatir de forma global todas y cada una de sus alteraciones, que incluya principios activos para reducir la obesidad, las cifras de presión arterial, la glucemia y los lípidos plasmáticos y que, idealmente, evite también procesos de agregación plaquetaria. Una posible herramienta relacionada con la intervención en las pautas alimentarias puede basarse en la inclusión de determinados componentes de los alimentos que aporten mejoras sustanciales a las alteraciones funcionales y metabólicas características de este síndrome.

1.2 Principales alteraciones asociadas al síndrome metabólico. Mecanismos implicados en su desarrollo y mantenimiento

La etiopatogenia del SM no es del todo conocida. Su fisiopatología es extremadamente compleja y sólo se ha dilucidado una parte de ella. Un gran número de pacientes tienen una serie de factores en común, como son una edad avanzada, son obesos, sedentarios, y tienen cierto grado de IR. A continuación desglosaremos las principales alteraciones asociadas al SM y los mecanismos de acción implicados en su desarrollo y mantenimiento.

Obesidad

La obesidad se considera uno de los principales problemas de salud a nivel mundial y se estima que afecta a más de 400 millones de individuos (Figura 1). Debido al rápido aumento de su prevalencia en los últimos años, se ha considerado una pandemia (Kimokoti y Millen, 2011). En los países industrializados ha pasado a ser el principal desorden nutricional (Wang et al., 2010), y una de las principales causas de muerte y discapacidad (Gómez-Ambrosi et al., 2008).

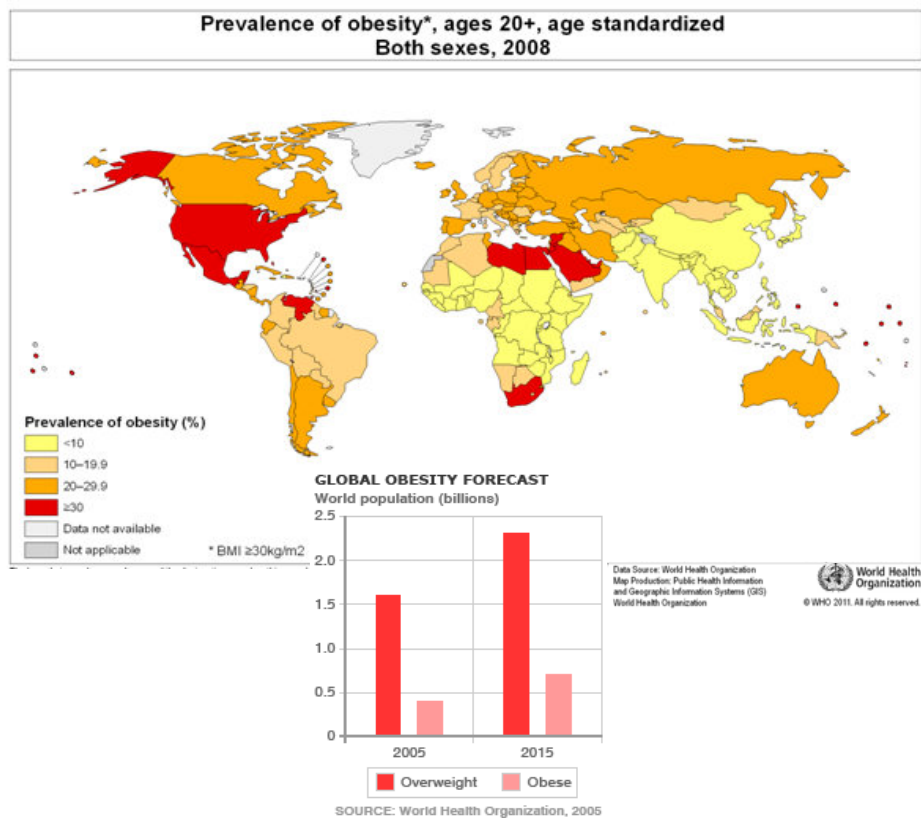


Figura 1. Mapa de la prevalencia actual de obesidad a nivel mundial, el que se refleja que el 65 % de la población mundial que vive en países industrializados presenta sobrepeso. El 35 % de adultos mayores de 20 años tienen sobrepeso, siendo el 11 % de ellos obesos (*Organización Mundial de la Salud (OMS) 2011*). En el gráfico se puede observar la incidencia de esta patología la cual se estima casi llegará a duplicarse en 10 años (*OMS, 2006*).

En la antigüedad se consideraba que la obesidad solo estaba influenciada por la ingesta calórica. En la actualidad, y a pesar de que su etiología no es del todo conocida, se considera una enfermedad multifactorial en la que están involucrados factores ambientales, genéticos, neurológicos, endocrinos y la actividad física (Schnitzler y Fisch, 2012; Angelakis et al., 2012), siendo difícil en cada caso particular valorar la importancia relativa de cada uno de ellos.

La obesidad se define como un exceso de grasa corporal o tejido adiposo producido como consecuencia de un desequilibrio positivo y prolongado entre la ingesta y el gasto energético (Arrizabalaga et al., 2004). A corto plazo el control de

la ingesta está principalmente mediado por las vías de señalización procedentes del tracto gastrointestinal, incluidos los péptidos orexigénicos (grelina) que activan las señales de hambre y los péptidos anorexigénicos: colecistoquinina (CCK), péptido similar al glucagón 1 (GLP-1), y péptido tirosina-tirosina (PYY 3-36) que generan señales de saciedad. En el control de la ingesta a largo plazo parecen ser primordiales las señales procedentes del tejido adiposo (leptina) y el páncreas (insulina), liberadas en respuesta a la ingesta de alimentos y a los depósitos de grasa corporal (Konturek y Czesnikiewics-Guzik, 2004), de los que hablaremos con detalle más adelante.

Según la distribución de la grasa corporal, la obesidad se clasifica en central o androide con predominio de tejido adiposo en la región abdominal (tipo manzana) asociándose a factores de riesgo cardiovascular, y ginoide con acúmulo de tejido grasa principalmente en la región fémoro-glútea (tipo pera) (Vague, 1947). Los obesos con exceso de grasa visceral (central) tienen mayor riesgo de padecer SM (Despres, 2001; Klein et al., 2008; Hamdy et al., 2006).

La cantidad de grasa corporal puede medirse de forma directa mediante técnicas como la hidrodensitometría, pletismografía, tomografía computerizada, resonancia magnética, absorciometría dual energética de rayos X o la bioimpedanciometría (Martínez, 2010). Sin embargo, estas técnicas no se suelen utilizar de forma habitual en la práctica clínica, debido a su elevado coste y a que se requieren equipos específicos y personal especializado. Existen otras técnicas más baratas, accesibles, fáciles y reproducibles, basadas en la antropometría. El índice de masa corporal (IMC) es uno de los criterios más utilizados para realizar el diagnóstico de obesidad, ya que el peso está estrechamente relacionado con la grasa corporal, que se define como el cociente del peso en kilogramos entre la talla en metros al cuadrado (Tabla 3). Sin embargo, hay que ser conscientes que el IMC no mide directamente la cantidad de grasa corporal, por lo que para hacer una determinación más precisa al respecto se hace uso de otros índices que tienen

mayor correlación con los factores de riesgo metabólicos, como son por ejemplo el perímetro de la cintura (PC) (existe riesgo por encima de 82 cm en mujeres y 94 cm en hombres), el índice cintura-cadera (ICC) obtenido al dividir la circunferencia de la cintura entre la circunferencia de la cadera en centímetros, considerándose valores de riesgo aquellos superiores a 0.9 en mujeres y a 1.0 en hombres, la medición de pliegues cutáneos o el índice nutricional (Sweeting, 2007; Martínez, 2010).

Tabla 3. Clasificación internacional de la OMS del estado nutricional (infrapeso, sobrepeso y obesidad) de acuerdo con el índice de masa corporal (IMC) (OMS 2004). IMC = Índice de masa corporal

Clasificación	IMC (Kg/m ²)	
	Valores de corte principales	Valores de corte adicionales
Infrapeso	< 18.50	< 18.50
Delgadez severa	< 16.00	< 16.00
Delgadez moderada	16.00 - 16.99	16.00 - 16.99
Delgadez aceptable	17.00 - 18.49	17.00 - 18.49
Normal	18.50 - 24.99	18.50 - 22.99
		23.00 - 24.99
Sobrepeso	≥ 25.00	≥ 25.00
Pre-obeso	25.00 - 29.99	25.00 - 27.49
		27.50 - 29.99
Obeso	≥ 30.00	≥ 30.00
Obeso tipo I	30.00 - 34.99	30.00 - 32.49
		32.50 - 34.99
Obeso tipo II	35.00 - 39.99	35.00 - 37.49
		37.50 - 39.99
Obeso tipo III	≥ 40.00	≥ 40.00

El tejido adiposo está compuesto principalmente por células denominadas adipocitos y también por adipoblastos, células vasculares, inmunológicas y nerviosas (Wang et al., 2008). Los adipocitos están adaptados para almacenar ácidos grasos en forma de triglicéridos reunidos en una gota citoplasmática única (Hernán Daza, 2002). El número y tamaño de los adipocitos aumenta a medida que el individuo aumenta de peso. Se trata de células altamente diferenciadas que realizan tres funciones: almacén, liberación de energía y endocrina.

Los adipocitos de los individuos con SM tienen además una actividad lipolítica muy elevada. Los ácidos grasos libres que se liberan del adipocito de las reservas grasas actúan como fuente de energía para muchos órganos. Un exceso de estos ácidos grasos libres circulantes contribuye de forma adversa en el SM y sus complicaciones.

En los últimos años se ha visto que el tejido adiposo, en especial el visceral, es un tejido muy activo que expresa gran cantidad de genes para la secreción de proteínas. Los adipocitos segregan, además, moléculas biológicamente activas que reciben el nombre de adipocitoquinas (Funahashi et al., 1999; Adami y Ravera, 2001; Frayn, 2001; Goossens 2008). Hasta el momento se han identificado un gran número de adipocitoquinas. Todas ellas forman parte de una red de comunicaciones entre el tejido adiposo y otros tejidos y órganos, como el músculo esquelético, la corteza adrenal, el cerebro y el sistema nervioso simpático. Estas moléculas actúan sobre múltiples sistemas regulando diversos procesos metabólicos. Una función esencial de las adipocitoquinas es su participación en la respuesta de las células a la insulina, favoreciendo la utilización de glucosa por los tejidos y el metabolismo de los ácidos grasos. Estas moléculas modulan, además, procesos como el apetito, el balance energético, la inmunidad, la angiogénesis, la presión sanguínea y la homeostasis. La mayoría de las adipocitoquinas aumentan en proporción directa con el aumento del IMC.

En la tabla 4 se muestran las adipocitoquinas que se liberan del tejido adiposo. Comentaremos más detalladamente las características y propiedades más relevantes de algunas de ellas, y su relación con el SM.

Tabla 4. Principales adipocitoquinas liberadas por el tejido adiposo y efectos que producen en el organismo.

ADIPOCITOQUINA	FUNCIÓN	REFERENCIA
Lipoproteinlipasa (LPL)	Hidroliza triglicéridos	<i>Rashid et al., 2002</i>
Lipasa sensible a hormonas (LSH)	Hidroliza triglicéridos y ésteres	<i>Kraemer y Shen, 2002</i>
Proteína de unión a retinol-4 (RBP-4)	Induce expresión de enzimas gluconeogénicas en hígado y deteriora las vías de señalización de insulina en músculo	<i>Olszanecka-Glinianowicz et al., 2009</i>
Interleuquina 6 (IL-6)	Citoquina proinflamatoria periférica	<i>Di Lorenzo et al., 2013</i>
Factor de necrosis tumoral alpha (TNF-α)	Citoquina proinflamatoria Regula la proliferación celular y la apoptosis	<i>El-Wakkad et al., 2013</i> <i>Dinarelo y Moldawer, 1999</i>
Adiponectina	Promueve oxidación de grasas en músculo y es insulinosensibilizante periférico	<i>Yamauchi et al., 2003</i> <i>Badman y Flier, 2007</i>
“ <i>Peroxisome Proliferator Activated Receptor- Gamma</i> ” (PPAR- γ)	Regulador de la transcripción de genes adipogénicos	<i>Palou et al., 2004</i>
Factor de crecimiento similar a insulina tipo 1 (IGF-1)	Potencia la acción de la insulina	<i>Berrymann et al., 2013</i>
Leptina	Hormona que regula el balance energético y el peso corporal	<i>Fruhbeck et al., 2002</i>
Resistina	Regula adipogénesis y disminuye sensibilidad a la insulina	<i>Steppan et al., 2001</i>
Apelina (APLN)	Adipocitoquina con propiedades antiobesidad y antidiabéticas	<i>Castan-Laurell et al., 2011</i>
Visfatina	Citoquina proinflamatoria. Inhibe la apoptosis de neutrófilos activados. Activa receptores de insulina	<i>Badman y Flier, 2007</i>
Inhibidor del activador de plasminógeno tipo 1 (PAI-1)	Factor inhibe la formación de trombos (antitrombótico)	<i>Sprengers y Kluft, 1987</i>
Adipofilina	Marcador de acumulación lipídica	<i>Buechler et al., 2001</i>
Prostaglandina E2 (PGE2)	Inhibe lipolisis y activa secreción de leptina	<i>Fain et al., 2000</i>

"Secreted frizzled-related protein 5" (SFRP5)	Proteína antiinflamatoria en tejido adiposo	<i>Ouchi et al., 2011</i>
Proteína C reactiva (CPR)	Citoquina proinflamatoria periférica. Activa monocitos y macrófagos	<i>Pasceri et al., 2000</i> <i>Renna et al., 2013</i>
Interleuquina 1 beta (IL-1 β)	Citoquina proinflamatoria	<i>Di Lorenzo et al., 2013</i>
Dipeptidil-dipeptidasa IV (DPP IV)	Proteasa que degrada incretinas (GLP-1 y GIP). Bloquea la tolerancia a la glucosa y la secreción de insulina	<i>Drucker y Nauck, 2006</i>
Vaspina	Proteasa sensibilizadora de la insulina	<i>Bergmann y Sypniewska, 2013</i>
Omentina	Citoquina antiinflamatoria, antidiabética y antiaterogénica	<i>El-Mesallamy et al., 2011</i>
Chemerina (RARRES2 o TIG2)	Proteína antiinflamatoria y asociada con la diferenciación de los adipocitos y estimulan la lipólisis	<i>Ouwens et al., 2012</i>
"Fibroblast growth factor 21" (FGF21)	Proteína que estimula el consumo de glucosa por los adipocitos diferenciados	<i>Bergmann y Sypniewska, 2013</i>
A-FABP	Proteína que transporta ácidos grasos de cadena larga entre diferentes compartimentos celulares	<i>Kralisch et al., 2012</i>

Leptina. La leptina fue descubierta por Zhang et al. en el año 1994. Se trata de una proteína de 167 aminoácidos y con una masa molecular de 16 kDa. Se sintetiza principalmente en los adipocitos y, en menor medida, en la placenta y el estómago (Mantzoros, 1999). La leptina se considera una hormona reguladora del balance energético y del peso corporal (Fruhbeck et al., 2002). Reduce los niveles intracelulares de lípidos en el músculo esquelético, el hígado y las células β -pancreáticas, mejorando la sensibilidad a la insulina. Estos cambios están parcialmente mediados por activación simpática central de receptores adrenérgicos (Minokoshi et al., 2002). Los niveles de leptina circulantes están directamente relacionados con la adiposidad, pero éste no es el único factor que determina los niveles de esta adipocitoquina. Se sabe además que la leptina se correlaciona positivamente con el IMC (Muñoz, 2007), estimándose que en personas obesas hay

una situación de resistencia a la leptina (Friedman et al., 1998). Se ha llegado a sugerir que la hiperleptinemia y la resistencia a la leptina, más que la hiperinsulinemia, podrían ser los factores que conducen al SM (Zimmet y Buyku, 1999).

Adiponectina. La adiponectina es otra de las proteínas producidas por el adipocito, también llamada AdipoQ o Acrp30. La presencia de esta proteína en plasma fue observada en 1999 por Arita et al. Esta adiponectina se sintetiza exclusivamente en el tejido adiposo blanco, y se produce al diferenciarse el adipocito. Es una proteína de 247 aminoácidos, con una masa molecular de 30 kDa. El gen de la adiponectina se encuentra ubicado en el cromosoma 3q27, precisamente donde se ha identificado el locus susceptible para el SM, la DM2 y la enfermedad coronaria. La adiponectina se puede considerar una hormona secretada por los adipocitos con efectos antidiabéticos, antiinflamatorios y antiaterogénicos (Ouchi et al., 2001; Yamauchi et al., 2003). Muchos estudios hablan de una correlación entre sensibilidad a insulina y niveles elevados de adiponectina en humanos y en animales de experimentación, siendo los niveles circulantes de esta proteína menores en situaciones de obesidad, IR o DM2 (Arita et al., 1999; Pajvani y Scherer, 2003).

Factor de necrosis tumoral (TNF). El factor de necrosis tumoral (TNF), es una citoquina secretada principalmente por células del sistema inmune. Otras células, tales como astrocitos, microglías, miocitos y fibroblastos pueden también producir TNF- α (Tracey, 1994; Ibelgaufts, 1995). Esta molécula se descubrió en 1985 en el suero de ratones después de la infección con endotoxinas bacterianas (Old, 1985). Se han identificado dos formas moleculares denominadas TNF- α o Caquexina y TNF- β o Linfotoxina (Tracey, 1994; Ibelgaufts, 1995). El TNF está principalmente expresado en la membrana celular y participa en la regulación de la proliferación celular y la apoptosis (Dinarello y Moldawer, 1999). Concretamente, el TNF- α tiene además una importante actividad proinflamatoria (Bulló Bonet et al., 2000;

Dinarello y Moldawer, 1999). Esta citoquina se considera clave por su papel mediador en la respuesta inflamatoria y en la respuesta al daño o invasión de tejidos por parte de microorganismos como parásitos o bacterias. También tiene gran importancia en el control de procesos neoplásicos. El TNF- α ha cobrado especial interés, ya que podría justificar algunas de las alteraciones observadas en el SM.

Aparte de sus efectos en el sistema inmunitario, también se han comprobado acciones en el ámbito periférico (Hotamisligil y Spiegelman 1994). Se ha visto que el TNF- α está implicado en el desarrollo de IR porque provoca la inactivación del sustrato receptor de la insulina intracelular (IRS-1) (Hotamisligil et al., 1996). Otro mecanismo propuesto es que el TNF- α liberado en el adipocito es capaz de inhibir la actividad y la expresión de la lipoproteinlipasa (LPL) y promueve el aumento de la trigliceridemia (Hotamisligil et al., 1993; Bruun et al., 2003). También parece estar relacionado el hecho de que el TNF- α es capaz de reducir la expresión y secreción de la adiponectina (Arita et al., 1999). A nivel del endotelio vascular, además de la actividad proinflamatoria, el TNF- α tiene actividad procoagulante ya que estimula la expresión de factores tisulares promoviendo la adhesión de los monocitos al endotelio vascular, y la subsiguiente diferenciación a macrófagos y células espumosas, situación clave para el inicio y desarrollo de enfermedad cardiovascular. Por último, el TNF- α también se secreta y actúa nivel neuronal, principalmente en la región hipotalámica que regula la temperatura corporal y el apetito.

La mejor forma de tratar la obesidad es mediante su prevención. Aunque las intervenciones preventivas sobre la obesidad todavía no han demostrado mejorar la prevalencia de la misma, sí se han conseguido mejoras en el conocimiento y comportamiento poblacional (Summerbell et al., 2005). Además, el principal problema no es el aumento de peso corporal en sí mismo, sino la morbilidad

asociada a las complicaciones metabólicas y estas pueden mejorar sustancialmente incluso tras una pérdida de peso moderada.

Los tratamientos tradicionales de reducción de peso basados en las dietas hipocalóricas y el aumento de la actividad física han tenido cierto éxito en el control de la obesidad. Sin embargo, por lo general estas estrategias dan lugar a reducciones de peso limitadas y temporales (Sanz et al., 2009), o solo a la pérdida de un 10% del peso inicial (Jubbin y Rajesh, 2012). Además, en ocasiones, seguir una dieta adecuada resulta imposible para algunos pacientes, en parte porque el origen de su obesidad es la ansiedad. Estas personas suelen entrar en un círculo vicioso en el que comen de forma compulsiva, con sobreingesta y el consiguiente aumento de peso. La modificación de la conducta desempeña también un papel importante en el tratamiento de la obesidad. Con ella se pretende ayudar al individuo obeso a cambiar su actitud frente a la comida y sus hábitos alimentarios y de actividad física. El apoyo psicológico y psiquiátrico puede ser necesario, especialmente cuando existen alteraciones importantes de la personalidad o cuadros ansioso-depresivos relevantes.

Los fármacos son otra de las armas terapéuticas para el tratamiento de la obesidad y, en ciertos casos, puede ser necesario además completar el tratamiento con terapia farmacológica. En el año 1999, la FDA aprobó el entonces único medicamento para el tratamiento de la obesidad en Estados Unidos, el orlistat. Este fármaco actúa uniéndose a las serinas de las lipasas gástricas y pancreáticas, inhibiendo de esta forma su acción (Ziegler y Quilliot 2000), con lo que se reduce la absorción sistémica de grasas contenidas en la dieta. Actualmente en España existen dos fármacos aprobados por el Ministerio de Sanidad para el tratamiento de la obesidad: el orlistat y la sibutramina. La sibutramina actúa a nivel del sistema nervioso central, inhibiendo la recaptación de serotonina y noradrenalina, produciendo una sensación de saciedad. Recientemente, y después de 13 años, la FDA ha aprobado dos nuevos fármacos contra la obesidad: la lorcaserina (Belviq) y

la fentermina en combinación con el topiramato (Qsymia). La lorcaserina es un agonista de los receptores de la serotonina del tipo 5-HT_{2C} situados en el cerebro, que produce sensación de saciedad. La fentermina es un supresor del apetito de la familia de las anfetaminas que actúa como agonista adrenérgico sobre el sistema nervioso central, y el topiramato, que es un fármaco antiepiléptico que ayuda a reducir la ingesta incontrolada porque bloquea los canales de sodio dependientes en las neuronas y potencia la actividad del ácido gamma-aminobutírico en el cerebro.

En casos especiales se puede recurrir a la terapia quirúrgica, como la cirugía bariátrica. El tratamiento quirúrgico debe reservarse solo a pacientes seleccionados que cumplen una serie de condiciones y en los que naturalmente hayan fracasado reiteradamente el resto de tratamientos.

Insulinorresistencia

El concepto de IR fue introducido en 1936 (Himsworth, 1936). Esta condición puede definirse como la disminución de la capacidad de la insulina para producir la respuesta fisiológica sobre el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa. Como consecuencia, se produce un incremento de la secreción de insulina con el fin de compensar la anterior situación, dando lugar a una hiperinsulinemia, que puede ser compatible con niveles de glucemia normales, debido a la función compensadora ejercida por las células β -pancreáticas. Según progresa esta función compensadora, los islotes de Langerhans del páncreas son incapaces de sostener el estado de hiperinsulinemia. Esto ocasiona una intolerancia a la glucosa, con elevación de la glucosa postprandial y posterior disminución de la secreción de insulina, aumento en la producción hepática de glucosa y en último término desarrollo de DM2 (Erkelens, 2001; Martínez de Moretin et al., 2003). La IR produce también un deterioro de la supresión de la salida de glucosa desde el hígado inducida por la insulina, lo que agrava la hiperinsulinemia y produce un acúmulo de lípidos en el

hígado y en el tejido adiposo (Cani et al., 2007). Así, esta alteración metabólica se considera responsable de la hiperglucemia y el aumento en la producción hepática de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y triglicéridos, del aumento de la presión arterial y también de la estimulación de la proliferación tanto vascular como endotelial causante del inicio del proceso de aterosclerosis (Anderson y Critchley, 2001). Algunos autores consideran la IR el nexo de unión entre las diferentes manifestaciones del SM y la responsable, junto con la obesidad, de la mayor parte de las anomalías presentes en este síndrome y uno de los marcadores más tempranos del mismo (Anderson et al., 2001).

Hasta hace muy poco tiempo la IR se asociaba con DM2 y se consideraba el factor principal que ocasionaba la disfunción de las células β -pancreáticas (Salehi et al., 2008; Chia y Egan, 2008). Sin embargo, en la actualidad se han reconocido otros factores etiopatogénicos relacionados con el control de la secreción de insulina y de glucagón, como son una serie de hormonas producidas por el tracto gastrointestinal que se conocen como incretinas y que se liberan en respuesta a la ingestión de alimentos (Drucker, 2006). Entre ellas se encuentran el GLP-1 y el polipéptido insulínico dependiente de glucosa (GIP). El GIP promueve la secreción de hormonas del adipocito (resistina) y aumenta la secreción de glucagón por las células β del páncreas. Por su parte, el GLP-1 inhibe la liberación del glucagón, el vaciamiento gástrico y la ingesta de comida (Vilsboll et al., 2001; Abu-Hamdah et al., 2009). El efecto de las incretinas es muy breve debido a que inmediatamente después de liberarse a la circulación se inactivan por la enzima dipeptidilpeptidasa 4 (DPP-IV). De hecho, en la actualidad los tratamientos que se están desarrollando para la DM2 están orientados a optimizar la acción de estas incretinas o a inhibir la enzima DPP-IV (Murphy et al., 2006; D'Alessio et al., 2009). Sin embargo, existen discrepancias en cuanto a su utilización, ya que algunos investigadores relacionan estos tratamientos con graves efectos secundarios como son la pancreatitis, el cáncer pancreático y tiroideo entre otros (Labuzek et al., 2013).

Se ha demostrado que hay una fuerte asociación entre la IR y un excesivo acúmulo de lípidos fuera del tejido adiposo, particularmente en la musculatura y en el hígado (Blaak et al., 2005; Noto et al., 2006). Los ácidos grasos son también fuertes predictores de la IR a nivel muscular ya que su oxidación produce la inhibición de la utilización de glucosa por el músculo. El efecto lipotóxico a largo plazo de los ácidos grasos sobre las células β -pancreáticas colabora en el vínculo entre obesidad, IR y desarrollo de DM2 (Ronti et al., 2006). Así pues, los ácidos grasos están aumentados en el tejido muscular de sujetos obesos, y más aún en sujetos con DM2. La IR provoca además una menor retención de los ácidos grasos libres en adipocitos, lo que ocasiona un incremento de flujo de ácidos grasos libres de vuelta al hígado. Estos ácidos grasos influyen en la expresión génica de proteínas y en la síntesis hepática de lipoproteínas. Todos estos procesos contribuyen al desarrollo de dislipemia y complicaciones cardiovasculares

Entre los tratamientos más utilizados para reducir la IR se encuentran las Biguanidas (metformina), cuya acción fundamental consiste en disminuir la salida hepática de glucosa hacia el torrente sanguíneo (Robinson et al., 1998). Las Glitazonas o Tiazolidindionas (pioglitazona y rosiglitazona), una nueva clase de fármacos antidiabéticos orales que mejoran la sensibilidad tisular a la acción de la insulina (principalmente en músculo e hígado) y disminuyen la producción hepática de glucosa mediante la estimulación del receptor del activador del proliferador de peroxisomas tipo γ (PPAR- γ) (Pittas y Greenberg, 2002). Destacan también los inhibidores de la α -glucosidasa que se utilizan principalmente para reducir la glucemia postprandrial en individuos con DM2, y pueden además mejorar la IR de forma indirecta a través de señales gastrointestinales (Van de Laar et al., 2006). Cuando la diabetes no se controla con monoterapia, una alternativa es la combinación de fármacos sensibilizadores, por ejemplo, la asociación de biguanidas con tiazolidindionas.

Dislipidemia

El perfil lipídico que presentan los pacientes que sufren SM se resume en un aumento de las concentraciones de colesterol total, asociado a las VLDL y a las lipoproteínas de baja densidad (LDL), valores elevados de la apoproteína B-100 y otras alteraciones como la hipertrigliceridemia moderada y la disminución del colesterol asociado a las lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Poirier et al., 2006; Ebbert y Jensen, 2013). Estas alteraciones contribuyen de manera significativa al incremento de riesgo de enfermedad cardiovascular en individuos con SM (McBride, 2008). De hecho, un aumento en la concentración plasmática de colesterol de un 1% supone un aumento de un 2-3% en el riesgo de enfermedad coronaria (James et al., 2000).

A continuación se explican con más detalle los principales eventos que desencadenan la dislipemia en el SM (Figura 2). En primer lugar, se sabe que el adipocito visceral es más sensible a los efectos metabólicos de las hormonas lipídicas, glucocorticoides y catecolaminas, lo que produce un aumento de la liberación de ácidos grasos libres al sistema portal, que sirven como sustrato hepático para formar VLDL, y que se encargan de transportar el exceso energético en forma de triglicéridos. En segundo lugar, el incremento de la IR conduce a un incremento de la producción de apoproteína B-100, principal componente proteico de las VLDL y las LDL, y con ello un incremento de la síntesis y secreción de VLDL. La sobreproducción de VLDL satura la enzima LPL, que produce una disminución de la depuración de triglicéridos postprandiales, provocando la hipertrigliceridemia característica del SM (Rashid et al., 2002). Las LDL enriquecidas en triglicéridos se convierten en formas más pequeñas y densas. Estas LDL pequeñas y densas se oxidan y glicosilan más fácilmente, y son captadas con menor frecuencia por el hígado a través del receptor de LDL. Esto favorece su depósito a nivel de la pared vascular, lo que determina su capacidad aterogénica. Los cambios en la conformación de la apolipoproteína B-100 que se producen en las LDL promueven,

además, una mayor afinidad de estas partículas por los proteoglicanos arteriales, que se transportan mejor dentro del espacio subendotelial (Berneis y Krauss, 2002). En el año 2000, Hotta et al. sugirieron que la hipoadiponectinemia observada en el SM, podía acelerar también los cambios ateroscleróticos observados en dicho síndrome (Matsubara et al., 2002). La disminución del colesterol HDL parece que es secundaria al aumento de VLDL a través del intercambio del colesterol.

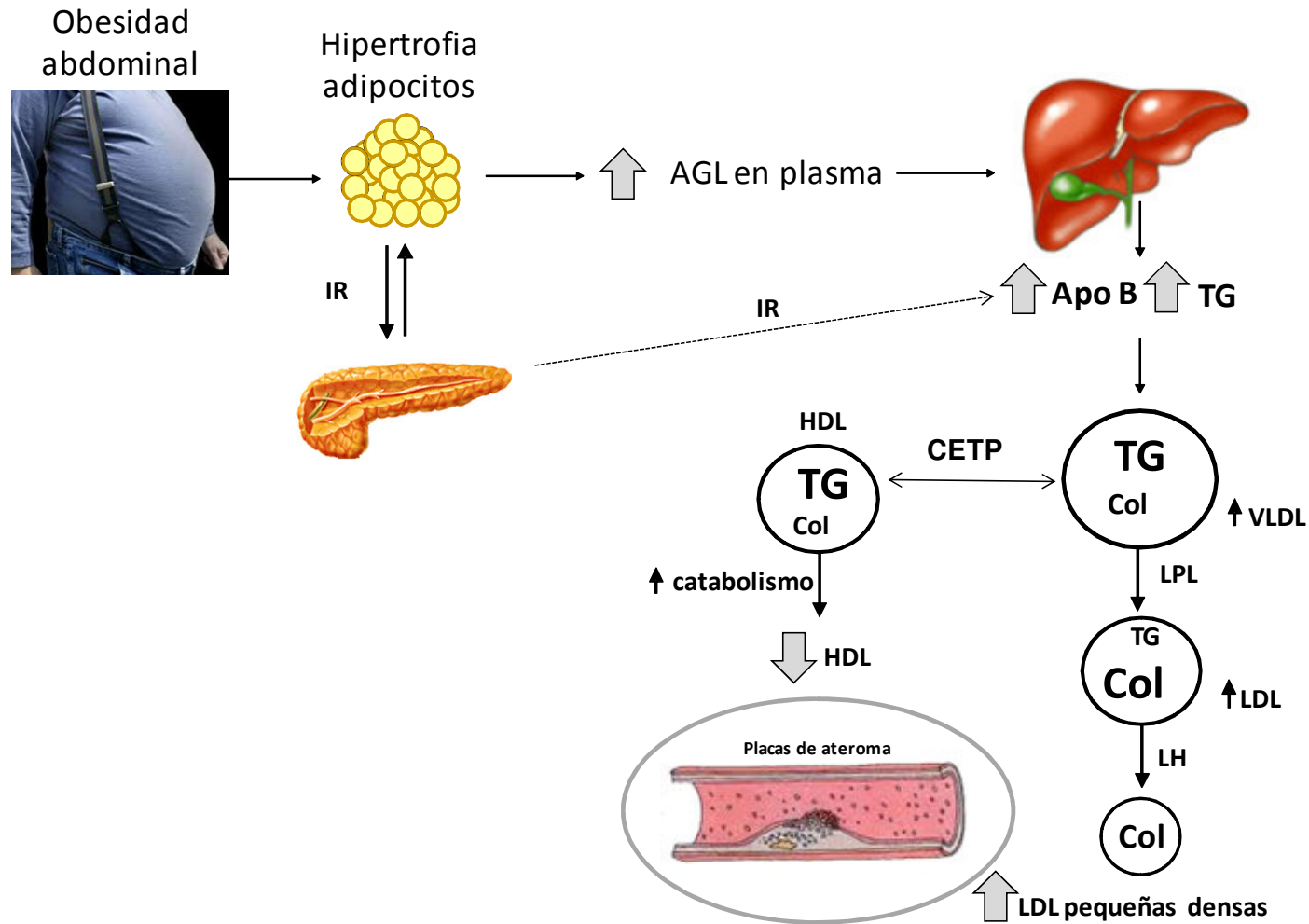


Figura 2: Esquema del proceso metabólico que desencadena dislipemia en el desarrollo del síndrome metabólico. AGL = ácidos grasos libres; Apo B = apolipoproteína B; CETP = Proteína transportadora de ésteres de colesterol; Col = colesterol; IR = insulinoresistencia; HDL = lipoproteínas de alta densidad; LDL = lipoproteínas de baja densidad; LH = lipasa hepática; LPL = lipoproteinlipasa; TG = triglicéridos; VLDL = lipoproteínas de muy baja densidad.

El tratamiento farmacológico de la dislipidemia en el SM debe iniciarse con estatinas y, de ser necesario, combinar las estatinas con fibratos y derivados del ácido nicotínico. En general, con su uso se ha observado una mejoría del perfil aterogénico, de la reactividad vascular dependiente de endotelio y de la sensibilidad hepática a la insulina, esta última mejora al disminuir el acúmulo de lípidos en hígado y músculo (Malik et al., 2001). Otra alternativa es el tratamiento con niacinas o vitamina B3. La ingesta de altas dosis de esta vitamina hidrosoluble produce un bloqueo o disminución de la lipólisis en el tejido adiposo. La niacina se usa en el tratamiento de la dislipemia debido a que reduce las VLDL y aumenta los niveles de HDL (Boden et al., 2011). Otra posibilidad es el tratamiento con Ezetimiba, una droga que actúa inhibiendo la absorción del colesterol de la dieta en el intestino delgado (García-Calvo et al., 2005), así como en los hepatocitos (Temel et al., 2007).

Esteatosis hepática

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA) o esteatosis hepática, es una enfermedad inflamatoria de gran relevancia en la actualidad, directamente relacionada con la obesidad, el estrés oxidativo, la IR, la hipertrigliceridemia y la DM2, siendo una de las mayores causas de morbi-mortalidad relacionada con patologías hepáticas (Barba et al., 2008). Se considera la principal manifestación hepática del SM. Hasta el momento se desconoce la prevalencia de EHGNA en la población general, pero se sabe que la prevalencia aumenta en grupos de alto riesgo, alcanzando valores de entre el 70 y el 86% en pacientes obesos y/o diabéticos. (Barba et al., 2008, Klein et al., 2008). Esta patología se conoce también con el nombre de “enfermedad del este” y se asocia con factores socioeconómicos, tipo y composición de las dietas y nivel de actividad física (Musso et al., 2003).

La EHGNA provoca cambios histológicos en el hígado que son muy parecidos a aquellos inducidos por el consumo excesivo de alcohol. Esta dolencia se

caracteriza por depósitos de lípidos en el citoplasma de los hepatocitos y de las células de Kupffer, en forma de vacuolas lipídicas (acúmulo de 5 a 10% del peso del órgano), que desplazan el núcleo celular a la periferia, dando lugar a la formación de células en anillo. Este acúmulo de lípidos se produce porque el grado de lipogénesis es mayor al grado de lipólisis (desequilibrio entre el consumo, la oxidación y la disposición de triglicéridos). Una de las principales características histológicas es la esteatosis macrovesicular y los infiltrados inflamatorios de leucocitos polimorfonucleares y/o neutrófilos que desencadenan la liberación de citoquinas pro-inflamatorias como el TNF- α y la IL-6. Estas citoquinas que, como hemos visto aumentan la IR de los tejidos, provocan también un empeoramiento del cuadro de esteatosis hepática. La IR se considera, por lo tanto, el factor fisiopatológico individual más importante en el desarrollo de la esteatosis (Charlton et al., 2002, Sanyal et al., 2003), y su severidad está estrechamente relacionada con el grado de obesidad central (Lizardi-Cervera et al., 2004, Hamdy et al., 2006, Fan y Farrell, 2008).

Según el grado de afectación hepática la EHGNA se clasifica en diferentes estadios, que puede ir desde la simple acumulación de triglicéridos en los hepatocitos (esteatosis hepática simple o clase 1), pasando por la esteatosis con inflamación no específica (esteatohepatitis o clase 2), esteatosis con degeneración balonzante (clase 3), y fibrosis (clase 4). En la última etapa de la enfermedad se desarrolla cirrosis y cáncer de hígado. En el caso del SM estaríamos hablando de esteatosis de clase 1, relacionada principalmente con la obesidad y la IR, y esteatohepatitis de clase 2 relacionada con el estrés oxidativo.

En la actualidad no existe ningún medicamento que, por sí solo, logre controlar esta patología. El tratamiento de la EHGNA incluye la disminución de peso y la disminución de la IR. La disminución de peso puede lograrse con medidas dietéticas y/o aumento de actividad física, y para mejorar la IR se utilizan fármacos que aumentan la sensibilidad a esta hormona como metformina (Bugianesi et al.,

2005), pioglitazona (Promrat et al., 2004) y rosiglitazona (Neuschwander-Tetri et al., 2003). También se utilizan compuestos que tienen efecto en la homeostasis lipídica, que disminuyen los depósitos intrahepáticos de lípidos como la S-adenosil-L-metionina. Otra forma de abordar el tratamiento de esta patología es mediante la utilización de suplementos antioxidantes como la betaína (Miglio et al., 2000; Abdelmalek et al., 2001) o el α -tocoferol (análogo de la vitamina E) (Lavine, 2000; Hasegawa et al., 2001; Yoneda et al., 2004).

Hipertensión arterial asociada al síndrome metabólico

La relación entre los distintos componentes del SM (obesidad, DM2, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia etc.) y las enfermedades cardiovasculares es ampliamente conocida y estudiada (Mancia et al., 2007; Wassink et al., 2007). Se sabe que los factores de riesgo que confluyen en el SM, entre ellos la HTA, incrementan además la mortalidad cardiovascular (Waine, 2005).

Dentro de los factores de riesgo adquiridos, la obesidad en sí misma puede ser la causa de desarrollo de HTA, pues el aumento de peso se acompaña de retención de sodio por aumento de la actividad del sistema renina-angiotensina, y aumento del trabajo cardíaco. La pérdida de peso es, por tanto, vital para controlar la HTA del paciente con SM.

El SM también se asocia con cambios en la proliferación de las células del músculo liso vascular, que se hipertrofia como consecuencia de la acción mitogénica de la insulina. También se asocia con un estímulo del crecimiento del endotelio y una disfunción de este tejido. Se ha comprobado que, además, existe gran similitud entre la proinsulina y la propia insulina, y los péptidos conocidos como factores de crecimiento similares a la insulina (“Insulin-like growth factor-1”=IGF-1 e “Insulin-like growth factor-2”=IGF-2), que estimulan el crecimiento del endotelio (Ueno et al., 2000). La IR conlleva, en realidad, un aumento en la reabsorción tubular de

sodio y un aumento potencial en los niveles citosólicos de calcio. Además de la hipertrofia del músculo liso y la disfunción endotelial, también se señalan como mecanismos implicados en la HTA del paciente con SM el incremento de las resistencias vasculares periféricas, la activación del sistema nervioso simpático y la modificación del transporte de iones a través de las membranas celulares. Otro mecanismo implicado en la HTA asociada al SM son los cambios fisiopatológicos a nivel renal que se encuentran estrechamente relacionados con los niveles elevados de leptina. Esta adipocitoquina aumenta la actividad simpática a través de su acción en el hipotálamo y ocasiona un aumento en los niveles de presión arterial.

El uso de tratamientos antihipertensivos que bloquean el eje renina-angiotensina se ha asociado con una menor incidencia de diabetes (Mancia et al., 2006), y con efectos favorables en las lesiones de los órganos diana de los sujetos que la padecen. Por ello, los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) y los antagonistas del receptor AT1 de la angiotensina II (ARA) deben considerarse las drogas de elección para el tratamiento de la HTA en el SM (ESH, ESC 2007). Debido a que los sujetos con SM con frecuencia son obesos y sensibles a la sal, parece razonable añadir un diurético tiazídico a bajas dosis, aunque debe recordarse que los diuréticos, en especial a dosis altas, tienen efectos metabólicos desfavorables sobre la glucemia y el perfil lipídico. Otros tratamientos menos frecuentes pero posibles son los bloqueantes de calcio, la espironolactona o los beta bloqueantes con acción vasodilatadora (carvedilol, nebivolol) (Kaiser et al., 2006).

Estado inflamatorio y estrés oxidativo asociado al síndrome metabólico

Los pacientes con SM presentan un estado de inflamación crónica leve, caracterizado por una elevada producción de citoquinas y adipocitoquinas proinflamatorias que contribuyen al desarrollo y mantenimiento de las alteraciones metabólicas de forma permanente (Sanz et al., 2009). Como ya se ha comentado anteriormente, las concentraciones de mediadores inmunológicos, como el TNF- α y

la leptina, suelen estar elevadas en la sangre periférica de estos pacientes, mientras que las de adiponectina están reducidas (Tilg y Moschen, 2006).

También hemos comentado que el tejido adiposo visceral es mucho más activo en la producción de citoquinas que el tejido adiposo subcutáneo, y además la grasa visceral puede alcanzar el hígado a través de la circulación portal. Esta grasa visceral estimula la inflamación hepática e induce una respuesta inflamatoria sistémica crónica (Wang y Nakayama, 2010). En esta situación de obesidad, el tejido adiposo experimenta alteraciones celulares y moleculares que se inician con una acumulación de macrófagos, y esto desencadena una inflamación local con producción de citoquinas proinflamatorias, como el TNF- α . La IR asociada al SM, se considera un proceso proinflamatorio en el que se generan niveles elevados de citoquinas (Rader, 2007). La leptina, que en individuos con SM se encuentra elevada por la IR, también juega un papel en el desarrollo de inflamación, ya que incrementa la activación de células T y de macrófagos y aumenta la liberación de TNF- α (Singla et al., 2010).

El SM se asocia también con un aumento del estrés oxidativo en el organismo a diferentes niveles. Hay que tener en cuenta que la IR y posterior hiperglucemia aumenta, además, la producción de radicales libres a nivel de las células endoteliales, e induce un aumento en la formación de productos avanzados de glicosilación. Se produce, por tanto, un considerable aumento de anión superóxido en las células endoteliales, y aumenta la producción de nitrotirosina (un marcador del estrés oxidativo que puede además inducir apoptosis en las células miocárdicas). El aumento del estrés oxidativo anula, en último término, la vasodilatación dependiente de endotelio en las grandes arterias (Arcaro y Cretti, 2002). Se ha descrito que el aumento de especies reactivas de oxígeno asociado a altos niveles de TNF- α , puede contribuir al deterioro renal al inducir disfunción endotelial renal, microalbuminuria, expansión mesangial y fibrosis (Liese et al., 2001; Raimundo y Lopes, 2011).

1.3 La rata Zucker como modelo animal para el estudio del síndrome metabólico

En la actualidad existen distintos modelos experimentales de síndrome metabólico (Tabla 5). Las ratas Zucker obesas son el modelo animal más utilizado y mejor conocido de obesidad genética. Estos animales, además de la obesidad que les caracteriza, presentan alteraciones semejantes a las que aparecen en el síndrome metabólico humano.

En 1961, Zucker y Zucker observaron un fenotipo obeso en un cruce entre la cepa M de Merck y ratas Sherman, derivado de una mutación espontánea, denominada *fatty (fa)*, que expresaban los animales homocigóticos para este alelo (*fa/fa*). Esta mutación es autosómica recesiva y afecta al receptor del gen de la leptina (*lepr*) (Chua et al., 1996, Philips et al., 1996). Está localizada en el codón +269, sustituyendo una glutamina con una prolina lo que produce la expresión de una proteína incorrecta. (Takaya et al., 1996a; 1996b). Una consecuencia directa o indirecta de la pérdida en la regulación mediada por el receptor de la leptina es que las ratas Zucker obesas presentan grandes cantidades circulantes de esta hormona respecto a sus controles, las ratas Zucker delgadas (Picó et al., 2002).

Tabla 5. Principales modelos experimentales de ratas para el estudio del síndrome metabólico. HTA = hipertensión arterial. IR= insulinoresistencia

Modelos experimentales y principales patologías desarrollan	Referencias
Receptor de la leptina no funcional	
Rata Stroke-prone-SHR (SHRSP) HTA, obesidad, hiperlipidemia e hiperinsulinemia.	<i>Yamori et al., 1978</i>
Rata SHROB (spontaneously hypertensive-obese) HTA, obesidad e hiperfagia	<i>Koletsky, 1973</i>
Rata SHHF (spontaneously hypertensive-heart failure) HTA, fallo cardiaco y DM2.	<i>McCune, 1990</i>
Rata JCR-LA-cp Obesidad, hiperfagia, hipertrigliceridemia, hiperinsulinemia	<i>Russell et al., 1989</i>
Rata Zucker Obesidad, hiperfagia, hiperlipidemia, IR, HTA moderada	<i>Zucker y Zucker, 1961</i>
Zucker diabéticas Obesidad, hiperfagia, hiperlipidemia, IR, HTA moderada y DM2	<i>Peterson et al., 1990</i>
Receptor de la leptina funcional	
Rata Wistar Ottawa Hipertrigliceridemia e hiperinsulinemia	<i>Colle et al., 1981</i>
Rata Otsuka Long-Evans Tokushima fatty (OLETF) Obesidad, hipertrigliceridemia, hiperinsulinemia e hiperglucemia	<i>Shima et al., 1999</i>
Inducidos por dieta	
Dieta alta en fructosa Hipertrigliceridemia, IR y resistencia a la leptina	<i>Bray et al., 2004; Shapiro et al., 2008</i>
Dieta alta en sacarosa Obesidad, esteatosis, hipertrigliceridemia, IR y esteatosis	<i>Kanarek et al., 1989; Coelho et al., 2010</i>
Dieta hipergrasa Obesidad, esteatosis, hipertrigliceridemia e IR	<i>Buettner et al., 2006; Sweazec et al., 2010</i>
Dieta hipergrasa y alta en fructosa Obesidad, esteatosis, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia e IR	<i>Panchal et al., en prensa</i>
Dieta hipergrasa y alta en sacarosa Obesidad, esteatosis, hiperinsulinemia e hiperleptinemia	<i>Sato et al., 2010</i>

Las ratas Zucker obesas son un modelo de obesidad genético que se asemeja en muchos aspectos al SM humano (Fellmann et al., 2013), ya que estos animales, además de la obesidad que los caracteriza, acusan varias anomalías endocrinas usuales también en estos pacientes (Frisbee et al., 2002; Aleixandre y Miguel, 2009). Estos animales manifiestan hiperfagia y obesidad, debido principalmente a un acúmulo de grasa en la zona abdominal. Las ratas Zucker obesas desarrollan, de hecho, hiperplasia e hipertrofia de adipocitos (Johnson et al., 1971), y presentan dislipemia (Stern et al., 1972; Bryce, 1977; Ionescu, 1985; Muller y Cleary, 1988) y daño renal (Kasiske et al., 1992). Una de las posibles lesiones primarias que acarrearía la mutación *fa* sería el incremento en la actividad de la LPL del tejido adiposo. El incremento en la actividad de esta enzima podría correlacionarse con el aumento en la captura de triglicéridos por este tejido (Maggio y Greenwood, 1982), lo que se relaciona con el elevado contenido en el plasma de triglicéridos, ácidos grasos y colesterol en estos animales (Zucker, 1965; Witztum y Schonfeld, 1979; Turkenkopf et al., 1980). Además de resistencia a las acciones metabólicas de la insulina, estos animales presentan hiperinsulinemia y ligera intolerancia a la glucosa, pero no manifiestan hiperglicemia postprandial (Fellmann et al., 2013). Las concentraciones de glucosa de estas ratas son, en realidad, normales o sólo ligeramente altas.

También hay que tener en cuenta que la obesidad está asociada con un estado de inflamación crónica, y las ratas Zucker obesas también se caracterizan por una producción anormal de mediadores inflamatorios, como un aumento de los niveles de TNF- α (Picchi et al., 2006) o de angiotensina II (De Gasparo, 2002). Se ha postulado que la sobreexpresión de TNF- α o angiotensina II, provenientes del tejido adiposo, induce en estos animales una activación de la NADPH oxidasa, y por ello en las ratas Zucker obesas se produce más cantidad de anión superóxido. Este aumento de estrés oxidativo podría relacionarse con el desarrollo de HTA y alteraciones vasculares que pueden aparecer con la edad en estos animales (Zucker y Zucker, 1961; Zucker, 1965; Lash et al., 1989; Tofovic y Jackson, 2003).

Las ratas Zucker delgadas, heterocigotas para el alelo *fa*, tienen un perfil lipídico semejante al de las ratas Sprague-Dawley (Zucker, 1965; Barry y Bray, 1969) y al de las ratas Wistar (Schonfeld y Pflieger, 1971). Estos animales son sensibles a la insulina, son normoinsulinémicos, y su tolerancia a la glucosa es normal. Por lo que se pueden usar como el control de las ratas Zucker obesas.

1.4 Componentes de los alimentos con actividad biológica. El huevo como fuente de péptidos bioactivos

A lo largo de la historia, la humanidad se ha ido concienciando que los hábitos alimenticios influyen en el desarrollo de ciertas enfermedades. La célebre frase de Hipócrates “qué tu alimento sea tu medicina, y tu medicina sea tu alimento” hoy en día tiene fundamento científico, ya que se sabe que, más allá de sus propiedades nutricionales, los componentes de los alimentos pueden ejercer distintas actividades biológicas, y pueden, por consiguiente, producir un efecto beneficioso sobre una o varias funciones específicas en el organismo. Distintos estudios epidemiológicos han conseguido que se imponga el consumo de dietas más saludables y en el momento actual la población considera los alimentos desde una nueva perspectiva, ya que numerosos trabajos científicos han avalado a sus componentes como ingredientes de interés para la salud. En los últimos años, estos componentes alimentarios con actividad biológica se están utilizando para desarrollar nuevos alimentos denominados alimentos funcionales.

Debido al creciente interés que suscitan, la Unión Europea, ha regulado la información dirigida al consumidor sobre los efectos favorables que los alimentos funcionales ejercen sobre la salud y sobre la prevención de enfermedades (Reglamento (CE) Nº 1924/2006). En base a esta regulación, en el desarrollo de un alimento funcional será imprescindible comprobar científicamente las propiedades beneficiosas que se alegan, especialmente cuando se trata de nuevos alimentos. El

desarrollo de un alimento funcional tendrá en realidad que cumplir varios objetivos, pues será necesario identificar los principios activos y también confirmar su seguridad, establecer las dosis necesarias para el efecto, y dilucidar la base en que se fundamenta el mismo; es decir, averiguar su mecanismo de acción. Las pruebas de bioactividad *in vitro* han servido muchas veces para descubrir nuevas actividades biológicas en estos alimentos, pero estas pruebas no resultan suficientes para cumplir con todos los requisitos mencionados. Por eso, cada vez existen más estudios *in vivo* que utilizan animales de experimentación para evaluar los compuestos de origen alimentario que previamente han mostrado bioactividad *in vitro*. Hoy día, además, son absolutamente necesarios los estudios de intervención en humanos, bien planificados, para que sus efectos beneficiosos queden suficientemente demostrados (Aggett, 2009).

De todos los componentes alimentarios, las proteínas se han convertido en una de las fuentes principales para la obtención de alimentos funcionales. Además del valor nutricional determinado por su digestibilidad y la composición de los aminoácidos constituyentes, las proteínas alimentarias pueden ejercer directamente ciertas actividades biológicas cuando se ingieren en la dieta. En los últimos años se han descrito numerosas proteínas, tanto de origen animal como de origen vegetal, que poseen actividad biológica, y en la actualidad se continúa la investigación de nuevas fuentes proteicas con potenciales propiedades beneficiosas sobre la salud.

En la actualidad, las proteínas alimentarias se investigan no sólo desde el punto de vista nutricional o funcional, sino como materia prima para la obtención de péptidos bioactivos (Korhonen y Pihlanto-Leppälä 2002), ya que toda fuente de proteínas alimentarias es susceptible de aportar péptidos funcionales. Estos péptidos funcionales o bioactivos se definen como secuencias específicas de aminoácidos inactivos en el interior de la proteína precursora, que ejercen determinadas actividades biológicas tras su liberación mediante hidrólisis química o

enzimática (Meisel, 1998; Mine y Kovacs-Nolan, 2006; Korhonen, 2009). Generalmente son péptidos de pequeño tamaño, de 3 a 20 aminoácidos, aunque en algunas ocasiones pueden exceder esa longitud, que se liberan durante el procesado industrial de los alimentos, o bien durante la digestión gastrointestinal (Pihlanto-Leppälä 2000; Shahidi y Zhong, 2008), pudiendo ejercer un importante papel en la regulación y la modulación metabólica, que sugiere su uso potencial como ingredientes de alimentos funcionales para promover un buen estado de salud o para reducir el riesgo de padecer una determinada enfermedad.

En los últimos años y, debido a la gran relevancia que estos péptidos han alcanzado en el mercado, se han desarrollado técnicas para la obtención de nuevos péptidos bioactivos a partir de proteínas alimentarias. Uno de los métodos más extendido para la obtención de péptidos bioactivos derivados de proteínas alimentarias es la hidrólisis enzimática. Dependiendo de la fuente proteica, del tipo de enzima usado, del grado de hidrólisis determinado por las condiciones utilizadas (relación enzima/sustrato, tiempo de incubación, pH y temperatura) se van a definir en gran medida las características del hidrolizado, la actividad biológica y los péptidos obtenidos (Wang y González, 2005). El tipo de enzima y la naturaleza de la misma, caracterizada por su especificidad juegan también un papel esencial en la formación y el tipo de péptidos bioactivos producidos (Vermeirssen et al., 2003; Mulero-Cánovas et al., 2011). Las primeras enzimas utilizadas en la obtención de péptidos bioactivos fueron proteasas pancreáticas de origen animal, si bien cada vez están adquiriendo mayor importancia las de otros orígenes (vegetal, bacteriano o fúngico). Por ello, y para conseguir una gran heterogeneidad en la producción de hidrolizados proteicos es muy importante la utilización de enzimas de diferentes orígenes. Una vez liberados, estos péptidos activos pueden ejercer distintas actividades biológicas en el organismo y tener efecto sobre la salud humana. Desde su descubrimiento, en 1979, se han descrito péptidos derivados de proteínas alimentarias con diferentes actividades biológicas, antihipertensiva, opioide, antioxidante, hipocolesterolemica, inmunomodulante, antimicrobiana o

antidiabética, entre otras (Moller et al., 2008) (Tabla 6). En la actualidad, ya se comercializan algunos productos que contienen estos péptidos destinados a la prevención y/o el tratamiento de la HTA, cuya actividad viene avalada por distintos ensayos clínicos (Seppo et al., 2003; Tuomilehto et al., 2004; Nakamura et al., 2011; Turpeinen et al., 2011).

Tabla 6: Principales actividades biológicas encontradas en proteínas y derivados proteicos de origen alimentario. IECA = Inhibidora de la enzima convertidora de Angiotensina. IECE = Inhibidora de la enzima convertidora de Endotelina. DPP IV = Dipeptidil-dipeptidasa IV.

Actividad	Referencias
IECA	<i>Saito et al., 2000; Hernández-Ledesma et al., 2005; Miguel et al., 2005; Gouda et al., 2006</i>
Antioxidante	<i>Gobetti et al., 2002; Dávalos et al., 2004; Hernández-Ledesma et al., 2006; Graszkiwicz et al., 2007</i>
IECE	<i>Maes et al., 2004; Okitsu et al., 1995</i>
Vasodilatadora	<i>Seppo et al., 2003; Mizushima et al., 2004; De Leo et al., 2009</i>
Hipocolesterolémica -Unión a los ácidos biliares -Alteran solubilidad micelas de colesterol -Modifican expresión enzimas lipogénicas -Inhiben LPL	<i>Liasset et al., 2009; Choi et al., 2002</i> <i>Zhong et al., 2007</i> <i>Cho et al., 2008; Zhang et al., 2011</i> <i>Kagawa et al., 1996</i>
Inmunomoduladora	<i>Matar et al., 2003; Meisel y FitzGerald 2003</i>
Antidiabética -Inhiben α -glucosidasa o α -amilasa -Inhiben DPP IV	<i>Yu et al., 2011</i> <i>Wang et al., 2012; Tulipano et al., 2011</i>
Reguladora de la ingesta	<i>Shimizu et al., 2007; Foltz et al., 2008; Tulipano et al., 2011</i>
Antimicrobiana	<i>Orsi, 2004; Kovacs-Nolan et al., 2005</i>
Opiácea	<i>Martinez y Martinez, 2006; Haque et al., 2006</i>

Las proteínas del huevo, que están principalmente presentes en la clara del huevo, se consideran de alto valor biológico y son una fuente muy importante de nitrógeno en la dieta. Este alimento juega además un papel fundamental en la nutrición humana. La estructura y funcionalidad de las proteínas de la clara del huevo ha sido ampliamente estudiada, y es probablemente la originalidad de este alimento y la diversidad de proteínas que contiene, con muy diferentes propiedades

físicoquímicas (masas moleculares y puntos isoelectrónicos) (Guerin-Dubiard et al., 2006), lo que las hace especialmente atractivas para la búsqueda de nuevas moléculas biológicamente activas. Pese a ello, relativamente pocos estudios han abordado la producción de péptidos bioactivos a partir de proteínas de huevo y no existe evidencia clínica de su utilización en la literatura reciente.

En el momento actual, se han descrito péptidos derivados de hidrolizados de proteínas de huevo con diferentes actividades biológicas. Por ejemplo, se han descrito péptidos derivados de proteínas de huevo con actividad antihipertensiva, asociados principalmente con un mecanismo vasodilatador endotelio-dependiente (Fujita et al., 1995, Scruggs et al., 2004, Miguel et al., 2006), con su capacidad para inhibir la ECA *in vitro* o *in vivo* (Miguel et al., 2004, Yu et al., 2011, Ahmad et al., 2012), y también se han descrito péptidos derivados de proteínas de huevo con propiedades antioxidantes bien por su capacidad neutralizadora de radicales libres (Jung et al., 2001), por su capacidad de inhibir la oxidación de las LDLs (Dávalos et al., 2004), y producir por ello efectos beneficiosos sobre el perfil lipídico (Mano et al., 2008), o bien por disminuir el estrés oxidativo asociado a la inflamación (Huang et al., 2010). Recientemente, también se han descrito péptidos derivados de ovoproteínas con actividad hipoglucémica capaces de inhibir la enzima α -glucosidasa (Yu et al., 2012). Se ha descrito además que la ingesta de proteínas de huevo produce un efecto saciante mayor y consecuentemente una ingesta calórica menor que las proteínas de otros alimentos como la leche y la soja (Van der Wal et al., 2005; Ratliff et al., 2010). Este hecho nos hace pensar que los péptidos obtenidos a partir de la hidrólisis de las proteínas de huevo, pueden presentar actividad reguladora del apetito y que esta propiedad biológica puede ser incluso más prometedora que en aquellos péptidos derivados de otras proteínas de origen alimentario.

En lo que se refiere a péptidos bioactivos, la investigación actual demanda evaluar más de una actividad biológica, con el objetivo de estudiar la

multifuncionalidad de estas secuencias y su capacidad para afectar de forma simultánea sobre varias funciones específicas en el organismo. La mayoría de los estudios llevados a cabo en esta línea evalúan únicamente dos propiedades biológicas de forma simultánea. Principalmente se estudia su capacidad para inhibir la ECA y su capacidad antioxidante o vasodilatadora, debido a la estrecha relación que existe entre el estrés oxidativo y las alteraciones vasculares con la HTA (Miguel et al., 2004a; Miguel et al., 2004b; Miguel et al., 2007; Segura Campos et al., 2010; Yamada et al., 2010), pero también existen trabajos que evalúan la actividad inhibidora de la ECA conjuntamente con otras actividades como la actividad hipoglucémica (Otani et al., 2009). Sin embargo existen muy pocos estudios en los que se evalúan más de dos actividades a la vez (Correa et al., 2011), y en ocasiones, lo que se investigan son distintos mecanismos de acción implicados en una misma actividad biológica (Li y Aluko, 2010). Por lo tanto, la originalidad de investigar varias actividades biológicas a la vez para seleccionar un hidrolizado de proteínas alimentarias que contenga péptidos bioactivos multifuncionales, que de forma simultánea se concentren en un hidrolizado, podría ofrecer una nueva estrategia en el desarrollo de alimentos multifuncionales. Existen estudios con otros componentes alimentarios en los que la presencia de multiactividad biológica sirve de base para investigar su posible utilización en patologías multifactoriales como el SM, como por ejemplo estudios tras el consumo de resveratrol (Rivera et al., 2009; Gómez-Zorita et al., 2012), de quercetina (Rivera et al., 2008) o de ácido linoléico conjugado (Gilbert et al., 2011).

Sin embargo, y a pesar de que se ha descrito que los hidrolizados y los péptidos derivados de proteínas de huevo pueden presentar más de una actividad biológica, es necesario abordar su estudio desde una perspectiva multifuncional. Por todo lo anteriormente expuesto, entre las nuevas perspectivas para el tratamiento del SM destaca la posible utilización de alimentos multifuncionales de naturaleza proteica, capaces de afectar a las distintas alteraciones asociadas a este trastorno multifactorial para abordarlo de forma global.

HIPÓTESIS Y OBJETIVO

El **objetivo global** del presente trabajo ha consistido en la obtención de hidrolizados de proteínas de huevo multifuncionales que permitan controlar algunas de las patologías asociadas al síndrome metabólico (obesidad, diabetes, dislipemia y/o hipertensión).

Nuestra **hipótesis** de trabajo se basó en que la administración oral de un hidrolizado de clara de huevo que contuviera péptidos con diferentes actividades biológicas podría ser de utilidad para mejorar y/o prevenir simultáneamente algunas de las alteraciones cardiometabólicas asociadas al síndrome metabólico.

Para conseguir el objetivo propuesto se llevó a cabo el siguiente plan de trabajo:

- a. Obtención de hidrolizados enzimáticos a partir de proteínas de huevo que combinen en la mayor medida posible actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina, antioxidante, hipocolesterolémica y antidiabética *in vitro*.
- b. Caracterización *in vivo* del efecto de los hidrolizados seleccionados en base a sus actividades *in vitro* mediante la utilización de un modelo experimental animal que presenta alteraciones semejantes a las de los pacientes con síndrome metabólico, las ratas Zucker obesas. Para ello se evaluó el efecto en este modelo experimental de la administración de los hidrolizados seleccionados sobre:
 - la obesidad y el metabolismo lipídico
 - el metabolismo de la glucosa
 - el estrés oxidativo y la inflamación
 - el sistema cardiovascular

La finalidad de esta investigación es poder abordar los estudios en humanos que nos permitan sentar las bases de los efectos que este tipo de componentes alimentarios puede ejercer sobre la salud.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

En esta Tesis Doctoral se llevó a cabo, en primer lugar, la obtención de hidrolizados de clara de huevo utilizando para ello diferentes enzimas de grado alimentario. En cada uno de los hidrolizados obtenidos se determinaron *in vitro* diferentes actividades biológicas (inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), antioxidante, hipocolesterolémica e inhibidora de la dipeptidil-dipeptidasa IV (DPP IV)). Asimismo, cada uno de los hidrolizados se analizó mediante cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) para determinar el grado de hidrólisis. Posteriormente, se seleccionaron aquellos hidrolizados en los que confluían el mayor número de actividades biológicas *in vitro* de forma simultánea y esos hidrolizados se analizaron, además, mediante HPLC acoplado a espectrometría de masas (HPLC-MS/MS) con el objetivo de identificar las secuencias peptídicas potencialmente responsables de su actividad biológica y poder así confirmar su actividad mediante estudios *in vivo*.

A continuación se realizó un estudio experimental para evaluar el efecto de la administración de los hidrolizados de clara de huevo previamente seleccionados en base a las actividades *in vitro* anteriormente mencionadas, sobre las alteraciones más frecuentes asociadas al síndrome metabólico (SM) (obesidad, diabetes, dislipemia e hipertensión arterial). Para ello utilizamos el modelo genético de ratas Zucker obesas, a las que se les administró durante 12 semanas cada uno de los hidrolizados seleccionados. Durante el estudio se registraron parámetros como el peso corporal, la ingesta sólida y la ingesta líquida. Al finalizar el periodo experimental se evaluó en los animales la presión arterial. Posteriormente los animales se sacrificaron y se obtuvieron muestras de sangre y diferentes órganos para realizar distintas determinaciones con el objetivo de profundizar en el efecto que producía cada uno de los hidrolizados en estos animales y dilucidar, además, su posible mecanismo de acción (Figura 3).

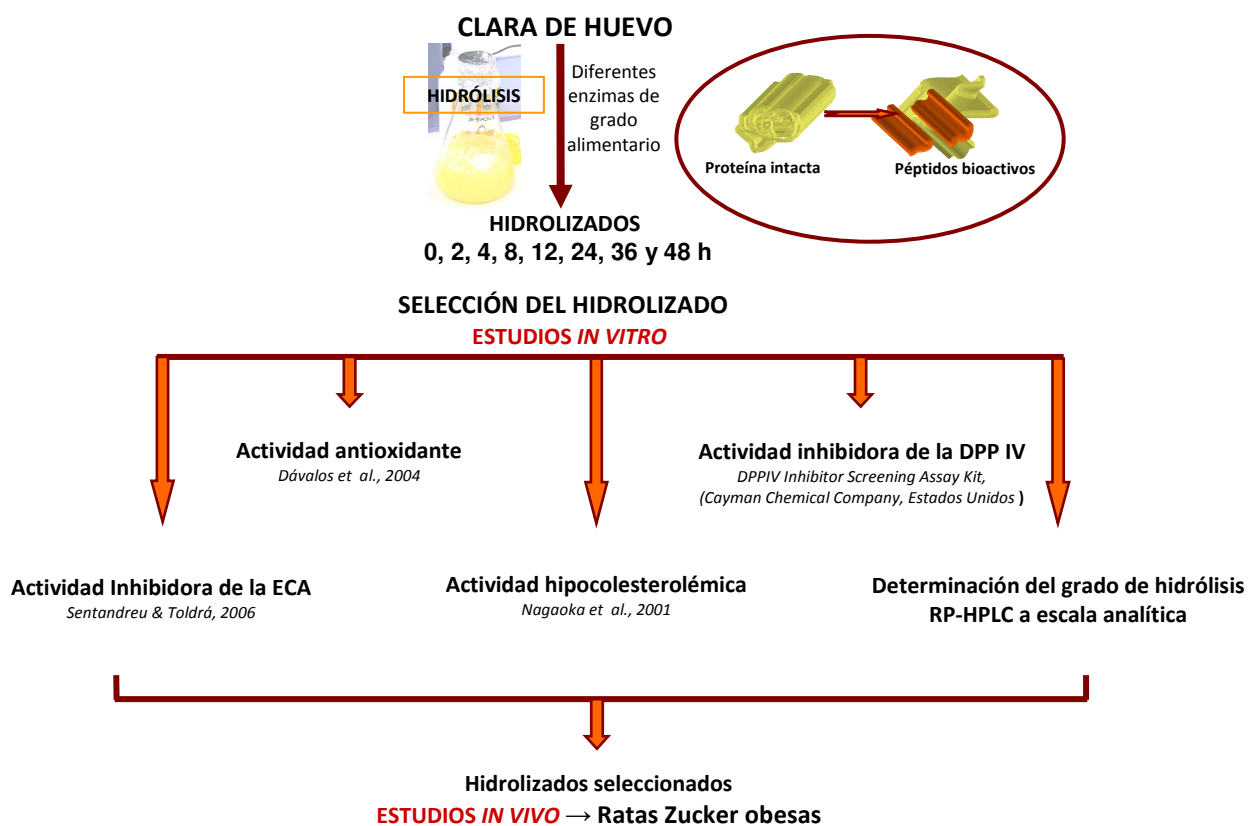


Figura 3. Esquema representativo de la estrategia utilizada para la obtención de hidrolizados multifuncionales útiles en las complicaciones asociadas al síndrome metabólico.

3.1 Obtención de hidrolizados de la clara de huevo

Para obtener los diferentes hidrolizados se empleó como sustrato clara de huevo pasteurizada de origen comercial (Guillén, España). La hidrólisis se llevó a cabo con diferentes enzimas, todas ellas de grado alimentario. Las enzimas utilizadas tenían distintos orígenes (digestivo, vegetal, bacteriano y fúngico) (Tabla 7).

A continuación se muestran las enzimas utilizadas, su nombre comercial y su procedencia:

- **ALCALASE 2.4LFG:** Subtilisina (E.C. 3.4.21.62) 2.4 AU-A/g procedente de *Bacillus licheniformis* (Novozymes, Dinamarca).
- **BC PEPSIN 1:3000:** Pepsina (E.C. 3.4.23.1) procedente de estómago de cerdo (Biocatalysts, Reino Unido).

- **FLAVOURZYME 1000L:** Aminopeptidasa (E.C. 3.4.23.18) procedente de *Aspergillus oryzae* (Novozymes).
- **NEUTRASE 0.8L:** Neutrasa (E.C. 3.4.24.28) ≥ 0.8 U/g, procedente de *Bacillus Amyloliquefaciens* (Novozymes).
- **PANCREATIN 4XNF:** Pancreatina procedente de páncreas porcino (Biocatalysts).
- **PEPTIDASE 433P:** Aminopeptidasa (E.C. 3.4.11.1) procedente de *Rhizopus oryzae* (Biocatalysts).
- **PROMOD 144P 100TU:** Papaína (E.C. 3.4.22.2) procedente de papaya (Biocatalysts).
- **PTN 6.0 Saltfree:** Tripsina (E.C. 3.4.21.4) procedente de páncreas porcino (Novozymes).

Las condiciones de hidrólisis óptimas para cada enzima, seleccionadas en base a las especificaciones de cada fabricante, se detallan en la siguiente tabla.

Tabla 7. Desglose de las enzimas de grado alimentario utilizadas en la obtención de hidrolizados de clara de huevo funcionales. Condiciones óptimas de hidrólisis e inactivación de cada una de las enzimas utilizadas.

Parámetros	ALCALASA 2.4L FG	FLAVOURZYME 1000L	NEUTRASA 0.8L	PTN 6.0 Saltfree	BC PEPSIN 1:3000	PEPTIDASA 433P	PANCREATIN 4XNF	PROMOD 144GL
pH	7,5	6,5	7	7,5	2	7	7,5	6,5
Temperatura (°C)	50	50	50	38	37	50	38	65
Concentración (E/S)	1/300 (v/v)	1/300 (v/v)	1/300 (v/v)	2:100 (p/p)	2:100 (p/p)	2:100 (p/p)	2:100 (p/p)	2:100 (p/p)
Inactivación	↑T ^º 95°C 15min	↑T ^º 95°C 15min	↑T ^º 95°C 15min	↑T ^º 95°C 15min	↑pH 7	↑T ^º 95°C 15min	↑T ^º 95°C 15min	↑T ^º 95°C 15min

Las hidrólisis se realizaron en un baño termostático con agitación durante 48 horas. Se recogieron alícuotas a tiempo 0 y a las 2, 4, 8, 12, 24, 36 y 48 horas. La inactivación de las diferentes enzimas se consiguió calentando cada uno de los hidrolizados a una temperatura superior a los 95 °C, durante 15 minutos, excepto la pepsina que se inactivó elevando el pH por encima de 7.0 con NaOH 5 N.

Posteriormente todos los hidrolizados se centrifugaron a 2500 g durante 15 minutos, se recogieron los sobrenadantes y se almacenaron a -20 °C hasta su utilización.

3.2 Selección del hidrolizado en base a sus actividades *in vitro*

En cada uno de los hidrolizados obtenidos a diferentes tiempos se llevaron a cabo las determinaciones *in vitro* que se describen a continuación con el fin de poder seleccionar los hidrolizados más prometedores.

3.2.1 Medida de la actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina

La actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) se determinó de acuerdo con el método desarrollado por (Sentandreu y Toldrá, 2006) con algunas modificaciones (Quirós et al., 2009) (Figura 4).

El método utilizado se basa en la hidrólisis del compuesto o-aminobenzoilglicil-p-nitrofenilalanil-prolina (Abz-Gly-Phe(NO₂)-Pro) por la acción de la ECA (EC 3.4.15.1, Sigma-Aldrich S.A., España). Esta reacción da lugar al producto fluorescente o-aminobenzoilglicina (Abz-Gly). El sustrato (Abz-Gly-Phe(NO₂)-Pro) se disolvió en tampón Tris 0.15 M con NaCl 1.125 M a pH 8.3 para obtener una concentración final de 0.45 mM. La ECA se preparó a una concentración de 0.04 U/ml de enzima en tampón Tris 0.15 M que contenía ZnCl₂ 0.1 μM a pH 8.3. Para

llevar a cabo el ensayo se utilizó una placa multipocillo de poliestireno negra con fondo redondo (Costar, Estados Unidos).

Se añadieron 40 μ l de agua bidestilada en los pocillos controles y en los blancos, y 40 μ l de muestra en el pocillo correspondiente a la muestra y el blanco de muestra (igual que el blanco pero sustituyendo el agua por muestra, para tener en cuenta posibles interferencias). A continuación se añadieron 40 μ l de solución de enzima en los pocillos control y en los pocillos con muestras, y 40 μ l de tampón Tris en los blancos y en los pocillos correspondientes a los blancos de muestra.

La reacción enzimática se inició tras añadir 160 μ l del sustrato y se incubó inmediatamente a 37 °C en un fluorímetro (FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech, Alemania). La fluorescencia se midió a los 30 minutos, siendo la longitud de onda de excitación de 350 nm y la de emisión 420 nm. La medida de fluorescencia del equipo se controló mediante el software Optima Control.

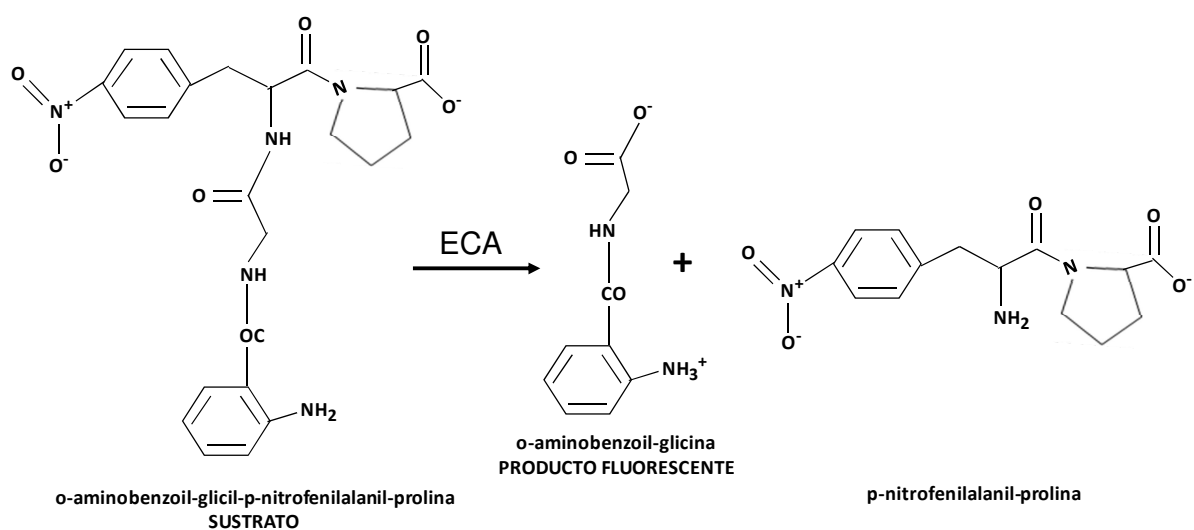


Figura 4. Reacción que cataliza la ECA dando lugar a un producto fluorescente. A menor fluorescencia, mayor inhibición de la ECA.

Todas las muestras se prepararon por triplicado y se llevaron a cabo al menos 2 ensayos independientes para cada muestra. El porcentaje de inhibición de la ECA se expresó de la siguiente forma:

$$\text{Actividad inhibidora de la ECA (\%)} = \frac{(F_C - F_B) - (F_M - F_{BM})}{F_C - F_B} \times 100$$

F_C : Fluorescencia emitida tras la acción de la ECA sobre el sustrato fluorescente sin inhibidor (control).

F_M : Fluorescencia emitida tras la acción de la ECA sobre el sustrato fluorescente en presencia de una sustancia supuestamente inhibidora (muestra).

F_B : Fluorescencia emitida por el sustrato fluorescente (blanco).

F_{BM} : Fluorescencia emitida por el sustrato fluorescente y la muestra (blanco de muestra).

Los resultados finales se expresaron como el IC_{50} que se define como la concentración de proteínas de cada muestra problema que inhibe al 50 % de la actividad de la enzima.

3.2.2 Medida de la actividad antioxidante

Para determinar la actividad antioxidante, se utilizó el ensayo ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) y se utilizó fluoresceína como sustrato oxidable. Este ensayo se llevó a cabo según el método descrito por Ou et al. (2001), modificado por Dávalos et al. (2004).

Este ensayo mide la capacidad que tienen los antioxidantes presentes en una muestra para neutralizar los radicales peroxilo, que se originan a partir de la descomposición térmica del 2,2'-azo-bis-(2-metilpropionamida) dihidrocloruro (AAPH) y que causa la oxidación de la fluoresceína que actúa como sustrato (Figura 5). Como antioxidante de referencia se utilizó el ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox), análogo soluble de la vitamina E.

El AAPH, el trolox y las muestras se diluyeron en tampón fosfato (75 mM, pH 7.4). El trolox se diluyó para obtener diferentes concentraciones (0.2 - 2 nmol) con las que se construyó una curva de calibrado de referencia. Las soluciones de AAPH y trolox se prepararon diariamente. Se preparó también una solución stock de fluoresceína (1.17 mM) en el mismo tampón, que se almacenó en oscuridad a 4 °C durante 4 semanas. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 200 µl (20 µl de la muestra correspondiente, 120 µl de fluoresceína y 60 µl de AAPH).

La fluorescencia se midió usando un fluorímetro (FLUOstar OPTIMA), siendo la longitud de onda de excitación de 485 nm y la de emisión 520 nm. Se utilizaron placas multipocillo de poliestireno negras (Nunc, Dinamarca), y la medida de fluorescencia se realizó a 40 °C cada minuto, durante 135 minutos. Las medidas de fluorescencia se normalizaron con respecto al blanco (no antioxidante). A partir de las curvas normalizadas se calculó el área bajo la curva (AUC) de descenso de fluorescencia utilizando la siguiente fórmula:

$$AUC = 1 + \sum_{i=1}^{i=80} f_i / f_0$$

Donde f_0 es la lectura de la fluorescencia inicial a 0 minutos y f_i es la lectura de fluorescencia después de i minutos.

Todas las muestras se prepararon por triplicado y se llevaron a cabo al menos tres ensayos independientes para cada muestra. Los valores de ORAC se expresaron como µmol de equivalentes de trolox/g de proteína, usando para ello la curva del patrón calculada para cada ensayo.

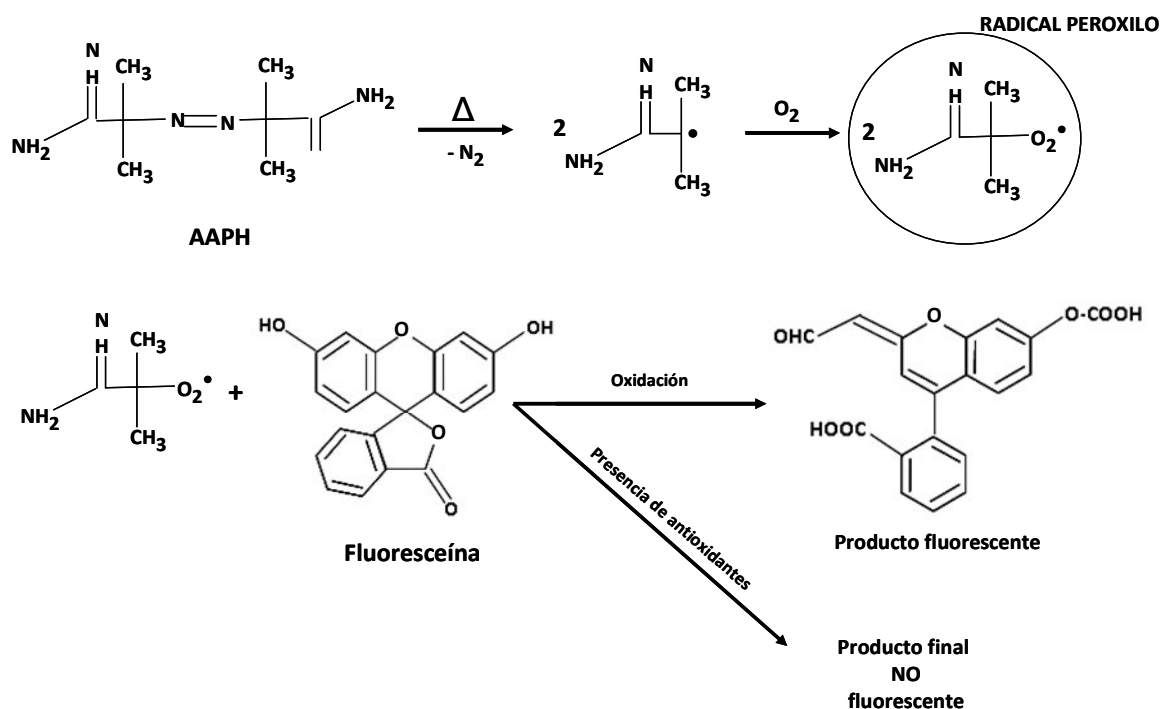


Figura 5. Esquema simplificado del proceso de oxidación de la fluoresceína por los radicales peroxilo producidos por la descomposición térmica del 2,2'-azo-bis-(2-metilpropionamidina) dihidrocloruro (AAPH). Tomado de Ou et al., 2001.

3.2.3 Medida de la actividad hipocolesterolémica

Para determinar la actividad hipocolesterolémica se utilizó el ensayo descrito por Yoshie-Stark y Wasche (2004). Este ensayo se basa en la capacidad potencial de los péptidos para unirse a las micelas, formadas por los ácidos biliares y a las que se une el colesterol para ser absorbido. Los péptidos que poseen la propiedad de unirse a estas micelas provocan su precipitación a nivel intestinal, lo que disminuye la absorción del colesterol de la dieta y hace que no aumenten sus niveles plasmáticos. Por otro lado, al no reabsorberse los ácidos biliares, se necesita colesterol endógeno para su síntesis de novo, y en consecuencia disminuyen los niveles de colesterol en el plasma.

Para determinar esta capacidad de unión, se preparó una mezcla con diferentes ácidos biliares que se asemeja a la composición de la bilis humana (ácido glicocólico (9 mmol/L), ácido glicochenodeoxicólico (9 mmol/L), ácido glicodeoxicólico (9 mmol/L), ácido taurocólico (3 mmol/L), ácido taurochenodeoxicólico (3 mmol/L) y ácido taurodeoxicólico (3 mmol/L), (Sigma). La concentración postprandial de ácidos biliares en la zona distal del intestino es de aproximadamente 2 mM mientras que en la zona proximal puede llegar a ser de 10 mM (Hamilton et al., 2007). Nuestra concentración de trabajo fue por lo tanto de 6 mM.

Se incubó la mezcla de ácidos biliares con los diferentes hidrolizados durante 2 horas a 37 °C. Tras centrifugar esta mezcla se determinó en el sobrenadante la cantidad de ácidos biliares mediante un kit comercial (Bile acids, Trinity Biotech Plc, Irlanda), que se basa en que, durante la oxidación de los ácidos biliares, reacción catalizada por la enzima 3 alpha-hidroxiesteroide deshidrogenasa, se reduce la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) a nicotinamida adenina dinucleótido deshidrogenasa (NADH). Posteriormente el NADH se oxida, y el nitroazul de tetrazolio (NBT) se reduce bajo la acción catalítica de la enzima diaforasa. El formazan liberado tras esta reacción se midió a 530 nm en un espectrofotómetro (Biotek HT Sinergy, Estados Unidos), controlado por el software Gen 5 1.06 (Figura 6). La intensidad del color que se produce es directamente proporcional a la concentración de ácidos biliares que hay en las muestras.

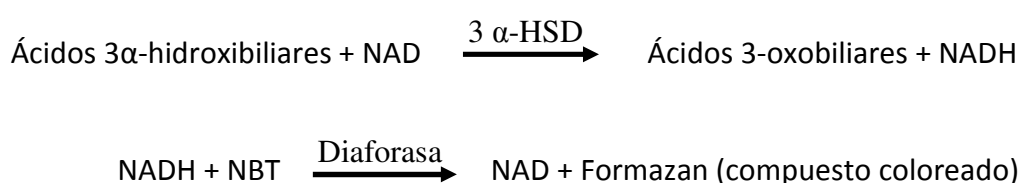


Figura 6. Esquema simplificado del proceso de oxidación de los ácidos biliares dando lugar a un compuesto coloreado (Formazan).

Todas las muestras se prepararon por triplicado y se llevaron a cabo al menos 3 ensayos independientes para cada muestra. Los resultados se expresaron en mmol unido/mg de proteína.

3.2.4 Medida de la actividad inhibidora de la enzima dipeptidil-dipeptidasa IV

La actividad inhibidora de la enzima dipeptidil-dipeptidasa IV (DPP IV) se determinó mediante un kit comercial (DPPIV Inhibitor Screening Assay Kit, Cayman Chemical Company, Estados Unidos). Este ensayo se basa en la hidrólisis de un sustrato fluorogénico, 7-amino-4-metil-cumarina (AMC) por la acción de la DPP IV (EC 3.4.14.5). La rotura de los enlaces peptídicos producida por la enzima libera AMC que se mide mediante fluorescencia.

La reacción se llevó a cabo mezclando 10 µl de enzima, con 10 µl de la muestra a analizar y 50 µl de AMC (200 µM), responsable de disparar la reacción. La mezcla se incubó durante 30 minutos a 37 °C y se midió en un fluorímetro (FLUOstar OPTIMA), siendo la longitud de onda de excitación de 350 nm y la de emisión 450 nm. Todas las muestras se prepararon por triplicado. El porcentaje de inhibición se calculó de la siguiente forma:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Actividad Inicial} - \text{Actividad Inhibidor}}{\text{Actividad Inicial}} \times 100$$

Los resultados finales se presentaron como el IC₅₀ o concentración de proteínas de cada muestra problema que inhibe el 50 % de la actividad de la enzima.

3.2.5 Determinación del contenido en proteínas

Para determinar el contenido de proteínas se empleó el ensayo diagnóstico de Biorad (DC protein assay, Biorad, Estados Unidos). Este ensayo se basa en la reacción del Cu^{2+} con la proteína en un medio alcalino, y la consecuente reducción del reactivo Folin por el complejo que forma la proteína con el cobre, que pasa de una tonalidad amarilla a un característico color azul con una absorbancia máxima a 750 nm. El color se produce principalmente por la presencia de los aminoácidos tirosina y triptófano y, en menor proporción, por la presencia de cisteína, cistina e histidina.

En una placa multipocillo se añadieron 20 μl de la muestra diluida, 20 μl de la mezcla de los reactivos A (solución alcalina de tartrato de cobre) y S (sustancia surfactante) en una proporción 100:2 y 160 μl del reactivo B (reactivo Folin ó 1,2-naftoquinona-4-sulfonato de sodio). Todo ello se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. A continuación se midió la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro (Biotek HT Sinergy), tomando como referencia un blanco que contenía 20 μl de agua bidestilada en vez de muestra. Se realizó una curva de calibrado (5-50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) con seroalbúmina bovina (Sigma).

3.2.6 Análisis del proceso de hidrólisis mediante cromatografía de líquidos de alta eficacia a escala analítica

El análisis del proceso de hidrólisis de los hidrolizados se llevó a cabo mediante cromatografía de líquidos de alta eficacia en fase reversa (RP-HPLC). Para ello se utilizó un cromatógrafo de líquidos Waters 600 HPLC (Waters Corp., Estados Unidos), equipado con un inyector automático 717 plus y un detector de absorbancia dual 2487. Las separaciones se realizaron en una columna Hi Pore C_{18} RP318 (250 x 4.6 mm, BioRad Laboratories, Estados Unidos) a temperatura ambiente, y la monitorización se hizo a las absorbancias de 214 y 280 nm. Se

empleó, como fase A, agua bidestilada con 0.037 % (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA), y como fase B acetonitrilo con un 0.027 % (v/v) de TFA. Las separaciones se realizaron a un flujo de 1 ml/min. El gradiente lineal de fase B utilizado fue del 0 % a 100 % en 90 minutos, bajando de nuevo hasta el 0 % de B en los siguientes 20 minutos. Los datos se procesaron usando el software Empower 2 (Waters Corp.). Todas las muestras se filtraron a través de un filtro de 0.45 µm de Millipore (Waters Corp.), y se inyectaron en el cromatógrafo 50 µl de los hidrolizados preparados a una concentración de proteína de 6 mg/ml. El progreso de la hidrólisis se evaluó comparando el cromatograma de la clara de huevo sin hidrolizar con el cromatograma de los hidrolizados obtenidos a distintos tiempos.

3.2.7 Análisis de los hidrolizados mediante cromatografía de líquidos de alta eficacia acoplado a espectrometría de masas.

Para identificar las secuencias de los péptidos mayoritarios incluidos en los hidrolizados se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alta eficacia acoplado a un espectrómetro de masas (RP-HPLC-MS/MS). Para ello, se empleó un equipo HP Agilent 1100 System (Agilent Technologies) equipado con una bomba cuaternaria Agilent series 1100, un detector de longitud de onda variable Agilent series 1100 y un inyector automático Agilent series 1100. Como sistema de adquisición de datos se utilizó el programa ChemStation (Agilent Technologies). Se empleó una columna en fase inversa Hi-Pore C₁₈ (250 x 4.6 mm d.i., 5 µm de tamaño de partícula) (Bio-Rad Laboratories). Como eluyente A se utilizó agua con 0.037 % (v/v) de TFA, y como eluyente B acetonitrilo con 0.027 % (v/v) de TFA. Se inyectaron 50 µl de muestra a una concentración de 6 mg/ml. Antes de su inyección los diferentes hidrolizados se diluyeron en agua bidestilada y se filtraron a través de filtros con un tamaño de poro de 0.45 µm. El gradiente lineal de fase B utilizado fue del 0 % a 100 % en 90 minutos, bajando de nuevo hasta el 0 % de B en los siguientes 20 minutos. La detección se realizó a 214 nm, y a la salida del detector, el flujo de 0.8 ml/min se dividió en una proporción 1:40 para dar un flujo final aproximado de 20

µl/min hacia el nebulizador del espectrómetro de masas, que estaba acoplado en línea al equipo de HPLC. Se empleó un equipo de trampa iónica Esquire 3000 (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania). Para la ionización se utilizó la técnica de electrospray y como analizador se utilizó una trampa de iones. Como sistema de adquisición de datos se utilizó el programa Esquire Control, versión 5.0 (Bruker Daltonik). La interpretación de los espectros de masas en tandem para la identificación de las secuencias peptídicas se realizó con el programa Biotools 2.1 (Bruker Daltonik) (Gómez-Ruiz *et al.*, 2002). El espectrómetro de masas utilizó N₂ como agente nebulizante y los espectros de masas se adquirieron en el rango de 100-1500 m/z.

En la tabla 8 se resumen las determinaciones realizadas y técnicas utilizadas en el estudio *in vitro*.

Tabla 8: Determinaciones realizadas y técnicas utilizadas en los estudios *in vitro*.

DETERMINACIÓN	TÉCNICA UTILIZADA
Actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina	Método fluorimétrico (Sentandreu y Toldrá (2006); Quirós et al., 2009)
Actividad antioxidante	Método fluorimétrico (Ou et al., 2001; Dávalos et al., 2004).
Actividad hipocolesterolémica	“Kit” comercial Bile Acids (Trinity Biotech, Irlanda)
Actividad inhibidora de la enzima dipeptidil dipeptidasa IV	“Kit” comercial DPP IV Inhibitor Screening Assay Kit (Cayman Chemical Company, Estados Unidos).
Determinación del contenido en proteínas	Método espectrofotométrico (DC protein assay, Biorad, Estados Unidos)
Determinación del grado de hidrólisis	RP-HPLC escala analítica
Análisis e identificación de los péptidos	RP-HPLC-MS/MS

3.3 Protocolo general del estudio en ratas Zucker

Los experimentos con animales llevados a cabo en esta Tesis Doctoral se diseñaron con el objeto de minimizar el número de animales utilizados y su sufrimiento, de acuerdo con la Regulación de la Comisión Europea para cuidado y empleo de animales de experimentación (86/609/CEE), el Real Decreto 53/2013 del 1 de febrero sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, aprobados por el Comité Ético de la Universidad Rey Juan Carlos.

Para llevar a cabo este estudio se utilizaron 30 ratas Zucker obesas macho de 8 semanas de vida con un peso comprendido entre 265 y 275 g, y 10 ratas Zucker delgadas machos de 8 semanas de vida, con un peso comprendido entre 150 y 175 g. Todos los animales procedían de Charles River Laboratories (España) y llegaron al animalario de la Universidad Rey Juan Carlos con 7 semanas de vida. Después de un periodo de adaptación, se colocaron en grupos de 5 animales, en jaulas transparentes (40 cm×28cm×25 cm) con un lecho de viruta que fue reemplazado cada 4-5 días y se mantuvieron en condiciones controladas, con una temperatura ambiental estable de 23 °C, humedad del 60 % y ciclos de luz-oscuridad de 12 horas. Los animales se alimentaron *ad libitum* durante todo el estudio, con una dieta sólida estándar (Harlan Laboratories, Estados Unidos), y agua corriente filtrada que fue renovada periódicamente. Para garantizar el mantenimiento del bienestar animal, a medida que los animales fueron desarrollando obesidad fue necesario separarlos en grupos más pequeños (2 animales/jaula).

Al comienzo del estudio, las ratas Zucker obesas se dividieron en 3 grupos, de 10 animales cada uno, que ingirieron con el agua de bebida, hasta la semana 20 de vida, los siguientes productos: agua, una solución de hidrolizado de clara de huevo H1, y una solución de hidrolizado de clara de huevo H2. La concentración de los hidrolizados se ajustó semanalmente para que los animales recibiesen una dosis

diaria de 750 mg/kg, teniendo en cuenta el volumen ingerido la semana anterior. Durante el periodo experimental se controló semanalmente el peso corporal, la ingesta sólida y la ingesta líquida de los animales. Además, una semana antes de finalizar el periodo experimental se llevó a cabo el estudio de la neuropatía sensorial (test de filamentos de Von Frey) cuya metodología aparece descrita en el apartado 3.3.6. La última semana del periodo experimental, las ratas se mantuvieron en jaulas metabólicas (Figura 7), y se recogieron muestras de orina y heces de los animales para determinar el contenido de grasa en estas últimas.

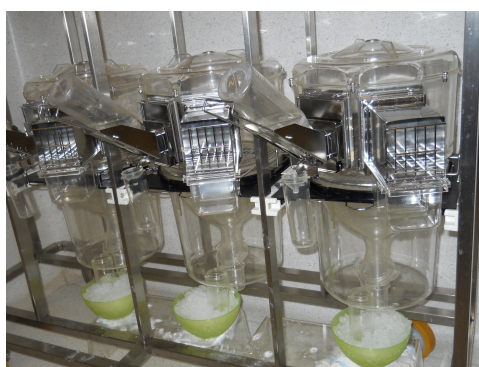


Figura 7: Jaulas metabólicas utilizadas para la recogida de las heces y orina de los animales.

La grasa eliminada en las heces se determinó siguiendo el método Soxhlet según se describe en el apartado 3.4.4 El porcentaje de grasa en las heces, permitió a su vez estimar la grasa diaria eliminada por cada animal.

Al final del periodo experimental y después de un periodo de ayuno de 16 horas, las ratas se anestesiaron con equitesin (sulfato de magnesio, 1.06 g; Pentobarbital 0.46 g; Propilenglicol 21.4 ml; Hidrato de cloral 2.1 g; Etanol absoluto 5.7 ml; 0.3 ml/kg, i.p.). A continuación, se llevó a cabo la medida de la presión arterial en la carótida siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.3.1.

Tras realizar la medida de la presión arterial, los animales se sacrificaron por decapitación con guillotina y se recogieron muestras de sangre de las ratas en tubos

que contenían heparina de litio como anticoagulante (BD Vacutainer CPT, Reino Unido). El plasma obtenido se congeló a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso para efectuar las siguientes determinaciones bioquímicas: colesterol, triglicéridos, ácidos grasos libres, actividad lipasa, adiponectina, TNF- α , malonildialdehído, capacidad antioxidante, glucosa, insulina y actividad de la ECA según se describe en el apartado 3.4.

A continuación, se abrió el tórax de las ratas sacrificadas, y se extrajo rápidamente el corazón, la aorta y el lecho mesentérico de cada uno de los animales. El corazón aislado se utilizó para llevar a cabo los estudios de funcionalidad cardíaca (preparación de Langendorff), según se describe en el apartado 3.3.2. La aorta y el mesenterio se utilizaron para los diferentes estudios *ex vivo* de reactividad vascular descritos en el apartado 3.3.3. Seguidamente se extrajeron los siguientes órganos: hígado, riñón y páncreas, tejido adiposo blanco epididimal y tejido adiposo pardo interescapular. Todos los órganos se limpiaron, se pesaron y se procesaron según el protocolo correspondiente a cada uno de ellos. El peso relativo de cada uno de los órganos se calculó dividiendo el peso de cada órgano por el peso total del animal correspondiente. Una muestra de cada uno de estos tejidos se guardó en paraformaldehído al 10 % para realizar estudios histológicos, y otra muestra se almacenó congelada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para llevar a cabo otras determinaciones (Figura 8).

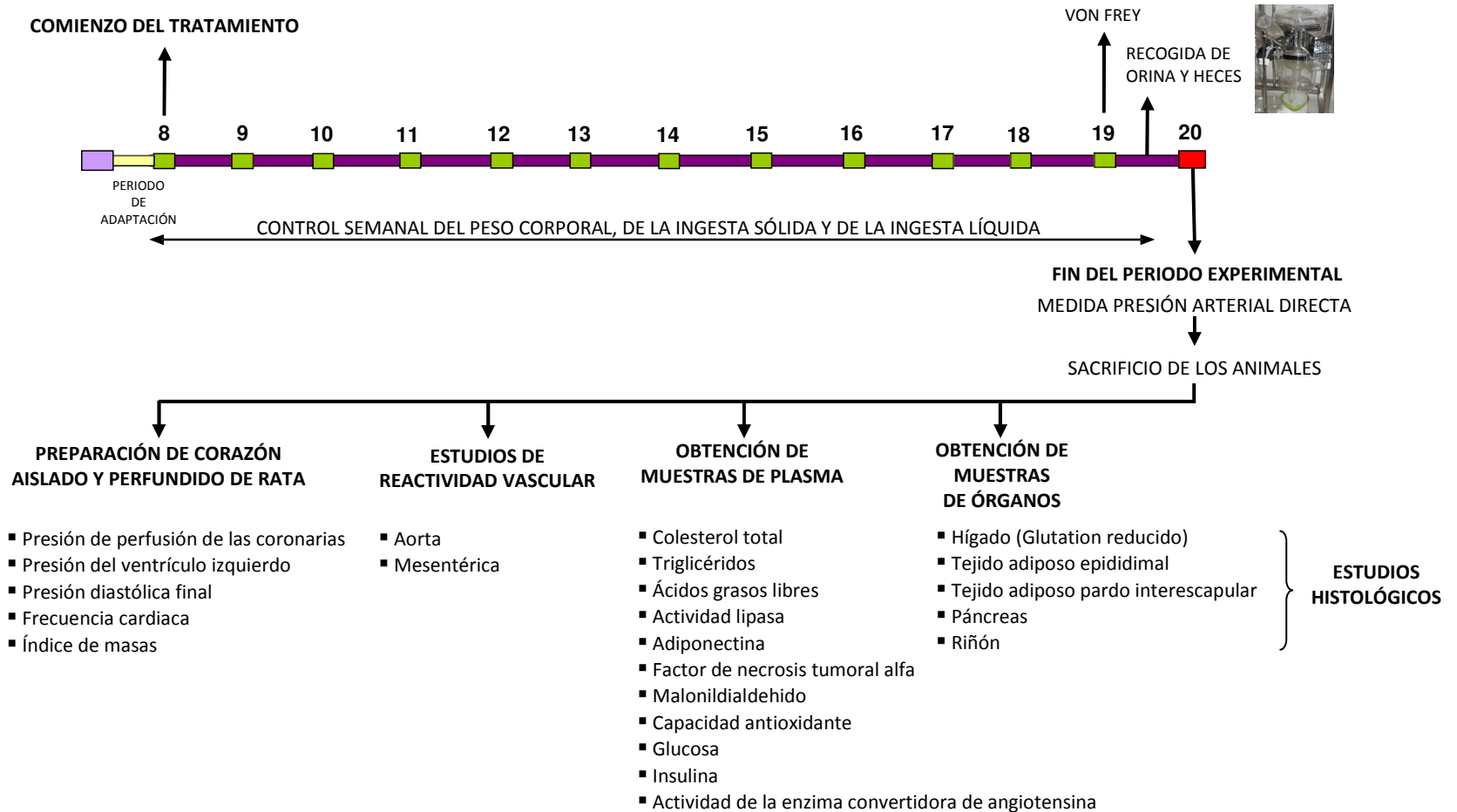
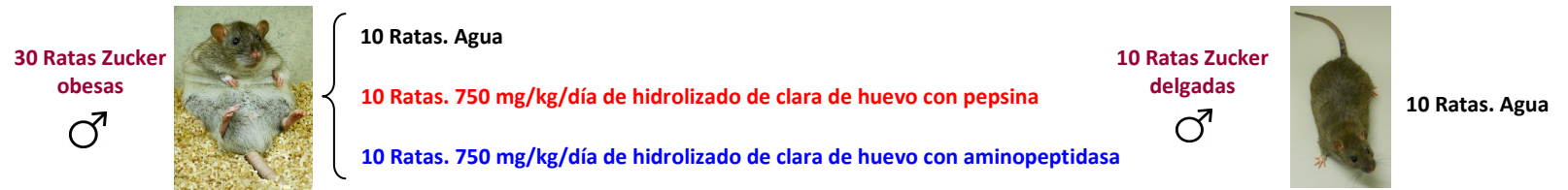


Figura 8. Esquema del protocolo experimental y las determinaciones que se realizaron en el estudio en ratas Zucker.

3.4 Determinaciones y técnicas utilizadas

3.4.1 Medida de la presión arterial directa

La medida de la presión arterial se obtuvo mediante la utilización de una técnica invasiva que permite obtener medidas directas tras la implantación de un catéter en la arteria carótida del animal (Ábalo et al., 2011). Para ello, en primer lugar, los animales se anestesiaron con equitesin. Una vez anestesiado el animal, se colocó en posición decúbito supino sobre la cama (Figura 9), se realizó una incisión en la zona ventromedial del cuello y se procedió a separar y cortar la piel, dejando un campo quirúrgico en forma de ojal lo suficientemente amplio para las manipulaciones posteriores. A través del ojal, se separaron los paquetes musculares hasta lograr acceder al paquete vasculo-nervioso formado por la arteria carótida y el nervio vago. Se separó dicho nervio y, una vez aislada la arteria, se pasaron por debajo de ésta dos hilos, ligando uno en la parte distal, y dejando iniciado el nudo en la parte proximal para la posterior ligadura de la cánula. Una vez preparada la carótida, se colocó una pinza de arteria por encima del nudo iniciado en la parte proximal. Esta pinza tenía como misión interrumpir la circulación para permitir realizar una pequeña incisión a través de la cual se introdujo una cánula de PVC que se sujetó a la arteria mediante un doble nudo con un hilo de costura. Una vez bien sujeta la cánula, se soltó la pinza para reestablecer de nuevo la circulación. Esta cánula se encontraba a su vez acoplada a una jeringuilla que contenía heparina sódica (10 UI/rata) (Hospira Productos Farmacéuticos y Hospitalarios S.L. España), y que se inyectaba lentamente en un volumen de suero fisiológico de 0.4 ml con el fin de evitar la coagulación sanguínea durante el ensayo. Una vez realizada la canulación, se registraron de manera continuada, durante 10 minutos, los siguientes parámetros: presión arterial media, presión arterial sistólica, presión arterial diastólica y frecuencia cardiaca (Figura 10).

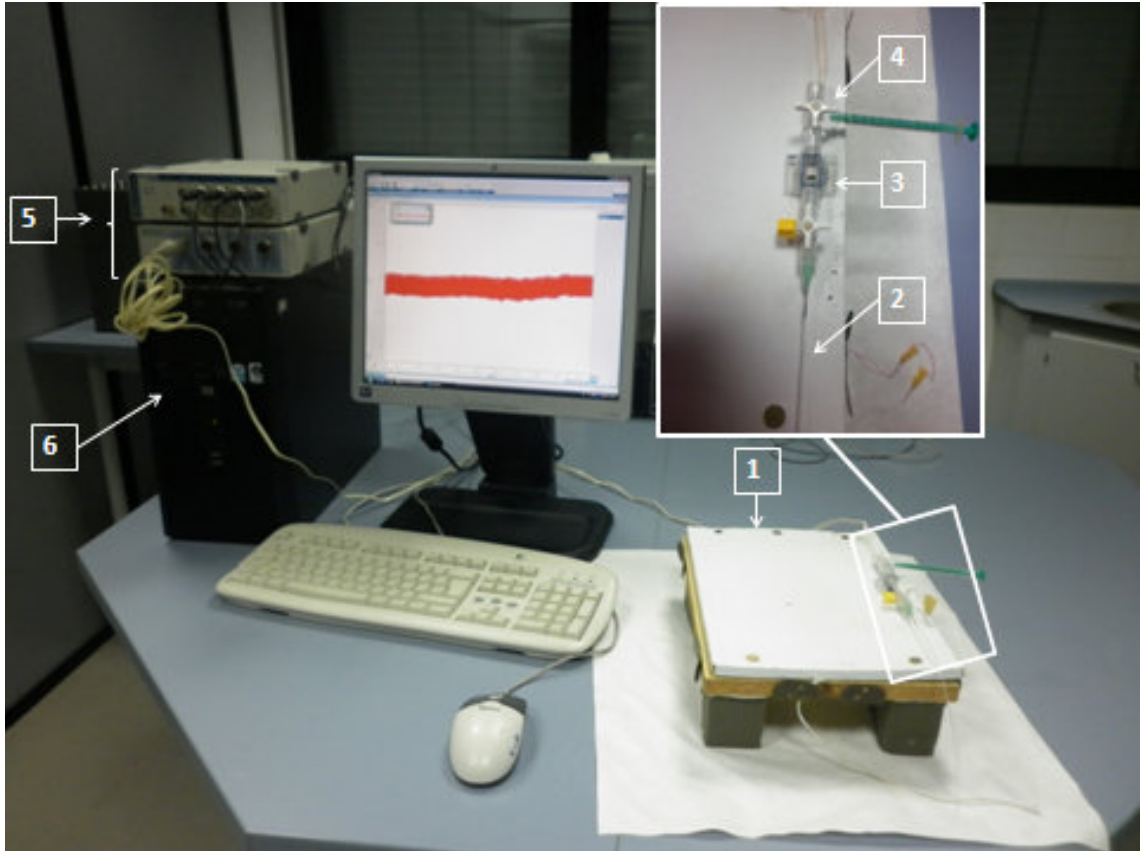


Figura 9. Equipo de medida de la presión arterial directa. Compuesto por una cama con sistema de ganchos laterales para mantener sujeto al animal (1), una cánula de PVC que se introduce en la arteria carótida (2), unos transductores de presión (Cibertec, S.A., España) para el registro de la presión arterial (3), una llave de tres vías que conecta el sistema con una jeringa (4), un sistema PowerLab/400 (PanLab S.A., España) formado por una unidad de amplificación y filtrado de señal conectado a un ordenador para registrar la presión arterial durante todo el experimento (5), un ordenador con el software Chart 4.1 (6).

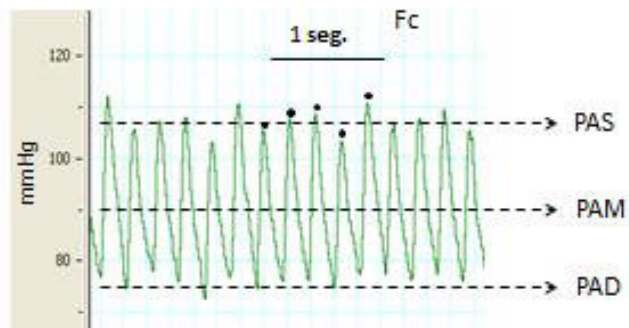


Figura 10: Ejemplo del registro obtenido durante la medida de presión arterial. PAS = Presión arterial sistólica; PAM = Presión arterial media; PAD = Presión arterial diastólica; Fc = Frecuencia cardiaca.

3.4.2 Preparación de corazón aislado y perfundido de rata (Preparación de Langendorff)

En 1895, Oscar Langendorff describió un sistema de perfusión para corazón aislado de mamíferos (Langendorff, 1898), que permite estudiar diferentes parámetros que determinan su funcionalidad. Esta técnica se basa en el mantenimiento de la actividad del miocardio gracias a la perfusión retrógrada a todo el territorio conorario a través de la aorta ascendente, de una solución fisiológica oxigenada a 37 °C, de modo que quede asegurada la nutrición y oxigenación del músculo cardiaco (Figura 11).

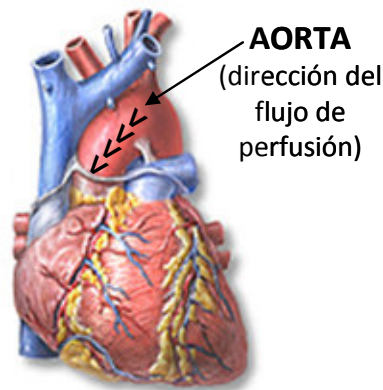


Figura 11. Esquema del flujo de perfusión retrógrada a través de la aorta ascendente a todo el territorio coronario.

Para la obtención de la preparación de corazón aislado de rata, en los animales previamente desangrados, se realizó una incisión en la línea media desde el abdomen hasta el cuello, retirando el esternón por completo y exponiendo la cavidad torácica. Los corazones se extrajeron rápidamente y se sumergieron en solución de Krebs-Henseleit que contenía (mM): 115 NaCl, 25 NaHCO₃, 4.7 KCl, 1.2 MgSO₄·7H₂O, 2.5 CaCl₂, 1.2 KH₂PO₄, 11.1 de glucosa y 0.01 Na₂EDTA) a 4 °C. El frío permite detener momentáneamente el metabolismo del corazón para preservarlo hasta el momento de su colocación en el sistema de perfusión. Esta es la principal desventaja de este método de montaje, ya que el corazón se somete a una

isquemia desde el momento de la extracción hasta que éste se coloca en el sistema de Langendorff que podría suponer un pre-condicionamiento cardiaco. Sin embargo, está descrito que el periodo necesario para establecer un pre-condicionamiento en corazones de rata es de 3 minutos, y que éste se establece especialmente cuando estos pequeños periodos de isquemia se repiten (Vegh et al., 1992), mientras que la isquemia que los corazones sometidos a esta extracción soportan es de únicamente unos segundos.

El sistema de Langendorff (Figura 12) está formado por una copa de baño de órganos y un refrigerante de serpentín de doble camisa acoplado a un baño termostatzado que calienta la solución fisiológica y la mantiene a 37 °C durante todo el experimento (Lépicier et al., 2003) (1), un sistema de desagüe para recoger la solución fisiológica ya perfundida (2), un vaso de precipitados que se utiliza como reservorio de la solución fisiológica, mantenida constantemente en agitación y burbujeada con gas carbógeno (95 % O₂ / 5 % CO₂) (3), una bomba peristáltica (Gilson Inc., Estados Unidos) que permite regular el flujo de perfusión (4), una cánula de acero inoxidable para fijar y perfundir la aorta (5), un transductor de presión acoplado a la cánula lateral del sistema para el registro de la presión de perfusión coronaria (6) y un sistema para el registro de los parámetros de función del ventrículo izquierdo (7). Este sistema consta de un balón de látex que se introduce en el ventrículo izquierdo, y que está conectado, a través de una cánula y la correspondiente llave de tres vías, a una jeringa de precisión y a un transductor de presión formando un circuito independiente relleno de agua destilada. El circuito acoplado a la jeringa se utilizó para ajustar una presión inicial dentro del balón de 5-10 mmHg, que se considera la presión diastólica inicial.

Este sistema de perfusión, se encuentra acoplado a un registro que permite la monitorización de la actividad cardiaca durante el experimento, y que está formado por dos transductores de presión (Cibertec, S.A. España), uno acoplado a la cánula del balón inserto en el ventrículo izquierdo y otro conectado lateralmente

a la cánula en la que se fijó la aorta (A), una unidad de adquisición de datos y un amplificador de señal conectado a un ordenador (PowerLab/400, PanLab S.A., España) para registrar la función cardiaca durante todo el experimento (B) y un ordenador para el registro y tratamiento de datos mediante el programa informático Chart 4.1 para Windows (C).

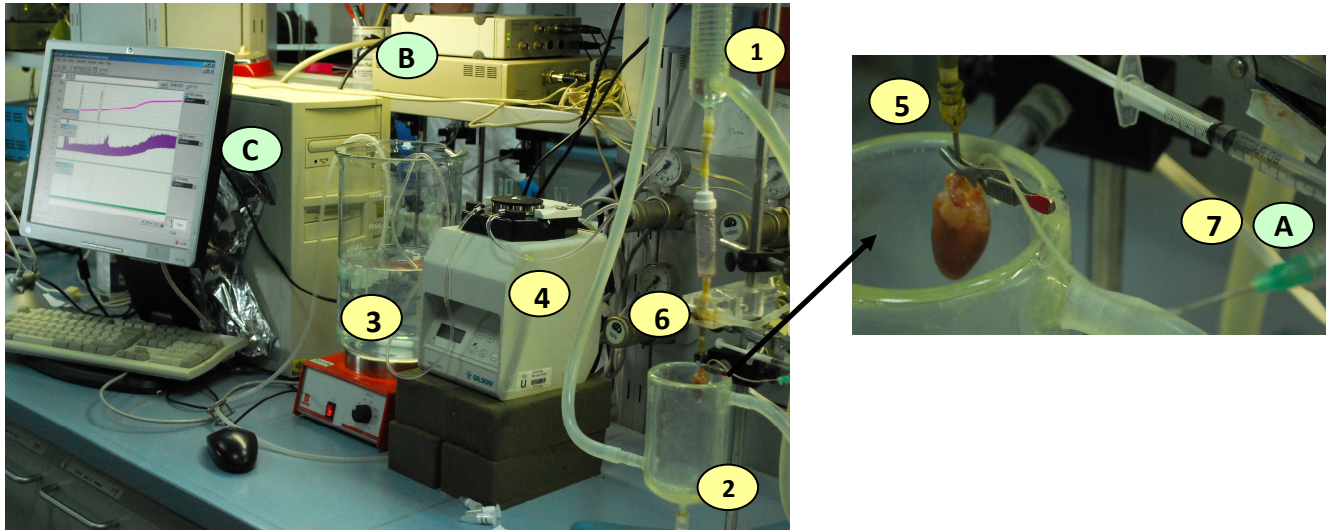


Figura 12. Sistema de Langendorff.

Para colocar el corazón en el sistema de Langendorff, se localizó la aorta, se limpió de grasa y tejido conectivo y, a través de ella, se insertó una cánula de acero inoxidable que se fijó a la arteria con un hilo. De esta manera, el corazón se perfundió retrógradamente con solución fisiológica a un flujo constante de 20 ml/min (Takeo et al., 1995; Randall et al., 1997). Una vez sujeto el corazón a la cánula y, por lo tanto perfundido, se procedió a localizar el orificio de la vena pulmonar y, a través de él y atravesando la válvula mitral, se introdujo el balón de látex en el ventrículo izquierdo. Una vez aislado el corazón, éste se mantuvo durante un periodo de estabilización de 20 minutos con un flujo constante de 20 ml/min para recoger los parámetros de función cardiaca basal que se explican a continuación:

- Presión de perfusión de las coronarias (PPC): Este valor es una función directa del diámetro de los vasos coronarios, y se obtiene cuando se mantiene un flujo de perfusión constante (20 ml/min).

- Presión desarrollada por el ventrículo izquierdo (PDVI): Este parámetro es un indicador de la contractilidad miocárdica. Es la diferencia entre los valores de presión sistólica y diastólica ventricular.

- Presión diastólica final (PDF): Esta presión se fijó al principio del experimento ajustando el volumen del balón de látex (5-10 mm Hg). Se calcula como el valor mínimo de presión ejercida por el ventrículo izquierdo en la diástole ventricular.

- Frecuencia cardiaca (Fc): Este parámetro se define como el número de contracciones del corazón o pulsaciones por unidad de tiempo. Se calcula a partir de la señal obtenida de la presión ventricular izquierda.

Una vez finalizado el experimento de función cardiaca, el corazón se pesó con el fin de determinar los índices de masas. Posteriormente, las aurículas se cortaron y se eliminó la pared del ventrículo derecho, dejando aislado el ventrículo izquierdo (que incluye el septo y la pared del ventrículo izquierdo). Una vez aislado también se registró el peso del ventrículo izquierdo (Bregagnollo et al., 2007).

A partir de estos valores se calcularon:

- Índice de masa cardiaca (IMC) calculado como peso del corazón (mg)/peso corporal (g).

- Índice de masa del ventrículo izquierdo (IMVI) calculado como peso del ventrículo izquierdo (mg)/ peso corporal (g).

3.4.3 Estudios de reactividad vascular

3.4.3.1 Estudios en aorta

Después de extraer el corazón, se extrajo la aorta torácica, se introdujo en una solución de Krebs-Henseleit (KH) que contenía (mM): 118 NaCl; 4.75 KCl; 1.2 MgSO₄; 1.19 KH₂PO₄; 2.54 CaCl₂; 25 NaHCO₃; 11 glucosa (pH 7.4) a 4 °C oxigenada con una mezcla de gas carbógeno (pH = 7.4), y se limpió el tejido adiposo.

Para realizar los experimentos de reactividad vascular en aorta se empleó el método de Nielsen y Owman (1971). Para ello, la aorta se dividió en segmentos de 3-4 mm de longitud, aproximadamente. En cada segmento se introdujo, por un extremo, un gancho de acero inoxidable inmóvil de 0.6 mm de diámetro que sirve para fijar la preparación en el baño. Y por el otro extremo, otro gancho de acero inoxidable de 0.6 mm de diámetro unido a un hilo, quedando el anillo situado en su zona central. El gancho unido al hilo está acoplado a un transductor de fuerza (Grass FT3C, Estados Unidos), conectado a su vez a un amplificador (Ampo 16/2, España), que envía la señal a través de un interfaz (Letica Interface LE 60-100L/H, Estados Unidos) a un software (eDAQ Chart versión 5.2, Panlab, España) y permite obtener medidas digitales de la contracción o relajación, así como la visualización de las mismas a través de la pantalla del ordenador (Figura 13).

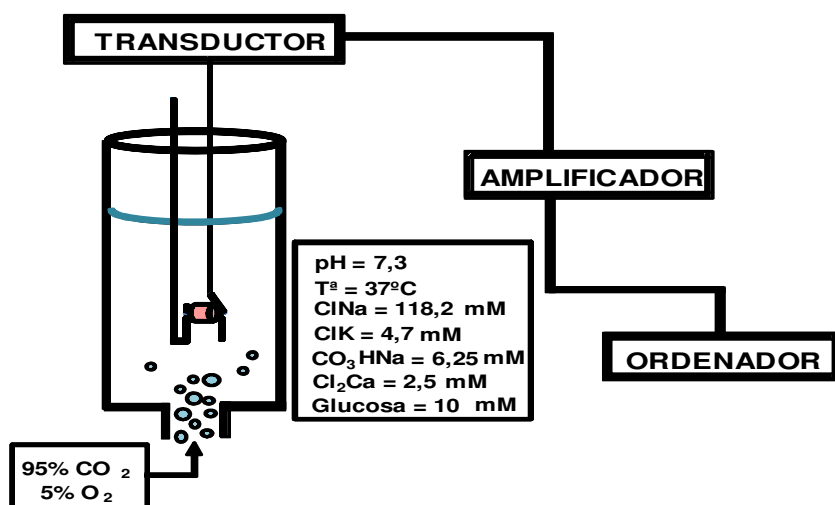


Figura 13. Esquema del ensayo con anillos de aorta de ratas Zucker en baños de órganos.

Los segmentos vasculares se introdujeron en un baño de órganos que contenía 5 ml de KH a 37 °C, burbujeados continuamente con carbógeno. Los segmentos se sometieron a una tensión inicial de 2 g, que se reajustó periódicamente hasta que éstos se estabilizaron al cabo de 45 minutos, aproximadamente. Entonces, se provocó la contracción de los anillos, exponiéndolos a una concentración 80 mM de KCl, lo que permitió comprobar la funcionalidad arterial. Cuando se alcanzó la altura máxima de esta contracción (aproximadamente 30 minutos después de la administración de KCl), las preparaciones se lavaron con solución KH, hasta que recuperaron la tensión basal inicial antes de la administración.

La presencia de endotelio funcional se determinó por la capacidad de las arterias, previamente contraídas con fenilefrina (Phe) hasta, aproximadamente, el 50 % de la contracción del KCl, de relajarse en respuesta a 10 µM de acetilcolina (Ach). Se consideraron segmentos con endotelio funcional aquellos que relajaban con acetilcolina más de un 80 % del tono previo. Aquellas preparaciones que alcanzaron una relajación inferior al 80 % no se utilizaron en este estudio. Una vez

comprobada la presencia de endotelio, se realizó una curva concentración respuesta a Ach (0.001-10 μM) en segmentos previamente precontraídos con Phe en ausencia (curva control) o en presencia de los diferentes fármacos utilizados. Después de realizar la curva de relajación a Ach se lavaron las preparaciones varias veces con KH, durante 30 minutos y se realizó una curva de contracción a Phe (0.001-10 μM) en ausencia (curva control) o en presencia de los diferentes fármacos utilizados.

Los fármacos se administraron 30 minutos antes de realizar las correspondientes curvas de relajación o contracción. Para analizar el papel del NO en la respuesta relajante inducida por la Ach, se estudió el efecto producido por L- N_G -nitroarginina metil éster (L-NAME) (100 μM) (Sigma-Aldrich S.A., España), inhibidor no selectivo de la NOS, sobre dicha curva. Para determinar el papel del anión superóxido en la relajación inducida por Ach, se utilizó el inhibidor de la enzima nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato (NADPH) oxidasa, apocinina (APO) (0,3 mM) (Sigma). También se utilizaron preparaciones incubadas con Tetraetilamonio (TEA) (2 mM) (Sigma), un inhibidor de los canales de potasio.

3.4.3.2 Estudios en arteria mesentérica

Para estudiar la reactividad vascular de las arterias mesentéricas se utilizó el método descrito por Mulvany y Halpern (1977). Para ello, segmentos de aproximadamente 2 mm de longitud de la arteria mesentérica se transfirieron a un baño de órganos de un miógrafo dual isométrico (JP-Trading, Dinamarca), en el cual se introdujeron dos alambres de acero de 40 μm de diámetro por la luz de la arteria (Figura 14). Después de un periodo de estabilización de 30 minutos en KH a 37 °C y pH de 7.4, las arterias se estiraron gradualmente hasta conseguir su tensión óptima en función de su diámetro. Para ello, se determinó en cada segmento arterial, la relación entre la tensión de reposo de la pared vascular y la circunferencia interna del vaso y, a partir de ella, la circunferencia interna correspondiente a una presión

transmural de 100 mmHg para un vaso relajado *in situ* (L100) (Mulvany y Halpern, 1977). Para la realización de los experimentos, las arterias se colocaron con una circunferencia interna L_i , siendo $L_i=0,9x L100$, circunferencia a la cual el desarrollo de fuerza es máximo. El diámetro de las arterias se determinó como $l_i= L_i/\pi$.

Después del proceso de normalización, se lavaron los segmentos arteriales y se equilibraron durante 30 minutos. A continuación, se comprobó la contractilidad de los segmentos por exposición de los mismos a una solución de alta concentración de potasio (K^+ KHS 120 mM). La presencia de endotelio funcional se determinó por la capacidad de las arterias, previamente contraídas con Phe hasta, aproximadamente, el 50 % de la contracción del K^+ KHS, de relajarse en respuesta a 10 μ M de Ach. Se consideraron segmentos con endotelio funcional aquellos que relajaban con acetilcolina más de un 80 % del tono previo. Aquellas preparaciones que alcanzaron una relajación inferior al 80 % no se utilizaron en este estudio. Una vez comprobada la presencia de endotelio, se realizó una curva concentración respuesta a Ach (0.001-10 μ M) en segmentos previamente precontraídos con Phe en ausencia (curva control) o en presencia de (L-NAME) (100 μ M). Después de realizar la curva de relajación a Ach se lavaron las preparaciones varias veces con KH, durante 30 minutos y se realizó una curva de contracción a Phe (0.1-100 μ M) en ausencia (curva control) o en presencia de de (L-NAME) (100 μ M). El L-NAME se administró 30 minutos antes de realizar las correspondientes curvas (Figura 15).

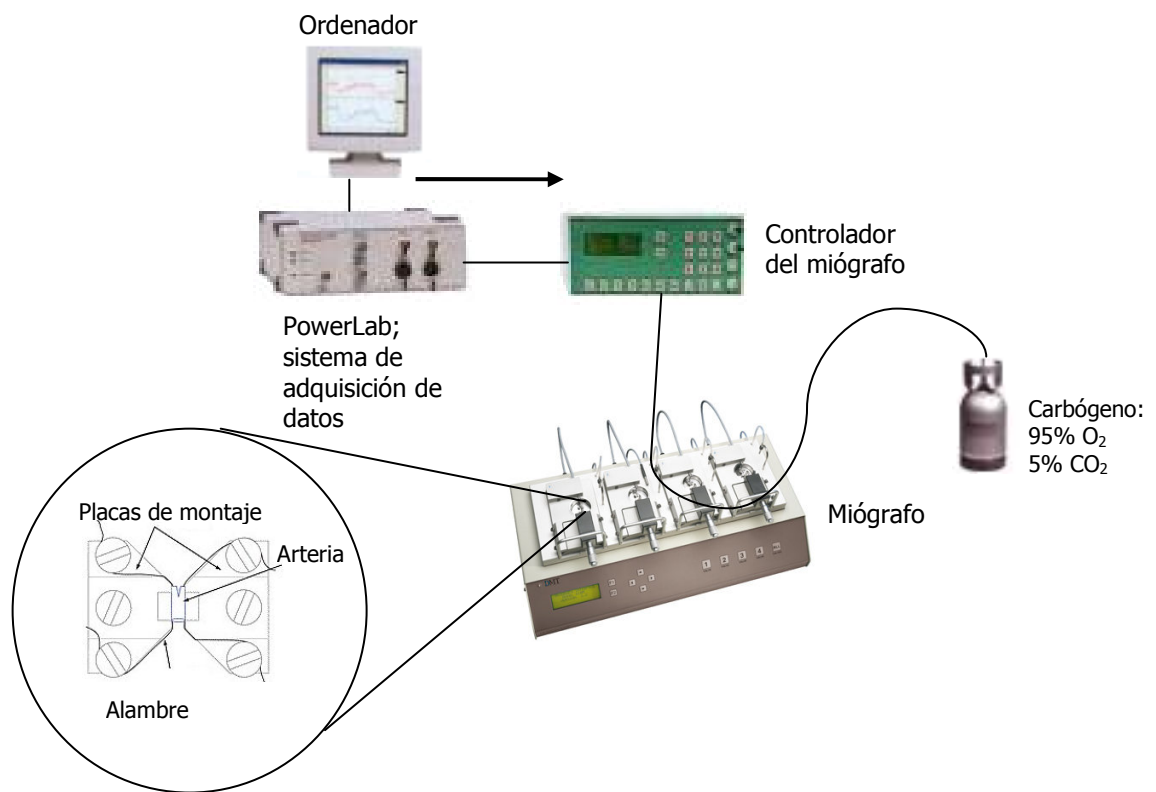


Figura 14. Esquema representativo del miógrafo de alambres donde se realizaron los experimentos de reactividad vascular arterias mesentéricas.

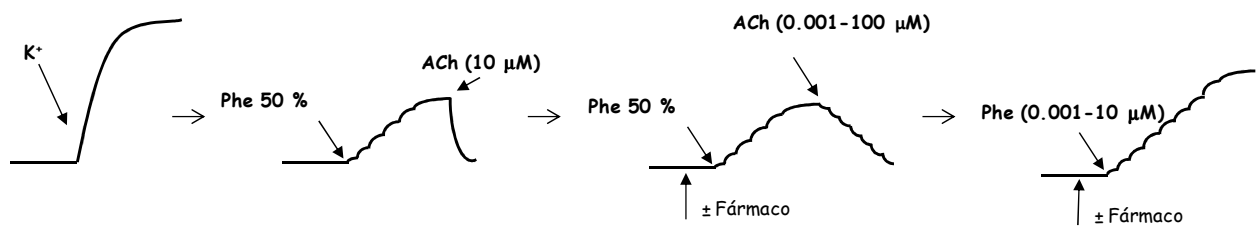


Figura 15. Esquema representativo del protocolo experimental realizado en los experimentos de reactividad vascular en aorta y arterias mesentéricas de ratas Zucker. Phe= fenilefrina, ACh= acetilcolina.

3.4.4 Grasa en heces. Método Soxhlet.

Para determinar el porcentaje de grasa en las heces de los animales recogidas de las jaulas metabólicas, se utilizó el método descrito por Soxhlet en 1990 (Método Soxhlet. AOAC, 1990).

Después de recoger las heces, éstas se desecaron en una estufa a 40 °C durante 24 horas para eliminar totalmente la humedad. Se desecó también el matraz que se utilizó para llevar a cabo la extracción de la grasa, manteniéndolo para ello a 103 °C durante 30 minutos. A continuación, se taró este matraz (m1), se pesaron de 2 a 5 g de heces, y se registró esta medida como m (peso de la muestra). Los gramos de heces pesados se incorporaron a un dedal de extracción o papel filtro, tapado con algodón en ambos extremos. Este dedal se acopló a un tubo de extracción del sistema Soxhlet, donde se incluye también el matraz de extracción que se había pesado con anterioridad. A continuación, se añadió el disolvente (éter etílico de punto de ebullición 40-60 °C, (Sigma). Para conseguir la extracción de la grasa, el disolvente se mantuvo en contacto con la muestra durante 6-8 horas, pasando a través de ella a una velocidad de condensación de 3-6 gotas/segundo. Una vez terminada la extracción, se eliminó el resto del disolvente en un rotavapor, y se secó el matraz con la grasa en la estufa a 103 °C durante 10 minutos. A continuación, se pesó el matraz y se registró esta medida como m2 (peso del matraz con grasa).

$$\% \text{ grasa cruda} = \frac{m1 - m2}{m} \times 100$$

m= peso de la muestra

m1= tara del matraz vacío

m2= peso del matraz con grasa

Teniendo en cuenta estos datos, la ingesta y la composición de las diferentes dietas, se calculó el porcentaje de grasa aparentemente digerida (GAD) según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ GAD} = 100 \times (\text{grasa ingerida} - \text{grasa eliminada}) / \text{grasa ingerida}$$

3.4.5 Estudio de la neuropatía diabética. Método Von Frey

La sensibilidad mecánica en las ratas de este estudio se realizó una semana antes de finalizar el periodo experimental utilizando el test de los filamentos de von Frey (Fox et al., 2001; Vera et al., 2012). Para ello se usó un dispositivo o von Frey electrónico (EVF3, Bioseb, BP89, ChavilleCedez, Francia), que consiste en un filamento conectado al equipo que genera un estímulo mecánico de intensidad creciente que se aplica en la superficie plantar de ambas patas traseras del animal (Figura 16). El sistema registra automáticamente la intensidad del estímulo que provoca el reflejo de retirada de la pata. Por lo general, se utiliza una presión de corte de 50 g ya que dicha presión era capaz de levantar la pata del animal.

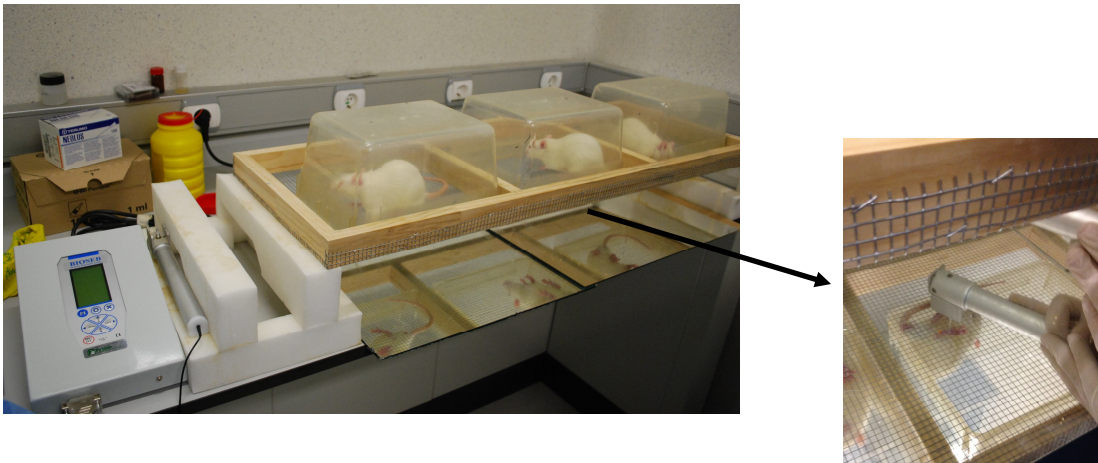


Figura 16. Imagen de la realización del Test de los filamentos de von Frey en ratas con un dispositivo electrónico.

Previamente a la realización del test se acostumbró a los animales a la malla metálica durante al menos 10 minutos. El test se realizó 4 veces en cada pata trasera y dejando un tiempo entre estímulo de al menos un minuto. Para el análisis se utilizó la media de las cuatro medidas, evaluando la presencia o no de alodinia mecánica, que se define como el descenso significativo en el umbral de la estimulación mecánica que provoca la retirada de la pata por presencia de neuropatía diabética.

3.4.6 Determinación de colesterol y triglicéridos en plasma

Para obtener los valores de colesterol total, triglicéridos en plasma se utilizaron kits comerciales basados en métodos enzimático-colorimétricos (Spinreact S.A/S.A.U, España). Para ello se pipetearon 10 µl de plasma y se añadió 1 ml de reactivo, la mezcla se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se midió la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro (Biotek HT Sinergy). A continuación se explica el fundamento de cada kit:

Determinación de colesterol total en plasma. El colesterol presente en las muestras de plasma se determinó por un método enzimático basado en la fórmula de Allain et al., 1974, y Roeschlau et al., 1974. La enzima colesterol esterasa (CHE) hidroliza los ésteres de colesterol a colesterol libre y el ácido graso correspondiente. Éste último, en presencia de la colesterol oxidasa (CHOD) y oxígeno, oxida el colesterol libre para formar 4-Colestenona y peróxido de hidrógeno. En una reacción catalizada por la peroxidasa (POD), el peróxido reacciona con la 4-Aminofenazona para formar quinonimina, un compuesto de color rosáceo (Figura 18). La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra de plasma (Naito et al., 1984; Meiattini et al., 1978). Los resultados se muestran como mg de colesterol/dl de plasma.

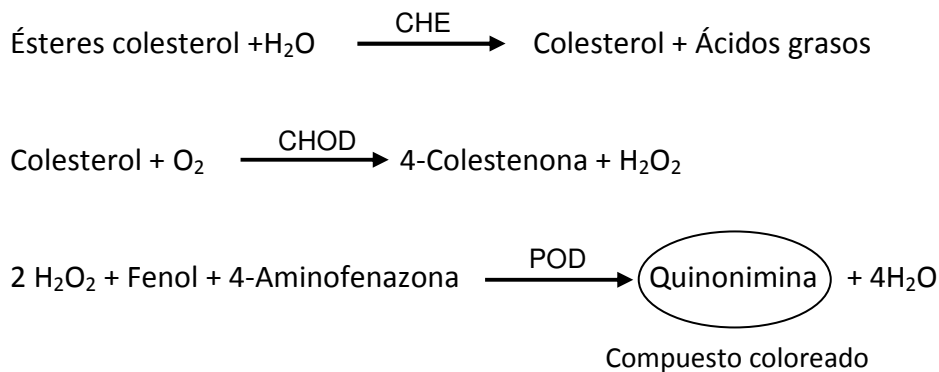


Figura 18. Esquema de las reacciones catalizadas por las enzimas colesterol esterasa (CHE), colesterol oxidasa (CHOD) y peroxidasa (POD) que partiendo de ésteres de colesterol y mediante una cadena de reacciones terminan formando un compuesto coloreado proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra (Allain et al., 1974, y Roeschlau et al., 1974).

Determinación de triglicéridos en plasma. La determinación de los triglicéridos presentes en las muestras de plasma se calcula mediante un método enzimático basado en la hidrólisis de los triglicéridos a glicerol y ácidos grasos libres por la acción de la lipoproteinlipasa (LPL). El glicerol se fosforila por la presencia de la enzima glicerolfosfato deshidrogenasa (GPO) dando lugar en presencia de glicerol quinasa (GK) y ATP a glicerol-3-fosfato (G3P) y adenosina-5-difosfato (ADP). El G3P reacciona con el oxígeno dando lugar a dihidroxiacetona fosfato (DAP) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por acción de la enzima glicerol fosfato oxidasa (GPO). El H_2O_2 reacciona con la 4-aminofenazona (4-AF) y el p-clorofenol, reacción catalizada por la peroxidasa (POD), produciendo un compuesto de coloración rosácea (Figura 19). La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de triglicéridos presentes en la muestra de plasma (Fossati et al., 1982). Los resultados se expresan como mg de triglicéridos/dl de plasma.

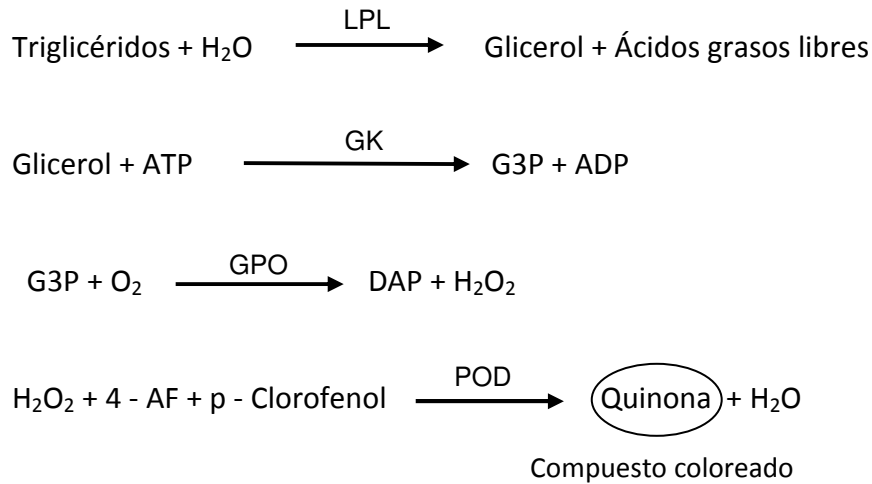


Figura 19. Esquema simplificado de las reacciones enzimáticas que producen un compuesto coloreado, proporcional a la concentración de triglicéridos presentes en la muestra de plasma. Donde: LPL: Lipoproteinlipasa; GK: Glicerol quinasa; GPO: Glicerol fosfato oxidasa; POD: Peroxidasa.

3.4.7 Determinación de ácidos grasos libres en plasma

Para determinar los ácidos grasos libres del plasma se utilizó un kit colorimétrico comercial (EnzyChrom Free Fatty Acid Assay Kit, BioAssay Systems, Estados Unidos) basado en la reacción enzimática de los ácidos grasos libres con la Acil-CoA que forman peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La intensidad de color se midió a 37°C con un espectrofotómetro (Biotek HT Sinergy), a una longitud de onda de 570 nm. La intensidad de color formada es directamente proporcional a la concentración de ácidos grasos libres en la muestra. Como patrón se realizó una curva estándar de ácido palmítico (0-1000 μM).

La concentración de ácidos grasos libres presentes en cada muestra se calculó de la siguiente forma:

$$\text{Concentración de ácidos grasos libres} = \frac{\text{Abs}_{\text{muestra}} - \text{Abs}_{\text{blanco}}}{\text{Pendiente } (\mu\text{M}^{-1})} \times n \text{ } (\mu\text{M})$$

Donde:

- Abs_{muestra} y Abs_{blanco}: Absorbancia de la muestra y absorbancia del blanco a 572 nm, respectivamente.
- Pendiente: Pendiente de la recta patrón.
- n: Factor de dilución de la muestra.

3.4.8 Determinación de la actividad lipasa en plasma

La actividad de la lipasa pancreática en plasma se determinó con el kit colorimétrico comercial (QuantiChrom Lipase Assay Kit, BioAssay Systems, Estados Unidos) basado en el método BALB-DTNB de Furukawa et al. (1982). El ensayo se basa en la reacción de los grupos sulfhidrilo (SH) de la lipasa con el dimercaptopropanol tributirato (BALB) formando un compuesto que reacciona con el 5,5'-Ditiobis (2-Ácido nitrobenzoico) (DTNB) dando lugar a un producto de color amarillo. La intensidad de color se midió a 37 °C, a los 10 y a los 20 minutos en un espectrofotómetro (Biotek HT Sinergy), a 412 nm. La intensidad del color formado es proporcional a la actividad lipasa en la muestra. Como blanco se utilizó agua y como patrón de actividad se utilizó un calibrador con una actividad de 735U/L.

La actividad lipasa se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad lipasa} = \frac{\text{Abs}_{20 \text{ min}} - \text{Abs}_{10 \text{ min}}}{\text{Abs}_{\text{Cal}} - \text{Abs}_{\text{H}_2\text{O}}} \times 735 \text{ (U/L)}$$

Donde:

- Abs_{20 min} y Abs_{10 min}: Absorbancia de la muestra a 412 nm a los 20 minutos y 10 minutos, respectivamente.
- Abs_{Cal} y Abs_{H₂O}: Absorbancia del calibrador y absorbancia del agua a 412 nm a los 20 minutos, respectivamente.

3.4.9 Determinación de los niveles de adiponectina y factor de necrosis tumoral en plasma

Para determinar las concentraciones plasmáticas de adiponectina y factor de necrosis tumoral (TNF- α) se usaron los kit de ELISA directos, específicos para rata: Adiponectina (Invitrogen, Gran Bretaña), y TNF- α (Invitrogen). El fundamento de la técnica es el mismo que se ha descrito en el punto 3.3.8. La cuantificación se llevó a cabo a una longitud de onda de 450 nm con un espectrofotómetro (Biotek HT Sinergy).

Los resultados de los niveles de adiponectina se expresaron como ng de adiponectina/ml de plasma. Los resultados de los niveles de TNF- α se expresaron como pg de TNF- α /ml de plasma.

3.4.10 Determinación de malonildialdehído en plasma

Para determinar los niveles de malonildialdehído (MDA) en el plasma de las ratas se utilizó el ensayo modificado del ácido tiobarbitúrico (TBA) (Rodríguez-Martínez y Ruiz-Torres, 1992). Para ello, el plasma se mezcló con ácido tricloroacético al 20 % en 0.6 M HCl (1:1 v/v), y los tubos se mantuvieron en hielo durante 20 minutos para precipitar los componentes del plasma, evitando así, posibles interferencias. Las muestras se centrifugaron a 1500 g durante 15 minutos. A continuación, se añadió el TBA (Sigma) (120 mM en Tris 260 mM y pH 7) al sobrenadante en una proporción 1:5 (v/v), y la mezcla se calentó a 97°C durante 30 minutos. La reacción entre MDA y TBA produce un pigmento estable de color rojo-rojoso, con un coeficiente de absorción molar de $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ en el espectro visible (535 nm). En este aducto, la proporción MDA:TBA es de 1:2. Para la medida de la absorbancia se utilizó un espectrofotómetro (Biotek HT Sinergy, Estados Unidos), controlado por el software Gen 5 1.06. Las concentraciones de MDA en plasma se expresaron como μmol de MDA/ml de plasma.

3.4.11 Medida de la capacidad antioxidante del plasma

Para determinar la capacidad antioxidante en las muestras de plasma se utilizó el ensayo ORAC descrito en el apartado 3.2.2. Los resultados se expresaron como μmol de equivalente de Trolox/ μl de plasma.

3.4.12 Homogeneización y determinación de glutatión reducido en tejido hepático.

Para llevar a cabo las determinaciones de glutatión reducido, las muestras de hígado se homogeneizaron en tampón fosfato a pH 7.4 (Sigma) a 4 °C utilizando un homogeneizador de vidrio (Figura 21). Posteriormente, los homogeneizados se centrifugaron a 5000 g y 4 °C durante 15 minutos, y se recogieron alícuotas los sobrenadantes, que se almacenaron a -80 °C hasta su utilización.



Figura 21: Homogeneización del tejido hepático con un homogeneizador de vidrio.

El contenido de glutatión reducido en el hígado se determinó por el método fluorimétrico monoclorobimane (Kamencic et al., 2000). Para ello, 90 μl de sobrenadante de homogeneizado de hígado se depositaron en una placa multipocillo de poliestireno negra, y se añadieron a la placa 10 μl de una solución que contenía glutatión S-transferasa (1U/ml) obtenida de hígado de caballo (Sigma) y monoclorobimane 1 mM (Fluka Biochemical, Suiza). La placa se incubó a temperatura ambiente protegida de la luz durante 30 minutos. Durante este tiempo

tiene lugar una reacción en la que el glutathion se une al monoclorobimane, generando un complejo fluorescente. Esta reacción está catalizada por la glutathion S-transferasa. Transcurrido dicho tiempo, se procedió a cuantificar la concentración del complejo, y por lo tanto de glutathion, mediante un fluorímetro (FLUOstar OPTIMA), a una longitud de onda de excitación de 390 nm y de emisión de 510 nm. Para determinar el contenido de proteínas en las muestras de hígado, se utilizó la técnica espectrofotométrica descrita en el apartado 3.2.5. Las concentraciones de glutathion reducido en el hígado se expresaron como μmol de glutathion reducido/g de proteína.

3.4.13 Determinación de glucosa en plasma

Para obtener los valores de colesterol total, triglicéridos en plasma se utilizaron kits comerciales basados en métodos enzimático-colorimétricos (Spinreact S.A/S.A.U, España). Para ello se pipetearon 10 μl de plasma y se añadió 1 ml de reactivo, la mezcla se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se midió la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro (Biotek HT Sinergy). A continuación se explica el fundamento de cada kit:

Determinación de glucosa en plasma. La glucosa fue determinada por un método enzimático que utiliza la glucosa oxidasa (GOD) para catalizar la oxidación de la glucosa a ácido glucónico. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) producido se detecta mediante un aceptor cromogénico de oxígeno, fenol, 4-aminofenazona (4-AF), en presencia de la enzima peroxidasa (POD), dando lugar a un compuesto coloreado denominado quinona (Figura 17). La intensidad de color que se forma es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra de plasma (Kaplan *et al.*, 1984; Trinder *et al.*, 1969). Los resultados se expresaron como mg de glucosa/dl de plasma.

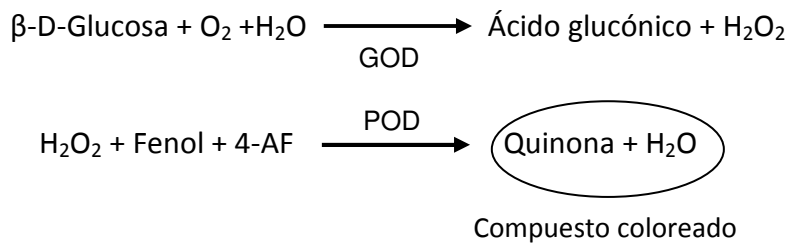


Figura 17. Cadena de reacciones de oxidación de glucosa mediadas por las enzimas glucosa oxidasa (GOD) y peroxidasa (POD) que terminan dando lugar a un compuesto de color rosáceo proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra.

3.4.14 Determinación de insulina en plasma

Para determinar la concentración de insulina plasmática se utilizó un ensayo inmunoenzimático (ELISA) de tipo directo con un kit comercial ultrasensible específico para rata (MercoDIA AB, Suecia).

Durante la incubación, la insulina presente en las muestras de plasma reacciona con los anticuerpos anti-insulina unidos a la placa multipocillo y con los anticuerpos anti-insulina conjugados con peroxidasa adicionados. El conjugado unido se detectó mediante la reacción con el sustrato 3,3', 5,5'-tetrametilbencidina. Esta reacción se detuvo por la adición de ácido, y la lectura se realizó a 450 nm con un espectrofotómetro (Biotek HT Sinergy) (Figura 20). Los niveles de insulina en el plasma se expresan en µg de insulina/L de plasma.

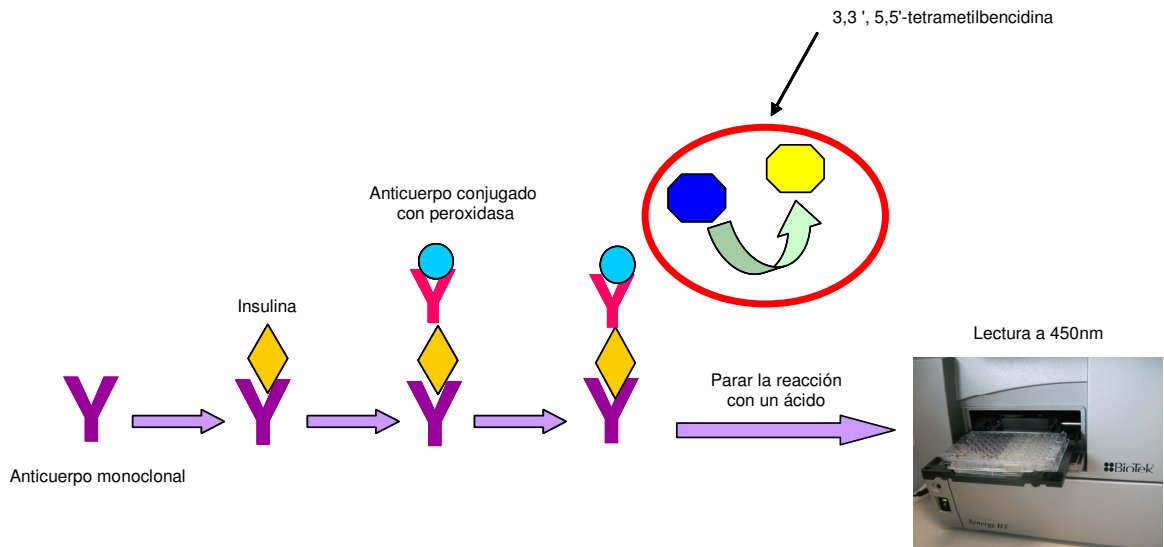


Figura 20. Principio del ensayo de ELISA directo. Reacciones en cadena para determinar la insulina en el plasma.

Índice HOMA-IR, HOMA- β y QUICKI

El valor de la concentración plasmática de insulina, junto con el valor de la concentración plasmática de glucosa en los animales sacrificados, se utilizaron para calcular el índice de resistencia a la insulina [“homeostasis model assessment” (HOMA)-IR] y el índice de secreción de insulina en las células β -pancreáticas [HOMA- β]. También se calculó el índice cuantitativo de sensibilidad a la insulina [“Quantitative Insulin Sensitivity Check Index” (QUICKI)] (Ferrannini y Mari, 1998). Las fórmulas que proporcionan los valores de los índices mencionados figuran a continuación:

$$\mathbf{HOMA-IR} = \text{insulina en ayunas } (\mu\text{U/ml}) \times \text{glucosa en ayunas (mm)}/22.5$$

$$\mathbf{HOMA-\beta} = 20 \times \text{insulina en ayunas } (\mu\text{U/ml})/[\text{glucosa en ayunas (mm)}-3.5]$$

$$\mathbf{QUICKI} = 1/[\log \text{insulina en ayunas } (\mu\text{U/ml}) + \log \text{glucosa en ayunas (mg/dl)}].$$

3.4.15 Medida de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina en plasma

La actividad de la ECA se midió con un método fluorimétrico adaptado de Friedland y Silverstein (Friedland y Silverstein, 1976), según se explica a continuación. Una muestra de 3 µl de plasma se incubó durante 15 minutos a 37 °C por triplicado con 40 µl de tampón borato, que contenía una concentración 5 mM del sustrato sintético de la ECA hipuril-histidil-leucina (Hip-His-Leu) (Sigma). La reacción se paró añadiendo 190 µl de NaOH 0.35 N. El producto generado (His-Leu), se midió fluorimétricamente después de 10 minutos de incubación con 100 µl de una solución de *o*-ftaldialdehído al 2 % en metanol. Las medidas de fluorescencia se llevaron a cabo a 37 °C en un lector de placas (Fluostar Optima), a una longitud de onda de 350 nm de excitación y de 520 nm de emisión. Se usaron placas multipocillo de poliestireno negras (Biogen Científica, España). La curva de calibrado se hizo usando ECA de pulmón de conejo (Sigma).

3.4.16 Estudios histológicos

Para llevar a cabo el estudio histopatológico, al finalizar el tratamiento se obtuvieron distintos tejidos para su análisis, hígado, páncreas, riñón y tejido adiposo. El tejido adiposo fue obtenido de distintas localizaciones para estudiar las variedades blanca (epididimal) y parda (interescapular). Todos los tejidos se fijaron en solución de formaldehído al 10 % en PBS durante un mínimo de 48 horas y fueron procesados para su inclusión en parafina en un procesador automático Thermo Shandon (Thermo Fisher Scientist, Estados Unidos). Una vez embebidos en parafina se cortaron con un micrótopo Microm (MICROM International GmbH, Alemania) en secciones de 5 µm. A continuación, las preparaciones se tiñeron con hematoxilina-eosina (H & E) para su estudio general y con la tinción de Van Gieson para la determinación de fibrosis.

La observación se realizó con un microscopio Zeiss Axioskop 2 (Zeiss MicroImaging GmbH, Alemania) equipado con el programa de análisis de imagen AxioVision 4.6 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Alemania). Este programa se empleó para medir el tamaño medio de los islotes de Langerhans, que se expresó en μm^2 , y para contar el número medio de células adiposas presentes por unidad de área. En el primer caso se analizaron entre 2 y 4 secciones por páncreas midiéndose, bajo el objetivo de 40 aumentos, un mínimo de 100 islotes por tratamiento. Por otra parte, el tamaño de los adipocitos se cuantificó, en el caso de la grasa parda, bajo el objetivo de 40 aumentos, determinándose el número medio de adipocitos por cada $4 \times 10^4 \text{ mm}^2$, mientras que, para la grasa blanca se utilizaron 20 aumentos dado el mayor tamaño de sus células, resultando un área medida por sección de $15 \times 10^4 \text{ mm}^2$.

3.5 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en los animales se expresaron como la media \pm el error estándar de la media (EEM) de, al menos, 7 animales.

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el test de la “t de student” para datos no apareados. En algunos casos, el análisis estadístico se llevó a cabo mediante el cálculo de la varianza utilizando un ANOVA de dos vías, seguido del test de Bonferroni. Se considera siempre significativa la diferencia para valores de $P < 0.05$. Para llevar a cabo el análisis estadístico se empleó el programa estadístico Graph-Pad Prism versión 4.00 para Windows (Graph-Pad Software, San Diego, CA). Se realizaron las siguientes comparaciones: * $P < 0.05$ ratas delgadas vs ratas obesas que bebieron agua, # $P < 0.05$ ratas obesas que bebieron agua vs ratas obesas que recibieron los hidrolizados de clara de huevo.

En la tabla 9 se resumen las determinaciones realizadas y técnicas utilizadas en el estudio *in vivo*.

Tabla 9. Determinaciones realizadas y técnicas utilizadas en el estudio en ratas Zucker.

DETERMINACIÓN	TÉCNICA UTILIZADA
Presión arterial directa	Ábalo et al., 2011
Preparación de corazón aislado y perfundido	Langerdorff, 1898
Reactividad vascular en aorta	Nielsen y Owman, 1971
Reactividad vascular en mesentérica	Mulvany, 1977
Determinación de grasa en las heces	Método Soxhlet (AOAC, 1990)
Test de los filamentos de Von Frey	Fox et al., 2001; Vera et al., 2012
Determinación de colesterol total y triglicéridos en plasma	“Kit” comercial colorimétrico (Spinreact, S.A/S.A.U, España)
Determinación de ácidos grasos libres en plasma	“Kit” comercial colorimétrico (BioAssay Systems, Estados Unidos)
Determinación de la actividad lipasa en plasma	“Kit” comercial colorimétrico (BioAssay Systems, Estados Unidos)
Determinación de adiponectina y factor de necrosis tumoral en plasma	“Kit” ELISA comercial (Invitrogen, Life Technologies, Estados Unidos)
Determinación de malonildialdehído en plasma	Ensayo modificado del ácido tiobarbitúrico (Rodríguez Martínez y Ruiz-Torres, 1992)
Capacidad antioxidante del plasma	Método fluorimétrico desarrollado por Ou et al., 2001, modificado por Dávalos et al., 2004
Determinación del glutation reducido en tejido hepático	Método fluorimétrico del monoclorobimane (Kamenic et al., 2000)
Determinación de glucosa en plasma	“Kit” comercial colorimétrico (Spinreact, S.A/S.A.U, España)
Determinación de insulina en plasma	“Kit” ELISA comercial (Mercodia AB, Suecia)
Medida de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina en plasma	Método fluorimétrico adaptado de Friedland y Silverstein, 1976
Estudios histológicos	Tinción general Hematoxilina-Eosina (EH) y tinción Van Giesson específica para hígado

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta Tesis Doctoral, se han obtenido hidrolizados enzimáticos derivados de proteínas de la clara de huevo que se han seleccionado en función de su utilidad potencial para la prevención y/o el tratamiento de determinadas patologías multifactoriales como el síndrome metabólico (SM) y hemos intentado demostrar que su consumo puede producir un claro beneficio a nivel metabólico y cardiovascular. A continuación, se muestran los resultados obtenidos y la discusión de los mismos. Para ello, hemos dividido esta sección en cinco apartados. En primer lugar, se expondrán los resultados obtenidos en los experimentos *in vitro* que sirvieron para seleccionar los hidrolizados de clara de huevo más prometedores. A continuación, se explicarán y discutirán los resultados obtenidos en el estudio *in vivo* realizado en ratas Zucker. Se comentarán, por este orden, los resultados relacionados con la obesidad y el metabolismo lipídico, después se presentarán los resultados obtenidos sobre distintos parámetros relacionados con el estrés oxidativo y la inflamación, se explicarán los resultados relativos al metabolismo de la glucosa y finalmente se abordarán los resultados y discusión de los efectos sobre el sistema cardiovascular.

4.1 OBTENCIÓN Y SELECCIÓN DE HIDROLIZADOS DE CLARA DE HUEVO. ESTUDIOS *IN VITRO*

La primera parte de esta investigación consistió en la obtención de hidrolizados de clara de huevo utilizando enzimas de grado alimentario de diferentes orígenes (bacteriano, vegetal, fúngico y digestivo) y especificidades, ampliamente usadas en la mejora de productos alimenticios. Las reacciones se llevaron a cabo en las condiciones óptimas de actuación de cada enzima, se recogieron alícuotas a distintos tiempos hasta las 48 horas, y el progreso de la hidrólisis se analizó mediante cromatografía de líquidos de alta eficacia en fase inversa (RP-HPLC). En cada uno de los hidrolizados se determinaron *in vitro* la actividad inhibidora de la

enzima convertidora de angiotensina (ECA), las actividades antioxidante e hipocolesterolémica y, en algunos casos, la actividad inhibidora de la enzima dipeptidil dipeptidasa IV (DPP IV). Todas estas determinaciones se realizaron con el objetivo de seleccionar aquellos hidrolizados que presentaran el mejor potencial para combatir de forma conjunta las complicaciones más frecuentes asociadas al SM, en concreto, la obesidad, las alteraciones en el metabolismo de la glucosa, la dislipemia y el aumento de presión arterial. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 10-17.

Tabla 10. Resultados obtenidos tras la determinación de las diferentes actividades *in vitro* en los hidrolizados producidos con Neutrase 0.8L a diferentes tiempos. ECA = Enzima convertidora de angiotensina. Los valores sombreados muestran las mayores actividades alcanzadas.

NEUTRASE 0.8L			
Tiempo de incubación (horas)	Actividad Inhibidora de la ECA (IC₅₀ µg/ml)	Actividad Antioxidante (µmol Trolox/ g proteína)	Actividad hipocolesterolémica (mmol unido/ mg proteína)
0	>1000	71.4	0.015
2	0.135	397.2	-0.015
4	0.085	488.1	-0.009
8	0.089	465.6	-0.016
12	0.102	503.0	-0.043
24	0.103	591.7	-0.034
36	0.112	632.8	-0.055
48	0.120	484.2	-0.057

Tabla 11. Resultados obtenidos tras la determinación de las diferentes actividades *in vitro* en los hidrolizados producidos con Alcalase 2.4LFG a diferentes tiempos. ECA = Enzima convertidora de angiotensina. Los valores sombreados muestran las mayores actividades alcanzadas.

ALCALASE 2.4LFG			
Tiempo de incubación (horas)	Actividad Inhibidora de la ECA (IC₅₀ µg/ml)	Actividad Antioxidante (µmol Trolox/ g proteína)	Actividad hipocolesterolémica (mmol unido/ mg proteína)
0	>1000	79.1	0.015
2	0.363	298.9	0.082
4	0.237	371.7	0.071
8	0.483	288.9	0.054
12	0.527	297.2	0.072
24	0.816	329.7	0.064
36	0.558	376.8	0.028
48	0.235	278.1	-0.043

Tabla 12. Resultados obtenidos tras la determinación de las diferentes actividades *in vitro* en los hidrolizados producidos con Promod 144P a diferentes tiempos. ECA = Enzima convertidora de angiotensina. Los valores sombreados muestran las mayores actividades alcanzadas.

PROMOD 144P			
Tiempo de incubación (horas)	Actividad Inhibidora de la ECA (IC₅₀ µg/ml)	Actividad Antioxidante (µmol Trolox/ g proteína)	Actividad hipocolesterolémica (mmol unido/ mg proteína)
0	>1000	114.0	0.002
2	0.245	390.2	-0.037
4	0.119	509.5	-0.038
8	0.202	453.3	-0.056
12	0.185	451.5	-0.040
24	0.079	489.1	-0.035
36	0.129	520.8	-0.016
48	0.106	515.7	-0.018

Tabla 13. Resultados obtenidos tras la determinación de las diferentes actividades *in vitro* en los hidrolizados producidos con Flavourzyme 1000L a diferentes tiempos. ECA = Enzima convertidora de angiotensina. Los valores sombreados muestran las mayores actividades alcanzadas.

FLAVOURZYME 1000L			
Tiempo de incubación (horas)	Actividad Inhibidora de la ECA (IC ₅₀ µg/ml)	Actividad Antioxidante (µmol Trolox/ g proteína)	Actividad hipocolesterolémica (mmol unido/ mg proteína)
0	>1000	62.4	-0.048
2	0.687	544.8	-0.042
4	0.651	660.1	0.000
8	0.666	691.9	0.000
12	0.473	714.9	0.008
24	0.215	873.7	0.008
36	0.147	928.7	-0.023
48	0.170	552.1	-0.069

Tabla 14. Resultados obtenidos tras la determinación de las diferentes actividades *in vitro* en los hidrolizados producidos con Peptidase 433P a diferentes tiempos. ECA = Enzima convertidora de angiotensina; DPP IV = Dipeptidil-dipeptidasa IV. Los valores sombreados muestran las mayores actividades alcanzadas.

PEPTIDASE 433P				
Tiempo de incubación (horas)	Actividad Inhibidora de la ECA (IC ₅₀ µg/ml)	Actividad Antioxidante (µmol Trolox/ g proteína)	Actividad hipocolesterolémica (mmol unido/ mg proteína)	Actividad inhibidora de la DPP IV (IC ₅₀ mg/ml)
0	>1000	79.4	0.012	>1000
2	0.909	292.3	0.071	136.18
4	0.725	516.3	0.169	16.46
8	0.676	418.9	0.092	20.67
12	0.507	491.7	0.180	20.94
24	0.151	1099.9	0.259	8.07
36	0.230	610.1	0.138	10.31
48	0.122	904.8	0.103	6.67

Tabla 15. Resultados obtenidos tras la determinación de las diferentes actividades *in vitro* en los hidrolizados producidos con Pancreatin 4XNF a diferentes tiempos. ECA = Enzima convertidora de angiotensina. Los valores sombreados muestran las mayores actividades alcanzadas.

PANCREATIN 4XNF			
Tiempo de incubación (horas)	Actividad Inhibidora de la ECA (IC₅₀ µg/ml)	Actividad Antioxidante (µmol Trolox/ g proteína)	Actividad hipocolesterolémica (mmol unido/ mg proteína)
0	>1000	67.4	0.013
2	12.430	102.1	0.030
4	5.100	131.9	0.043
8	9.202	100.4	0.043
12	2.434	253.6	0.093
24	3.121	258.6	0.027
36	2.534	159.9	-0.098
48	0.332	297.2	-0.075

Tabla 16. Resultados obtenidos tras la determinación de las diferentes actividades *in vitro* en los hidrolizados producidos con PTN 6.0 Saltfree a diferentes tiempos. ECA = Enzima convertidora de angiotensina. Los valores sombreados muestran las mayores actividades alcanzadas.

PTN 6.0 Saltfree			
Tiempo de incubación (horas)	Actividad Inhibidora de la ECA (IC₅₀ µg/ml)	Actividad Antioxidante (µmol Trolox/ g proteína)	Actividad hipocolesterolémica (mmol unido/ mg proteína)
0	>1000	62.7	0.052
2	2.574	97.8	0.037
4	1.927	180.6	0.055
8	2.948	99.3	0.180
12	3.553	111.1	-0.144
24	0.843	202.1	0.048
36	0.862	145.9	0.119
48	0.845	111.0	-0.030

Tabla 17. Resultados obtenidos tras la determinación de las diferentes actividades *in vitro* en los hidrolizados producidos con Bc Pepsin 1:3000 a diferentes tiempos. ECA = Enzima convertidora de angiotensina; DPP IV = Dipeptidil-dipeptidasa IV. Los valores sombreados muestran las mayores actividades alcanzadas.

BC PEPSIN 1:3000				
Tiempo de incubación (horas)	Actividad Inhibidora de la ECA (IC ₅₀ µg/ml)	Actividad Antioxidante (µmol Trolox/ g proteína)	Actividad hipocolesterolémica (mmol unido/ mg proteína)	Actividad inhibidora de la DPP IV (IC ₅₀ mg/ml)
0	>1000	75.7	0.028	>1000
2	0.082	316.1	0.055	14.27
4	0.051	624.0	0.016	5.03
8	0.047	574.2	0.154	7.18
12	0.072	370.8	0.034	6.66
24	0.044	574.1	0.077	4.56
36	0.053	418.5	-0.010	5.55
48	0.047	457.0	0.029	4.82

La búsqueda de actividad inhibidora de la ECA, que como parte del sistema renina-angiotensina, hidroliza la angiotensina I dando lugar al potente vasoconstrictor angiotensina II y que, además, hidroliza a la bradiquinina que tiene acción vasodilatadora, es la estrategia más comunmente empleada para la selección de hidrolizados y péptidos antihipertensivos derivados de proteínas alimentarias (Martínez-Maqueda et al., 2006). Como se observa en las Tablas 10-17, y de acuerdo con estudios previos (Miguel et al., 2004), la clara de huevo sin hidrolizar no mostró actividad inhibidora de la ECA. La inhibición de esta enzima se observó tras la hidrólisis de las proteínas de la clara de huevo con las diferentes enzimas. En todos los casos, la actividad aumentó con el grado de hidrólisis, debido a la liberación de péptidos activos, hasta llegar a una actividad óptima que, posteriormente, comenzó a disminuir debido a la degradación de éstos a fragmentos inactivos. El grado de hidrólisis que condujo a la máxima actividad dependió, además, de la enzima utilizada, puesto que la especificidad y actividad de

ésta condicionan la secuencia y concentración de los péptidos liberados (López-Fandiño et al., 2006).

Neutrase 0.8L y Alcalase 2.4LFG (Tablas 10 y 11), ambas endoproteasas de origen bacteriano con una variada especificidad de sustrato, degradaron rápidamente a las proteínas de la clara de huevo, dando lugar a un perfil cromatográfico que apenas varió tras 4 horas de hidrólisis (resultados no mostrados). La máxima actividad inhibidora de la ECA se obtuvo, en ambos casos, tras 4 horas de incubación, aunque fue aproximadamente 3 veces más efectiva la inhibición de la ECA con Neutrase 0.8L. Promod 144P, una enzima de origen vegetal que contiene 5 proteasas de diferente especificidad, hidrolizó las proteínas de partida en, aproximadamente, 12 horas y condujo, tras 24 horas, a una importante inhibición de la ECA (Tabla 12).

Las dos aminopeptidasas de origen fúngico, Flavourzyme 1000L y Peptidase 433P, exopeptidasas que liberan el aminoácido N-terminal de péptidos y proteínas, dieron lugar a una hidrólisis más lenta de las principales proteínas de la clara de huevo (que desaparecieron entre las 12 y 24 horas). La Figura 22, muestra los cromatogramas de los hidrolizados obtenidos con Peptidase 433P a diferentes tiempos. Flavourzyme 1000L y Peptidase 433P condujeron a similares actividades inhibidoras de la ECA, con un IC_{50} óptimo equivalente a, aproximadamente, 150 $\mu\text{g/ml}$, tras 36 y 24 horas de hidrólisis, respectivamente (Tablas 13 y 14).

Las enzimas digestivas, Pancreatin 4xNF y PTN 6.0, procedentes de páncreas porcino, proteolizaron muy lentamente las principales proteínas de la clara de huevo pues, en ambos casos, se detectó ovoalbúmina intacta tras 48 horas de hidrólisis (resultados no mostrados). Esto se debe a que el ovomucoide, que supone un 11% de la clara de huevo, es un potente inhibidor de la tripsina (Van der Planken et al., 2004). La actividad inhibidora de la ECA obtenida tras la hidrólisis con estas

enzimas fue baja en general, alcanzándose el máximo grado de inhibición hacia el final de la hidrólisis (Tablas 15 y 16).

La mayor actividad inhibidora de la ECA se obtuvo con BC Pepsin. Esta enzima procedía de estómago de cerdo. La hidrólisis de la clara de huevo con esta enzima digestiva condujo, tras 4-8 horas de hidrólisis, a un IC₅₀ equivalente a, aproximadamente, 50 µg/ml y se mantuvo a este nivel durante las 48 horas de incubación (Tabla 17). Los cromatogramas de los hidrolizados obtenidos con BC Pepsin (Figura 23) mostraron la presencia de ovoalbúmina intacta al menos durante 12 horas, lo que evidencia que no es necesario alcanzar elevados grados de hidrólisis para producir hidrolizados muy activos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente en nuestro laboratorio, que demostraron que la hidrólisis de la clara de huevo con pepsina, durante 3-8 horas, da lugar a hidrolizados muy activos, con valores de IC₅₀ comprendidos entre 40 y 50 µg/ml. En dichos hidrolizados se identificaron nuevas secuencias peptídicas con potente actividad inhibidora de la ECA (Tabla 18), tales como RADHPFL, YAEERYPIL e IVF (Miguel et al., 2004), y se detectó la presencia de FRADHPFL (ovokinina), un octapéptido que, de acuerdo con Fujita et al. (1995), posee acción vasodilatadora en arterias mesentéricas caninas. Se comprobó que el hidrolizado de clara de huevo con pepsina, y algunos de los péptidos activos que contiene, producen una disminución significativa de la presión arterial sistólica y diastólica en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) tras su administración aguda por vía oral. Así, una dosis de 200 mg/kg de hidrolizado condujo a una reducción de la presión arterial sistólica (PAS) en estos animales de, aproximadamente, 40 mm Hg 6 horas después de su administración (Miguel et al., 2005). Se demostró, además, que el hidrolizado es capaz de atenuar el desarrollo de hipertensión arterial (HTA) cuando se administra de forma continuada a las ratas SHR (500 mg/kg/día) desde el destete hasta las 20 semanas de vida (Miguel et al., 2006). Posteriormente, se observó que los péptidos RADHPFL, YAEERYPIL e IVF inducen vasodilatación en aorta de rata (Miguel et al., 2007a). Otras secuencias incluidas en el hidrolizado, como

YRGGLEPINF y ESIINF también poseen actividad vasorelajante y, en este caso, esta actividad sería, al menos en parte, responsable de su actividad antihipertensiva en SHR, ya que no son inhibidores de la ECA (Miguel et al., 2007b) (Tabla 18). Por otra parte, algunos de los péptidos presentes en el hidrolizado, como FRADHPFL, RADHPFL, YRGGLEPINF y RDILNQ ejercen, además, efecto relajante vascular en arterias de resistencia (Tabla 18) (Miguel et al., 2010). Tal y como se muestra en la Tabla 18, el análisis mediante espectrometría de masas (RP-HPLC-MS/MS) pudo confirmar la presencia, en el hidrolizado de clara de huevo con BC Pepsin durante 8 horas, de todas las secuencias activas previamente descritas, lo que garantizaría su efecto antihipertensivo.

El uso de antioxidantes dietéticos se reconoce por su potencial efectividad para mejorar los mecanismos y las defensas antioxidantes del organismo, contribuyendo de esta forma a promover un buen estado de salud. Además de antioxidantes reconocidos como el α -tocoferol, la vitamina C o fitoquímicos como luteína, licopeno, isoflavonas etc., los péptidos de origen alimentario están recibiendo especial atención, y aunque hay todavía muy pocos estudios *in vivo*, los estudios *in vitro* señalan que podrían ser efectivos en el control de procesos oxidativos a través de distintos mecanismos. Un aspecto a tener en cuenta es que, dada la complejidad de los procesos oxidativos que ocurren en los alimentos y en los sistemas biológicos, no es fácil que un único método permita caracterizar todo el potencial antioxidante de un compuesto (Antolovich et al., 2002). Considerando esa limitación, el método ORAC, que determina la actividad neutralizadora de radicales libres, se utiliza extensamente en los estudios *in vitro* de actividad antioxidante. En 2011, Samaranayaka y Li-Chan hicieron una revisión de los sustratos, enzimas proteolíticas y condiciones de digestión que han dado lugar a hidrolizados de proteínas alimentarias con actividad antioxidante y resaltaron, como se indicó anteriormente, la importancia de la especificidad de las proteasas y el grado de hidrólisis en las propiedades estructurales de los péptidos resultantes (tamaño,

hidrofobicidad y composición en aminoácidos) y, por lo tanto, también en su actividad antioxidante, tal y como se muestra en las Tablas 10-17.

Las proteínas de la clara de huevo mostraron una modesta actividad antioxidante que aumentó con la hidrólisis en todos los casos hasta llegar a un valor óptimo a partir del cual comenzó a disminuir (como en el caso de Neutrase 0.8 L – Tabla 10- y Flavourzyme 1000L –Tabla 13-), o sufrió oscilaciones (como en el caso de BC Pepsin –Tabla 17-) que posiblemente reflejan las formaciones y degradaciones sucesivas de las secuencias con capacidad neutralizadora de radicales peroxilo. De hecho, la mayoría de los péptidos antioxidantes presentan masas moleculares entre 500 y 1800 Da y contienen en sus secuencias aminoácidos azufrados (Cys y Met), aromáticos (Trp, Tyr and Phe), e His. Las actividades antioxidantes de las secuencias peptídicas son mucho mayores que las correspondientes a dichos aminoácidos, pues la mayor estabilidad de los radicales peptídicos evita la propagación e iniciación de las reacciones oxidativas (Elias et al., 2008).

Las actividades antioxidantes más elevadas correspondieron a los hidrolizados obtenidos con las aminopeptidasas Flavourzyme 1000L y Peptidase 433P a partir de las 24 horas de incubación, coincidiendo con la aparición de la máxima actividad inhibidora de la ECA (Tablas 13 y 14). Esta actividad, equivalente a 900-1100 μmol de Trolox/g de proteína, es muy elevada y comparable a la de otros hidrolizados protéicos (cita estudio antiox) y a otros compuestos antioxidantes muy potentes descritos en la bibliografía. Así, a modo de ejemplo, es importante señalar que el polvo de cacao posee un valor de 826 μmol de Trolox/g y que un cacao rico en polifenoles (CocoanOX de Natracéutical Group que contiene una cantidad media de polifenoles, y un contenido de epicatequina y catequina, mucho mayor que un cacao estándar) presenta valores de 2861 μmol de Trolox/g, estando ambos resultados obtenidos con el mismo método utilizado en nuestro estudio (Quiñones et al., 2010).

Neutrased 0.8L y BC Pepsin (Tablas 10 y 17) también dieron lugar a una importante actividad neutralizadora de radicales peroxilo, que llegó a alcanzar aproximadamente los 600 μmol de Trolox/g de proteína. La actividad antioxidante más baja correspondió a las enzimas pancreáticas, lo que reflejaría una proteólisis poco efectiva, como ya se ha comentado. En la práctica, alcalasa, Flavourzyme y pepsina se han empleado frecuentemente en la producción de péptidos antioxidantes pero, dependiendo del sustrato, tripsina y quimotripsina también han proporcionado buenos resultados (Samaranayaka y Li-Chan, 2011). Anteriormente ya se había demostrado la actividad neutralizadora de radicales libres de un hidrolizado de clara de huevo con pepsina y algunos de sus péptidos, como YAEERYPIL, SALAM y YQIGL (Tabla 18) (Dávalos et al., 2004). Las secuencias YAEERYPIL, SALAM y YQIGL se detectaron también mediante RP-HPLC-MS/MS en el hidrolizado de clara de huevo con BC Pepsin tras 8 horas de incubación con la enzima, tal y como se indica en la Tabla 18, lo que avalaría y confirmaría su efecto antioxidante. Aunque, salvo en el caso de YAEERYPIL, no se encontró correlación entre la actividad inhibidora de la ECA y la actividad antioxidante en los péptidos individuales (Dávalos et al., 2004), la combinación de ambas actividades en el hidrolizado lo hacen muy interesante para utilizarlo en el control de las afecciones cardiovasculares. De hecho, se demostró que la administración continuada del hidrolizado de clara de huevo con pepsina a SHR (500 mg/kg/día durante 20 semanas) aumenta la capacidad neutralizadora de radicales libres del plasma, inhibe la peroxidación lipídica en la aorta y ejerce efectos beneficiosos en el perfil lipídico, bajando los niveles de triglicéridos y colesterol total en el plasma sin modificar los niveles de colesterol-HDL (Manso et al., 2008).

Algunos hidrolizados de proteínas vegetales y animales han mostrado propiedades hipolipidémicas *in vitro*, en cultivos celulares y en modelos animales. Esta actividad se ha relacionado con su capacidad de: unirse a los ácidos biliares, romper las micelas de colesterol en el tracto gastrointestinal o alterar la actividad de enzimas clave en el hígado y los adipocitos (Howard y Udenigwe, 2013). El

bloqueo los ácidos biliares en el lumen intestinal interrumpe su circulación enterohepática, puesto que se forman complejos insolubles que se excretan, y esto causa una disminución del colesterol endógeno al estimular su catabolismo. La capacidad de los hidrolizados protéicos de unirse a los ácidos biliares parece depender de la hidrofobicidad de los péptidos que los constituyen. Así, se establecerían interacciones entre los aminoácidos hidrofóbicos (Leu, Tyr y Trp) y catiónicos (Lys) de los péptidos con el esqueleto hidrofóbico y el grupo carboxílico de los ácidos biliares, respectivamente (Porez et al., 2012).

La hidrólisis de la clara de huevo con BC Pepsin durante 8 horas mejoró su capacidad de unión a los ácidos glicocólico, glicochenodeoxicólico, glicodeoxicólico, taurocólico, taurochenodeoxicólico y taurodeoxicólico *in vitro*, alcanzando valores de 0.154 mmol/mg de proteína (Tabla 17). Este hecho podría ser responsable de los efectos hipocolesterolémicos detectados *in vivo* en un hidrolizado similar (Manso et al., 2008). Sin embargo, hay que tener en cuenta la heterogeneidad de péptidos que se encuentran en hidrolizados complejos como éste, que podrían actuar a través de diferentes mecanismos de acción hipolipemiente y no solamente a través de la unión a ácidos biliares, al igual que ocurriría con la actividad antioxidante. La actividad hipocolesterolémica más elevada se encontró en el hidrolizado con Peptidase 433P durante 48 horas (Tabla 14). También se detectó actividad hipocolesterolémica en los hidrolizados con proteasas pancreáticas (Tablas 15 y 16) y en los hidrolizados obtenidos con Alcalase 2.4LFG (Tabla 11), pero no así en los de Neutrase 0.8 L, Promod 144P y Flavourzyme 1000L (Tablas 10, 12 y 13).

A la vista de los resultados obtenidos, se seleccionaron para el estudio *in vivo* los hidrolizados producidos con BC Pepsin durante 8 horas y con Peptidase 433P durante 24 horas, pues en ellos concurría más de una actividad biológica relevante que se relaciona con alguna de las patologías que caracterizan al SM. En el primer caso, la elección del hidrolizado con BC Pepsin durante 8 horas, se justificó por su elevada actividad inhibidora de la ECA e importantes actividades antioxidante e

hipocolesterolémica (Tabla 17). Además, y como ya se ha discutido, un hidrolizado semejante (obtenido tras 3 horas de incubación con pepsina) ya había demostrado actividad antihipertensiva, antioxidante e hipocolesterolémica en SHR (Miguel et al., 2005; Miguel et al., 2006; Manso et al., 2008). La actividad biológica de este hidrolizado podría deberse, al menos en parte, a la presencia de determinados péptidos bioactivos que también se hallaban en el hidrolizado con BC Pepsin durante 8 horas (Tabla 18). En el segundo caso, el hidrolizado con Peptidase 433P durante 24 horas, destaca por sus actividades antioxidante e hipocolésterolémica (Tabla 14) que, como ya se ha mencionado, podrían deberse a la presencia de aminoácidos hidrofóbicos. El análisis de este hidrolizado mediante RP-HPLC-MS/MS mostró, a pesar de la presencia de sólo algunos picos mayoritarios que absorbían a 214 nm, un perfil muy complejo con muchos iones, que solamente permitió la identificación inequívoca de las secuencias: LPDEVSG, procedente de la ovoalbúmina, y DDNKVED, GVDTKSD, IESGSVEQA y GGLVYT, procedentes de la ovotransferrina. No se detectó la presencia de ninguno de los péptidos activos que se indican en la Tabla 18.

En los hidrolizados seleccionados se determinó, además, la actividad inhibidora de la enzima DDP IV. Esta enzima es responsable de la degradación e inactivación de incretinas, entre las que se encuentran el péptido 1 similar al glucagón (GLP-1) y el polipéptido insulínico dependiente de glucosa (GIP) que, en respuesta a la ingestión de alimentos, actúan estimulando la secreción de insulina dependiente de glucosa por las células β -pancreáticas (Drucker, 2006). Estudios muy recientes han puesto de manifiesto el efecto inhibidor de ciertos hidrolizados de proteínas alimentarias sobre esta enzima. La clara de huevo no poseía actividad inhibidora de la enzima DDP IV, pero ésta aumentó con la hidrólisis, proporcionando valores de IC_{50} de 8.07 mg/ml, en el caso del hidrolizado con Peptidase 433P durante 24 horas (Tabla 14), y de 7.18 mg/ml en el hidrolizado con BC Pepsin durante 8 horas (Tabla 17). Si bien, estos valores de IC_{50} no son los más bajos que podrían obtenerse con ambas enzimas, se comparan muy favorablemente con los de hidrolizados muy

activos descritos en la bibliografía, producidos a partir de hidrolizados de proteínas de suero lácteo con tripsina (1.51 mg proteína/ml; Silveira et al., 2013), pepsina (0.075 mg/ml; Lacroix y Li-Chan, 2012) y una mezcla de proteinasas (\approx 1.5 mg/ml; Tulipano et al., 2011; Nongonierma y FitzGerald, 2013a; Nongonierma y FitzGerald, 2013b) o caseína hidrolizada con diferentes enzimas (entre 0.4 y 5 mg/ml; Pieter, 2006), lo que respalda la selección de ambos hidrolizados para el ensayo *in vivo*.

Finalmente, y con objeto de profundizar en su caracterización, las actividades inhibidora de la ECA, antioxidante, e inhibidora de la enzima DPP IV se estimaron también separadamente en las fracciones mayor y menor de 3000 Da de los hidrolizados seleccionados, mostrando, como era de esperar, que las tres actividades se concentran en los péptidos de menor tamaño (Tabla 19). Esto es particularmente llamativo en el hidrolizado obtenido con aminopeptidasa, puesto que la fracción menor de 3000 Da presentó, respectivamente, 20, 7 y 10 veces más actividad inhibidora de la ECA, antioxidante e inhibidora de la enzima DPP IV que la fracción mayor de 3000 Da. Esto pone de manifiesto que la ultrafiltración de los hidrolizados permitiría obtener fracciones enriquecidas en péptidos multifuncionales con potente actividad.

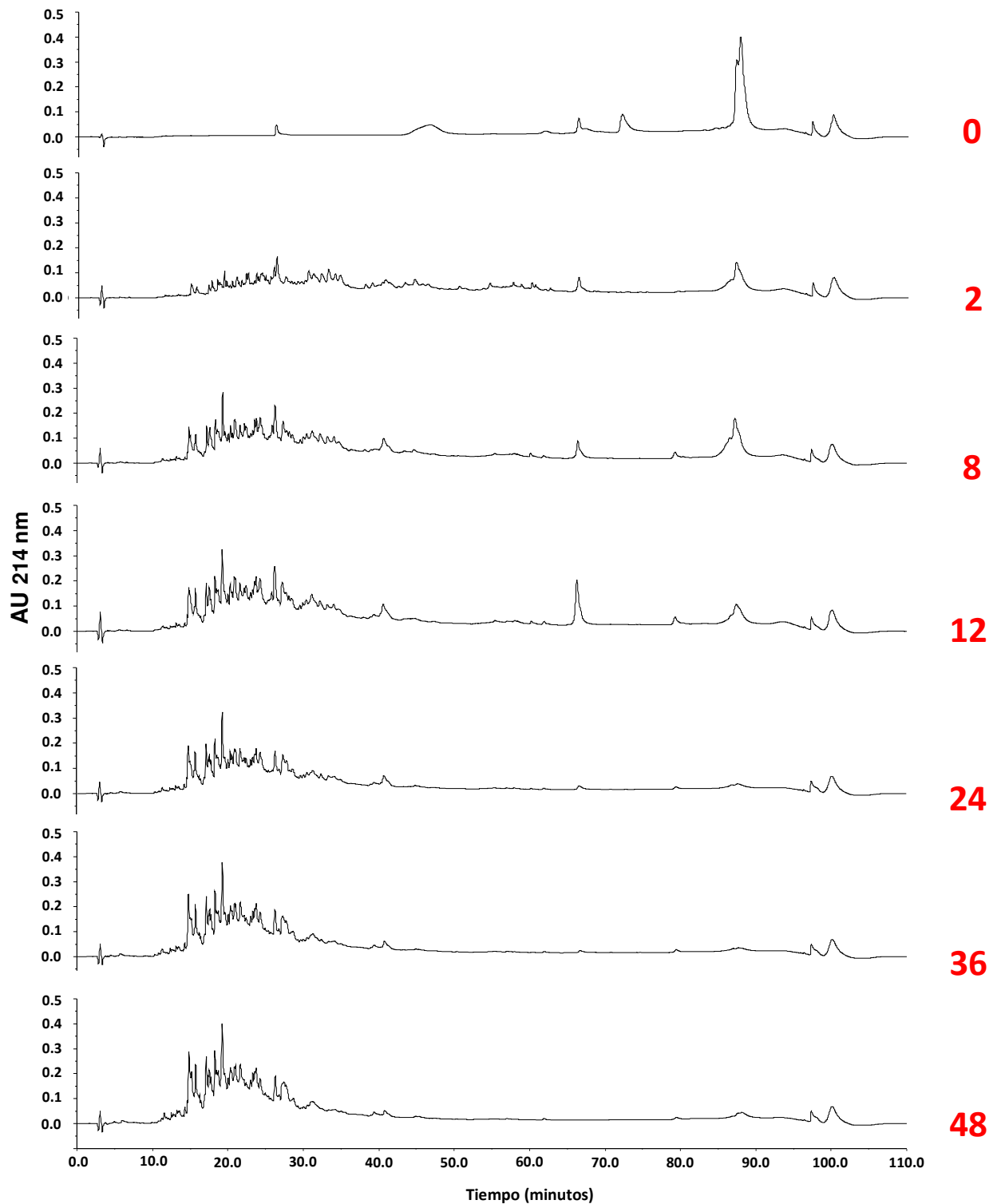


Figura 24. Hidrolizados de clara de huevo con BC pepsin (pepsina). Evolución del proceso de hidrólisis a pH 2.0 y 37 °C durante 48 horas.

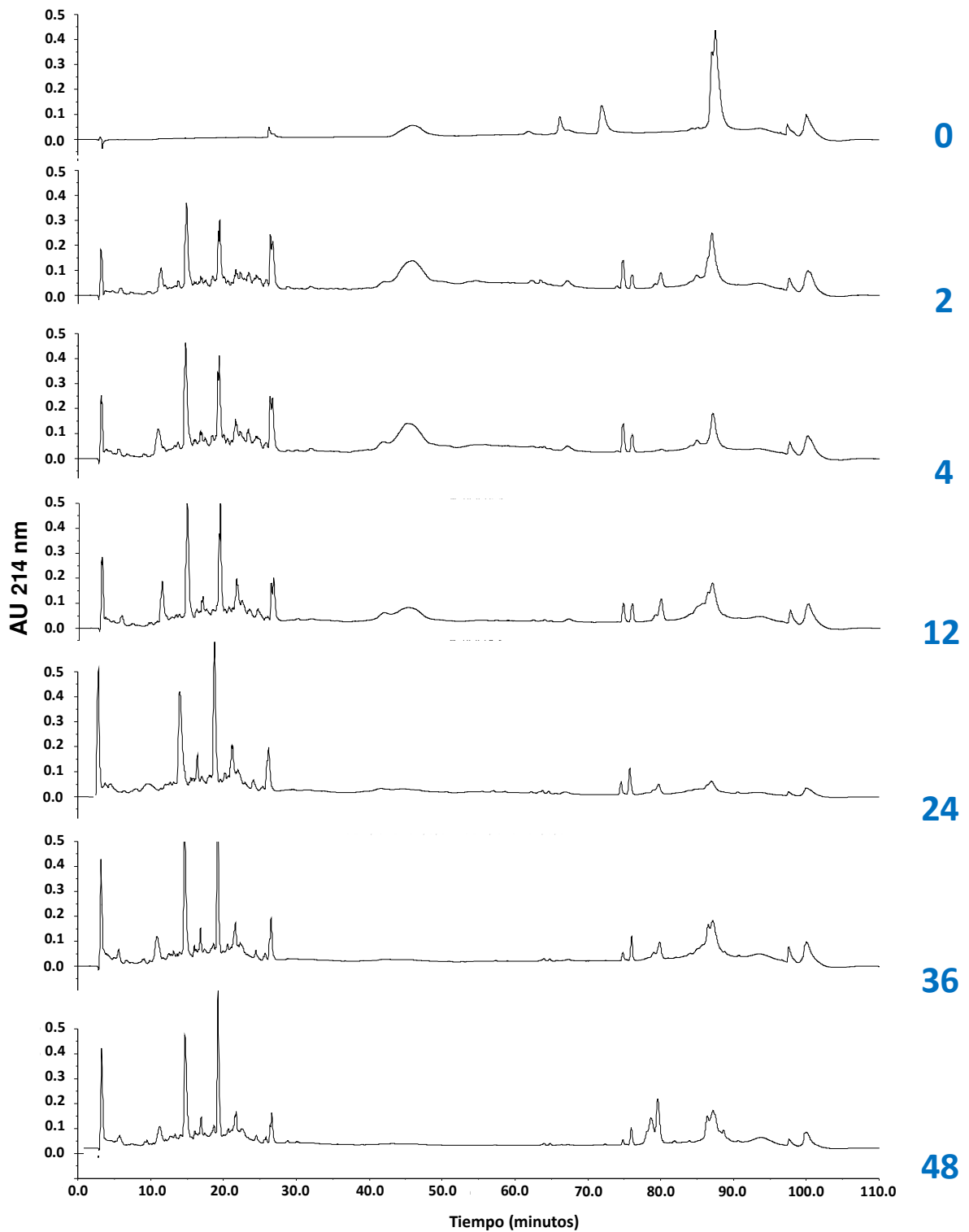


Figura 25. Hidrolizados de clara de huevo con Peptidase 433P (aminopeptidasa). Evolución del proceso de hidrólisis a pH 7.0 y 50 °C durante 48 horas.

Tabla 18. Secuencias identificadas por Miguel et al. (2004) en un hidrolizado de clara de huevo con pepsina durante 3 horas y su actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), antioxidante, vasodilatadora y/o antihipertensiva. La última columna señala su presencia en el hidrolizado obtenido con BC Pepsin durante 8 horas. SHR = Ratas espontáneamente hipertensas.

Péptido	Actividad inhibidora de la ECA (μM)	Actividad antioxidante (μmol Trolox)	Actividad vasodilatadora (%) Arterias de conductancia	Actividad vasodilatadora (%) Arterias de resistencia	Actividad antihipertensiva en SHR (mm Hg)	Referencias	Presencia en BC PEPSIN 8 Horas
FRADHPFL	3.2	0.13	49.5 / 68	46.3	-25.0	<i>Fujita et al., 1995; Dávalos et al., 2004</i>	SI
RADHPFL	6.2	0.13	40.5	42.6	-34.0	<i>Miguel et al., 2004; Dávalos et al., 2004</i>	SI
YAERYPIL	4.7	3.81	31.5	19.1	-31.6 (2 mg/ml)	<i>Miguel et al., 2004; Dávalos et al., 2004</i>	SI
YRGGLEPINF	>1000	1.18	44.1	72.4	-30.6 (10 mg/ml)	<i>Miguel et al., 2004;2007; Dávalos et al., 2004</i>	SI
ESIINF	>1000	<0.022	42.5	17.4	-30.03 (10 mg/ml)	<i>Miguel et al., 2004; 2007; Dávalos et al., 2004</i>	SI
RDILNQ	435.7	<0.022	49.3	66.2	-15.7 (10 mg/ml)	<i>Miguel et al., 2004; 2007; Dávalos et al., 2004</i>	SI
IVF	33.9	<0.022	28.7	n.d.	-31.7	<i>Miguel et al., 2004; 2007; Dávalos et al., 2004</i>	SI
YQIGL	173.8	1.72	<10	<10	n.d.	<i>Miguel et al., 2004; 2007; Dávalos et al., 2004</i>	SI
SALAM	229.1	2.66	12.2	<10	n.d.	<i>Miguel et al., 2004; 2007; Dávalos et al., 2004</i>	SI
FSL	172.9	<0.022	<10	<10	n.d.	<i>Miguel et al., 2004; 2007; Dávalos et al., 2004</i>	SI

Tabla 19. Resultados obtenidos tras la determinación de las diferentes actividades *in vitro* en los hidrolizados seleccionados y en sus fracciones menores y mayores de 3000 Da. ECA = Enzima convertidora de angiotensina; DPP IV = Dipeptidil-dipeptidasa IV.

Hidrolizados seleccionados y fracciones	Actividad Inhibidora de la ECA (IC ₅₀ µg/ml)	Actividad Antioxidante (µmol Trolox/g proteína)	Actividad hipocolesterolemica (mmol unido/ mg proteína)	Actividad inhibidora de la DPP IV (IC ₅₀ mg/ml)
PEPSINA 8 h	0.047	574.2	0.154	7.18
Fracción < 3000 Da	0.019	939.5	--	3.32
Fracción > 3000 Da	0.051	249.6	--	10.76
AMINOPEPTIDASA 24 h	0.151	1099.9	0.259	8.07
Fracción < 3000 Da	0.038	1932.3	--	3.96
Fracción > 3000 Da	0.754	268.2	--	42.65

4.2 EFECTOS DEL CONSUMO DE HIDROLIZADOS DE PROTEÍNAS DE CLARA DE HUEVO SOBRE LA OBESIDAD Y EL METABOLISMO LIPÍDICO EN RATAS ZUCKER OBESAS

Para los estudios *in vivo* realizados en esta Tesis Doctoral, hemos utilizado ratas Zucker obesas. Estos animales, como ya se explicó en el apartado de Introducción, son homocigotos para el alelo *fatty (fa)* y constituyen un modelo de obesidad que presenta muchas de las anomalías que caracterizan al SM. Las ratas Zucker delgadas no presentan este genotipo y carecen de las anomalías que sufren los animales obesos. En este estudio, se incluyó también un grupo de ratas Zucker delgadas, que se alimentaron con dieta estándar y agua, que se utilizaron como referente de normalidad en esta raza.

Ya se ha explicado que no todos los pacientes que sufren SM presentan idénticas anomalías. De hecho, para su diagnóstico se requiere que confluyan varios factores de riesgo, que pueden ser distintos según se utilice una u otra definición de las presentadas en el apartado de Introducción. No existe, por ello, un único modelo animal que permita evaluar productos útiles en el SM. Las ratas Zucker obesas pueden considerarse uno de los modelos experimentales más idóneos para simular este síndrome ya que desarrollan algunas de las patologías más frecuentes asociadas al SM como obesidad, IR y dislipemia. En la actualidad, también se están utilizando modelos experimentales de obesidad inducidos por dieta para intentar reproducir el SM que son preferidos por algunos investigadores (Sampey et al., 2011), aunque por el momento no se han establecido ni unificado los parámetros que permitan obtener un único modelo experimental reproducible de SM. Por su parte, las ratas Zucker delgadas no padecen obesidad, ni resistencia a la insulina y presentan perfiles lipídicos normales, por lo que pueden considerarse como controles sanos para el estudio del SM (Arias-Díaz et al., 2007).

En este estudio se administraron 750 mg/kg/día de cada uno de los hidrolizados seleccionados a los animales. Cada uno de los grupos de ratas Zucker obesas tratados con hidrolizado de clara de huevo recibieron el producto diluido en el agua de bebida. Esta solución se ajustaba semanalmente para que los animales recibiesen esta dosis diaria de cada uno de los hidrolizados seleccionados. Para calcular la dosis utilizada tuvimos en cuenta principalmente un estudio llevado a cabo por nuestro grupo de investigación en el que se evalúa el efecto antihipertensivo de un hidrolizado de proteínas de clara de huevo con pepsina, similar al seleccionado en esta Tesis Doctoral, tras su administración crónica en un modelo experimental de hipertensión (Miguel et al., 2006). La dosis utilizada en nuestro estudio es, además, similar a la utilizada por otros investigadores que evalúan también el efecto antihipertensivo de péptidos derivados de proteínas alimentarias (Wu y Ding, 2001; Otani et al., 2009; Wang et al., 2012), y también se administraron dosis parecidas en otros estudios en los que se evalúa el efecto de hidrolizados proteicos sobre otros modelos de SM (Kim et al., 2004; Wang et al., 2012; Morato et al., 2013).

Inicialmente se presentarán y discutirán los resultados correspondientes a los registros de las ingestas sólida y líquida. Posteriormente se expondrán y razonarán los resultados referidos a los registros semanales de peso corporal y del peso de los órganos de los animales obtenidos al finalizar el estudio.

En los últimos años se ha descrito que la ingesta de proteínas de huevo produce un efecto saciante mayor y consecuentemente una ingesta calórica menor que las proteínas de otros alimentos como la leche y la soja (Vander Wal et al. 2005; Ratliff et al., 2010) y, por lo tanto, el consumo de proteínas de huevo podría considerarse más efectivo para controlar la saciedad. Por ello, en este estudio llevamos a cabo un registro semanal de la ingesta sólida y de la ingesta líquida de los animales.

La hiperfagia es una característica que define este modelo animal, debido a que la mutación recesiva en el alelo *fa* afecta al receptor Ob-R para la leptina, lo que se traduce en una disminución en el número de receptores expresados en la superficie celular y, en última instancia, en una marcada resistencia a la acción de la leptina (Phillips et al., 1996; Aleixandre y Miguel, 2009). Recientemente se ha descrito además que las ratas Zucker obesas presentan 3 veces más actividad de la enzima DPP IV que sus controles delgados (Aroor et al., 2013), lo que podría relacionarse también con una disminución de la saciedad en estos animales. La hiperfagia pudo apreciarse en estos animales durante las primeras siete semanas del estudio, cuando se observó que el promedio de la ingesta sólida diaria fue significativamente superior en las ratas Zucker obesas que en las ratas delgadas (Figura 24). A partir de la semana 14-15 de vida, la ingesta sólida fue similar en los grupos de ratas Zucker obesas y delgadas. Esto podría ser debido a que la hiperfagia en estos animales se manifiesta principalmente durante el periodo de crecimiento que se da en las primeras 16 semanas de vida (Vaselli et al., 1980). Además, el grado de obesidad tan acusado de las ratas a esta edad, les dificulta la movilidad y el acceso a la comida, por lo que la ingesta disminuye.

Entre los diferentes grupos de ratas Zucker obesas no se observaron diferencias en la ingesta sólida, a pesar del poder saciante que han demostrado poseer las proteínas, y especialmente las proteínas de huevo (Vander Wal et al. 2005; Ratliff et al., 2010; Anderson et al., 2011; Geraedts et al., 2011), así como los hidrolizados derivados de ellas (Bong et al., 2010; Bougatef et al., 2010; Nieuwenhuizen et al., 2010; Haeberer et al., 2011; Chen et al., 2012; Cudennec y Ravallec, 2013; Park et al., 2013). Esto podría explicarse por la acusada hiperfagia que desarrolla este modelo animal pero, sin embargo, en otros estudios sí que se ha observado una disminución de la ingesta cuando se administraban a las ratas Zucker obesas diferentes productos ricos en fibra alimentaria, otro componente de los alimentos con reconocido poder saciante (Sánchez, 2008). El mecanismo saciante de las proteínas se ha relacionado principalmente con la liberación de distintas

hormonas supresoras del apetito como la colecistoquinina (CCK) o el GLP-1 (Chen et al., 2012; Cudennec y Ravallec, 2013). Sin embargo, no siempre se ha podido demostrar este efecto tras el consumo de hidrolizados de proteínas (Park et al., 2008; Vaughn et al., 2008) o de fibra alimentaria (Sánchez et al., 2008,) a pesar de observarse, en algunos casos, disminuciones del peso corporal. El efecto saciante se relacionó en estos casos con un aumento del metabolismo energético en los animales.

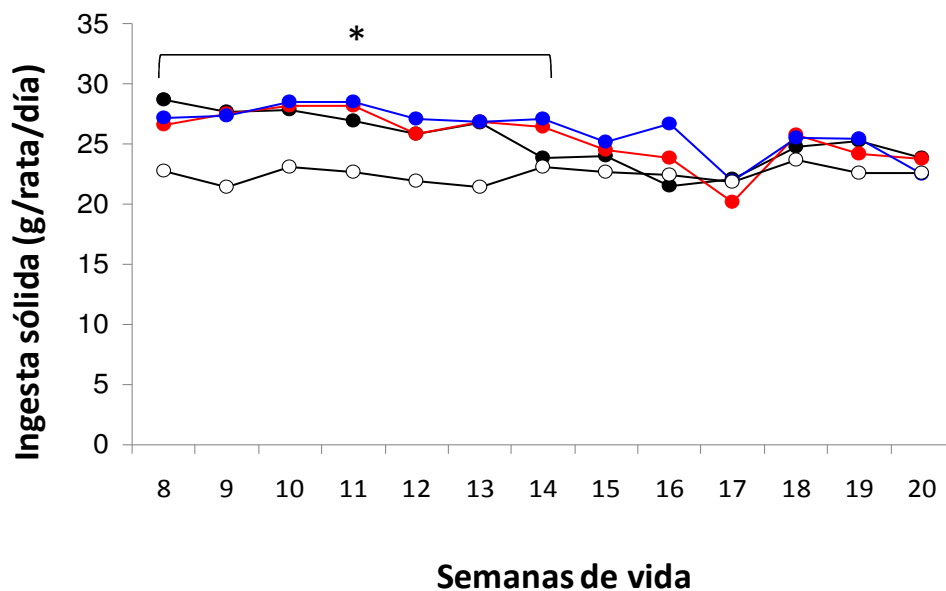


Figura 24. Seguimiento a lo largo del estudio de la ingesta sólida de los animales. A las ratas se les administraron diferentes productos en el agua de bebida desde la semana 8 hasta la semana 20 de vida. Grupos experimentales: (○) Ratas Zucker delgadas que bebieron agua, (●) ratas Zucker obesas que bebieron agua, (●) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de clara de huevo hidrolizada con pepsina, (●) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de clara de huevo hidrolizada con aminopeptidasa. Los datos representan los valores medios \pm EEM para un mínimo de 9 animales. Se utilizó un análisis de varianza de dos vías, seguido del test de Bonferroni, para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de $P < 0.05$. * $P < 0.05$ ratas Zucker delgadas vs ratas Zucker obesas que bebieron agua, desde la semana 8 hasta la semana 14 de vida.

Con respecto a la ingesta líquida, no se observaron diferencias entre las ratas Zucker delgadas y las ratas Zucker obesas que ingirieron agua. La ingesta líquida fue, sin embargo, significativamente mayor en los grupos de ratas Zucker obesas que recibieron los hidrolizados que en las ratas obesas que bebieron agua (Figura 25A). Podemos afirmar que los ovoproductos administrados resultan agradables de ingerir sin tener que añadir ningún compuesto que enmascare su sabor para su consumo. En su estado natural las proteínas no contribuyen químicamente a la formación de sabor en los alimentos, pero los productos procedentes de la hidrólisis de proteínas, es decir, los péptidos y los aminoácidos, tienen con frecuencia sabor amargo (Raksakulthai y Haard, 2003; Temussi, 2012) y pueden, además, reaccionar con otros ingredientes del alimento como azúcares y grasas creando sabores específicos. Sin embargo, en nuestro estudio no parece que este fenómeno afecte al consumo de los hidrolizados que fue, además, especialmente alto en las ratas que bebían el hidrolizado de clara de huevo con pepsina, probablemente por el sabor salado de este producto por la formación de NaCl debido al empleo de HCl y NaOH en su elaboración.

Para comprobar si este aumento significativo en la ingesta líquida producía alguna modificación en la diuresis de los animales, determinamos el volumen de orina de las ratas mediante la utilización de jaulas metabólicas. El volumen de orina registrado fue significativamente mayor en las ratas obesas respecto a las delgadas (Figura 25B), esto puede justificarse porque los animales obesos de esta raza desarrollan nefropatía diabética (Richards et al., 2001), y este aumento en la diuresis respecto a los animales delgados puede considerarse un signo precoz en el desarrollo de esta patología. Como cabía esperar, el aumento de ingesta líquida observado en las ratas obesas que consumieron los hidrolizados, produjo un volumen de orina superior al excretado por las ratas obesas que bebieron agua, aunque no llegaron a alcanzarse diferencias significativas.

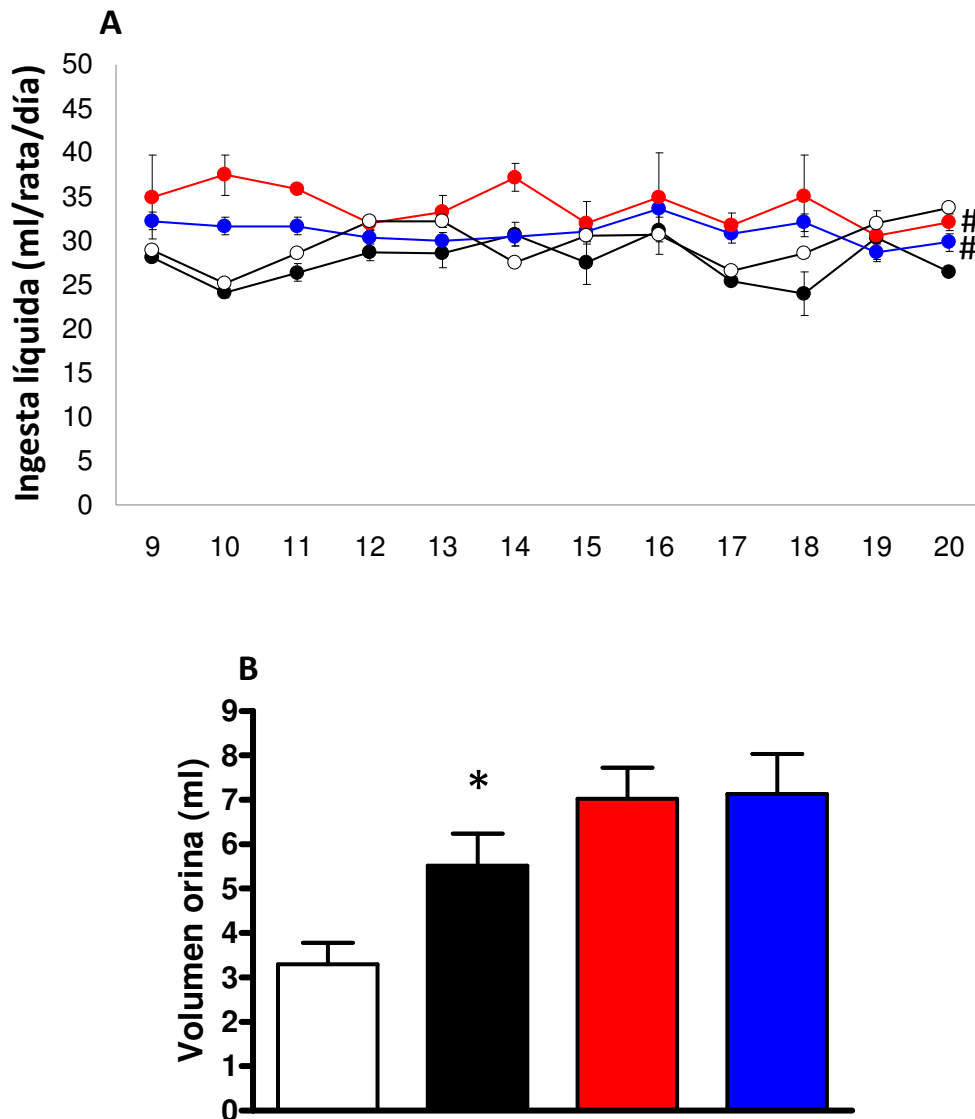


Figura 25. Seguimiento a lo largo del estudio de la ingesta líquida de los animales (A). Volumen de orina recogido en las jaulas metabólicas de las ratas al finalizar el estudio (B). A las ratas se les administraron diferentes productos en el agua de bebida desde la semana 8 hasta la semana 20 de vida. Grupos experimentales: (○) Ratas Zucker delgadas que bebieron agua, (●) ratas Zucker obesas que bebieron agua, (●) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de clara de huevo hidrolizada con pepsina, (●) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de de clara de huevo hidrolizada con aminopeptidasa. Los datos representan los valores medios \pm EEM para un mínimo de 9 animales. Se utilizó un análisis de varianza de dos vías, seguido del test de Bonferroni, para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de $P < 0.05$. * $P < 0.05$ ratas Zucker delgadas vs ratas Zucker obesa que bebieron agua.

La obesidad es una de las principales patologías asociadas al SM. La Figura 26, muestra la evolución a lo largo del estudio del peso corporal de los animales. La ganancia de peso corporal en las ratas Zucker delgadas fue significativamente menor que la ganancia de peso corporal en las ratas Zucker obesas que bebieron agua, resultados esperables en este modelo animal (Zucker, 1962), y que coinciden con los obtenidos previamente por otros grupos de investigación (Galisteo et al., 2005; Sánchez et al., 2011). Aunque se observó una menor ganancia de peso corporal durante las primeras semanas del estudio en los animales obesos que recibieron los hidrolizados de clara de huevo, lo cierto es que la administración continuada del producto durante 12 semanas no produjo cambios significativos en el peso de estos animales cuando se compararon con los pesos de las ratas Zucker obesas a las que se les administró únicamente agua como bebida. Posiblemente este efecto inicial sobre el peso corporal se haya enmascarado debido a la fuerte predisposición genética de este modelo experimental para desarrollar obesidad. Debe tenerse en cuenta que las ratas Zucker obesas desarrollan obesidad entre la tercera y la quinta semana de vida y cuando tienen catorce semanas de vida aproximadamente el 40% de su peso corporal es grasa (Zucker, 1962). Nosotros comenzamos el estudio cuando las ratas Zucker tenían 8 semanas de vida y el estudio finalizó cuando estos animales tenían 20 semanas de vida, es decir, nuestro estudio se prolongó hasta un momento en el que las ratas presentaban un porcentaje muy elevado de grasa corporal y un sobrepeso muy acusado (Figura 26).

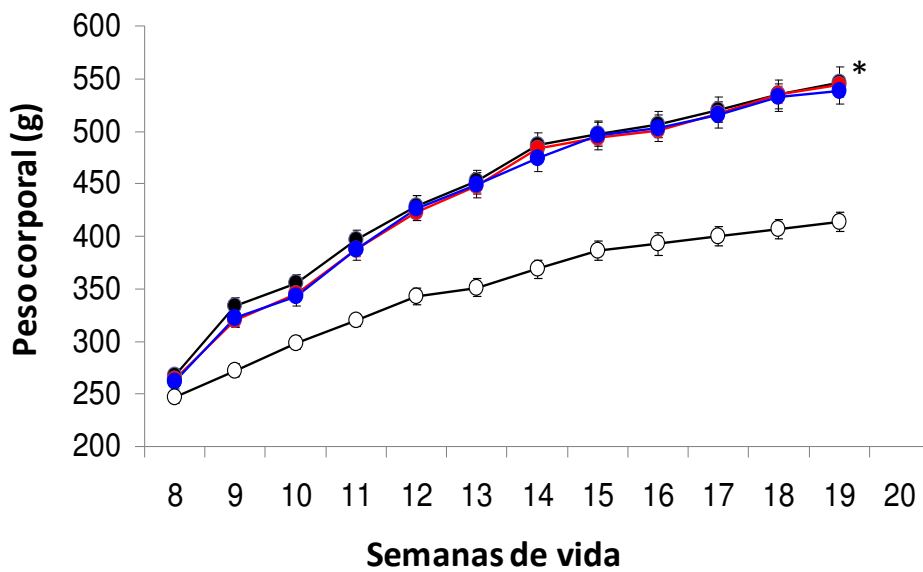


Figura 26. Evolución a lo largo del estudio del peso corporal de los animales. A las ratas se les administraron diferentes productos en el agua de bebida desde la semana 8 hasta la semana 20 de vida. Grupos experimentales: (○) Ratas Zucker delgadas que bebieron agua, (●) ratas Zucker obesas que bebieron agua, (●) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de clara de huevo hidrolizada con pepsina, (●) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de clara de huevo hidrolizada con aminopeptidasa. Los datos representan los valores medios \pm EEM para un mínimo de 9 animales. Se utilizó un análisis de varianza de dos vías, seguido del test de Bonferroni, para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de $P < 0.05$. * $P < 0.05$ ratas Zucker delgadas vs ratas Zucker obesas que bebieron agua.

Los resultados publicados sobre el peso corporal tras el consumo de hidrolizados proteicos y otros componentes alimentarios no son concluyentes. De acuerdo a nuestros resultados, en un estudio realizado en ratas Zucker diabéticas para comprobar el efecto del consumo de un hidrolizado de lisozima de huevo con alcalasa sobre la DM2, tampoco se obtuvieron disminuciones significativas del peso corporal, pero si se consiguieron mejorar algunas de las alteraciones renovasculares desarrolladas en estos animales (Wang et al., 2012). Existen otros estudios en los que tras el consumo de hidrolizados proteicos tampoco se observaron disminuciones del peso corporal utilizando distintos modelos experimentales de obesidad inducida por dieta, aunque sí se consiguió mejorar de forma significativa otros parámetros metabólicos (Lee et al., 2007; Park et al., 2008). Tampoco se

observaron reducciones de peso corporal en los modelos de obesidad inducidos por dieta tras la administración de otros componentes alimentarios como polifenoles del vino tinto (Agouni et al., 2009; Vendrame et al., 2013) o fibras solubles (Grover et al., 2011). Sin embargo, si han podido demostrarse disminuciones de este parámetro en ratas Zucker obesas tras el consumo de fibras alimentarias (Galisteo et al., 2005; Galisteo et al., 2010), extractos de la planta *Garcinia Cambogia* (Asghar et al., 2007), o tras el consumo de quercetina (Rivera et al., 2008). Utilizando otros modelos experimentales de SM si llegaron a observarse reducciones del peso corporal tras el consumo de hidrolizados derivados de proteínas alimentarias (Aoyama et al., 2000; Kim et al., 2004; Vaughn et al., 2008; Bong et al., 2010; Bougatef et al., 2010; Ko et al., 2013).

El interés sobre los efectos de determinados componentes alimentarios en la reducción o el mantenimiento del peso corporal ha aumentado de forma considerable en los últimos años. Diversos estudios epidemiológicos y observacionales señalan que el consumo de dietas ricas en proteína está inversamente relacionado con el peso corporal. Sin embargo, la asociación entre el consumo de proteína y la pérdida de peso no siempre ha podido demostrarse y esta correlación depende, además de la fuente de proteína utilizada (Westerterp-Plantega et al., 2009; Dong et al., 2013).

Aunque en nuestro estudio no se observaron diferencias significativas entre el peso corporal de los animales obesos de los diferentes grupos experimentales, sí que se pudieron observar algunas diferencias en lo que respecta al peso de los órganos (Tabla 20). En todos los grupos de ratas Zucker obesas se observó que el peso del hígado era significativamente superior, llegando incluso a duplicarse el peso de este órgano con respecto al de las ratas delgadas. Esta diferencia persistió cuando se comparó el peso relativo de este órgano en animales obesos y delgados. En este modelo experimental los animales manifiestan un acúmulo de grasa en tejidos no adiposos (Kakuma et al., 2000), principalmente en el hígado, por lo que

era esperable encontrar hepatomegalia debido a los depósitos de grasa (Argiles et al., 1989; Gómez-Zorita et al., 2012). El peso total del hígado, así como su peso relativo se vieron ligeramente disminuidos en las ratas Zucker obesas que consumieron el hidrolizado de clara de huevo con pepsina, pero sin llegar a traducirse en diferencias significativas, que si se encontraron en el peso de este órgano tras el consumo de nopal (Morán-Ramos et al., 2012) o de resveratrol (Gómez-Zorita et al., 2012) en este mismo modelo animal. El peso de los riñones y del corazón fue similar en las ratas Zucker delgadas y en las obesas, aunque se detectó un menor peso relativo en los riñones de los animales obesos. Estos resultados fueron similares a los obtenidos en ratas Zucker diabéticas a las que se les administró un hidrolizado de lisozima huevo con alcalasa (Wang et al., 2012).

En lo que respecta al tejido adiposo epididimal, tanto su peso como su peso relativo fueron significativamente superiores en los grupos de ratas Zucker obesas respecto a las delgadas. Estos parámetros fueron, además, significativamente menores en las ratas Zucker obesas que recibieron el hidrolizado de clara de huevo con pepsina, mientras que el consumo del hidrolizado de clara de huevo con aminopeptidasa no produjo modificaciones en el peso de este órgano. También se observaron disminuciones en la cantidad de tejido adiposo en otros modelos animales tras el consumo de diferentes hidrolizados de proteínas (Kim et al., 2004; Shimizu et al., 2006; Liaset et al., 2009; Aroor et al., 2013), y tras la ingesta de fibras solubles (Brockman et al., 2012). Estos resultados sugieren un efecto del hidrolizado de clara de huevo con pepsina en alguna ruta del metabolismo lipídico de estos animales que conduciría a una menor acumulación de lípidos tanto en tejidos grasos como en no grasos.

Tabla 20. Peso total y peso relativo de los órganos obtenidos de las ratas al finalizar el estudio. A las ratas se les administraron diferentes productos en el agua de bebida desde la semana 8 hasta la semana 20 de vida. Grupos experimentales: (○) Ratas Zucker delgadas que bebieron agua, (●) ratas Zucker obesas que bebieron agua, (●) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de clara de huevo hidrolizada con pepsina, (●) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de clara de huevo hidrolizada con aminopeptidasa. Los datos representan los valores medios \pm EEM para un mínimo de 9 animales. Se utilizó el test de la t de Student para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de $P < 0.05$. * $P < 0.05$ ratas Zucker delgadas vs ratas Zucker obesas que bebieron agua, # $P < 0.05$ ratas Zucker obesas que bebieron agua vs ratas Zucker obesas que recibieron los hidrolizado.

Grupos experimentales	Delgadas	Obesas	Obesas-pepsina	Obesas-aminopeptidasa
Peso del corazón (g)	1.45 \pm 0.06	1.43 \pm 0.06	1.50 \pm 0.09	1.56 \pm 0.08
Peso del hígado (g)	14.87 \pm 0.73	28.64 \pm 0.95 *	26.06 \pm 1.02	27.40 \pm 1.15
Peso relativo del hígado (g)	3.70 \pm 0.13	5.40 \pm 0.19 *	4.90 \pm 0.19	5.30 \pm 0.17
Peso de los riñones (g)	2.89 \pm 0.18	2.84 \pm 0.21	2.59 \pm 0.05	2.82 \pm 0.20
Peso relativo de los riñones (g)	0.72 \pm 0.04	0.53 \pm 0.03 *	0.48 \pm 0.01	0.54 \pm 0.03
Peso del tejido adiposo epididimal (g)	6.37 \pm 0.31	14.80 \pm 0.24 *	13.41 \pm 0.2#	14.18 \pm 0.44
Peso relativo del tejido adiposo epididimal (g)	1.60 \pm 0.006	2.72 \pm 0.07 *	2.47 \pm 0.02#	2.64 \pm 0.09

La dislipemia es otro factor de gran relevancia y directamente relacionado con el SM, y está asociada además con el desarrollo de aterosclerosis y enfermedades cardiovasculares (Kohen-Avramoglu et al., 2003; Seymour et al., 2009). Los niveles de lípidos en las ratas Zucker se evaluaron mediante la determinación de la concentración plasmática de colesterol total, triglicéridos y ácidos grasos libres. Adicionalmente se determinó la actividad de la enzima lipoproteinlipasa (LPL), ya que ésta juega un papel crucial en el metabolismo de las grasas (Ndisang y Jadhav, 2013).

Las concentraciones plasmáticas de colesterol total (Figura 27A) y de triglicéridos (Figura 27B) fueron significativamente mayores en las ratas Zucker obesas que en las ratas Zucker delgadas. El plasma de las ratas Zucker obesas presentaba, a simple vista, un aspecto lechoso. Esto datos están de acuerdo con lo

descrito en la literatura para este modelo experimental, que además de presentar hipercolesterolemia, también presenta hipertrigliceridemia (Blay et al., 2001; Agouni et al., 2009; Fellmann et al., 2013; Vendrame et al., 2013). La dislipemia en estos animales se relaciona con un desequilibrio en la síntesis y la oxidación de lípidos (Chanussot et al., 1983). Con la edad esta situación de dislipemia se va agravando debido a la elevada ingesta de nutrientes de forma crónica y también por la situación mantenida de IR y de resistencia a la leptina (Muller y Cleary, 1988; Noto et al., 2006).

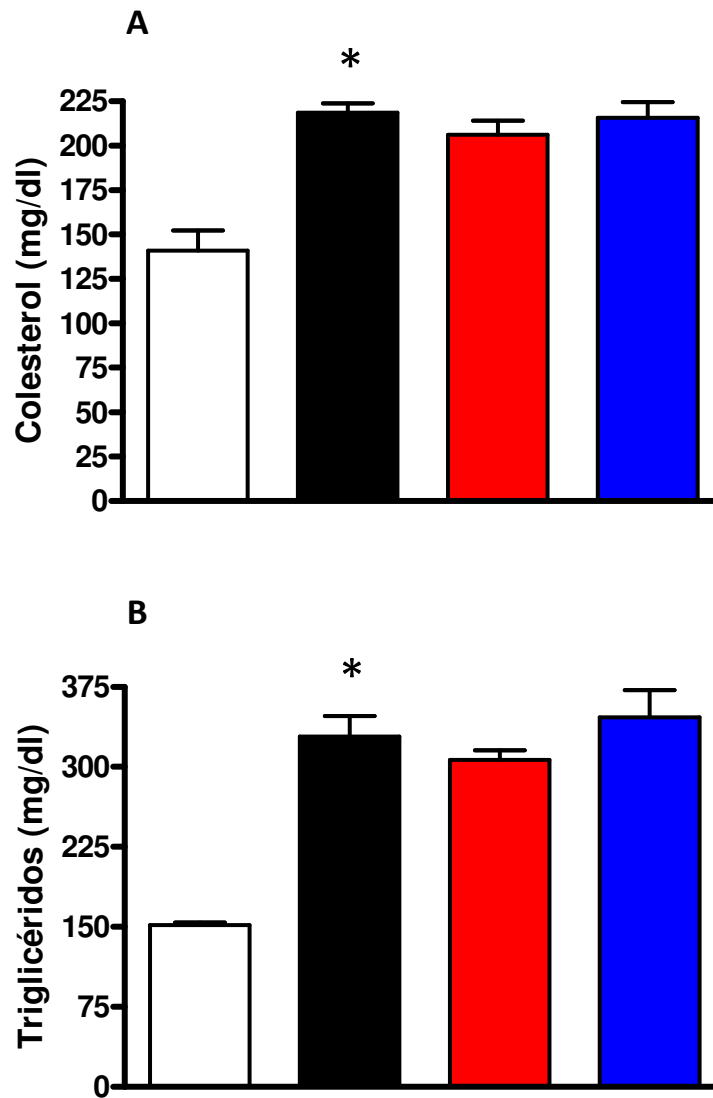


Figura 27. Concentración plasmática de colesterol total (A) y de triglicéridos (B) de los diferentes grupos de animales al finalizar el estudio. A las ratas se les administraron diferentes productos en el agua de bebida desde la semana 8 hasta la semana 20 de vida. Grupos experimentales: (○) Ratas Zucker delgadas que bebieron agua, (●) ratas Zucker obesas que bebieron agua, (●) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de clara de huevo hidrolizada durante con pepsina, (●) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de de clara de huevo hidrolizada con aminopeptidasa. Los datos representan los valores medios \pm EEM para un mínimo de 9 animales. Se utilizó el test de la t de Student para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de $P < 0.05$. * $P < 0.05$ ratas Zucker delgadas vs ratas Zucker obesas que bebieron agua.

Las concentraciones plasmáticas de colesterol y triglicéridos fueron ligeramente menores en el grupo de animales obesos tratado con el hidrolizado con pepsina, pero sin llegar a evidenciar una significación estadística. Es importante destacar que nuestro grupo de investigación ya había demostrado que tras la administración de un hidrolizado de clara de huevo con pepsina a un modelo experimental de hipertensión (SHR), los animales mostraron valores significativamente más bajos de colesterol y triglicéridos respecto al grupo control (Manso et al., 2008). En otros estudios sí se llegaron a encontrar reducciones estadísticamente significativas en las concentraciones plasmáticas de triglicéridos y/o colesterol en los que se evaluó el efecto sobre el metabolismo lipídico de diferentes hidrolizados de proteínas alimentarias (Aoyama et al., 2000; Wergedahl et al., 2004; Kim et al., 2004; Jung-Yoon et al., 2008; Beaulieu et al., 2010; Bong et al., 2010; Zhu et al., 2010; Jung et al., 2010; Hosomi et al., 2011), y también tras la ingesta de otros componentes alimentarios como fibras dietéticas (Romero et al., 2002; Weickert y Pfeiffer, 2008; Justo et al., 2013), fitoquímicos como el resveratrol (Rivera et al., 2009), quercetina (Rivera et al., 2008) o fitoesteroles (Misawa et al., 2012), tanto en ratas Zucker como en otros modelos experimentales. Aunque no está claro el mecanismo de acción hipolipemiante, algunos investigadores han relacionado el consumo de péptidos derivados de proteínas alimentarias con un aumento en la excreción de colesterol y ácidos biliares en las heces, ya que estos péptidos son capaces de disminuir la solubilidad de las micelas de colesterol y debido también a su capacidad de unión a los ácidos biliares (Zhong et al., 2007; Hosomi et al., 2011). Los resultados *in vitro* han demostrado que los hidrolizados seleccionados son capaces de aumentar la unión a los ácidos biliares, lo que podría ocasionar una disminución de la absorción intestinal de colesterol y, por lo tanto, podríamos sugerir este mecanismo de acción como el responsable del efecto beneficioso sobre el metabolismo lipídico que se observó en las ratas Zucker que ingerían el hidrolizado de clara de huevo con pepsina.

Los ácidos grasos libres circulantes se encuentran elevados en situaciones de obesidad y DM2, y su aumento contribuye a la aparición y mantenimiento del estado de IR asociado al SM (Bays et al., 2004; Stich y Berlan, 2004; Hufnagel et al., 2005; Poynten et al., 2005; Schaefer et al., 2005; Pilz et al., 2006). En nuestro estudio, la concentración plasmática de ácidos grasos libres fue significativamente superior en las ratas Zucker obesas respecto a sus controles, las ratas Zucker delgadas (Figura 29). Se ha descrito en la bibliografía que los niveles plasmáticos de ácidos grasos de las ratas Zucker obesas son más altos que en las ratas delgadas (Oana et al., 2005; Lupachyk et al., 2012). Con los resultados obtenidos hasta este momento decidimos evaluar este parámetro únicamente en las ratas Zucker obesas que recibieron el hidrolizado de clara de huevo con pepsina, ya que era en este grupo el que estábamos observando resultados más favorables en el metabolismo lipídico. De hecho, en este grupo de animales se observó una disminución significativa en la concentración plasmática de ácidos grasos libres en comparación con las ratas obesas que bebieron agua (Figura 28). Existen muy pocos estudios que evalúen el efecto de hidrolizados y péptidos derivados de proteínas alimentarias sobre el metabolismo de los ácidos grasos. A diferencia de nuestros resultados, Wang et al. (2012), no encontraron diferencias significativas en los niveles de ácidos grasos tras la administración de un hidrolizado de lisozima de huevo con alcalasa a ratas Zucker diabéticas. Sin embargo, otros investigadores sí que han obtenido reducciones en este parámetro tras el consumo de péptidos derivados de proteínas de origen marino en pacientes con DM2 (Zhu et al., 2010). El resto de literatura revisada en los que se observan reducciones en los niveles plasmáticos de ácidos grasos libres, cuando se utilizan ratas Zucker obesas así como cuando se usan otros modelos experimentales, hace referencia al efecto de otros componentes alimentarios como el resveratrol (Rivera et al., 2009; Gómez-Zorita et al., 2012), la quercetina (Rivera et al., 2008) o las fibras dietéticas (Galisteo et al., 2010).

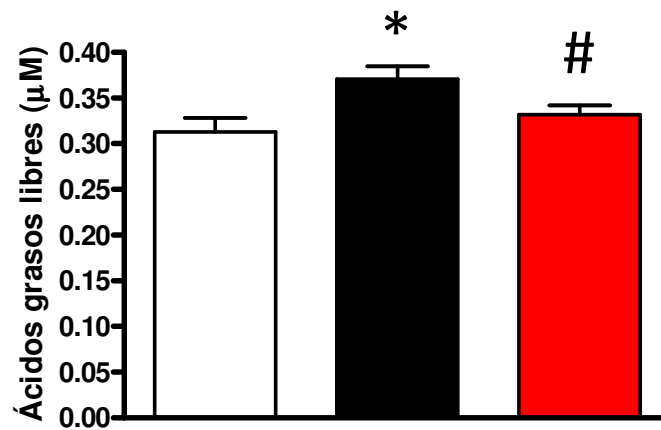


Figura 28. Concentración plasmática de ácidos grasos libres de los diferentes grupos de animales al finalizar el estudio. A las ratas se les administraron diferentes productos en el agua de bebida desde la semana 8 hasta la semana 20 de vida. Grupos experimentales: (○) Ratas Zucker delgadas que bebieron agua, (●) ratas Zucker obesas que bebieron agua, (●) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de clara de huevo hidrolizada con pepsina. Los datos representan los valores medios \pm EEM para un mínimo de 9 animales. Se utilizó el test de la t de Student para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de $P < 0.05$. * $P < 0.05$ ratas Zucker delgadas vs ratas Zucker obesas que bebieron agua, # $P < 0.05$ ratas Zucker obesas que bebieron agua vs ratas Zucker obesas que recibieron los hidrolizado.

La LPL es un enzima que desempeña un papel fundamental en el metabolismo lipídico. Esta enzima se encarga de hidrolizar los triglicéridos transportados por los quilomicrones y las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (Goldberg et al., 1996). Durante este proceso de hidrólisis se liberan ácidos grasos que se absorben en los tejidos periféricos, donde se oxidan y se emplean bien como fuente de energía o se re-esterifican en forma de triglicéridos y se almacenan en los tejidos, principalmente en el tejido adiposo (Zechner et al., 2000). La sobreproducción de VLDL satura la LPL que produce una disminución en la depuración de los triglicéridos postprandiales, lo que ocasiona la hipertrigliceridemia característica del SM (Rashid et al., 2002). Por la misma razón explicada anteriormente decidimos evaluar este parámetro únicamente en las ratas Zucker obesas que recibieron el hidrolizado de clara de huevo con pepsina.

Con respecto a la actividad de la LPL en el plasma, no se observaron diferencias significativas entre las ratas delgadas y las ratas obesas que bebieron agua (Figura 29), a pesar de que se ha descrito un aumento en la actividad de la LPL en los animales obesos de esta raza (Maggio, 1982). Tampoco se observaron diferencias entre los grupos de ratas obesas que recibieron los hidrolizados de huevo y los animales obesos que bebieron agua (Figura 29).

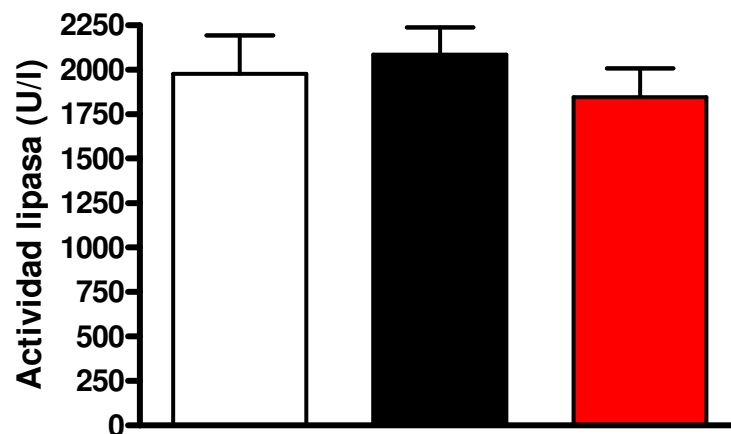


Figura 29. Actividad lipasa en plasma de los diferentes grupos de animales al finalizar el estudio. A las ratas se les administraron diferentes productos en el agua de bebida desde la semana 8 hasta la semana 20 de vida. Grupos experimentales: (○) Ratas Zucker delgadas que bebieron agua, (●) ratas Zucker obesas que bebieron agua, (●) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de clara de huevo hidrolizada con pepsina. Los datos representan los valores medios \pm EEM para un mínimo de 9 animales. Se utilizó el test de la t de Student para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de $P < 0.05$. No se encontraron diferencias significativas.

Se sabe que la grasa no digerida en el organismo se elimina por las heces. Teniendo en cuenta las disminuciones observadas en el peso de tejidos grasos y no grasos tras el consumo del hidrolizado de clara de huevo con pepsina, y su posible relación con una menor acumulación de lípidos en estos tejidos, el efecto de este hidrolizado sobre el metabolismo de los lípidos en las ratas Zucker obesas podría relacionarse con una mayor eliminación de grasa en estos animales. Por todo ello, decidimos determinar la cantidad de heces y analizar la grasa que contenían. La

cantidad de heces recogidas en las jaulas metabólicas fue significativamente mayor en las ratas Zucker obesas respecto a las ratas delgadas (Figura 30A). Con respecto a la grasa presente en las heces, las ratas Zucker obesas excretaron menos cantidad porcentual de grasa que las ratas delgadas (resultados no mostrados). El porcentaje de grasa aparentemente digerida (GAD) fue significativamente menor en los animales delgados que en los obesos (Figura 30B). El aumento del porcentaje de GAD observado en el grupo de ratas Zucker obesas puede ser, en realidad, un mecanismo implicado en su condición de obesidad. Estos animales son capaces de digerir mejor la grasa que los animales delgados, por lo tanto eliminan menos grasa a través de las heces y esta se acumula en el organismo, lo que promueve su condición de obesidad. Pudimos también observar que el consumo de los hidrolizados de clara de huevo no ocasionó ninguna modificación en el porcentaje de GAD en las ratas obesas y, por lo tanto, no se han podido correlacionar los efectos que el consumo del hidrolizado de clara de huevo con pepsina produce sobre el metabolismo lipídico con una mayor eliminación de grasa. Se ha descrito, sin embargo, que el consumo de otros hidrolizados de proteínas produce un aumento en la cantidad de heces y existe una mayor eliminación de grasa en ellas (Shimizu et al., 2006; Park et al., 2008). Este fenómeno también se ha observado tras el consumo de fibras dietéticas (Sánchez et al., 2008).

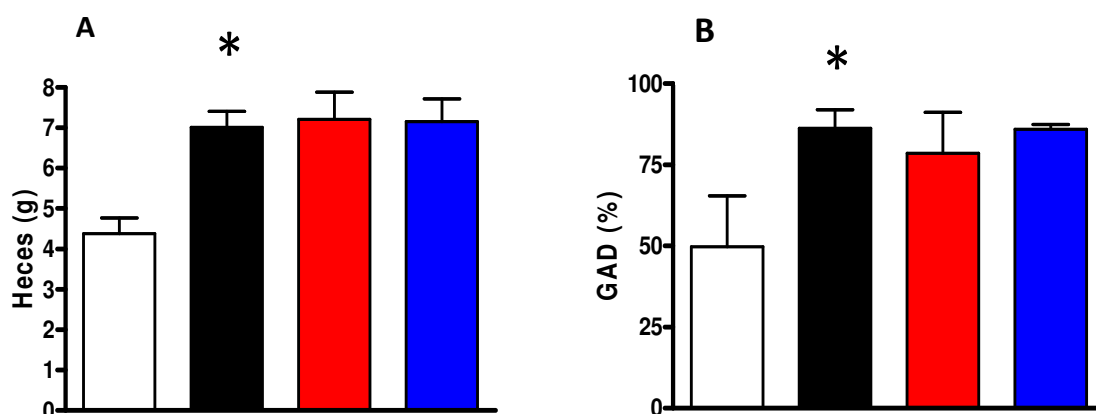


Figura 30. Cantidad de heces recogidas (A) y porcentaje de grasa aparentemente digerida (GAD) (B) de los grupos de animales al finalizar el estudio. A las ratas se les administraron diferentes productos en el agua de bebida desde la semana 8 hasta la semana 20 de vida. Grupos experimentales: (○) Ratas Zucker delgadas que bebieron agua, (●) ratas Zucker obesas que bebieron agua, (●) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de clara de huevo hidrolizada con pepsina, (●) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de de clara de huevo hidrolizada con aminopeptidasa. Los datos representan los valores medios \pm EEM para un mínimo de 9 animales. Se utilizó el test de la t de Student para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de $P < 0.05$. * $P < 0.05$ ratas Zucker delgadas vs ratas Zucker obesas que bebieron agua.

La aparición de depósitos grasos en tejidos y órganos no destinados al almacenamiento suele instaurarse a la semana 10 de vida en las ratas Zucker obesas (Zucker, 1962). Entre los tejidos que acumulan depósitos grasos destaca el hígado y, en menor medida, el páncreas y el músculo esquelético. Una alta concentración de lípidos en el hígado son los responsables, en la mayoría de los casos, de la hepatomegalia y el desarrollo posterior de esteatosis hepática (Larter et al., 2013). Dado que el hígado es uno de los órganos en los que se suelen presentar acúmulos de grasa en este modelo animal, fenómeno que pudimos apreciar además tras su observación macroscópica, nos pareció interesante llevar a cabo el estudio histológico de este tejido. Los cortes histológicos de tejido hepático teñidos con hematoxilina-eosina analizados al microscopio óptico muestran una clara diferencia en la apariencia de los hígados entre los distintos grupos experimentales (Figura 31).

El hígado de las ratas Zucker delgadas no presentó signos de patología hepática, ni linfocitos T o B extravasculares (Figura 31A). Por el contrario, en los hígados de las ratas Zucker obesas que bebieron agua se observa una clara esteatosis, con una distribución heterogénea de vesículas de grasa principalmente de tipo microvesicular (Figura 31B). Aunque en todos los cortes de tejido hepático correspondientes a los animales obesos se observa una ligera infiltración linfocitaria, no se detectan signos de fibrosis en ninguno de los grupos. Sin embargo, la gravedad de la esteatosis no fue la misma en todos los grupos de ratas obesas, ya que las ratas Zucker obesas que recibieron el hidrolizado de clara de huevo con pepsina mostraron un sorprendente menor grado de esteatosis, con menos vesículas grasas y de menor tamaño (Figura 31C), hecho que confirma nuestras observaciones macroscópicas. Esta mejora en la esteatosis está en concordancia con la disminución de peso del hígado observado en las ratas que consumían el hidrolizado de pepsina mostrado en la tabla 20, y sugiere que el consumo de este hidrolizado disminuye la acumulación de grasa en este órgano y, por consiguiente, la esteatosis hepática desarrollada.

También se observó una mejora de la esteatosis en diferentes estudios en los que las ratas Zucker obesas se trataron con distintos componentes alimentarios como el ácido linolénico conjugado (Gilbert et al., 2011), el nopal (Morán-Ramos et al., 2012), el resveratrol (Gómez-Zorita et al., 2012), o con determinadas fibras solubles (Sánchez et al., 2008).

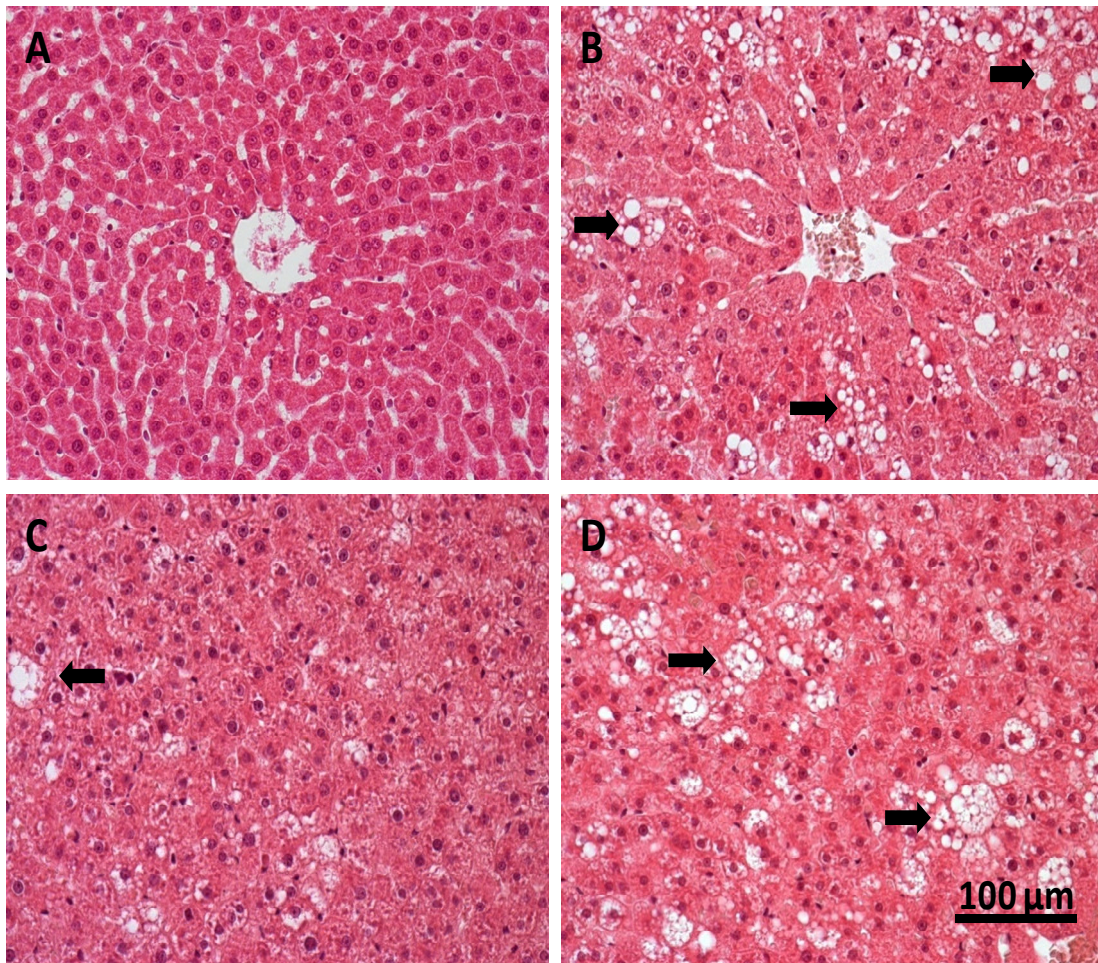


Figura 31. Imágenes tomadas en el microscopio óptico (objetivo 40x) de cortes de hígado teñidos con hematoxilina–eosina de diferentes grupos de ratas al finalizar el estudio. A las ratas se les administraron diferentes productos en el agua de bebida desde la semana 8 hasta la semana 20 de vida. Grupos experimentales: Ratas Zucker delgadas que bebieron agua (A), Ratas Zucker obesas que bebieron agua (B), Ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de clara de huevo hidrolizada con pepsina(C), Ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de clara de huevo hidrolizada con aminopeptidasa (D). Liposomas señalados con flechas.

Teniendo en cuenta las diferencias observadas en el metabolismo lipídico tras el consumo de los hidrolizados, y después de observar también diferencias importantes en cuanto a la acumulación de grasa en el tejido hepático, nos planteamos llevar a cabo el estudio histológico del tejido adiposo en sus dos variedades, blanco (epididimal) y marrón (interescapular). Los cortes histológicos se muestran en la Figura 32 y el recuento del número de adipocitos en la Figura 33.

Tanto en los cortes histológicos de tejido adiposo blanco como de tejido adiposo marrón, se observa, de forma general, un aumento del tamaño de los adipocitos en todos los grupos de ratas Zucker obesas en comparación con las ratas delgadas. El tamaño de los adipocitos del tejido adiposo blanco fue significativamente mayor tamaño en las ratas Zucker obesas que en las ratas Zucker delgadas, siendo el número de adipocitos por unidad de área hasta 5 veces mayor en las ratas delgadas que en las obesas (Figuras 32A, B y E). No se observaron diferencias en cuanto al tamaño y número de adipocitos entre los grupos de ratas obesas que recibieron hidrolizado y los animales obesos que bebieron agua (Figura 32B, C, D y E). Los resultados obtenidos concuerdan con los datos descritos en la literatura para este modelo experimental que desarrolla hipertrofia en los adipocitos (Chakrabarti et al., 2011). Estas observaciones se han obtenido también en el modelo de ratas Zucker diabéticas, donde la hipertrofia de los adipocitos se ha relacionado con un aumento de factores pro-inflamatorios, como el TNF- α (Ndisang y Jadhav, 2013). Por el contrario otros investigadores si observaron una disminución en la hipertrofia de los adipocitos del tejido adiposo blanco cuando trataron animales de esta misma raza con otros componentes alimentarios (Noto et al., 2006; Sato et al., 2007; Hamed et al., 2009; Declercq et al., 2010).

La hipertrofia fue incluso más evidente en el tejido adiposo marrón que en el tejido adiposo blanco (Figura 32 y 33). El tamaño de los adipocitos fue también significativamente menor en las ratas delgadas que en las obesas y el número de adipocitos por unidad de área del tejido adiposo marrón fue 8 veces mayor en las ratas Zucker delgadas que en las ratas obesas. Los adipocitos de los animales obesos llegaron incluso a tomar la apariencia de adipocitos del tejido adiposo blanco, ocasionando la transformación de sus depósitos grasos en uniloculares (Figuras 33A, B y E). El tamaño y el número de los adipocitos de las ratas Zucker obesas que recibieron el hidrolizado de clara de huevo con pepsina fue similar al de los adipocitos de las ratas Zucker obesas que bebieron agua (Figura 32B, C y E). Sin embargo, el tamaño de los adipocitos de las ratas Zucker obesas que recibieron el

hidrolizado de clara de huevo con aminopeptidasa fue mayor, y por lo tanto el número de adipocitos por unidad de área disminuyó significativamente respecto al de los adipocitos de ratas Zucker obesas que bebieron agua (Figura 33B, D y E). Este fenómeno puede relacionarse con los resultados explicados anteriormente para el grupo de ratas Zucker que recibieron el hidrolizado de clara de huevo con aminopeptidasa donde, hasta el momento, no se ha observado ninguna mejora en los parámetros metabólicos estudiados.

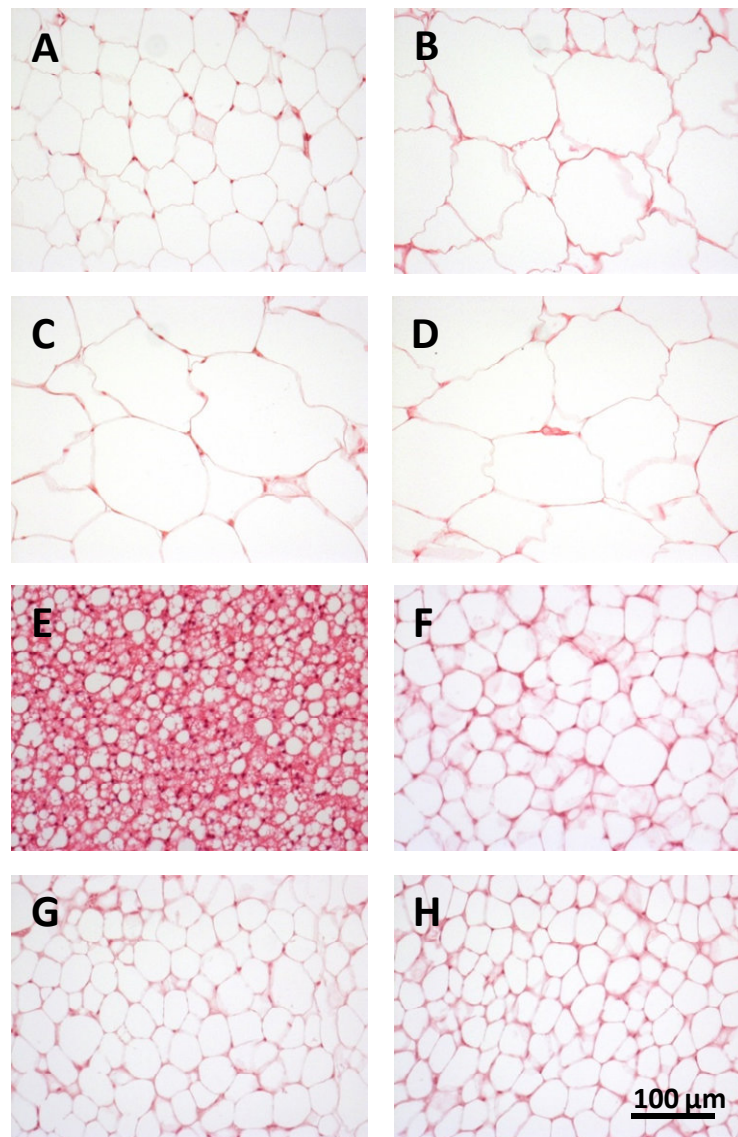


Figura 32. Imágenes tomadas en el microscopio óptico de cortes de tejido adiposo teñidos con hematoxilina–eosina de diferentes grupos de ratas al finalizar el estudio. Tejido adiposo blanco (objetivo 20x) (**A-D**) Tejido adiposo marrón (objetivo 40x) (**E-H**). A las ratas se les administraron diferentes productos en el agua de bebida desde la semana 8 hasta la semana 20 de vida. Grupos experimentales: Ratas Zucker delgadas que bebieron agua (**A y E**); Ratas Zucker obesas que bebieron agua (**B y F**), Ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de clara de huevo hidrolizada con pepsina (**C y G**), Ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de de clara de huevo hidrolizada con aminopeptidasa (**D y H**).

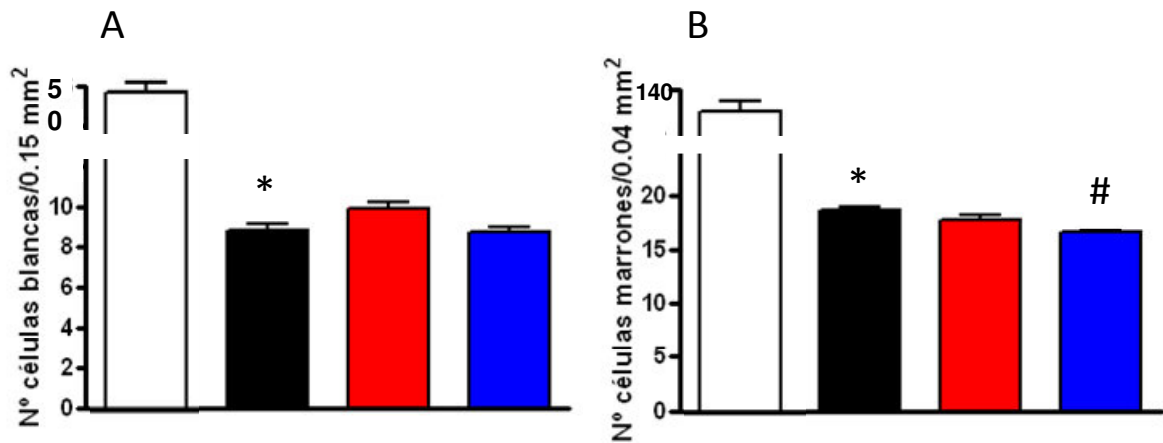


Figura 33. Recuento del número de adipocitos por área del tejido adiposo blanco (A) y del tejido adiposo marrón (B) de los diferentes grupos de ratas al finalizar el estudio. A las ratas se les administraron diferentes productos en el agua de bebida desde la semana 8 hasta la semana 20 de vida. Grupos experimentales: (○) Ratas Zucker delgadas que bebieron agua, (●) ratas Zucker obesas que bebieron agua, (●) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de clara de huevo hidrolizada con pepsina, (●) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de de clara de huevo hidrolizada con aminopeptidasa. Los datos representan los valores medios \pm EEM para un mínimo de 9 animales. Se utilizó el test de la t de Student para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de $P < 0.01$. * $P < 0.01$ ratas Zucker delgadas vs ratas Zucker obesas que bebieron agua, # $P < 0.01$ ratas Zucker obesas que bebieron agua vs ratas Zucker obesas que recibieron los hidrolizado.

4.3 EFECTOS DEL CONSUMO DE HIDROLIZADOS DE PROTEÍNAS DE CLARA DE HUEVO SOBRE LA INFLAMACIÓN Y EL ESTRÉS OXIDATIVO EN RATAS ZUCKER OBESAS

Como ya se ha comentado en la Introducción, la acumulación de tejido adiposo y especialmente el incremento de grasa visceral que acompaña a la obesidad está asociado con un estado de inflamación crónica, que conlleva a un desequilibrio en la producción de diferentes mediadores inflamatorios como hormonas, metabolitos y adipocitoquinas (Ouchi et al., 2003; Iannitti et al., 2012; Graf et al., 2013; Vendrame et al., 2013). Este desequilibrio produce niveles plasmáticos de TNF- α elevados (Shoelson et al., 2007; Zeyda y Stulnig, 2009) y niveles de adiponectina disminuidos (Weyer et al., 2001; Havel et al., 2002). El estado proinflamatorio está además fuertemente relacionado con el estrés oxidativo, la disfunción endotelial, la aterosclerosis y la IR, apoyando la hipótesis de que este estado de inflamación podría ser el nexo de unión entre las diferentes dolencias que caracterizan el SM (Giugliano et al., 2006).

En nuestro estudio, los niveles plasmáticos de TNF- α estaban más elevados en ratas obesas que en delgadas. Más concretamente, los niveles de TNF- α en las ratas Zucker obesas fueron 3 veces superiores a los de las ratas delgadas (Figura 34). El aumento del TNF- α caracteriza los principales modelos experimentales de obesidad (Hotamisligil et al., 1993; Gary-Bobo et al., 2007; Chentouf et al., 2011), entre los que se incluye el modelo de las ratas Zucker obesas que hemos utilizado (Picchi et al., 2006). Esto puede deberse a la hipertrofia que manifiestan los adipocitos en estos animales, lo que favorece la producción de citoquinas proinflamatorias como es el TNF- α (Skurk et al., 2007). Las ratas Zucker obesas que recibieron el hidrolizado de clara de huevo con pepsina presentaron una disminución significativa de los niveles de TNF- α en el plasma. Este resultado encaja con los resultados obtenidos sobre el metabolismo lipídico ya que la menor acumulación de grasa observada en las ratas obesas que consumieron el hidrolizado

de pepsina podría relacionarse con un menor estado inflamatorio en estos animales. Esta reducción en los niveles plasmáticos de TNF- α se ha observado también tras el consumo de un hidrolizado de lisozima de clara de huevo con alcalasa en ratas Zucker diabéticas (Wang et al., 2012), así como tras la ingesta de hidrolizados de otras proteínas de origen alimentario (Beaulieu et al., 2010; Rudkowska et al., 2010; Zhu et al., 2010; Ahn et al., 2012). También se han conseguido reducir los niveles de esta citoquina y, por lo tanto, el estado inflamatorio que manifiestan las ratas Zucker tras el tratamiento con aceites ricos en omega-3 (Baranowski et al., 2012), con fibras solubles (Sánchez et al., 2011; Justo et al., 2013) o con antocianinas (Seymour et al., 2009; Vendrame et al., 2013). Este parámetro tampoco se evaluó en el grupo de ratas Zucker obesas que bebieron el hidrolizado de clara de huevo con aminopeptidasa.

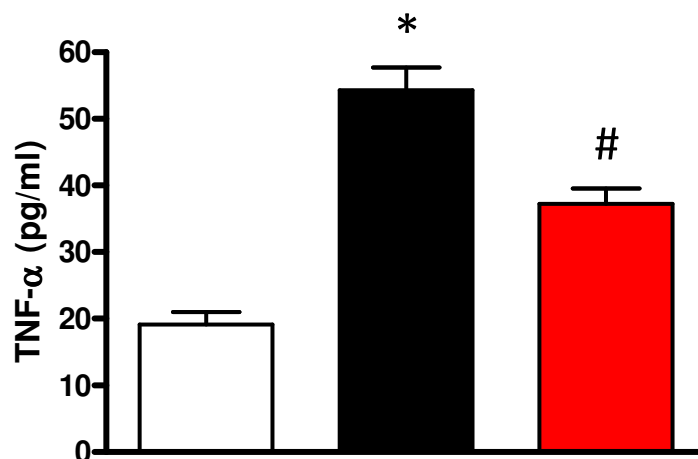


Figura 34. Concentración plasmática de factor de necrosis tumoral alpha (TNF- α) de los diferentes grupos de animales al finalizar el estudio. A las ratas se les administraron diferentes productos en el agua de bebida desde la semana 8 hasta la semana 20 de vida. Grupos experimentales: (○) Ratas Zucker delgadas que bebieron agua, (●) ratas Zucker obesas que bebieron agua, (●) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de clara de huevo hidrolizada con pepsina. Los datos representan los valores medios \pm EEM para un mínimo de 9 animales. Se utilizó el test de la t de Student para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de $P < 0.05$. * $P < 0.05$ ratas Zucker delgadas vs ratas Zucker obesas que bebieron agua, # $P < 0.05$ ratas Zucker obesas que bebieron agua vs ratas Zucker obesas que recibieron hidrolizado.

La adiponectina es una adipocitoquina con actividad antidiabética y antiinflamatoria (Bauer et al., 2010) de gran relevancia en el SM. En nuestro estudio, los niveles plasmáticos de adiponectina fueron más bajos en las ratas delgadas que en las ratas Zucker obesas que bebían agua (Figura 36). Estos resultados concuerdan con los estudios llevados a cabo por Oana et al. (2005), donde también se observaron concentraciones plasmáticas de adiponectina en ratas Zucker obesas de 13 a 17 semanas de vida, significativamente superiores a las concentraciones plasmáticas de esta proteína en las ratas Zucker delgadas. Aunque la mayoría de los autores señalan que niveles altos de adiponectina en plasma son beneficiosos (Iannitti et al., 2012; Vendrame et al., 2013), es importante tener en cuenta que niveles demasiado elevados de adiponectina se han asociado con una situación de resistencia a esta adipocitoquina que puede resultar patológica (Hua et al., 2007). Los niveles de adiponectina más elevados en las ratas Zucker obesas que en las ratas delgadas se pueden relacionar por lo tanto, con una posible resistencia a la adiponectina que presentan los tejidos de las ratas obesas, lo que hace que se tenga que secretar más adiponectina para que los tejidos puedan captarla, debido a que los receptores de esta adipocitoquina están disminuidos en dichos tejidos. Para justificar estos hechos, varios investigadores determinaron la expresión de los receptores de adiponectina en diferentes tejidos y llegaron a la conclusión de que estos receptores estaban disminuidos en el tejido hepático (Matsunami et al., 2010; Matsunami et al., 2011) y en el tejido adiposo de las ratas Zucker obesas (Bauer et al., 2010). Esto sugiere la posible existencia de un sistema autocrino en dichos tejidos que ocasionaría altos niveles de adiponectina en el plasma (Oana et al., 2005).

Las ratas Zucker obesas que consumieron los hidrolizados de huevo presentaron una bajada significativa de la concentración plasmática de adiponectina respecto a los animales obesos que bebieron agua (Figura 35). Estos resultados sugieren que el consumo de los hidrolizados podría haber disminuido la resistencia a la adiponectina característica de los animales obesos de esta raza. Sin embargo, para

comprobar esta hipótesis sería necesario haber evaluado los niveles de expresión de los receptores de adiponectina en este tejido. Existen, sin embargo, en la bibliografía algunos estudios donde los niveles de adiponectina en plasma aumentan en este modelo genético de obesidad tras el consumo de otros componentes alimentarios como el nopal (Morán-Ramos et al., 2012), algunas fibras solubles (Sánchez et al., 2011), o tras el consumo de arándanos (Vendrame et al., 2013). Esta discrepancia en los resultados encontrados en los niveles plasmáticos de adiponectina podría relacionarse con diferencias en el sexo o en la edad de los animales utilizados en los distintos estudios. También se ha observado que el consumo de hidrolizados de proteínas de maíz produce un aumento de los niveles de adiponectina en plasma en modelos experimentales de obesidad inducida por dieta (Bong et al., 2010). No podemos olvidar, sin embargo, que el modelo experimental utilizado en esta Tesis Doctoral, presenta un defecto en el receptor de la leptina, molécula estrechamente relacionada con la adiponectina, y los sistemas de regulación y mecanismos implicados podrían ser completamente diferentes según el modelo experimental utilizado. Por otro lado, ese mismo año Zhu et al. (2010), demostraron un aumento en los niveles de adiponectina plasmática en pacientes con DM2 tratados con péptidos derivados de proteínas de origen marino.

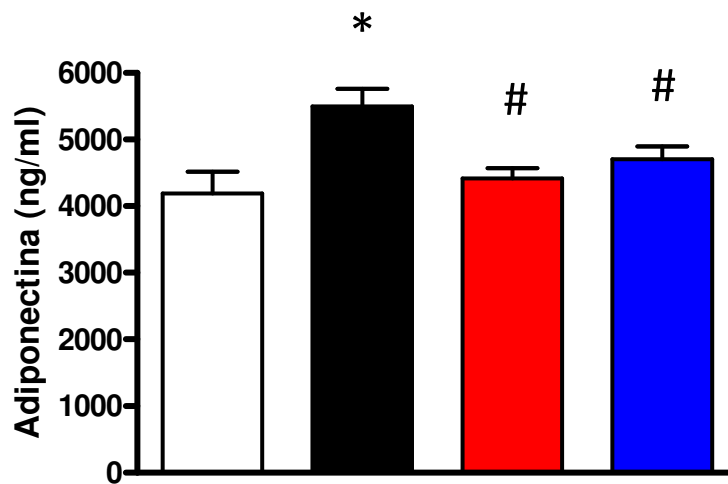


Figura 35. Concentración plasmática de adiponectina de los diferentes grupos de animales al finalizar el estudio. A las ratas se les administraron diferentes productos en el agua de bebida desde la semana 8 hasta la semana 20 de vida. Grupos experimentales: (○) Ratas Zucker delgadas que bebieron agua, (●) ratas Zucker obesas que bebieron agua, (●) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de clara de huevo hidrolizada con pepsina, (●) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de de clara de huevo hidrolizada con aminopeptidasa. Los datos representan los valores medios \pm EEM para un mínimo de 9 animales. Se utilizó el test de la t de Student para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de $P < 0.05$. * $P < 0.05$ ratas Zucker delgadas vs ratas Zucker obesas que bebieron agua, # $P < 0.05$ ratas Zucker obesas que bebieron agua vs ratas Zucker obesas que recibieron hidrolizado.

Hoy día se acepta, en realidad, que existe una relación entre obesidad y estrés oxidativo. De hecho, el aumento del estrés oxidativo en el tejido adiposo de los sujetos obesos podría ser uno de los principales mecanismos implicados en la aparición del SM en ellos (Ando y Fujita, 2009). Se ha postulado también que la sobreexpresión de TNF- α en las ratas Zucker obesas, induce en ellas una activación de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH). Como consecuencia de esta activación, se produce más cantidad de anión superóxido en las ratas Zucker, lo que se ha relacionado con un aumento del estrés oxidativo en estos animales (Galisteo et al., 2008). Por todo ello, se evaluaron en los animales las concentraciones plasmáticas de malonildialdehído (MDA), la capacidad antioxidante del plasma (ORAC) y los niveles de glutatión reducido en el hígado, con objeto de

conocer el estado redox de los animales y su grado de protección antioxidante e interpretar los mecanismos implicados en las acciones de los hidrolizados de clara de huevo estudiados.

La determinación de los niveles de MDA permite medir el grado de peroxidación lipídica. Los radicales libres atacan a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares y de las lipoproteínas transformándolos en ácidos grasos peroxidados, y estos ácidos grasos peroxidados sufren un acortamiento de su cadena lateral liberando MDA. Así pues, la concentración sérica de MDA es proporcional a la cantidad de ácidos grasos poliinsaturados oxidados.

Como muestra la figura 36, las ratas Zucker obesas que bebieron agua presentaron un aumento significativo en los niveles plasmáticos de MDA respecto a las ratas Zucker delgadas. El consumo del hidrolizado de clara de huevo con pepsina disminuyó significativamente los valores de MDA en los animales obesos. Sin embargo, las ratas Zucker obesas que recibieron el hidrolizado con aminopeptidasa, presentaron un aumento significativo de los niveles de MDA plasmático respecto a las ratas Zucker obesas que bebían agua (Figura 36). Estos datos indican que el grado de peroxidación lipídica es mayor en los animales obesos que en los delgados, y que el aumento de los niveles de MDA en individuos que padecen SM, podría reducirse con el consumo del hidrolizado de clara de huevo con pepsina. Una reducción en los niveles de MDA también se observó en otro estudio llevado a cabo por nuestro grupo de investigación, tras la administración de otro hidrolizado de clara de huevo con pepsina en SHR (Manso et al., 2008). El consumo de otros hidrolizados proteicos ocasionó también una reducción en los niveles de peroxidación lipídica en otros modelos experimentales (Zhu et al., 2010; Liu et al., 2011; Xue et al., 2012). Esta reducción en los niveles plasmáticos de MDA también se ha observado en ratas Zucker tras la administración de dietas suplementadas con diferentes componentes alimentarios como extractos vegetales (Asghar et al., 2007) o fibra alimentaria (Sánchez et al., 2011).

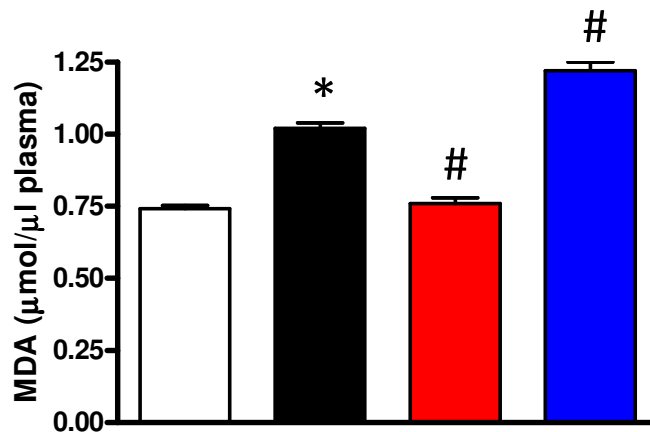


Figura 36. Concentración plasmática de malonildialdehído (MDA) de los diferentes grupos de animales al finalizar el estudio. A las ratas se les administraron diferentes productos en el agua de bebida desde la semana 8 hasta la semana 20 de vida. Grupos experimentales: (○) Ratas Zucker delgadas que bebieron agua, (●) ratas Zucker obesas que bebieron agua, (●) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de clara de huevo hidrolizada con pepsina, (●) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de de clara de huevo hidrolizada con aminopeptidasa. Los datos representan los valores medios \pm EEM para un mínimo de 9 animales. Se utilizó el test de la t de Student para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de $P < 0.05$. * $P < 0.05$ ratas Zucker delgadas vs ratas Zucker obesas que bebieron agua, # $P < 0.05$ ratas Zucker obesas que bebieron agua vs ratas Zucker obesas que recibieron hidrolizado.

Como bien sabemos, las especies reactivas de oxígeno, que se generan en la mitocondria como parte del metabolismo celular y que también provienen de distintos contaminantes ambientales, son altamente reactivas y, si no se neutralizan, dañan o destruyen en milisegundos distintos componentes celulares tales como la membrana celular, los ácidos nucleicos y las proteínas. Para ello, en el organismo existen distintos sistemas antioxidantes que ayudan a mantener un estado de equilibrio entre especies oxidantes y antioxidantes. La capacidad antioxidante total del plasma puede medirse con distintas técnicas. Una de ellas, muy utilizada por diversos investigadores y también por nuestro grupo de investigación, es el ensayo fluorimétrico que hemos utilizado en esta Tesis Doctoral. Este ensayo nos proporciona la capacidad del plasma para neutralizar radicales

peroxilo (ORAC). El valor del ORAC obtenido fue similar en el plasma de las ratas Zucker delgadas y en de las ratas Zucker obesas que bebieron agua (Figura 37). Sin embargo, las ratas Zucker obesas que recibieron el hidrolizado de clara de huevo experimentaron un aumento en la capacidad antioxidante plasmática, siendo este aumento significativo sólo en el grupo de las ratas Zucker obesas que ingirieron el hidrolizado de clara de huevo con aminopeptidasa (Figura 37), lo que sugiere la existencia de un mecanismo antioxidante compensatorio al aumento de los niveles de peroxidación lipídica observados en este grupo de animales. Estos resultados están acordes, además, con los obtenidos *in vitro*, donde el hidrolizado con aminopeptidasa presentó la actividad antioxidante más elevada de todos los hidrolizados desarrollados. El consumo de otros hidrolizados de proteínas también ha ocasionado un aumento de los sistemas antioxidantes como la superóxido dismutasa o la glutatión peroxidasa (Zhu et al., 2010), y también de la catalasa, produciendo un aumento de la capacidad antioxidante total (Liu et al., 2011). Esta mejora de la capacidad antioxidante también se observó tras la administración diferentes tipos de fibras dietéticas a ratas Zucker (Sánchez et al., 2008; Belobrajdic et al., 2011).

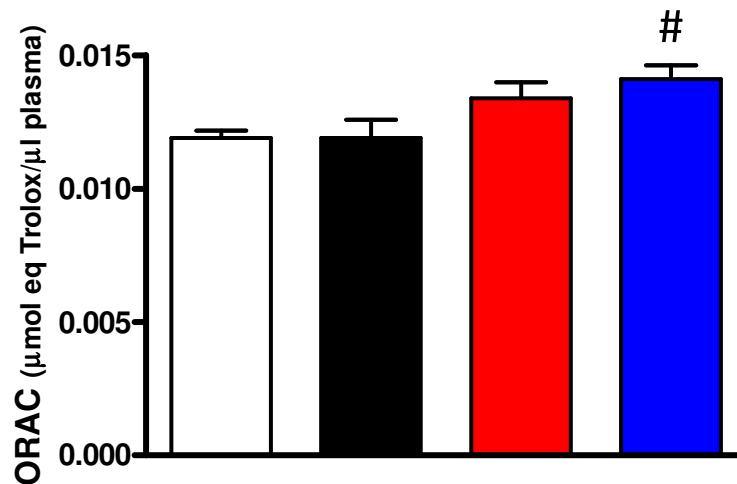


Figura 37. Actividad antioxidante plasmática medida a través de los radicales libres de oxígeno de los grupos de animales al finalizar el estudio. A las ratas se les administraron diferentes productos en el agua de bebida desde la semana 8 hasta la semana 20 de vida. Grupos experimentales: (○) Ratas Zucker delgadas que bebieron agua, (●) ratas Zucker obesas que bebieron agua, (●) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de clara de huevo hidrolizada con pepsina, (●) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de de clara de huevo hidrolizada con aminopeptidasa. Los datos representan los valores medios \pm EEM para un mínimo de 9 animales. Se utilizó el test de la t de Student para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de $P < 0.05$. # $P < 0.05$ ratas Zucker obesas que bebieron agua vs ratas Zucker obesas que recibieron hidrolizado. ORAC (Oxigen-Radical Absorbance Capacity).

El glutatión es una pequeña molécula compuesta por tres aminoácidos (ácido glutámico, glicina y cisteína), que funciona como un agente reductor no enzimático. Esta proteína está controlada homeostáticamente tanto fuera como dentro de la célula, de forma que se utiliza y regenera para mantener niveles adecuados disponibles en todo momento. Puede considerarse el principal antioxidante intracelular, y su déficit puede implicar la muerte celular. Existe en dos formas: la activa o reducida, y la forma oxidada que es inactiva. La forma oxidada raramente sobrepasa el 10% de la concentración total de glutatión, y la vulnerabilidad celular aumenta cuando los niveles de glutatión reducido representan menos del 90% de la concentración total de glutatión. La relación glutatión reducido/glutatión oxidado puede ser, en realidad, un indicador claro del

estrés oxidativo, ya que el glutatión reducido es capaz de eliminar especies reactivas de oxígeno y otros radicales libres. La producción de glutatión es sobre todo importante en el hígado. Allí, esta molécula se utiliza para la conjugación de los compuestos tóxicos y permite así que se expulsen del organismo. Desde el hígado esta molécula puede exportarse a otras partes, siempre y cuando sus niveles sean los adecuados.

La determinación de las concentraciones hepáticas de glutatión en los distintos grupos de ratas Zucker, nos pareció que podía resultar útil y que podía ayudar a conocer e interpretar los mecanismos implicados en las acciones de los hidrolizados estudiados. Las ratas Zucker obesas que bebieron agua presentaron una disminución significativa de los niveles de glutatión reducido en el tejido hepático respecto a los niveles de esta molécula registrados en los animales delgados (Figura 38). Los niveles de glutatión reducido aumentaron significativamente en las ratas Zucker obesas que recibieron el hidrolizado de clara de huevo con pepsina con respecto a las ratas Zucker obesas que bebieron agua. El aumento de los niveles de glutatión hepático también pudo observarse en este modelo animal tras la administración de distintas fibras alimentarias (Sánchez et al., 2008; Belobrajdic et al., 2011). Los niveles de esta molécula no se determinaron en el tejido hepático de los animales obesos que recibieron el hidrolizado de clara de huevo con aminopeptidasa. Aunque como ya hemos comentado anteriormente podría existir un mecanismo antioxidante compensador en estos animales a nivel sistémico, con los resultados obtenidos hasta el momento en este tejido, donde no se observó una mejora en la esteatosis, parece poco probable que exista este mecanismo compensador a nivel local en el hígado.

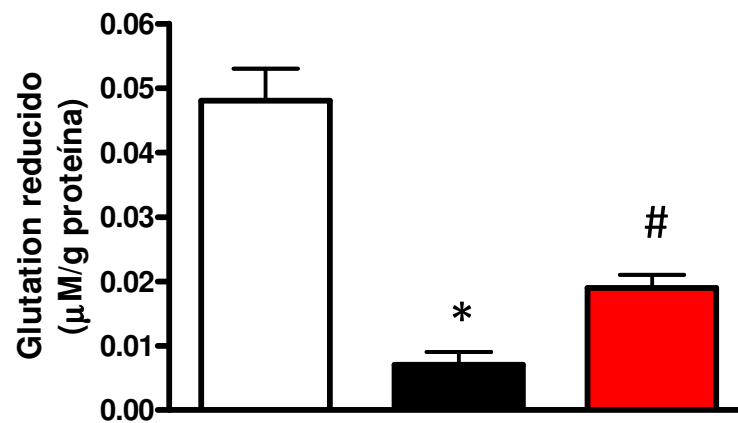


Figura 38. Concentración de glutatión reducido en tejido hepático de los grupos de animales al finalizar el estudio. A las ratas se les administraron diferentes productos en el agua de bebida desde la semana 8 hasta la semana 20 de vida. Grupos experimentales: (○) Ratas Zucker delgadas que bebieron agua, (●) ratas Zucker obesas que bebieron agua, (●) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 0.75 g/kg/día de clara de huevo hidrolizada con pepsina. Los datos representan los valores medios \pm ESM para un mínimo de 9 animales. Se utilizó el test de la t de Student para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de $P < 0.05$. * $P < 0.05$ ratas Zucker delgadas vs ratas Zucker obesas que bebieron agua, # $P < 0.05$ ratas Zucker obesas que bebieron agua vs ratas Zucker obesas que recibieron hidrolizado.

La mejora en los niveles de peroxidación lipídica junto con el aumento de los sistemas antioxidantes evaluados, sugieren que los hidrolizados estudiados podrían utilizarse para mejorar la defensa antioxidante del organismo.

4.4 EFECTOS DEL CONSUMO DE HIDROLIZADOS DE PROTEÍNAS DE CLARA DE HUEVO SOBRE EL METABOLISMO DE LA GLUCOSA EN RATAS ZUCKER OBESAS

La acumulación de grasa y las complicaciones metabólicas que se desarrollan en el SM se relacionan directamente con la IR (Liu et al., 2010; Chentouf et al., 2011). Por ello, decidimos evaluar en el plasma de los animales, los niveles de glucosa y la concentración de insulina. Con estas dos variables se calcularon, además, los índices HOMA-ir, HOMA- β y QUICKI, y llevamos también a cabo un estudio histológico del páncreas en todos los grupos de animales.

En lo que respecta a la glucemia, no se observaron diferencias significativas entre los grupos de ratas Zucker obesas y ratas Zucker delgadas (Figura 39). Las concentraciones plasmáticas de insulina fueron, sin embargo, mayores en las ratas Zucker obesas que en las ratas delgadas (Figura 40). Estos datos se corresponden con lo descrito para este modelo animal, que desarrolla hiperinsulinemia sin presentar niveles plasmáticos de glucosa elevados, y en el que la IR aparece cuando las ratas Zucker obesas son jóvenes, aproximadamente a las 7 semanas de vida (Kobatake et al., 1988; Shimioke et al., 1998; Oana et al., 2005). Tampoco se observaron cambios en los niveles de glucosa en los animales obesos que recibían hidrolizado de clara de huevo, pero en el grupo de animales que consumieron los hidrolizados si se observó una reducción en la concentración de insulina en plasma, que alcanzó solo diferencias significativas en el grupo de animales obesos que recibieron el hidrolizado de clara de huevo con pepsina (Figuras 39 y 40).

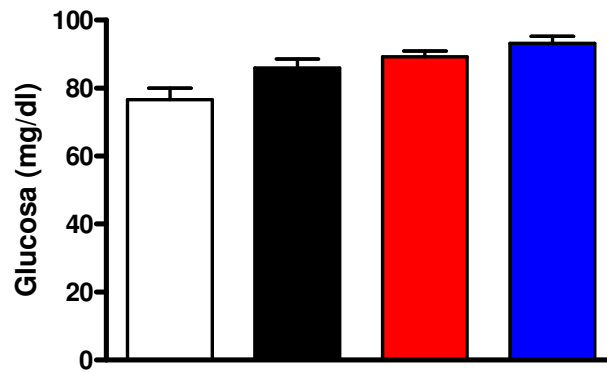


Figura 39. Concentración plasmática de glucosa de los grupos de animales al finalizar el estudio. A las ratas se les administraron diferentes productos en el agua de bebida desde la semana 8 hasta la semana 20 de vida. Grupos experimentales: (○) Ratas Zucker delgadas que bebieron agua, (●) ratas Zucker obesas que bebieron agua, (●) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de clara de huevo hidrolizada con pepsina, (●) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de de clara de huevo hidrolizada con aminopeptidasa. Los datos representan los valores medios \pm EEM para un mínimo de 9 animales. Se utilizó el test de la t de Student para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de $P < 0.05$. No se encontraron diferencias significativas.

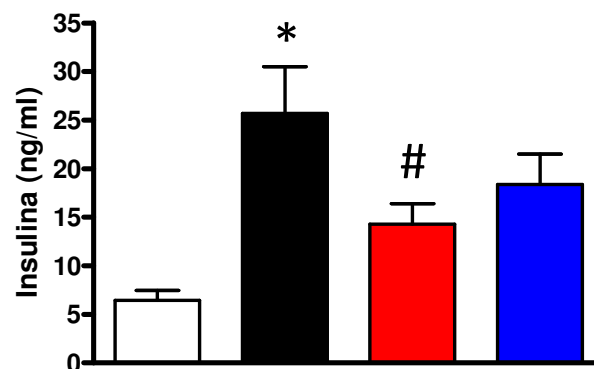


Figura 40. Concentración plasmática de insulina de los grupos de animales al finalizar el estudio. A las ratas se les administraron diferentes productos en el agua de bebida desde la semana 8 hasta la semana 20 de vida. Grupos experimentales: (○) Ratas Zucker delgadas que bebieron agua, (●) ratas Zucker obesas que bebieron agua, (●) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de clara de huevo hidrolizada con pepsina, (●) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de de clara de huevo hidrolizada con aminopeptidasa. Los datos representan los valores medios \pm EEM para un mínimo de 9 animales. Se utilizó el test de la t de Student para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de $P < 0.05$. * $P < 0.05$ ratas Zucker delgadas vs ratas Zucker obesas que bebieron agua, # $P < 0.05$ ratas Zucker obesas que bebieron agua vs ratas Zucker obesas que recibieron hidrolizado.

La acumulación de lípidos en el hígado se ha descrito como un posible mecanismo asociado con el desarrollo de IR (Noto et al., 2006; Morán-Ramos et al., 2012). Nuestros resultados demostraron una disminución significativa del grado de esteatosis en los animales que consumieron el hidrolizado de clara de huevo con pepsina. Por lo tanto, podíamos esperar menores niveles plasmáticos de insulina en estos animales, debido a una mejora de la resistencia a esta hormona. En el estudio llevado a cabo por Wang et al. (2012), en ratas Zucker diabéticas, el consumo de un hidrolizado de lisozima de huevo con alcalasa no produjo por el contrario ningún cambio significativo en los niveles de insulina plasmáticos. Sin embargo, existen distintos estudios con hidrolizados de proteínas alimentarias que también han demostrado una mejora significativa en el metabolismo de la glucosa en modelos experimentales de SM distintos a las ratas Zucker (Bong et al., 2010; Morato et al., 2013), y en pacientes con SM (Beaulieu et al., 2010; Zhu et al., 2010). Recientemente Morato et al. (2013) han observado que el consumo de un hidrolizado de proteínas de suero lácteo es capaz de modificar el metabolismo de la glucosa produciendo, un aumento de las reservas de glucógeno en el músculo, debido a un incremento en los niveles de GLUT-4, modulando la translocación de este transportador de glucosa a la membrana plasmática para mejorar la captación de glucosa en los tejidos. Existen otros componentes bioactivos derivados de los alimentos que han demostrado también una mejora de la IR que se desarrolla en las ratas Zucker, principalmente tras la administración de compuestos fitoquímicos como el resveratrol (Rivera et al., 2009; Gómez-Zorita et al., 2012), la quercetina (Rivera et al., 2008), fitoesteroles derivados del arroz (Justo et al., 2013), o fibras alimentarias (Galisteo et al., 2010; Sánchez et al., 2011; Belobrajdic et al., 2011).

Los índices HOMA y QUICKI son modelos matemáticos que se emplean de forma habitual en infinidad de estudios como indicadores para valorar las situaciones de IR, considerándose muy buenos parámetros predictivos (Pikavance et al., 1999; Gertow et al., 2006; Asghar y Lokhandwala, 2006). Las ratas Zucker obesas presentaron valores significativamente más altos de HOMA-ir (Figura 41A) y HOMA-

β (Figura 41B), así como un valor más bajo de QUICKI (Figura 41C) que las ratas Zucker delgadas. Estos resultados resultan lógicos ya que los animales obesos de esta raza muestran IR (Zucker, 1962). Estos resultados indican que existe además una disfunción de las células β -pancreáticas en las ratas Zucker obesas. Las ratas Zucker obesas que recibieron los hidrolizados de huevo presentaron valores más bajos de HOMA-ir y HOMA- β , así como un valor más alto de QUICKI que las ratas Zucker obesas que bebieron agua, observándose diferencias significativas para los tres índices en el caso de las ratas Zucker obesas que consumieron el hidrolizado de clara de huevo con pepsina. Estos resultados en la mejora de la función pancreática eran esperables, teniendo en cuenta que no se observaron diferencias en las concentraciones plasmáticas de glucosa y disminuyeron de forma significativa los niveles de insulina plasmáticos en este grupo de animales obesos. Al mostrar los tejidos menor resistencia a la insulina, pueden captarla mejor y los requerimientos de esta hormona disminuyen. Por este motivo, la capacidad secretora de las células β -pancreáticas no necesita ser tan alta. Bong et al. (2010), también observaron una disminución en el índice HOMA-ir tras la administración de hidrolizados de proteínas de maíz en ratas con obesidad inducida por dieta, y estos resultados también se obtuvieron en ratas Zucker que consumieron fitoquímicos derivados de la planta de arroz (Justo et al., 2013). Más aún, el incremento en el valor del índice QUICKI observado en las ratas Zucker obesas que consumieron el hidrolizado de pepsina indica que este grupo de animales desarrollan además un mecanismo compensador para aumentar la sensibilidad a la insulina. La administración de péptidos de origen marino a pacientes con SM también consiguió demostrar la capacidad de estos compuestos para aumentar este índice y, por lo tanto, los niveles de sensibilidad a la insulina (Zhu et al., 2010)

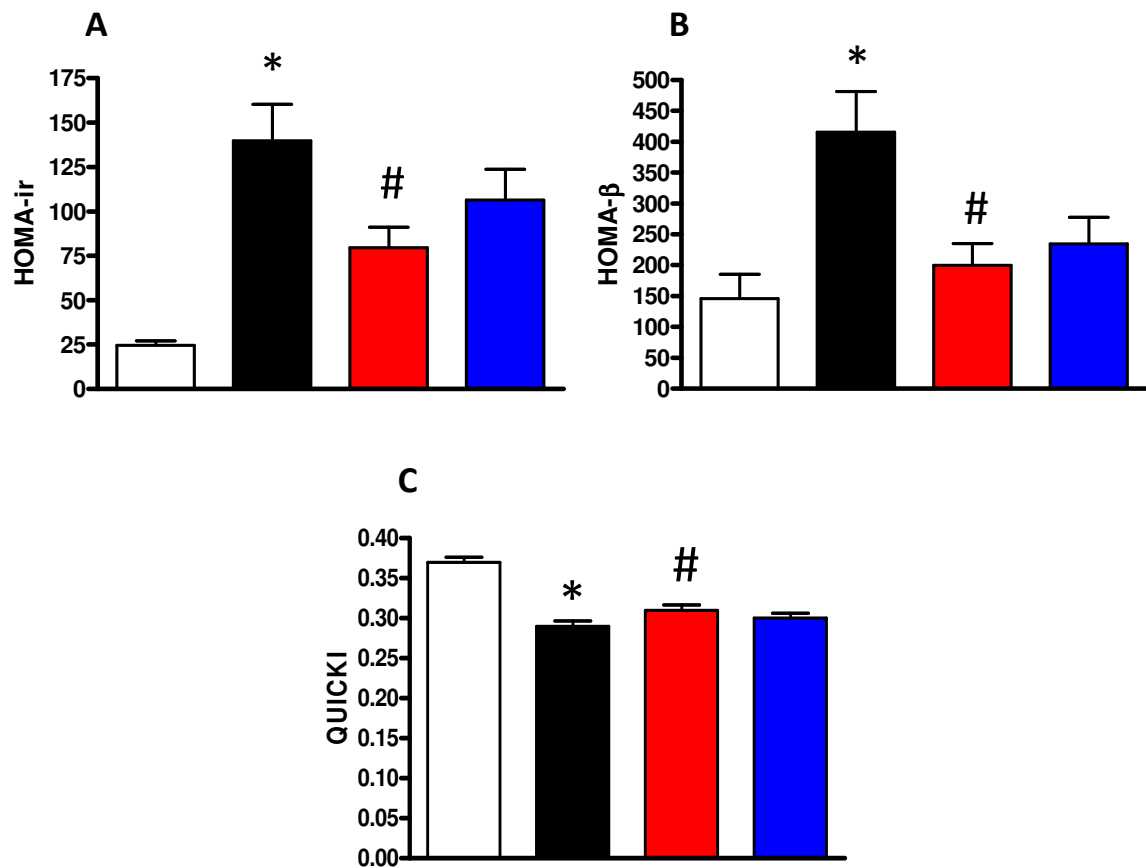


Figura 41. Índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR) (A), índice de secreción de insulina en las células β -pancreáticas (HOMA- β) (B) e índice cuantitativo de sensibilidad a la insulina (QUICKI) (C) de todos los grupos de animales al finalizar el estudio. A las ratas se les administraron diferentes productos en el agua de bebida desde la semana 8 hasta la semana 20 de vida. Grupos experimentales: (○) Ratas Zucker delgadas que bebieron agua, (●) ratas Zucker obesas que bebieron agua, (●) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de clara de huevo hidrolizada con pepsina, (●) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de de clara de huevo hidrolizada con aminopeptidasa. Los datos representan los valores medios \pm EEM para un mínimo de 9 animales. Se utilizó el test de la t de Student para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de $P < 0.05$. * $P < 0.05$ ratas Zucker delgadas vs ratas Zucker obesas que bebieron agua, # $P < 0.05$ ratas Zucker obesas que bebieron agua vs ratas Zucker obesas que recibieron hidrolizado.

A la vista de los resultados obtenidos en las concentraciones plasmáticas de insulina y en los índices HOMA y QUICKI, decidimos llevar a cabo también el estudio histológico del páncreas. Al observar las células del páncreas de las ratas delgadas al microscopio se vio que no presentaban signos de patología, y tampoco se

observaron linfocitos T ni B extravasculares. El tamaño medio de los islotes y su apariencia fue totalmente normal. Por el contrario, las ratas Zucker obesas que bebieron agua presentaron importantes cambios en la morfología de los islotes, estos presentaban hipertrofia, dando lugar a células mucho más alargadas de lo normal, con formas irregulares. Estos cambios en la morfología de los islotes pancreáticos de las ratas Zucker obesas ya han sido previamente descritos y se han asociado con daños en la funcionalidad de las células β -pancreáticas. Estas alteraciones pueden aparecer incluso en etapas tempranas de la vida de estos animales (Augstein y Salzsieder, 2009; Jones et al., 2010). La hipertrofia en las células del páncreas también se observó en las ratas Zucker obesas que recibieron los diferentes hidrolizados. El tamaño medio de los islotes que presentaron las ratas delgadas fue normal ($23.5 \times 10^3 \mu\text{m}^2$), pero este tamaño se duplicó en los islotes de las ratas Zucker obesas que bebieron agua y las que recibieron el hidrolizado de clara de huevo con pepsina. El tamaño de los islotes llegó incluso a triplicarse en el caso de las ratas obesas que consumieron el hidrolizado de clara de huevo con aminopeptidasa (Figura 42 y 43). Los resultados obtenidos en este último grupo de animales confirman una vez más que el consumo de este hidrolizado no mejora, e incluso en ocasiones agrava, algunas de las alteraciones metabólicas que se desarrollan en las ratas Zucker obesas.

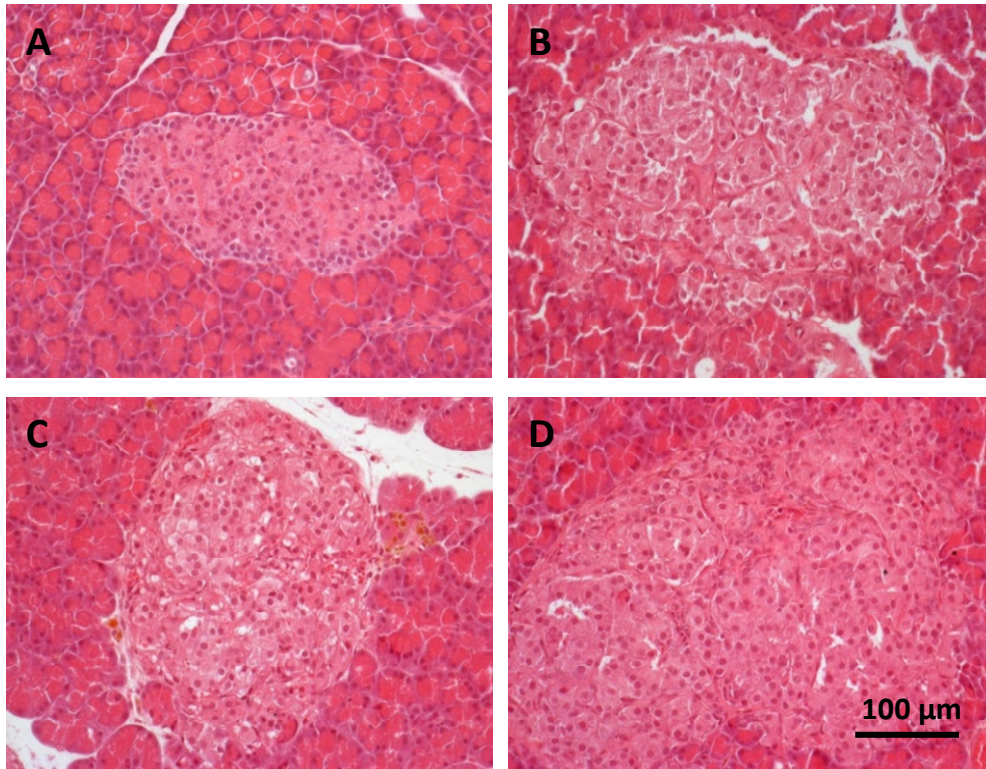


Figura 42. Imágenes tomadas en el microscopio óptico (objetivo 40x) de cortes de páncreas teñidos con hematoxilina–eosina de diferentes grupos de ratas al finalizar el estudio. A las ratas se les administraron diferentes productos en el agua de bebida desde la semana 8 hasta la semana 20 de vida. Grupos experimentales: **(A)** Ratas Zucker delgadas que bebieron agua, **(B)** ratas Zucker obesas que bebieron agua, **(C)** ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de clara de huevo hidrolizada con pepsina, **(D)** ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de de clara de huevo hidrolizada con aminopeptidasa.

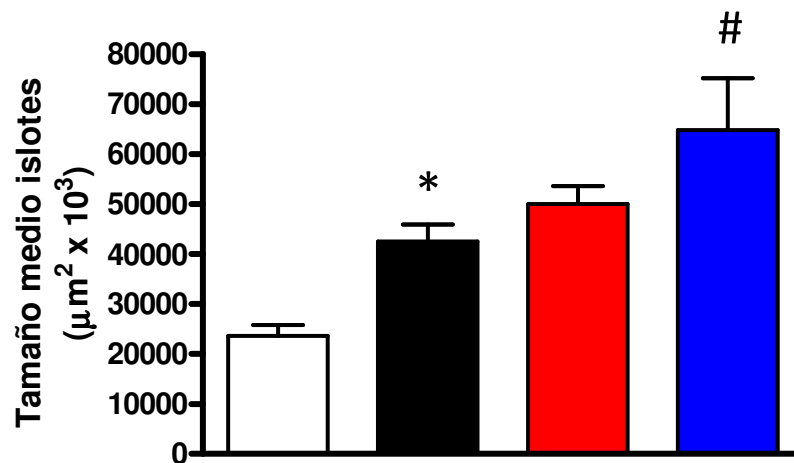


Figura 43. Tamaño medio de los islotes pancreáticos de los diferentes grupos de ratas al finalizar el estudio. A las ratas se les administraron diferentes productos en el agua de bebida desde la semana 8 hasta la semana 20 de vida. Grupos experimentales: (○) Ratas Zucker delgadas que bebieron agua, (●) ratas Zucker obesas que bebieron agua, (●) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de clara de huevo hidrolizada con pepsina, (●) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de clara de huevo hidrolizada con aminopeptidasa. Los datos representan los valores medios \pm EEM para un mínimo de 9 animales. Se utilizó el test de la t de Student para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de $P < 0.01$. * $P < 0.01$ ratas Zucker delgadas vs ratas Zucker obesas que bebieron agua, # $P < 0.01$ ratas Zucker obesas que bebieron agua vs ratas Zucker obesas que recibieron hidrolizado.

Se ha descrito que los pacientes con SM pueden tener también un mayor riesgo de sufrir enfermedades microvasculares y neuropatía periférica (Oltman et al., 2008). La neuropatía periférica se considera un trastorno multifactorial cuya etiología no es del todo conocida. Algunos autores la describen como una enfermedad vascular que ocasiona una isquemia en el nervio, alterando en consecuencia la función del mismo (Cameron et al., 1991; Cameron et al., 1994). Su aparición se ha relacionado también con la activación de cascadas inflamatorias en el sistema nervioso central y periférico (Ji et al., 2004; Uceyler et al., 2007; Ianitti et al., 2012). Otros investigadores han propuesto que esta enfermedad es causada por un aumento en el flujo de glucosa a través de la vía de la aldosa reductasa, lo que provoca un defecto en la actividad de la ATPasa Na^+/K^+ que altera la señal de transducción en las fibras nerviosas periféricas (Obrasova et al., 2002; Chen et al., 2011). La neuropatía periférica se desarrolla en sujetos con prediabetes y SM

incluso antes de desarrollar hiperglicemia (Lupachyk et al., 2012). En la actualidad, el tratamiento farmacológico desarrollado para tratar esta dolencia tiene limitada eficacia y efectividad, además de bastantes complicaciones, efectos secundarios y dependencia (Vorobeychik et al., 2011; Tesfaye et al., 2011).

La posible presencia de neuropatía periférica se evaluó utilizando el test de los filamentos de Von Frey una semana antes de finalizar el estudio. Como ilustra la figura 44, las ratas Zucker obesas presentaron un umbral de sensibilidad mecánica significativamente menor que las ratas delgadas, hecho que se asocia con la presencia de alodinia táctil. Se ha descrito que las ratas Zucker obesas desarrollan disfunción microvascular y neuronal independientemente de la hiperglucemia (Oltman et al., 2008). Este modelo exhibe, de hecho, un déficit en la conducción nerviosa, una pequeña disfunción sensorial de la fibra nerviosa y anomalías bioquímicas en los nervios periféricos, la médula espinal y el “vasa nervorum” (Oltman et al., 2006; Obrasova et al., 2007; Oltman et al., 2008; Vincent et al., 2009; Watcho et al., 2010; Lupachyk et al., 2012), por lo que este modelo se considera muy adecuado para investigar la contribución de la neuropatía periférica en situaciones de prediabetes, como la que se observa en los animales de nuestro estudio.

Otros investigadores han propuesto que la neuropatía diabética se relaciona con el aumento del estrés oxidativo que se produce en ratas Zucker debido a la elevada producción de anión superóxido y peroxinitritos (Lupachyk et al., 2012). Este incremento del estrés oxidativo puede producir un daño microvascular en las arteriolas epineurales del nervio ciático y ocasionar una disfunción en el mismo en ratas Zucker obesas de 20 semanas de vida (Coppey et al., 2000; Coppey et al., 2001; Oltman et al., 2008). Recientemente se ha propuesto también que la presencia de dolor por neuropatía presenta una activación de rutas pro-inflamatorias, con un incremento de los niveles de TNF- α en el plasma de ratas Zucker (Iannitti et al., 2012), ratas Zucker diabéticas (Galloway y Chattopadhyay, 2013) y en pacientes diabéticos (Uceyler et al., 2007). En esta Tesis Doctoral las

ratas Zucker obesas que recibieron los hidrolizados de clara de huevo presentaron un aumento significativo del umbral de sensibilidad mecánica en comparación con las ratas Zucker obesas que bebieron agua (Figura 44). Estos resultados podrían relacionarse con una mejora en el estrés oxidativo en los animales que consumieron los hidrolizados de clara de huevo. Especialmente en el grupo de ratas Zucker tratadas con el hidrolizado de clara de huevo con pepsina, que mostraron una disminución significativa en los niveles de MDA, un aumento de los sistemas antioxidantes y una disminución del estado inflamatorio, con unos niveles de TNF- α en plasma inferiores a los de los animales obesos que bebieron agua. Existen muy pocos estudios que evalúen la neuropatía periférica tras la administración de componentes alimentarios (Lupachyk et al., 2012), pero si existen algunos trabajos en los que se evalúa la actividad antinociceptiva y ésta aumenta tras el consumo de estos compuestos (Takeuchi et al., 2003; Yamaguchi et al., 2009; Tavares et al., 2013).

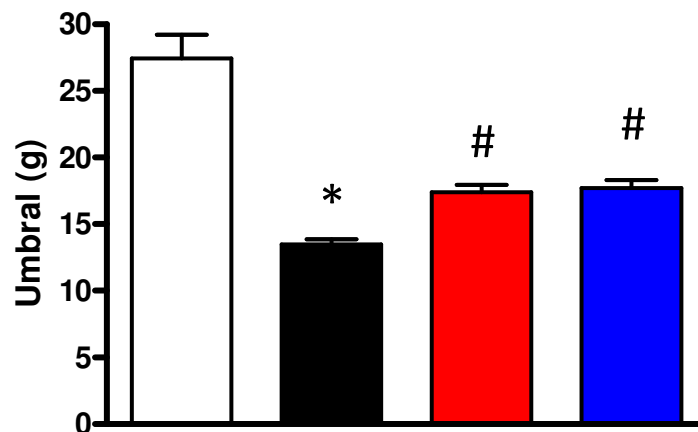


Figura 44. Umbral de sensibilidad mecánica obtenido en los grupos de animales a las 18 semanas de vida. A las ratas se les administraron diferentes productos en el agua de bebida desde la semana 8 hasta la semana 20 de vida. Grupos experimentales: (○) Ratas Zucker delgadas que bebieron agua, (●) ratas Zucker obesas que bebieron agua, (●) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de clara de huevo hidrolizada con pepsina, (●) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de clara de huevo hidrolizada con aminopeptidasa. Los datos representan los valores medios \pm EEM para un mínimo de 9 animales. Se utilizó el test de la t de Student para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de $P < 0.05$. * $P < 0.05$ ratas Zucker delgadas vs ratas Zucker obesas que bebieron agua, # $P < 0.05$ ratas Zucker obesas que bebieron agua vs ratas Zucker obesas que recibieron hidrolizado.

4.5 EFECTOS DEL CONSUMO DE HIDROLIZADOS DE PROTEÍNAS DE CLARA DE HUEVO SOBRE EL SISTEMA CARDIOVASCULAR EN RATAS ZUCKER OBESAS

La relación entre los distintos componentes del SM (obesidad, dislipemia, IR, etc) y las enfermedades cardiovasculares es ampliamente conocida y estudiada (Mancia et al., 2007; Wassink et al., 2007), y se sabe también que la HTA se considera unos de los principales factores de riesgo para el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares (Maraj et al., 2013). Por todo ello, en la presente Tesis Doctoral, nos propusimos determinar el efecto de los diferentes hidrolizados de clara de huevo sobre la presión arterial, la función cardiaca y la función vascular de las ratas Zucker, ya que estas variables pueden aparecer también alteradas en los pacientes con SM.

En nuestro estudio, el grupo de ratas Zucker obesas mostró valores de PAS significativamente mayores que los de las ratas Zucker delgadas. Sin embargo no se observaron diferencias significativas en los valores de presión arterial diastólica (PAD), presión arterial media (PAM) o frecuencia cardiaca (Fc) entre las ratas Zucker delgadas y las ratas Zucker obesas. El consumo de los hidrolizados de clara de huevo no ocasionó ningún cambio en los niveles de PAS, PAD y Fc de las ratas Zucker obesas (Figura 45).

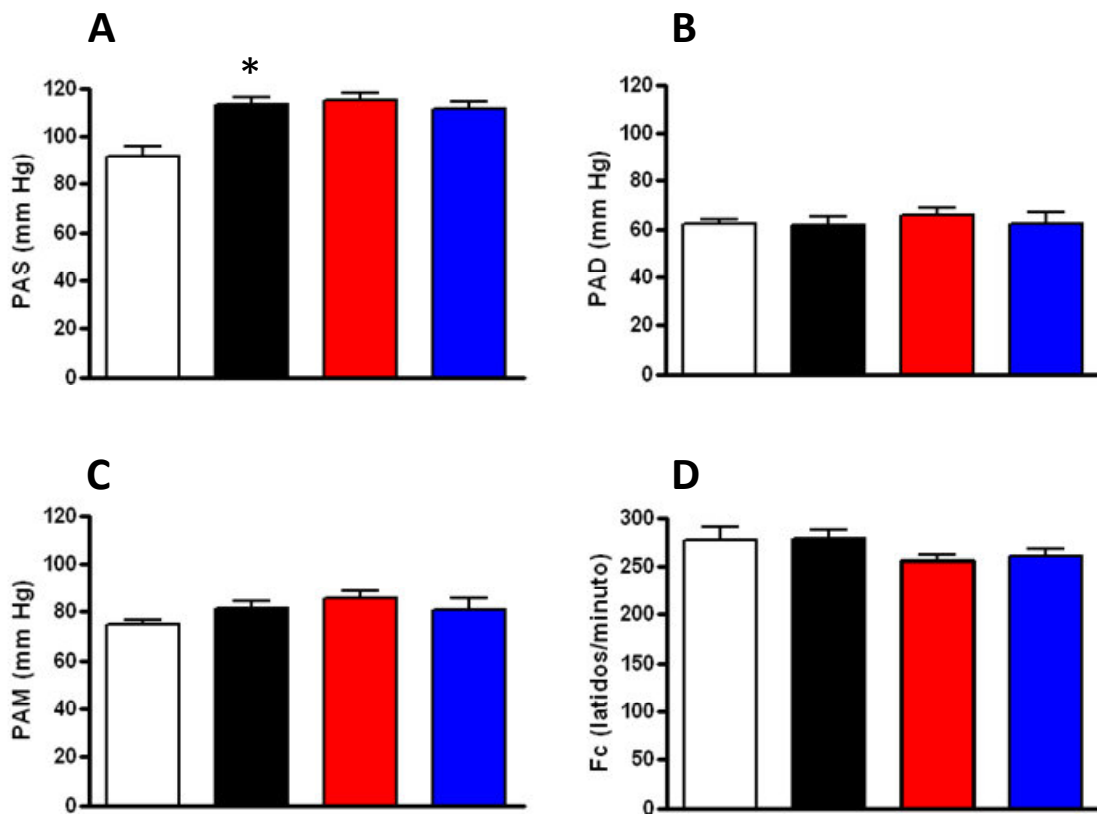


Figura 45. Representación de los parámetros de presión arterial basal (10 minutos después de la canulación de la carótida) de los distintos grupos de ratas. A) presión arterial sistólica (PAS), B) presión arterial diastólica (PAD), C) presión arterial media (PAM) y D) frecuencia cardíaca (Fc). Grupos experimentales: (○) Ratas Zucker delgadas que bebieron agua, (●) ratas Zucker obesas que bebieron agua, (●) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de clara de huevo hidrolizada con pepsina, (●) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de clara de huevo hidrolizada con aminopeptidasa. Los datos representan los valores medios \pm EEM para un mínimo de 8 animales. Se utilizó una t de Student para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de $P < 0.05$. * $P < 0.05$ ratas Zucker delgadas vs ratas Zucker obesas que bebieron agua.

En la actualidad, la edad de aparición de HTA en las ratas Zucker obesas no está bien definida y se ha discutido ampliamente si estas ratas pueden, en realidad, considerarse hipertensas o no. Los valores de presión arterial obtenidos en nuestro estudio son similares a los publicados en otros estudios en los que también se encuentran diferencias significativas entre los valores de presión arterial de las ratas Zucker obesas y sus controles delgados incluso antes de las 20 semanas de vida

(Zemel et al., 1992; Alonso-Galicia et al., 1996; Nishimatsu et al., 2005; Oltman et al., 2006; Belobrajdic et al., 2011). Sin embargo, otros estudios retrasan su aparición hasta aproximadamente las 24 semanas de vida (Cox y Kikta, 1992; Wu et al., 1996; Yuen et al., 1996; Arvola et al., 1999; He y MacLeod, 2002). Estas discrepancias pueden, en parte, deberse a diferencias metodológicas entre los distintos estudios. Principalmente, pueden influir las diferencias en las técnicas de medida, y/o las diferencias en la edad y/o sexo de los animales estudiados (Alonso-Galicia et al., 1996). Los diferentes estudios llevados a cabo sugieren que cuando se utilizan técnicas de medida indirecta para registrar los valores de presión arterial no se alcanzan diferencias significativas entre las ratas Zucker obesas y las ratas Zucker delgadas (Levin et al., 1984; O'Donnell et al., 1985; Mahle et al., 1986; Barringer et al., 1989). Sin embargo, cuando se utiliza la medida de presión directa tanto en ratas anestesiadas como conscientes, los datos indican que las ratas Zucker obesas tienen valores de presión arterial superiores a los de las ratas Zucker delgadas (Wickler et al., 1982; Boese et al., 1985; Kasiske et al., 1985; Kurtz et al., 1989; Zemel et al., 1990), hecho que también observamos en nuestro estudio. Kurtz et al. (1989) señalaron que las ratas Zucker obesas podrían considerarse pre-hipertensas cuando son jóvenes, e hipertensas a partir de las 25-30 semanas de vida. Sin embargo, es importante comprender que la utilización de las ratas Zucker obesas a partir de las 30 semanas de vida es complicada. A esa edad la obesidad está muy desarrollada en los animales y su salud empieza a deteriorarse. Los estudios con animales de edad avanzada pueden además resultar costosos y, desde el punto de vista técnico, el manejo de ratas Zucker de 30 semanas de vida puede ser complicado.

La ingesta de los hidrolizados de clara de huevo no ocasionó ninguna modificación en los parámetros de presión arterial en las ratas Zucker obesas (Figura 45), a pesar de que éstos habían mostrado una importante actividad inhibidora de la ECA *in vitro*, correspondiente a valores de IC₅₀ de 50 y 150 µg/ml, en el caso del hidrolizado con pepsina (Tabla 17) y aminopeptidasa (Tabla 14). Como

ya se ha indicado, varios estudios sobre hidrolizados de proteínas alimentarias (Contreras et al., 2009; Correa et al., 2011; Martínez-Maqueda et al., 2012; Fernández-Musoles et al., 2013), entre las que se encuentran proteínas derivadas de la clara de huevo (Miguel y Aleixandre, 2005; Miguel et al., 2007), han señalado efectos antihipertensivos en modelos animales de hipertensión. Hay sin embargo que tener en cuenta que la mayoría de estos estudios en los que se evalúa el efecto antihipertensivo de péptidos de origen alimentario se ha realizado en modelos experimentales de HTA, principalmente en ratas SHR (Miguel et al., 2007; Ruiz-Giménez et al., 2012; Ioune et al., 2013). Más concretamente, nuestro grupo de investigación ya había demostrado en estudios previos el efecto antihipertensivo de un hidrolizado de proteínas de la clara de huevo con pepsina en ratas espontáneamente hipertensas. Este hidrolizado no modificó sin embargo los niveles de presión arterial en las ratas Wistar-Kyoto, que son el control normotenso de las ratas hipertensas (Miguel et al., 2005). Por ello, no nos resultó sorprendente que los hidrolizados no produjeran modificación alguna sobre los parámetros de presión arterial en las ratas Zucker obesas, ya que a las 20 semanas, aunque estos animales muestran valores de PAS más elevados que sus controles, no alcanzaban valores de presión arterial muy altos, sobre todo en la PAD, más propios de la condición de hipertensión. Estos datos podrían avalar confirman la seguridad del consumo de estos productos en aquellos sujetos normotensos, ya que el efecto antihipertensivo que pudieran tener estos hidrolizados requiere un claro desarrollo de hipertensión. Sin embargo, el efecto antihipertensivo de otros componentes alimentarios sí que ha podido demostrarse en el modelo de ratas Zucker, aunque en estos estudios los animales superaban las 25 semanas de vida (Galisteo et al., 2005; Rivera et al., 2008).

Cuando evaluamos los parámetros de función cardiaca (función ventricular izquierda y presión de perfusión en coronarias) no se observaron diferencias significativas en la presión desarrollada por el ventrículo izquierdo (PDVI), en la presión diastólica final (PDF) o en la presión de perfusión de las coronarias (PPC)

entre el grupo de ratas Zucker delgadas y el grupo de ratas Zucker obesas. Sin embargo la Fc fue significativamente menor en las ratas Zucker obesas que en sus controles delgados (Figura 46). Así, ni la función ventricular izquierda, ni el flujo coronario parecen estar alterados en los animales obesos respecto a los delgados. Sin embargo, el hecho de observar una ligera bradicardia en los animales obesos podría sugerir que estamos en una fase inicial de disfunción autonómica cardíaca en los animales, ya que se sabe que el ritmo cardíaco refleja la actividad del sistema nervioso autónomo (Brito Díaz et al., 2013). Esta actividad se aprecia mucho mejor en la preparación de corazón aislado donde se evalúa de forma indirecta el ritmo sinusal que en la medida de presión directa, donde otros sistemas compensadores podrían contrarrestar la alteración autonómica cardíaca.

El consumo durante 12 semanas de los diferentes hidrolizados de clara de huevo tampoco modificó ninguna de estas de estas variables (PDVI, PDF o PPC). Sin embargo, el grupo de ratas Zucker que consumía el hidrolizado de clara de huevo con aminopeptidasa mostró un aumento significativo en la Fc respecto a los animales obesos que bebían agua (Figura 46). Estos datos sugieren que el consumo de los hidrolizados no afecta a la función cardíaca y en el caso del hidrolizado de clara de huevo con aminopeptidasa es capaz de aumentar los valores más bajos de Fc observados en los animales obesos, lo que podría sugerir una corrección en la disfunción autonómica cardíaca. Existe algún estudio en el que también se ha descrito que las ratas Zucker obesas tienen los niveles de Fc más bajos (Alonso-Galicia et al., 1996). Sin embargo, este dato contrasta con lo observado en los estudios llevados a cabo con perros obesos y con humanos obesos, en los que la Fc así como la presión arterial aumentan de forma significativa cuando se comparan estos valores con los de sus controles delgados (Reisen et al., 1978; Rocchini et al., 1987; Rocchini et al., 1989).

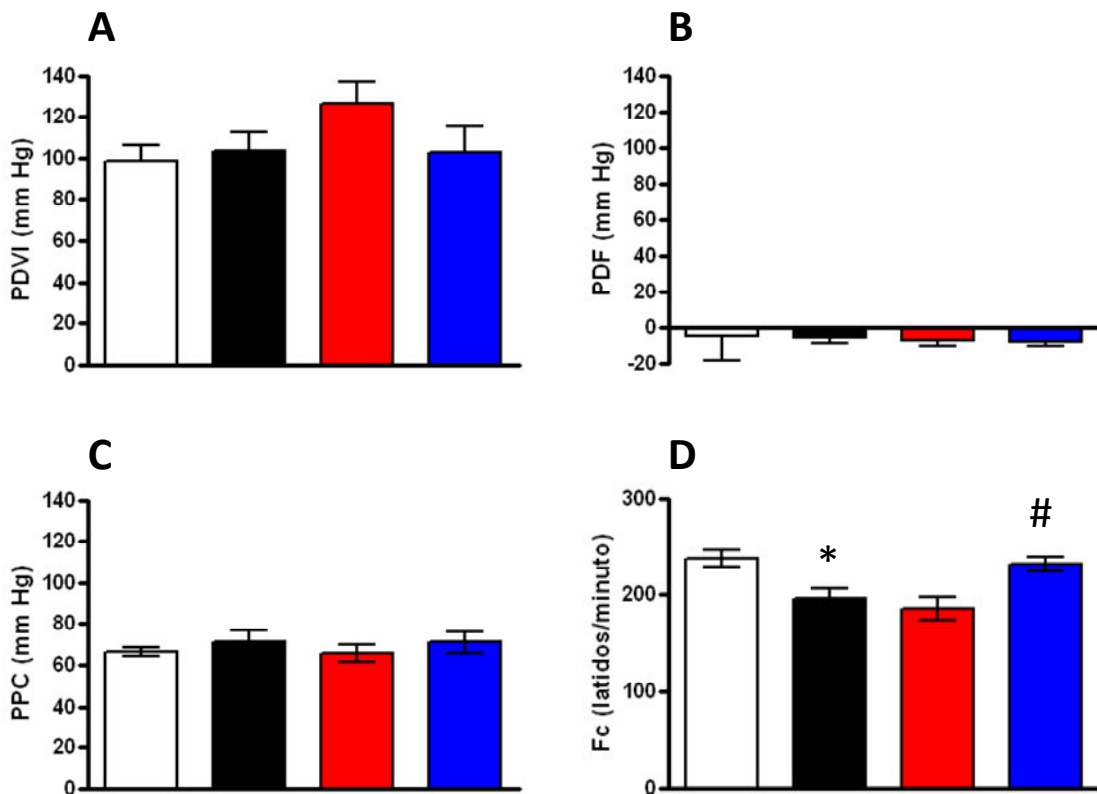


Figura 46. Representación de los parámetros de función cardíaca basal (tras 20 minutos de estabilización) de los distintos grupos de ratas. A) presión diastólica del ventrículo izquierdo (PDVI), B) presión diastólica final (PDF), C) presión parcial de la coronarias (PPC) y D) frecuencia cardíaca (Fc). Grupos experimentales: (○) Ratas Zucker delgadas que bebieron agua, (●) ratas Zucker obesas que bebieron agua, (●) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de clara de huevo hidrolizada con pepsina, (●) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de clara de huevo hidrolizada con aminopeptidasa. Los datos representan los valores medios \pm EEM para un mínimo de 8 animales. Se utilizó una t de Student para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de $P < 0.05$. * $P < 0.05$ ratas Zucker delgadas vs ratas Zucker obesas que bebieron agua, # $P < 0.05$ ratas Zucker obesas que bebieron agua vs ratas Zucker obesas que recibieron hidrolizado.

Cuando se analizaron los índices de masa del corazón (IMC) y el índice de masas del ventrículo izquierdo (IMVI) en los animales obesos y delgados, se observó que las ratas Zucker obesas presentaron valores IMC e IMVI menores que sus correspondientes controles delgados. Hay estudios que establecen que en situaciones de obesidad existe un aumento de apoptosis en los cardiomiocitos, y este hecho podría reflejarse de manera indirecta en los datos obtenidos en ratas

obesas respecto a ratas delgadas (Lee et al., 2007). Lo que si podemos afirmar con estos datos y su relación con nuestros resultados de la función cardiaca es que en nuestro modelo experimental a las 20 semanas de vida no tenemos disfunción ventricular izquierda. Tampoco se observaron diferencias en los índices de masas entre el grupo de ratas obesas y el grupo de ratas que consumía el hidrolizado de clara de huevo con pepsina. Sin embargo, el grupo de ratas que ingería el hidrolizado de clara de huevo con aminopeptidasa mostró un aumento significativo del IMC respecto al grupo de ratas obesas que bebían agua (Tabla 21). Aunque dentro de este estudio no se ha comprobado, es posible que este hidrolizado de clara de huevo con aminopeptidasa proteja de la apoptosis mencionada.

Tabla 21. Índice de masas del corazón (IMC) e índice de masas del ventrículo izquierdo (IMVI) obtenidos en las ratas al finalizar el estudio. Los datos representan los valores medios \pm EEM para un mínimo de 8 animales. Se utilizó el test de la t de Student para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de $P < 0.05$. * $P < 0.05$ ratas Zucker delgadas vs ratas Zucker obesas que bebieron agua, # $P < 0.05$ ratas Zucker obesas que bebieron agua vs ratas Zucker obesas que recibieron hidrolizado.

	Ratas Zucker delgadas	Ratas Zucker Obesas	Ratas Zucker Obesas-pepsina	Ratas Zucker Obesas-aminopeptidasa
IMC	3.63 \pm 0.16	2.72 \pm 0.09*	2.78 \pm 0.14	3.00 \pm 0.09#
IMVI	2.67 \pm 0.03	2.05 \pm 0.04*	2.01 \pm 0.09	2.09 \pm 0.06

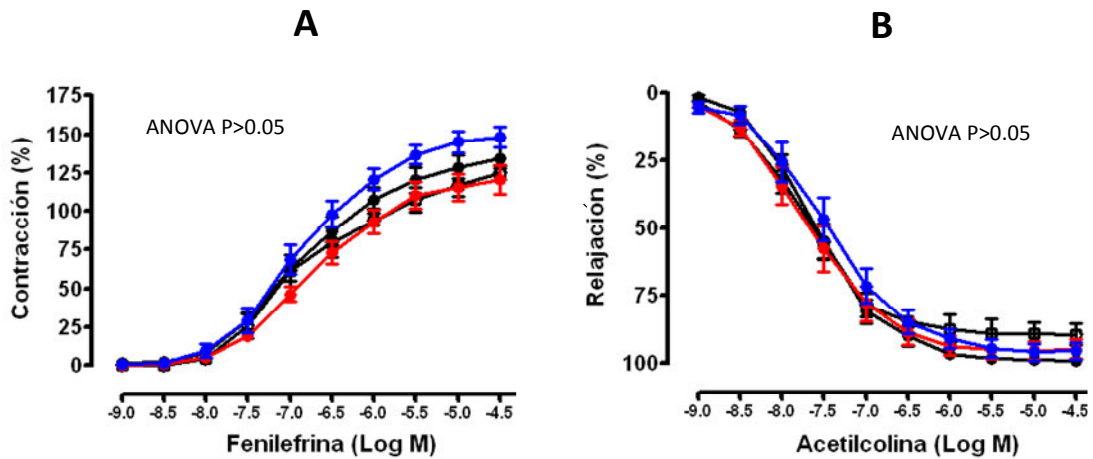
Existen varios factores que controlan los niveles de presión arterial en el organismo. Los cambios en la reactividad del músculo liso vascular se consideran como uno de los posibles mecanismos de acción implicados en la aparición de HTA. Se sabe también que el endotelio vascular juega un papel esencial en la regulación del flujo sanguíneo y en el mantenimiento del tono vascular mediante la liberación de factores vasodilatadores y vasoconstrictores (Siddiqui y Hussain, 2007). Además, hoy día resulta indudable que el estrés oxidativo, ocasionado por el desequilibrio entre la producción y neutralización de radicales libres, puede facilitar un aumento

en los niveles de presión arterial. Desde hace muchos años se reconoce también la importancia del sistema renina-angiotensina en el control de la presión arterial.

Por todo ello, en esta Tesis Doctoral decidimos investigar si alguno de estos mecanismos está alterado en nuestro modelo experimental, si podrían verse modificados con el consumo de los hidrolizados de proteínas de huevo y, de este modo, se mejorarían algunas de las complicaciones cardiovasculares observadas en situaciones de SM. Se evaluó por ello, la función contráctil y vasodilatadora de arterias de conductancia (aorta) y de resistencia (mesentéricas).

Al finalizar el estudio (cuando las ratas tenían 20 semanas de vida), las curvas de contracción en respuesta a fenilefrina (Phe) en anillos de aorta del grupo de ratas Zucker delgadas y del grupo de ratas Zucker obesas resultaron similares, no observándose alteraciones en la función contráctil del vaso. Tampoco se observaron diferencias significativas en las curvas de contracción entre los grupos de ratas obesas que consumían los hidrolizados de clara de huevo y las ratas Zucker obesas que bebían agua (Figura 47A). La administración de acetilcolina (Ach) en los anillos de aorta precontraídos con Phe ocasionó una relajación de este tejido que fue dosis dependiente, sin observarse diferencias significativas entre la respuesta vasodilatadora del grupo de ratas Zucker delgadas y la del grupo de ratas Zucker obesas, no observándose tampoco una alteración en la función vasodilatadora de la aorta en situación de obesidad a las 20 semanas de vida en estos animales. Tampoco se encontraron diferencias significativas en la función vasodilatadora de la aorta de las ratas Zucker obesas y la aorta de los grupos de ratas obesas que consumían hidrolizado de clara de huevo (Figura 47B). En resumen, en nuestro estudio no se observaron diferencias en la función contráctil o dilatadora de las preparaciones de aorta de los diferentes grupos. Sin embargo, otros investigadores habían encontrado una mayor respuesta a Ach en la aorta de ratas Zucker obesas con 32 semanas de vida (Subramanian y MacLeod, 2003). De nuevo, variaciones en

la edad de los animales y, por tanto, en la situación fisiopatología que la acompaña, podrían justificar estas diferencias con otros autores.



La respuesta vasoconstrictora inducida por Phe en las arterias mesentéricas de resistencia de las ratas Zucker delgadas fue dosis dependiente, y similar a la contracción producida por este agonista α -adrenérgico en las arterias mesentéricas de resistencia del grupo de ratas Zucker obesas (Figura 48A). En el grupo de ratas Zucker obesas que consumían el hidrolizado de clara de huevo con pepsina se observó una respuesta vasoconstrictora significativamente menor que en el grupo de ratas obesas que bebían agua (Figura 48B). Sin embargo no se observaron diferencias significativas en la respuesta vasoconstrictora entre el grupo de ratas Zucker obesas que consumía el hidrolizado de clara de huevo con aminopeptidasa y el grupo de ratas obesas que bebía agua (Figura 48C).

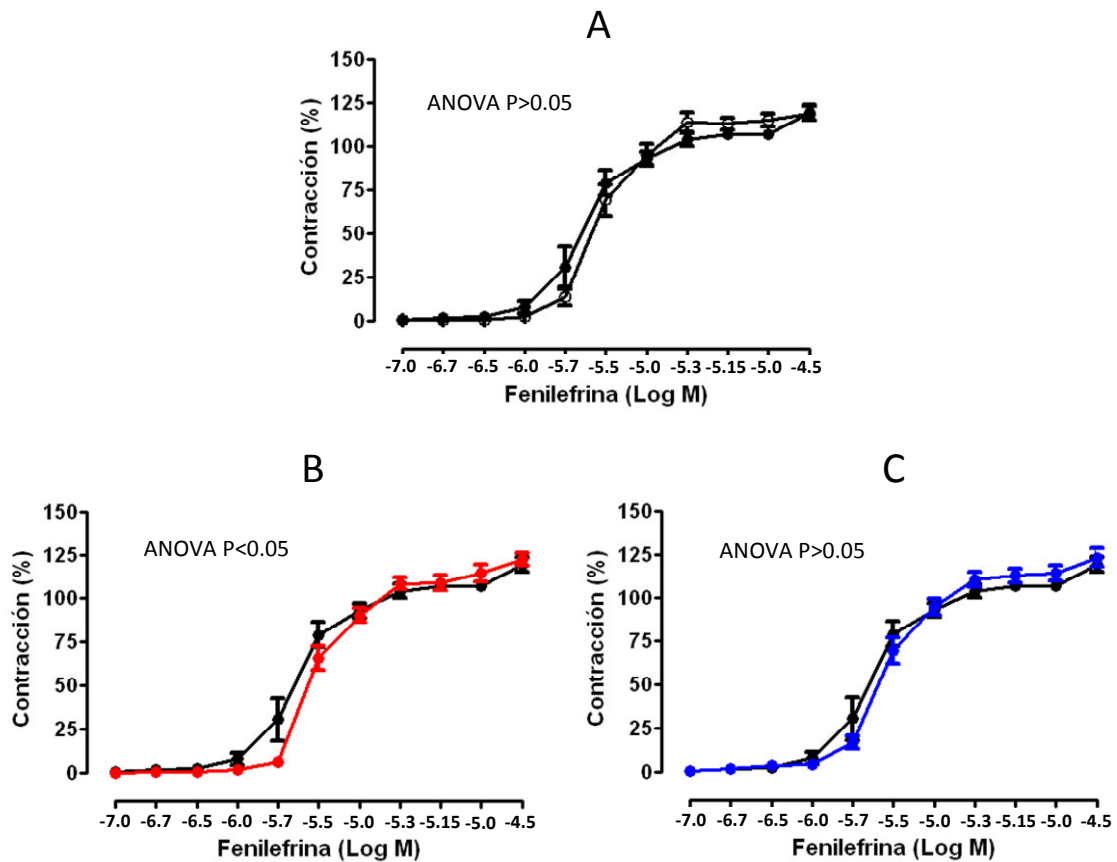


Figura 48. Curvas concentración-respuesta inducidas por fenilefrina de diferentes grupos de ratas en arterias mesentéricas de resistencia. Grupos experimentales: (○) Ratas Zucker delgadas que bebieron agua, (●) ratas Zucker obesas que bebieron agua, (●) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de clara de huevo hidrolizada con pepsina, (●) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de clara de huevo hidrolizada con aminopeptidasa. Los datos representan los valores medios \pm EEM para un mínimo de 8 animales. Se utilizó un ANOVA de dos vías para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de $P < 0.05$.

La administración de Ach (1 nM- 10 μ M) a segmentos pre-contraídos con Phe originó, al igual que en las preparaciones de aorta, una respuesta vasodilatadora concentración-dependiente en las arterias mesentéricas de resistencia. La respuesta vasodilatadora fue mayor en arterias mesentéricas de resistencia de las ratas Zucker delgadas que en las de las ratas Zucker obesas (Figura 49A). Las arterias mesentéricas de resistencia de las ratas Zucker obesas tenían, por

lo tanto, un deterioro en la función de su endotelio. Esto no nos resultó en modo alguno extraño, ya que las ratas Zucker de nuestro estudio además de obesidad presentaron dislipemia y estas alteraciones se asocian con el desarrollo de disfunción endotelial (Wilkinson y Cockcroft, 1998; Frisbee et al., 2005; Villalba et al., 2009; Serpillon et al., 2009).

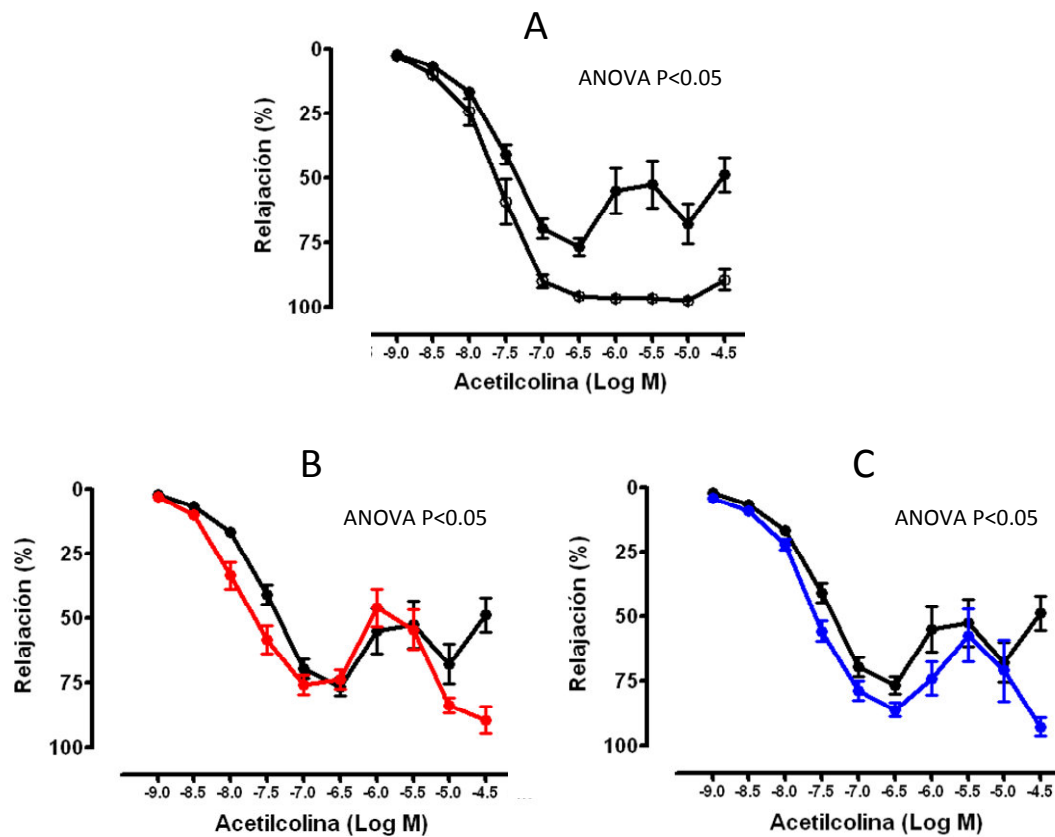


Figura 49. Curvas concentración-respuesta inducidas por acetilcolina de diferentes grupos de ratas en arterias mesentéricas de resistencia. Grupos experimentales: (○) Ratas Zucker delgadas que bebieron agua, (●) ratas Zucker obesas que bebieron agua, (●) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de clara de huevo hidrolizada con pepsina, (●) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de clara de huevo hidrolizada con aminopeptidasa. Los datos representan los valores medios \pm EEM para un mínimo de 8 animales. Se utilizó un ANOVA de dos vías para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de $P < 0.05$.

Los resultados de función vascular obtenidos en esta Tesis Doctoral están, en parte, en concordancia con los obtenidos por otros autores. Así, Subramanian et al. (2003) tampoco observaron cambios en las respuestas contráctiles a noradrenalina o endotelina-1 en la aorta de ratas Zucker obesas ni a las 20 ni a las 32 semanas de vida. Sin embargo, otros investigadores han encontrado una respuesta vasoconstrictora reducida en las arterias mesentéricas (Romanko y Stepp, 2005) y pulmonares (Moral-Sanz et al., 2011) de resistencia de ratas Zucker obesas pero no en las arterias pulmonares de conductancia de estos animales.

Además, nuestros resultados están de acuerdo con los encontrados por otros autores en lo que se refiere a las respuestas vasodilatadoras tanto en arterias mesentéricas de resistencia como en arterias de conductancia. Así, Oltman et al. (2006) no encontraron disfunción endotelial en la aorta de las ratas Zucker obesas, ni diferencias significativas en la función endotelial de las arterias de resistencia de las ratas Zucker obesas en las etapas más tempranas, pero si encontraron disfunción endotelial en los animales correspondientes al intervalo de 28-40 semanas de vida. La disfunción endotelial se ha descrito también en otros lechos vasculares de esta misma cepa de ratas, como arterias peneanas, pero, sin embargo, no se ha observado en arterias coronarias (Villalba et al., 2009), tal y como también se puede deducir indirectamente de nuestros resultados en función cardíaca, concretamente en los valores de PPC. Esto confirma que la función vasodilatadora en las ratas Zucker obesas es dependiente del tejido y que vasos de conductancia como la aorta, parecen ser más resistentes al daño endotelial que las arterias de pequeño tamaño, como las coronarias o las arterias mesentéricas de resistencia en estos animales. Estos datos también sugieren que la disfunción vascular en las ratas Zucker obesas ocurre más temprano en los vasos más pequeños y que, por lo tanto, estos vasos pueden ser más susceptibles a las complicaciones que se asocian con el SM y, sugiere además, que los cambios moderados en las arterias mesentéricas de resistencia son probablemente paralelos a los moderados cambios de presión arterial observados en nuestro estudio.

El deterioro en la función vasodilatadora dependiente de endotelio observada en las ratas Zucker obesas fue significativamente menor en los animales obesos que consumían hidrolizados de clara de huevo (Figura 49B y 49C). Hay que señalar que existen estudios en los que se ha demostrado que los péptidos bioactivos derivados de proteínas de huevo pueden tener efectos vasodilatadores endotelio dependientes (Miguel et al., 2006; Miguel et al., 2007; García-Redondo et al., 2010), y es importante señalar que algunas de esas secuencias aparecen en nuestro hidrolizado de clara de huevo con pepsina. Recientemente se ha demostrado que el consumo de un hidrolizado de lisozima de huevo con alcalasa fue capaz de mejorar la disfunción endotelial en la aorta de ratas Zucker diabéticas (Wang et al., 2012). La mayoría de los estudios experimentales y clínicos con péptidos bioactivos en los que se observa una mejora de la función vasodilatadora se han llevado a cabo con proteínas lácteas (Sipola et al., 2002; Ballard et al., 2009; Ehlers et al., 2011; Hirota et al., 2011; Ballard et al., 2013). El consumo de hidrolizados de proteínas de pollo también ocasionó una mejora de la función vasodilatadora en ratas Wistar tratadas L-NAME (Youzou et al., 2010).

Varios autores han relacionado la disfunción vascular que se produce en las ratas Zucker obesas con un aumento del estrés oxidativo, y se ha demostrado un aumento de especies reactivas de oxígeno en diferentes lechos vasculares de ratas Zucker obesas como las coronarias (Katakam et al., 2005), las arterias cerebrales (Phillips et al., 2005) y la arteria femoral (Frisbee et al., 2002). También se ha descrito que el anión superóxido produce un daño significativo en la vasodilatación mediada por óxido nítrico (NO) tanto en arterias mesentéricas de resistencia como en arterias coronarias. Se ha propuesto que el tratamiento con algunos fármacos (IECAs y estatinas) pueden mejorar la disfunción vascular y neuronal en ratas Zucker obesas debido a una reducción del estrés oxidativo en el tejido vascular de estos animales (Erdos et al., 2006; Shinozaki et al., 2007). En otros estudios, la administración de tirón, un compuesto neutralizador de radicales libres

inespecífico, mejoró significativamente la relajación a Ach en esta cepa de animales (Oltman et al., 2006). No podemos olvidar que el consumo de hidrolizado de clara de huevo y especialmente el hidrolizado de clara de huevo con pepsina ocasionó una disminución del estrés oxidativo, mecanismo que puede estar implicado en la mejora de la función endotelial observada en este grupo de animales.

La disfunción endotelial se caracteriza principalmente por una respuesta vasodilatadora a Ach reducida debido principalmente a una menor liberación de NO o a una menor biodisponibilidad de este metabolito. En las ratas Zucker obesas estas alteraciones se han relacionado con un aumento en la producción de anión superóxido, que está implicado en la disminución de la participación del NO (Moral-Sanz et al., 2011).

El NO producido por el endotelio participa en la modulación del tono arterial produciendo vasodilatación y contrarrestando la vasoconstricción provocada por agonistas contráctiles como se evidencia por la potenciación de la respuesta contráctil inducida por bloqueantes de la síntesis de NO. Así, en arterias de conductancia, la inhibición de la óxido nítrico sintasa (NOS) potencia las respuestas vasoconstrictoras a serotonina (Budzyn et al., 2008) y Phe (Rossoni et al., 2002; Alvarez de Sotomayor et al., 2008). Del mismo modo, en arterias de resistencia el bloqueo de la producción de NO genera aumento de las respuestas vasoconstrictoras (Briones et al., 2000; Wiggers et al., 2008). Además, existen estudios en los que se ha demostrado que la disfunción endotelial en arterias cerebrales y coronarias de ratas Zucker obesas está mediada por NO (Erdos et al., 2004a; Erdos et al., 2004b).

Por ello, estudiamos el papel del NO en la respuesta contráctil inducida por Phe y en la respuesta vasodilatadora inducida por Ach en segmentos de arterias mesentéricas de resistencia. Las curvas de contracción y relajación se llevaron a cabo en presencia o ausencia de un inhibidor de la síntesis de NO (L-NAME). La

contracción inducida por Phe en las arterias de ratas Zucker delgadas y obesas incubadas con L-NAME (100 μ M) fue mayor que la contracción inducida en las arterias a las que no se administró el inhibidor. Estos resultados indican que existe una modulación por NO sobre la contracción producida por la Phe en ratas Zucker delgadas y obesas (Figura 50A, B, C y D). Para comparar el efecto del L-NAME en las respuestas a Phe y Ach en las preparaciones de los diferentes grupos de animales, se calculó la diferencia del área bajo la curva (dABC), y los resultados se expresaron como el porcentaje de dABC (Figura 50E y 51E). Los datos obtenidos cuando se calculó el porcentaje de dABC muestran una mayor participación de NO en la contracción de las ratas Zucker delgadas. Como ya comentamos con anterioridad no se obtuvieron diferencias en las curvas de contracción entre los animales delgados y los obesos en las arterias mesentéricas de resistencia, lo que significa que debe existir un mecanismo compensatorio que, en definitiva, iguala las respuestas contráctiles en estos animales. Es importante recordar, sin embargo, que las ratas Zucker obesas que recibían hidrolizado de clara de huevo con pepsina tenían disminuída la contracción a Phe, y este efecto está parcialmente inhibido en presencia de L-NAME, mostrando además valores de dABC superiores a los de las ratas Zucker obesas que bebían agua. De la misma forma la relajación a Ach mejoró en los animales obesos que consumían los hidrolizados. Esta relajación fue significativamente menor cuando las preparaciones se incubaron con el inhibidor de la síntesis de NO (Figura 51A, B, C y D). El cálculo de dABC muestra también mayor participación del NO en las respuestas vasodilatadoras de las ratas Zucker delgadas respecto a las obesas, y el consumo de los hidrolizados de clara de huevo aumentó de forma significativa la participación de NO en la respuesta vasodilatadora. Estos resultados sugieren una mayor participación de NO en las respuestas contráctiles y vasodilatadoras en las ratas Zucker que recibían los hidrolizados de clara de huevo.

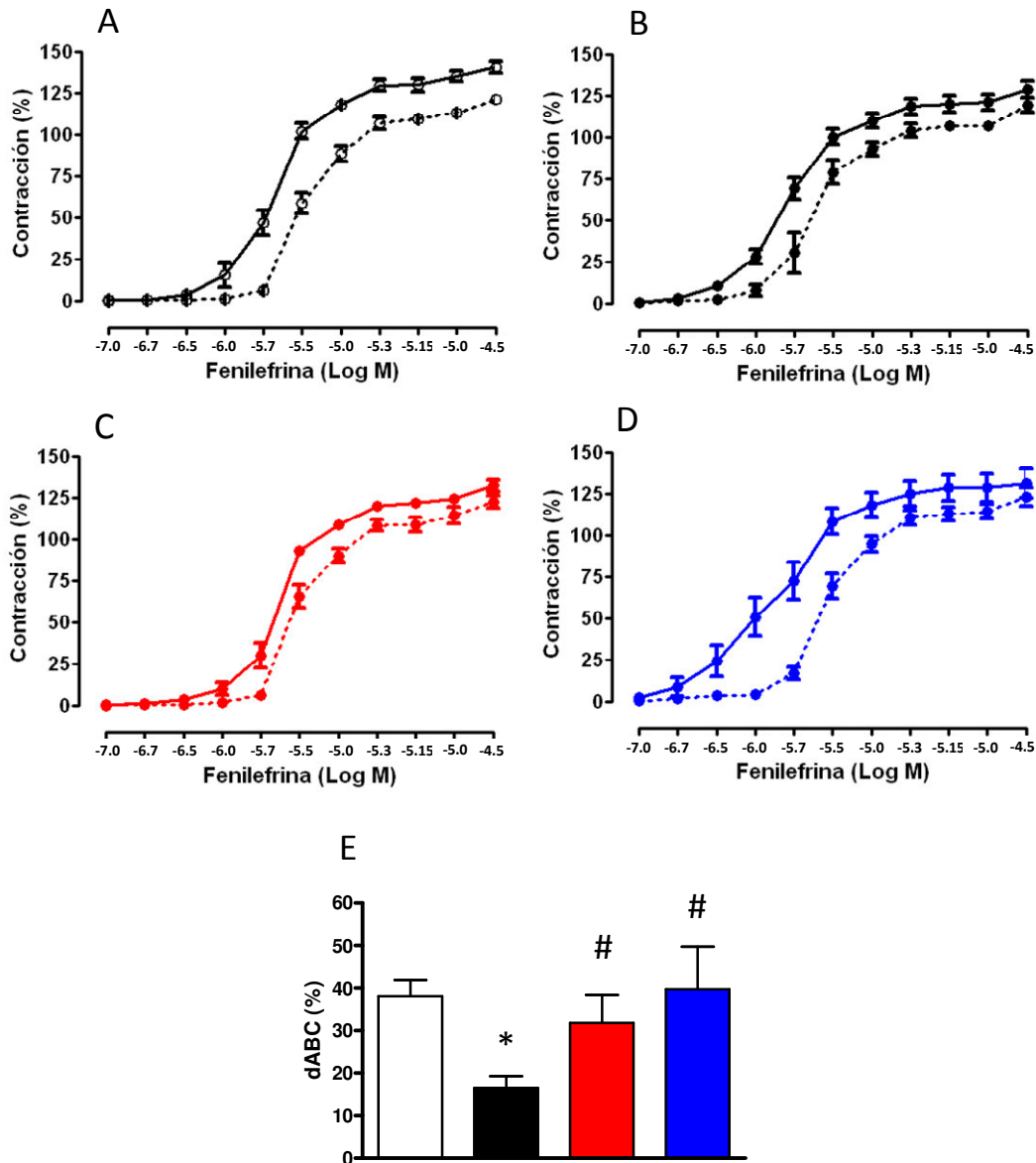


Figura 50. Curvas concentración-respuesta inducidas por fenilefrina en arterias mesentéricas de resistencia en presencia (línea normal) o ausencia (línea punteada) de L-NAME de diferentes grupos de ratas. A) (○) Ratas Zucker delgadas que bebiern agua, B) (●) ratas Zucker obesas que bebieron agua, C) (●) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de clara de huevo hidrolizada con pepsina, D) (●) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de clara de huevo hidrolizada con aminopeptidasa y E) los resultados se expresaron como el porcentaje de la diferencia del área bajo la curva (dABC). Los datos representan los valores medios \pm EEM para un mínimo de 8 animales. Se utilizó una t de Student para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de $P < 0.05$. * $P < 0.05$ ratas Zucker delgadas vs ratas Zucker obesas que bebieron agua, # $P < 0.05$ ratas Zucker obesas que bebieron agua vs ratas Zucker obesas que recibieron hidrolizado.

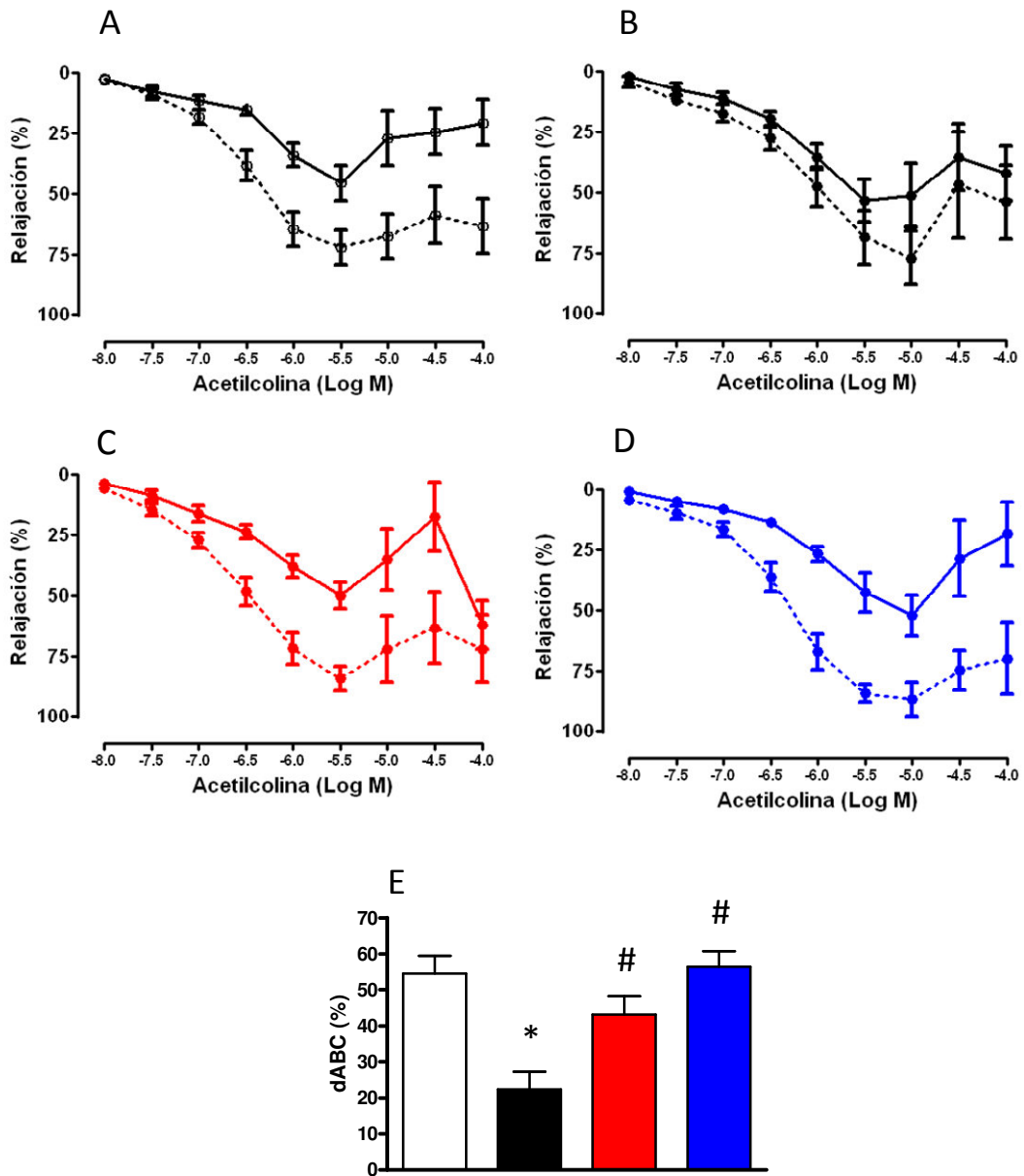


Figura 51. Curvas concentración respuesta de acetilcolina en arterias mesentéricas de resistencia en presencia (línea normal) o ausencia (línea punteada) de L-NAME de diferentes grupos de ratas. A) (○) Ratas Zucker delgadas que bebieron agua, B) (●) ratas Zucker obesas que bebieron agua, C) (●) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de clara de huevo hidrolizada con pepsina, D) (●) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de clara de huevo hidrolizada con aminopeptidasa y E) los resultados se expresaron como la diferencia del área bajo la curva (dABC). Los datos representan los valores medios \pm EEM para un mínimo de 8 animales. Se utilizó un ANOVA de dos vías para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de $P < 0.05$. * $P < 0.05$ ratas Zucker delgadas vs ratas Zucker obesas que bebieron agua, # $P < 0.05$ ratas Zucker obesas que bebieron agua vs ratas Zucker obesas que recibieron hidrolizado.

Es importante también señalar que la condición de IR y el aumento de ácidos grasos libres circulantes producen efectos negativos en la pared vascular. En esta situación se dispara el fenómeno de apoptosis en las células endoteliales y se produce un daño en la vasodilatación dependiente de endotelio (Schaefer et al., 2005; Hufnagel et al., 2005), debido a un daño en la vía de producción de NO o en su biodisponibilidad (Shankar y Steingberg, 2005). Como ya se ha comentado el consumo de hidrolizado de clara de huevo con pepsina fue capaz de disminuir los niveles de insulina y de ácidos grasos libres en el plasma, lo que puede estar favoreciendo una mejora de la función vascular en estos animales.

La ECA es una enzima multifactorial, que está localizada en diferentes tejidos y que es capaz de regular varios sistemas importantes para el control de la presión arterial. Es responsable de la formación del agente vasopresor angiotensina II y de la inactivación del agente vasodilatador bradiquinina. La actividad de esta enzima puede aumentar en patologías como la HTA, la obesidad y la DM2. La inhibición de ECA puede, por lo tanto, facilitar el control de la HTA y de otras patologías entre las que se incluyen el SM. De hecho, los inhibidores de la ECA son un tratamiento de primera elección en pacientes que padecen SM. En la presente Tesis Doctoral, nos propusimos evaluar la posibilidad de que la ingesta de hidrolizados de clara de huevo pudiese disminuir la actividad de la ECA, impidiendo así la formación de angiotensina II, que es además una de las principales fuentes de anión superóxido a nivel vascular.

Algunos estudios han sugerido que los niveles elevados de presión arterial en ratas Zucker obesas dependen, en parte, de angiotensina II, y también se ha descrito que las respuestas vasculares a angiotensina II están aumentadas en estos animales (Zemel et al., 1992; Harker et al., 1993). Sin embargo, también se sabe que los niveles de actividad de renina están disminuidos en los animales obesos (Alonso-Galicia et al., 1996) y, por lo tanto, no parece que la activación del sistema renina angiotensina esté implicada en el aumento de presión arterial que acontece en

estos animales. De hecho, se ha investigado si los niveles de expresión de los receptores de angiotensina II tipo I son diferentes entre ratas Zucker obesas y ratas Zucker delgadas, pero no se encontraron diferencias significativas, y se postuló que la hipercontractilidad en respuesta a angiotensina II observada en las ratas Zucker obesas puede estar influida por la localización de los receptores de angiotensina II tipo I (Nishimatsu et al., 2005).

Por otro lado, la mayoría de los péptidos antihipertensivos derivados de proteínas alimentarias basan su actividad en una posible inhibición de la ECA *in vitro*, sin embargo son muy pocos los estudios llevados a cabo para investigar la inhibición de la ECA *in vivo*. Nuestro grupo de investigación demostró que la inhibición de la actividad de la ECA podría ser responsable del efecto antihipertensivo observado en ratas SHR tras la administración de un hidrolizado de proteínas de huevo con pepsina (Miguel et al., 2007). Otros autores también han conseguido relacionar el efecto antihipertensivo de un hidrolizado de proteínas de sardina con la inhibición de la ECA en distintos tejidos, como aorta, riñón y arterias mesentéricas (Otani et al., 2009). Es importante resaltar que la mayoría de los estudios con hidrolizados y péptidos derivados de proteínas alimentarias en los que se evalúa la posible inhibición de la ECA *in vitro* o *in vivo* se han llevado a cabo mayoritariamente en modelos experimentales en los cuales el desarrollo de HTA se relaciona de forma más directa con la activación de la ECA.

En esta Tesis Doctoral la actividad de la ECA en el plasma de las ratas Zucker delgadas fue significativamente superior a la actividad de la ECA observada en el grupo de ratas Zucker obesas. La actividad de esta enzima en el plasma de los animales obesos que consumieron el hidrolizado de clara de huevo fue similar en las ratas Zucker obesas que bebieron agua (Figura 52). Estos datos sugieren que éste no es un mecanismo implicado en las alteraciones cardiovasculares observadas en las ratas Zucker obesas.

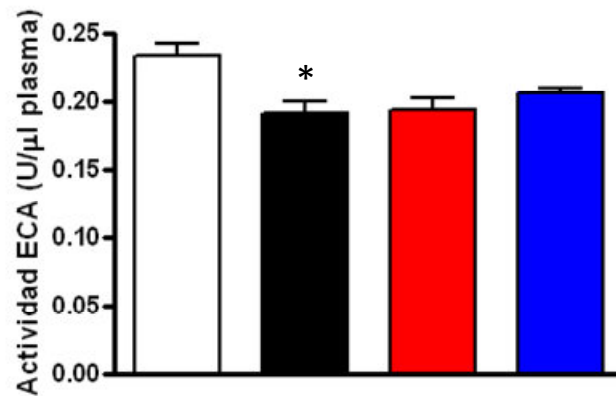


Figura 52. Actividad plasmática de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA) de diferentes grupos de ratas. Grupos experimentales: (○) Ratas Zucker delgadas que bebieron agua, (●) ratas Zucker obesas que bebieron agua, (●) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de clara de huevo hidrolizada con pepsina, (●) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de clara de huevo hidrolizada con aminopeptidasa. Los datos representan los valores medios \pm EEM para un mínimo de 8 animales. Se utilizó una t de Student para analizar los resultados, y se consideró significativa la diferencia para valores de $P < 0.05$. * $P < 0.05$ ratas Zucker delgadas vs ratas Zucker obesas que bebieron agua.

Es sobradamente conocido las patologías renales están estrechamente relacionadas con el desarrollo de enfermedad cardiovascular y en concreto con el desarrollo de hipertensión arterial. Teniendo en cuenta que las ratas Zucker obesas presentan daño renal (Maggio, 1982) y que podría estar relacionado con el aumento de presión arterial y la disfunción vascular observada en las ratas Zucker obesas, decidimos llevar a cabo una estudio histológico de este tejido y averiguar si el consumo de los hidrolizados producía algún efecto a este nivel.

La histología renal de las ratas Zucker delgadas tiene una apariencia normal. Sin embargo, los animales obesos presentan túbulos contorneados dilatados y muy vacuolarizados, aunque no existe una especial infiltración linfocitaria. No se aprecia variación tras el consumo de los hidrolizados de clara de huevo (Figura 53). Estos resultados coinciden con lo descrito en la bibliografía en cuanto a la apariencia de los riñones de ratas Zucker. Algunos investigadores han señalado que las ratas

Zucker obesas desarrollan a partir de las 12 semanas de vida alteraciones estructurales severas en los riñones que provocan un daño renal manifiesto aproximadamente a las 36 semanas de vida (Zucker y Zucker, 1967; Kasiske et al., 1985; Lavaud et al., 1996; Lavaud et al., 2001; Michel et al., 1997; Poirier et al., 2000). Se ha demostrado además que esas alteraciones se inician en ausencia de HTA, diabetes e inflamación (Lavaud et al., 2001) y que están producidas por un aumento del estrés oxidativo en este tejido (Poirier et al., 2000; Poirier et al., 2001). Según otros estudios, las alteraciones cardíacas parecen progresar tan rápidamente como la función renal se ve comprometida (Huting et al., 1993; Greaves et al., 1994; Covic et al., 1996; Tucker et al., 1997; Foley et al., 1998). Conti et al. (2004), se sorprendieron porque a pesar de este drástico fallo renal a las 36 semanas de vida no encontraron alteraciones cardíacas en este modelo experimental (Conti et al., 2004). Estos resultados concuerdan con los observados en nuestro estudio, donde a pesar encontrar alteraciones en los riñones entre los animales delgados y los animales obesos, no hemos observado alteraciones en la función cardíaca entre esos grupos de ratas.

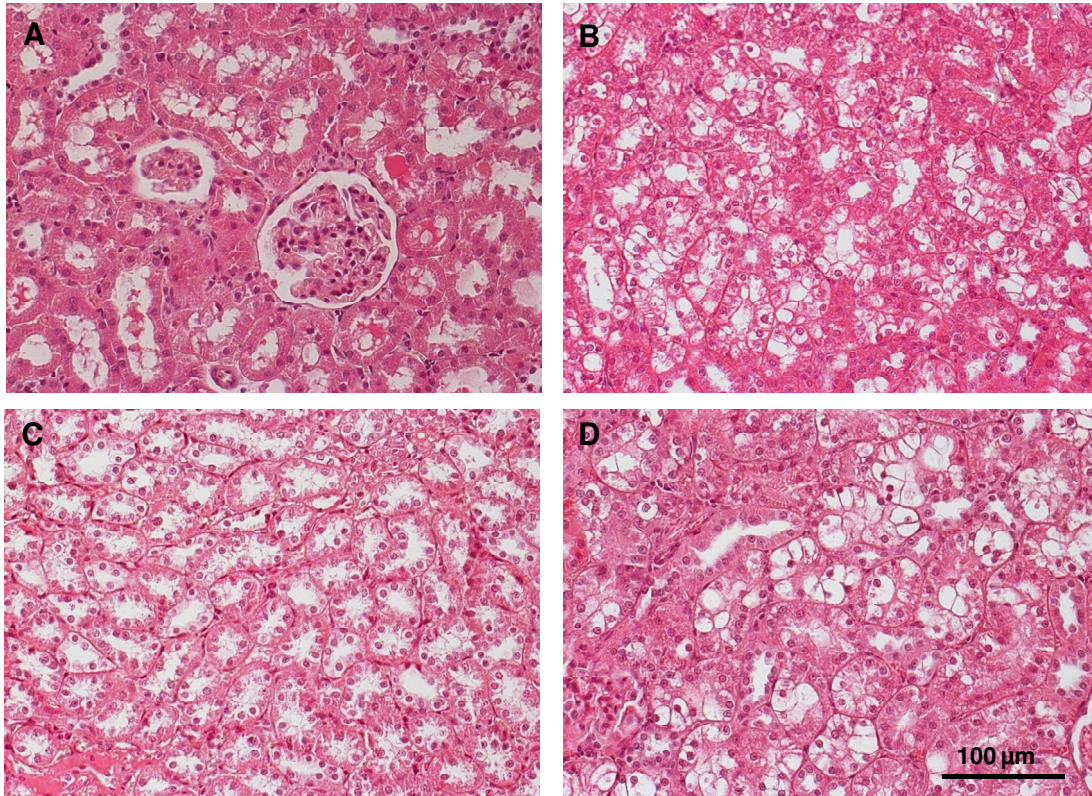


Figura 53. Imágenes tomadas en el microscopio óptico (objetivo 40x) de cortes de riñón teñidos con hematoxilina–eosina de diferentes grupos de ratas. Grupos experimentales: (A) Ratas Zucker delgadas que bebieron agua, (B) ratas Zucker obesas que bebieron agua, (C) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de clara de huevo hidrolizada con pepsina, (D) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de clara de huevo hidrolizada con aminopeptidasa.

Gracias a los estudios que hemos presentado en esta Tesis Doctoral, ha sido posible el inicio de un ensayo clínico en colaboración con el Hospital Central de la Defensa, que en estos momentos se está llevando a cabo, y que nos permitirá comprobar la eficacia y seguridad de los hidrolizados de clara huevo en las complicaciones más frecuentes que aparecen en los pacientes con SM. Además, hemos iniciado una colaboración con el prestigioso Chef Mario Sandoval, con el que estamos investigando la aplicación de los hidrolizados de huevo en la alta cocina, para el desarrollo de nuevo alimentos funcionales.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

Los resultados de esta Tesis Doctoral nos han llevado a las siguientes conclusiones:

1. De los hidrolizados enzimáticos de clara de huevo ensayados *in vitro*, los que aunaron en mayor medida actividades biológicas de interés para la prevención y/o el tratamiento del síndrome metabólico, como las actividades inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina, antioxidante e hipocolesterolémica, fueron el hidrolizado con pepsina durante 8 horas y el hidrolizado con aminopeptidasa durante 24 horas, que se seleccionaron para los ensayos *in vivo* posteriores.
2. El peso corporal fue inferior en los animales que recibieron los hidrolizados de proteínas de clara de huevo durante las 4 primeras semanas del estudio. El peso del tejido adiposo epididimal fue significativamente inferior en los animales que recibieron el hidrolizado de clara de huevo con pepsina que en los animales obesos que bebieron únicamente agua.
3. El consumo del hidrolizado de clara de huevo con pepsina redujo significativamente la esteatosis hepática y los niveles plasmáticos de ácidos grasos libres en las ratas Zucker obesas.
4. La administración del hidrolizado de clara de huevo con pepsina disminuyó el estado pro-inflamatorio de los animales obesos, mostrando niveles plasmáticos del factor de necrosis tumoral alfa significativamente más bajos. Ambos hidrolizados aumentaron, sin embargo, los niveles plasmáticos de adiponectina, probablemente en respuesta a una mejora en la resistencia a esta adipocitoquina que desarrolla este modelo animal.

5. Las ratas Zucker que recibieron el hidrolizado de clara de huevo con pepsina mostraron una mejora considerable del estrés oxidativo, puesto que se consiguió disminuir de forma significativa los niveles de peroxidación lipídica y aumentar los niveles de glutatión reducido en el hígado. Por el contrario, en los animales obesos que recibieron el hidrolizado de clara de huevo con aminopeptidasa se observaron mayores concentraciones plasmáticas de malondialdehído, pero también un aumento en la capacidad antioxidante del plasma como mecanismo compensatorio.

6. El consumo del hidrolizado de clara de huevo con pepsina disminuyó significativamente los niveles de insulina en el plasma y causó, además, una clara mejora de los índices de resistencia a la insulina (HOMA-ir), de funcionalidad de las células β -pancreáticas (HOMA- β) y de sensibilidad a la insulina (QUICKI) en los animales obesos. Asimismo, estos animales presentaron un aumento significativo del umbral de sensibilidad mecánica, lo que se relaciona con un menor desarrollo de neuropatía periférica.

7. La administración continuada del hidrolizado de clara de huevo con pepsina, así como del hidrolizado de clara de huevo con aminopeptidasa ocasionó una mejora en la función vascular de las arterias mesentéricas de resistencia, que se asoció a un aumento de los niveles y/o la biodisponibilidad de óxido nítrico.

En conjunto, nuestros resultados indican una mejora en los parámetros metabólicos de las ratas Zucker obesas que consumieron el hidrolizado de clara de huevo con pepsina, que mostraron una menor acumulación de grasa, un aumento en sus sistemas antioxidantes, una disminución del estado inflamatorio y una mayor sensibilidad a la insulina, así como una mejora en la función vascular, lo que demuestra la hipótesis de partida de este trabajo. Sin embargo, el hidrolizado de clara de huevo con aminopeptidasa sólo proporcionó una mejoría clara de la

disfunción endotelial que sufren estos animales. Estas observaciones refuerzan la actividad beneficiosa de determinados péptidos de origen alimentario en el mantenimiento de la salud y en la prevención de enfermedades. Este trabajo abre la puerta a otros estudios experimentales con los hidrolizados de clara de huevo utilizados que permitan, en última instancia, que estos productos lleguen a utilizarse como ingredientes funcionales en alimentos que mejoren las distintas patologías que se asocian al síndrome metabólico.

5. CONCLUSIONS

On the basis of the results obtained, the following conclusions can be drawn:

1. Among the enzymatic hydrolysates of egg white assayed *in vitro*, those that possessed more than one relevant biological activity for the prevention and/or treatment of the metabolic syndrome, such as angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity, antioxidant and hypocholesterolemic activities, were the hydrolysate with pepsin for 8 hours and the hydrolysate with aminopeptidase for 24 hours, which were selected for further *in vivo* studies.
2. The lowest body weight corresponded to the animals that received hydrolysed egg white during the first 4 weeks of the study. In addition, the weight of the epididymal adipose tissue was lower in the animals that were fed the hydrolysate of egg white with pepsin than in the obese animals that drank just water.
3. The intake of the hydrolysate of egg white with pepsin significantly reduced hepatic steatosis and lowered the plasma levels of free fatty acids in obese Zucker rats.
4. The intake of the hydrolysate of egg white with pepsin diminished the pro-inflammatory state in the obese Zucker rats, decreasing the plasma levels of tumor necrosis factor alpha. However, both hydrolysates increased plasma adiponectin, probably as a result of an improvement in the resistance to this adipocytokine that could occur in this animal model.
5. Zucker rats that were fed the hydrolysate of egg white with pepsin showed a considerable lower oxidative stress, with significantly decreased levels of lipid peroxidation and increased levels of reduced glutathione in the liver. In

contrast, the obese animals that were fed the hydrolysate of egg white with aminopeptidase exhibited higher plasma malondialdehyde levels, but also an increase in the plasmatic antioxidant status as a compensatory mechanism.

6. The intake of the hydrolysate of egg white with pepsin significantly lowered the plasma levels of insulin, causing a marked improvement in the insulin resistance check index (HOMA-ir), the functionality of β -pancreatic cells (HOMA- β) and the insulin sensitivity check index (QUICKI) in obese Zucker rats. These animals also showed a significant increase in the mechanical sensitivity threshold, which is related to a reduced development of peripheral neuropathy.
7. The long-term intake of egg white hydrolysed with both pepsin and aminopeptidase improved the vascular function in mesenteric resistance arteries of obese Zucker rats through an increase in the levels and/or the bioavailability of nitric oxide.

Overall, our results demonstrated that feeding egg white hydrolysed with pepsin significantly improved the cardio-metabolic abnormalities that affect obese Zucker rats, that showed less fat accumulation, increased antioxidant systems, lower inflammation and improved insulin sensitivity, as well as an amelioration of their vascular function, which altogether prove the initial hypothesis of this work. However, the egg white hydrolysed with aminopeptidase only provided a clear improvement of the endothelial dysfunction that these animal model presents. These observations reinforce the beneficial activity that certain food peptides exert in health maintenance and disease prevention. This work paves the way to other experimental studies with egg white hydrolysates that could ultimately prove their role in the management of the metabolic syndrome.

BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

A

- Ábalo R, Cabezos PA, Vera G, Lopez-Miranda V, Herradón E, Martín-Fontelles MI (2011). Cannabinoid-induced delayed gastric emptying is selectively increased upon intermittent administration in the rat: role of CB1 receptors. *Neurogastroenterology and Motility* 23:5
- Abdelmalek MF, Angulo P, Jorgensen RA, Sylvestre PB, Lindor KD (2001). Betaine, a promising new agent for patients with nonalcoholic steatohepatitis: Results of a pilot study. *American Journal of Gastroenterology* 96: 2711-2717.
- Abete I, Goyenechea E, Zulet MA, Martínez JA (2011). Obesity and metabolic syndrome: Potential benefit from specific nutritional components. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 21: B1-B15.
- Abu-Hamdah R, Rabiee A, Meneilly GS, Shannon RP, Andersen DK, Elahi D (2009). The extrapancreatic effects of glucagon-like peptide-1 and related peptides. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 94: 1843-1852.
- Adami GF, Ravera G (2001). Metabolic syndrome in severely obese patients. *Obesity Surgery* 11: 543-545.
- Aggett PJ (2009). The process for the assessment of scientific support for claims on food. *European Journal of Nutrition* 48: S23-S26.
- Agouni A, Lagrue-Lak-Hal A-, Mostefai HA, Tesse A, Mulder P, Rouet P, Desmoulin F, Heymes C, Martínez MC, Andriantsitohaina R (2009). Red wine polyphenols prevent metabolic and cardiovascular alterations associated with obesity in Zucker fatty rats (Fa/Fa). *PLoS ONE* 4(5).
- Ahima RS, Flier JS (2000). Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 11: 327-332.
- Ahmad A, Mina MY, Jamshidkhan C (2012). Purification and characterisation of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from lysozyme hydrolysates. *Food Chemistry* 131: 291-295.
- Alberti KG, Zimmet P, Shaw J (2005). The metabolic syndrome: a new worldwide definition. *Lancet* 366: 1059-1062.
- Alberti KGMM, Zimmet P, Shaw J (2006). Metabolic syndrome - A new world-wide definition. A consensus statement from the international diabetes federation. *Diabetic Medicine* 23: 469-480.

- Alberti KGMM, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruchart JC, James WPT, Loria CM, Smith SC (2009). Harmonizing the metabolic syndrome: A joint interim statement of the international diabetes federation task force on epidemiology and prevention; national heart, lung, and blood institute; american heart association; world heart federation; international atherosclerosis society; and international association for the study of obesity. *Circulation* 120: 1640-1645.
- Aleixandre A, Miguel M, Muguerza B (2008). Peptides with antihypertensive activity obtained from milk and egg proteins. *Nutrición Hospitalaria* 23: 313-318.
- Aleixandre De Artiñano A, Miguel Castro M (2009). Experimental rat models to study the metabolic syndrome. *British Journal of Nutrition* 102: 1246-1253.
- Allain CC, Poon LS, Chan CSG (1974). Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clinical Chemistry* 20: 470-475.
- Alonso-Galicia M, Brands MW, Zappe DH, Hall JE (1996). Hypertension in obese Zucker rats: Role of angiotensin II and adrenergic activity. *Hypertension* 28: 1047-1054.
- Alvarez De Sotomayor M, Vega S, Mingorance C, Marhuenda E, Herrera MD (2008). Effects of HMG-CoA reductase inhibition by simvastatin on vascular dysfunction induced by lipopolysaccharide in rats. *Pharmacology* 82: 89-96.
- Amber V, Bloom SR (2007). Adiposity and the gut - the role of gut hormones. *Current Nutrition and Food Science* 3: 75-90.
- Anderson JW, Johnstone BM, Cook-Newell ME (1995). Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *New England Journal of Medicine* 333: 276-282.
- Anderson PJ, Critchley JA (2001). Factor analysis of the metabolic syndrome: obesity vs. insulin resistance as the central abnormality. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* 25: 1782-1788.
- Anderson PJ, Critchley JAJH, Chan JCN, Cockram CS, Lee ZSK, Thomas GN, Tomlinson B (2001). Factor analysis of the metabolic syndrome: Obesity vs insulin resistance as the central abnormality. *International Journal of Obesity* 25: 1782-1788.
- Ando K, Fujita T (2009). Metabolic syndrome and oxidative stress. Free Radical. *Biology and Medicine* 47: 213-218.
- Angelakis E, Armougom F, Million M, Raoult D (2012). The relationship between gut microbiota and weight gain in humans. *Future Microbiology* 7: 91-109.
- Anraku M, Michihara A, Yasufuku T, Akasaki K, Tsuchiya D, Nishio H, Maruyama T, Otsugiri M, Maezaki Y, Kondo Y, Tomida H (2010). The antioxidative and antilipidemic effects of different molecular weight chitosans in metabolic syndrome model rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 33: 1994-1998.

- Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, Robards K (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst* 127: 183-198.
- Arcaro G, Cretti A (2002). Insulin causes endothelial dysfunction in humans: Sites and mechanisms. *Circulation* 105: 576-582.
- Argiles JM, Lopez-Soriano FJ, Evans RD, Williamson DH (1989). Interleukin-1 and lipid metabolism in the rat. *Biochemical Journal* 259: 673-678.
- Arias-Díaz J, Balibrea J (2007). Animal models in glucose intolerance and type-2 diabetes. *Nutrición Hospitalaria* 22: 160-168.
- Arioglu E, Duncan-Morin J, Sebring N, Rother KI, Gottlieb N, Lieberman J, Herion D, Kleiner DE, MD, Reynolds J, Premkumar A, Sumner AE, Hoofnagle J, Reitman ML, Taylor SI (2000). Efficacy and safety of troglitazone in the treatment of lipodystrophy syndromes. *Annals of Internal Medicine* 133: 263-274.
- Arrizabalaga J.J, Masmiqel L, Vidal J, Calañas-Continente A, Díaz-Fernández MJ, García-Luna P, Monereo S., Moreiro J, Moreno B, Ricart W, Cordido F (2004). Overweight and obesity in adults: Recommendations and treatment algorithms. *Medicina Clínica* 122: 104-110.
- Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y (1999). Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 257:79–83.
- Arvola P, Wu X, Kähönen M, Mäkynen H, Riutta A, Mucha I, Solakivi T, Kainulainen H, Porsti I (1999). Exercise enhances vasorelaxation in experimental obesity associated hypertension. *Cardiovascular Research* 43: 992-1002.
- Asghar M, Lokhandwala M (2006). Antioxidant tempol lowers age-related increases in insulin resistance in fischer 344 rats. *Clinical and Experimental Hypertension* 28: 533-541.

B

- Baigent C, Sudlow C, Collins R, Peto R (2002). Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *British Medical Journal* 324: 71-86.
- Bakker GCM, Van Erk MJ, Pellis L, Wopereis S, Rubingh CM, Cnubben NH, Kooistra T, Van Ommen B, Hendriks HFJ (2010). An antiinflammatory dietary mix modulates inflammation and oxidative and metabolic stress in overweight men: A nutrigenomics approach. *American Journal of Clinical Nutrition* 91: 1044-1059.

- Barba EJR (2008). Esteatosis hepática, esteatohepatitis y marcadores de lesión hepática. *Revista Mexicana Patología Clínica* 55: 216-232.
- Barringer DL, Bunag RD (1989). Uneven blunting of chronotropic baroreflexes in obese Zucker rats. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 256 (2).
- Barry WS, Bray GA (1969). Plasma triglycerides in genetically obese rats. *Metabolism* 18: 833-839.
- Bays H, Mandarino L, DeFronzo RA (2004). Role of the adipocytes, free fatty acids, and ectopic fat in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: peroxisomal proliferator-activated receptor agonists provide a rational therapeutic approach. *Journal of Endocrinology & Metabolism* 89:463-478.
- Bazil MK, Krulan C, Webb RL (1993). Telemetric monitoring of cardiovascular parameters in conscious spontaneously hypertensive rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 22: 897-905.
- Berneis KK, Krauss RM (2002). Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. *The Journal of Lipid Research* 43: 363-379.
- Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE (2001). The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nature Medicine* 7: 947-953.
- Berg AH, Combs TP, Scherer PE (2002). Acrp30/adiponectin: an adipocytokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 13: 84-89.
- Blaak EE (2005). Metabolic fluxes in skeletal muscle in relation to obesity and insulin resistance. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism* 19: 391-403.
- Blay M, Peinado-Onsurbe J, Julve J, Rodríguez V, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M (2001). Anomalous lipoproteins in obese Zucker rats. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 3: 259-270.
- Bodary PF, Westrick RJ, Wickenheiser KJ, Shen Y, Eitzman DT (2002). Effect of leptin on arterial thrombosis following vascular injury in mice. *JAMA* 287: 1706-1709.
- Boden W E, Probstfield J L, Anderson T, Chaitman BR, Desvignes-Nickens P, Koprowicz, McBride R, Teo K, Weintraub W (2011). Niacin in patients with low HDL cholesterol levels receiving intensive statin therapy. *New England Journal of Medicine* 365: 2255-2267.
- Boese CK, Kauker ML, Awah CG, Schelenker EH, Zawada ET, Ziegler DW (1985). Effect of fasting on mean arterial pressure in hypertensive obese Zucker rats. *Federation proceedings* 45: 302.
- Bonang G, Monintja HE, Sujudi, Van Der Waaij D (2000). Influence of breastmilk on the development of resistance to intestinal colonization in infants born at the Atma Jaya Hospital, Jakarta. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 32: 189-196.

- Bourre J (2005). Where to find omega-3 fatty acids and how feeding animals with diet enriched in omega-3 fatty acids to increase nutritional value of derived products for human: What is actually useful? *Journal of Nutrition, Health and Aging*, 9: 232-242.
- Bregagnollo EA, Mestrinel MA, Okoshi K, Carvalho FC, Bregagnollo IF, Padovani CR, Cicogna AC (2007). Relative role of left ventricular geometric remodeling and of morphological and functional myocardial remodeling in the transition from compensated hypertrophy to heart failure in rats with supraaortic stenosis. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 88: 199,206+225-233.
- Briones AM, Alonso MJ, Marín J, Balfagón G, Salaices M (2000). Influence of hypertension on nitric oxide synthase expression and vascular effects of lipopolysaccharide in rat mesenteric arteries. *British Journal of Pharmacology* 131: 185-194.
- Bruun JM, Lihn AS, Verdich C, Pedersen SB, Toubro S, Astrup A, Richelsen B (2003). Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans. *The American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 285: E527-E533.
- Budzyn K, Ravi RM, Miller AA, Sobey CG (2008). Mechanisms of augmented vasoconstriction induced by 5-hydroxytryptamine in aortic rings from spontaneously hypertensive rats. *British Journal of Pharmacology* 155: 210-216.
- Bugianesi E, McCullough A J, Marchesini G (2005). Insulin resistance: A metabolic pathway to chronic liver disease. *Hepatology* 42: 987-1000.
- Bulló-Bonet M, García-Lorda P, López-Soriano FJ, Argilés JM, Salas-Salvadó J (1999). Tumour necrosis factor, a key role in obesity? *FEBS Letters* 451: 215-219.
- Burley RW, Vadehra DV (1989). *The avian egg, chemistry and biology*. Hohn Wiley y sons, Inc: New York, New York.

C

- Cameron NE, Cotter MA, Low PA (1991). Nerve blood flow in early experimental diabetes in rats: relation to conduction defects. *American Journal of Physiology* 261: E1-E8.
- Cameron NE, Cotter MA, Archibald V, Dines KC, Maxfield EK (1994). Anti-oxidant and pro-oxidant effects on nerve conduction velocity, endoneurial blood flow and oxygen tension in non-diabetic and streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* 37: 449-459.

- Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, Fava F, Tuohy KM, Chabo C, Waget A, Delmée E, Cousin B, Sulpice T, Chamontin B, Ferrières J, Tanti JF, Gibson JR, Casteilla F, Delzenne MN, Alessi MC, Burcelin R (2007). Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56: 1761-1772.
- Carretero OA, Oparil S (2000). Essential hypertension part II: Treatment. *Circulation* 101: 446-453.
- Chanussot F, Lambert D, Debry G (1983). Plasma glycerol and hepatic synthesis of lipoproteins in the Zucker fa/fa rat. *Annals of Nutrition and Metabolism* 27: 370-379.
- Charlton M, Sreekumar R, Rasmussen D, Lindor K, Nair KS (2002). Apolipoprotein synthesis in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 35: 898-904.
- Chia CW, Egan JM (2008). Incretin-based therapies in type 2 diabetes mellitus. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 93: 3703-3716.
- Cho S, Juillerat MA, Lee C (2007). Cholesterol lowering mechanism of soybean protein hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 10599-10604.
- Cho S, Juillerat MA, Lee C (2008). Identification of LDL-receptor transcription stimulating peptides from soybean hydrolysate in human hepatocytes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 4372-4376.
- Choi S, Adachi M, Utsumi S (2002). Identification of the bile acid-binding region in the soy glycinin A1aB1b subunit. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 66 : 2395-2401.
- Chua SC, Chung WK, Wupeng XS, Zhang YY, Liu SM, Tartaglia L, Leibel RL (1996). Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in theob (leptin) receptor. *Science* 271:994-996.
- Clare DA, Catignani GL, Swaisgood HE (2003). Biodefense properties of milk: The role of antimicrobial proteins and peptides. *Current Pharmaceutical Design* 9: 1239-1255.
- Cleary MP, Vasselli JR, Greenwood MRC (1980). Development of obesity in Zucker obese (fafa) rat in absence of hyperphagia. *American Journal of Physiology* 238: E284-E292.
- Combs TP, Berg AH, Obici S, Scherer PE, Rossetti L (2001). Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *Journal of Clinical Investigation* 108: 1875-1881.
- Conti M, Renaud IM, Poirier B, Michel O, Belair M-, Mandet C, Bruneval P, Myara I, Chevalier J (2004). High levels of myocardial antioxidant defense in aging nondiabetic normotensive Zucker obese rats. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 286: R793-R800.
- Coppey LJ, Davidson EP, Dunlap JA, Lund DD, Yorek MA (2000). Slowing of motor nerve conduction velocity in streptozotocin-induced diabetic rats is preceded by impaired

- vasodilation in arterioles that provide circulation to the sciatic nerve. *International Journal of Experimental Diabetes Research* 1: 131-143.
- Coppey LJ, Gellett JS, Davidson EP ... (2001). Effect of antioxidant treatment of streptozotocin-induced diabetic rats on endoneurial blood flow, motor nerve conduction velocity, and vascular reactivity of epineurial arterioles of the sciatic nerve. *Diabetes* 50: 1927-1937.
- Coppey LJ, Gellett JS, Davidson EP ... (2001). Effect of M40403 treatment of diabetic rats on endoneurial blood flow, motor nerve conduction velocity, and vascular function of epineurial arterioles of the sciatic nerve. *British Journal of Pharmacology* 134: 121-129.
- Corrêa APF, Daroit DJ, Coelho J, Meira SM, Lopes FC, Segalin J . . . Brandelli A (2011). Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91: 2247-2254.
- Coterill OJ, Geiger GS (1977). Egg product yield trends from shell eggs. *Poultry Science* 56: 1027-1031.
- Covic A, Marian D, Florea L, Mititiuc I, Caruntu I, Cotuțiu C, Covic M (1996). The relationships of rapidly progressive glomerulonephritis (RPGN), crescentic glomerulonephritis and vasculitis: The clinical, histopathological and therapeutic considerations. *Revista Medico-Chirurgicala a Societații De Medici și Naturaliști Din Iași* 100: 63-72.
- Crook ED (2002). The genetics of human hypertension. *Seminars in Nephrology* 22: 27-34.

D

- D'Alessio DA, Denney AM, Hermiller LM, Prigeon RL, Martin JM, Tharp WG, Saylan ML, He Y, Dunning BE., Foley JE, Pratley RE (2009). Treatment with the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor vildagliptin improves fasting islet-cell function in subjects with type 2 diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 94: 81-88.
- Dávalos A, Miguel M, Bartolomé B, López-Fandiño R (2004). Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *Journal of Food Protection* 67: 1939-1944.
- De Ferranti SD, Gauvreau K, Ludwig DS, Neufeld E J, Newburger J W, Rifai N (2004). Prevalence of the metabolic syndrome in american adolescents: Findings from the third national health and nutrition examination survey. *Circulation* 110: 2494-2497.
- De Gasparo M (2002). AT(1) and AT(2) angiotensin II receptors: key features. *Drugs* 1: 1-10.

- De Leo F, Panarese S, Gallerani R, Ceci LR (2009). Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides: Production and implementation of functional food. *Current Pharmaceutical Design* 15: 3622-3643.
- Deacon CF, Marx N (2012). Potential cardiovascular effects of incretin-based therapies. *Expert Review of Cardiovascular Therapy* 10: 337-351.
- Despres JP (2001). Health consequences of visceral obesity. *Annals of Medicine* 23: 534-541.
- Dinarello CA, Moldawer LL (1999). Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. A primer for clinicians. Amgen, Thousand Oaks, CA, E.U.
- Dobrian AD, Ma Q, Lindsay JW, Leone KA, Ma K, Coben J, Galkina EV, Nadler JL (2011). Dipeptidyl peptidase IV inhibitor sitagliptin reduces local inflammation in adipose tissue and in pancreatic islets of obese mice. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 300: E410-E421.
- Dong JY, Zhang ZL, Wang PY, Qin LQ (2013). Effects of high-protein diets on body weight, glycaemic control, blood lipids and blood pressure in type 2 diabetes: meta-analysis of randomised controlled trials. *British Journal of Nutrition* 5: 1-9.
- Dowell FJ, Martin W, Dominiczak AF, Hamilton CA (1999). Decreased basal despite enhanced agonist-stimulated effects of nitric oxide in 12-week-old stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *European Journal of Pharmacology* 379: 175-182.
- Drucker DJ (2006). The biology of incretin hormones. *Cell Metabolism* 3: 153-165.
- Drucker DJ, Nauck MA. (2006) The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet* 368: 1696-705.
- Dunkley AJ, Charles K, Gray LJ, Camosso-Stefinovic J, Davies MJ, Khunti K (2012). Effectiveness of interventions for reducing diabetes and cardiovascular disease risk in people with metabolic syndrome: Systematic review and mixed treatment comparison meta-analysis. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 14: 616-625.

E

- Ebbert JO, Jensen M (2013). Fat depots, free fatty acids, and dyslipidemia. *Nutrients* 5: 498-508.
- Eiji O (2012). Metabolic syndrome: its history, mechanisms, and limitations *Acta Diabetologica* 49: 89-95.
- Elias R J, Kellerby SS, Decker EA (2008). Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical Reviews of Food Science and Nutrition* 48: 430–441.

EMA2010http://www.emea.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/01/WC500070039.pdf

Erdös B, Simanle SA, Snipes JA, Miller AW, Busija DW (2004a). Potassium channel dysfunction in cerebral arteries of insulin-resistant rats is mediated by reactive oxygen species. *Stroke* 35: 64-69.

Erdös B, Snipes JA, Miller AW, Busija DW (2004b). Cerebrovascular dysfunction in Zucker obese rats is mediated by oxidative stress and protein kinase C. *Diabetes* 53:1352-1359.

Erdös B, Snipes JA, Tulbert CD, Katakam P, Miller AW, Busija DW (2006). Rosuvastatin improves cerebrovascular function in Zucker obese rats by inhibiting NAD(P)H oxidase-dependent superoxide production. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 290: H1264-H1270.

Erkelens DW (2001). Insulin resistance syndrome and type 2 diabetes mellitus. *American Journal of Cardiology* 88: 38J-42J.

ESH ESC Guidelines 2007: Mancia G, Backer DG, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, Germano RG, Grassig G, Heagerty A, Sverre M, Kjeldsen E, Laurent S, Narkiewicz K, Ruilop L, Rynkiewicz A, Schmieder RE, Struijker H, Boudier AJ, Zanchetti A (2007) ESH-ESC Practice Guidelines for the Management of Arterial Hypertension. ESH-ESC Task Force on the Management of Arterial Hypertension. *Journal of Hypertension* 25:1751-1762. http://www.swisshypertension.ch/docs/2007_hypertension_practice_guidelines.pdf

Esposito K, Ciotola M, Giugliano D (2007). Mediterranean diet and the metabolic syndrome. *Molecular Nutrition and Food Research* 51: 1268-1274.

ESTRATEGIANAOS2005:http://www.naos.aesan.msssi.gob.es/naos/ficheros/investigacion/documento_indicadores.pdf

F

Fan J, Farrell GC (2008). VAT fat is bad for the liver, SAT fat is not! *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 23: 829-832.

Farias DRE, Pereira AF, Rosa G (2010). Metabolic syndrome in coronary artery and occlusive vascular diseases: A systematic review. *Arquivos Brasileiros De Cardiologia*, 94: e150-e178; e86-e114.

FDA Orlistat 1999 <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/dockets/06p0154/06p-0154-c000002-03-Attachment-01-vol3.pdf>

FDA 2008 Rimonabant <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/07/briefing/2007-4306b1-fda-background.pdf>

FDASibutraminahttp://www.digemid.minsa.gob.pe/UpLoad/UpLoaded/PDF/Alertas/2010/ALE RTA_09-10.pdf

FDABelviqyQysimia<http://www.fda.gov/downloads/ForConsumers/ConsumerUpdates/UCM312391.pdf>

Fellmann L, Nascimento AR, Tibiriça E, Bousquet P (2013). Murine models for pharmacological studies of the metabolic syndrome. *Pharmacology and Therapeutics* 137: 331-340.

Fernández-Bergés D, Cabrera De León A, Sanz H, Elosua R, Guembe MJ, Alzamora, Vega-Alonso T, Feliz-redondo FJ, Ortiz-Marron H, Rigo F, Lama C, Gavrilá D, Segura-Fragoso A, Lozano L, Marrugat J (2012). Metabolic syndrome in Spain: Prevalence and coronary risk associated with harmonized definition and who proposal. DARIOS study. *Revista Española De Cardiología* 65: 241-248.

Ferrante JRAW (2007). Obesity-induced inflammation: A metabolic dialogue in the language of inflammation. *Journal of Internal Medicine* 262: 408-414.

Foley RN, Parfrey PS, Kent GM, Harnett JD, Murray DC, Barre PE (1998). Long/term evolution of cardiomyopathy in dialysis patients. *Kidney International* 54: 1720-1725.

Folkow B (1990). 'Structural factor' in primary and secondary hypertension. *Hypertension* 16: 89-101.

Foltz M, Ansems P, Schwarz J, Tasker MC, Loubakos A, Gerhardt CC (2008). Protein hydrolysates induce CCK release from enteroendocrine cells and act as partial agonists of the CCK 1 receptor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 837-843.

Fossati P, Prencipe L (1982). Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clinical Chemistry* 28: 2077-2080.

Fox A, Kessingland A, Gentry C, McNair K, Patel S, Urban L, James I (2001). The role of central and peripheral Cannabinoid1 receptors in the antihyperalgesic activity of cannabinoids in a model of neuropathic pain. *Pain* 92: 91-100.

Frayn KN (2001). Adipose tissue and the insulin resistance syndrome. *Proceedings of the Nutrition Society* 60: 375-380.

Friedland J, Silverstein E (1976). A sensitive fluorimetric assay for serum angiotensin-converting enzyme. *American Journal of Clinical Pathology* 66: 416-424.

Friedman JM (1998). Leptin, leptin receptors, and the control of body weight. *Nutrition Reviews* 56: S38-S46.

Frisbee JC, Maier KG, Stepp DW (2002). Oxidant stress-induced increase in myogenic activation of skeletal muscle resistance arteries in obese zucker rats. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 283: H2160-H2168.

- Frisbee JC (2005). Hypertension-independent microvascular rarefaction in the obese zucker rat model of the metabolic syndrome. *Microcirculation* 12: 383-392.
- Frühbeck G (2002). Peripheral actions of leptin and its involvement in disease. *Nutrition Reviews* 60: S47-S55.
- Frühbeck G (2004). The adipose tissue as a source of vasoactive factors. *Current Medicinal Chemistry: Cardiovascular and Hematological Agents* 2: 197-208.
- Fujita H, Sasaki R, Yoshikawa M (1995). Potentiation of the antihypertensive activity of orally administered Ovokinin, a vasorelaxing peptide derived from ovalbumin, by emulsification in egg phosphatidyl-choline. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 59: 2344-2345.
- Funahashi T, Nakamura T, Shimomura I, Maeda K, Kuriyama H, Takahashi M, Arita Y, Kihara S, Matsuzawa Y (1999). Role of adipocytokines on the pathogenesis of atherosclerosis in visceral obesity. *Internal Medicine* 38: 202-206.
- Furukawa I, Kurooka S, Arisue K, Kohda K, Hayashi C (1982). Assays of serum lipase by the 'BALB/DTNB method' mechanized for use with discrete and continuous-flow analyzers. *Clinical Chemistry* 28: 110-113.

G

- Galisteo M, Sánchez M, Vera R, González M, Anguera A, Duarte J, Zarzuelo A (2005). A diet supplemented with husks of plantago ovata reduces the development of endothelial dysfunction, hypertension, and obesity by affecting adiponectin and TNF- α in zucker rats. *Journal of Nutrition* 135: 2399-2404.
- Galisteo M, Duarte J, Zarzuelo A (2008). Effects of dietary fibers on disturbances clustered in the metabolic syndrome. *Journal of Nutritional Biochemistry* 19: 71-84.
- García-Calvo M, Lisnock J, Bull HG, Hawes BE, Burnett DA, Braun M, Crona JH, Davis HR, Dean DC, Detmers PA, Graziano MP, Hughes M, MacIntyre MA, Ogawa A, O'Neil KA, Lyer SPN, Shevell DE, Smith MM, Tang YS, Chapman KT, Thornberry NA (2005). The target of ezetimibe is niemann-pick C1-like 1 (NPC1L1). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 8132-8137.
- García-Villalba R, Carrasco-Pancorbo A, Nevedomskaya E, Mayboroda OA, Deelder AM, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A (2010). Exploratory analysis of human urine by LC-ESI-TOF MS after high intake of olive oil: Understanding the metabolism of polyphenols. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398: 463-475.

- Geraedts MCP, Troost FJ, Fischer MAJG, Edens L, Saris WHM (2011). Direct induction of CCK and GLP-1 release from murine endocrine cells by intact dietary proteins. *Molecular Nutrition and Food Research* 55: 476-484.
- Gertow K, Rosell M, Sjögren P, Eriksson P, Vessby B, de Faire U, Hamsten A, Hellenius M, Fisher RM (2006). Fatty acid handling protein expression in adipose tissue, fatty acid composition of adipose tissue and serum, and markers of insulin resistance. *European Journal of Clinical Nutrition* 60: 1406-1413.
- Gilbert W, Gadang V, Proctor A, Jain V, Devareddy L (2011). Trans-trans conjugated linoleic acid enriched soybean oil reduces fatty liver and lowers serum cholesterol in obese Zucker rats. *Lipids* 46: 961-968.
- Ginter E, Simko V (2012). Type 2 diabetes mellitus, pandemic in 21st century. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 771: 42-50.
- Gómez-Ambrosi J, Rodríguez A, Catalán V, Frühbeck G (2008). Role of adipose tissue in obesity-associated inflammation. *Revista Española De Obesidad* 6: 264-279.
- Gómez-Ruiz JA, Ballesteros C, González Viñas MÁ, Cabezas L, Martínez-Castro I (2002). Relationships between volatile compounds and odour in manchego cheese: Comparison between artisanal and industrial cheeses at different ripening times. *Lait* 82: 613-628.
- Gómez-Zorita S, Fernández-Quintela A, Macarulla MT, Aguirre L, Hijona E, Bujanda L, Milagro F, Martínez JA, Portillo MP (2012). Resveratrol attenuates steatosis in obese Zucker rats by decreasing fatty acid availability and reducing oxidative stress. *British Journal of Nutrition* 107: 202-210.
- Goossens GH (2008). The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. *Physiology and Behavior* 94: 206-218.
- Greaves SC, Gamble GD, Collins JF, Whalley GA, Sharpe DN (1994). Determinants of left ventricular hypertrophy and systolic dysfunction in chronic renal failure. *American Journal of Kidney Diseases* 24: 768-776.
- Groop L, Orho-Melander M (2001). The dysmetabolic syndrome. *Journal of Internal Medicine* 250: 105-120.
- Grover GJ, Koetzner L, Wicks J, Gahler RJ, Lyon MR, Reimer RA, Wood S (2011). Effects of the soluble fiber complex PolyglycopleX® on glucose homeostasis and body weight in young Zucker diabetic rats. *Frontiers in Pharmacology* SEP.
- Guérin-Dubiard C, Pasco M, Mollé D, Désert C, Croguennec T, Nau F (2006). Proteomic analysis of hen egg white. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 3901-3910.
- Guías presión arterial (National Heart, Lung and Blood Institute, 2004), <http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/hypertension/jnc7full.pdf>

H

- Häberer D, Tasker M, Foltz M, Geary N, Westerterp M, Langhans W (2011). Intra-gastric infusion of pea-protein hydrolysate reduces test-meal size in rats more than pea protein. *Physiological Behaviour* 104: 1041-1047.
- Hamdy O, Porramatikul S, Al-Ozairi E (2006). Metabolic obesity: The paradox between visceral and subcutaneous fat. *Current Diabetes Review*, 2: 367-373.
- Hamilton JP, Xie GF, Raufman JP, Hogan S, Griffin TL, Packard CA, Chatfield DA, Hagey LR, Steinbach JH, Hofmann AF (2007). Human cecal bile acids: concentration and spectrum. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 293: G256-G263.
- Harker CT, O'Donnell MP, Kasiske BL, Keane WF, Katz SA (1993). The renin-angiotensin system in the type II diabetic obese Zucker rat. *Journal of the American Society of Nephrology* 4: 1354-1361.
- Harte A, McTernan P, Chetty R, Coppack S, Katz J, Smith S, Kumar S (2005). Insulin-mediated upregulation of the renin-angiotensin system in human subcutaneous adipocytes is reduced by rosiglitazone. *Circulation* 111: 1954-1961.
- Hasegawa T, Yoneda M, Nakamura K, Makino I, Terano A (2001). Plasma transforming growth factor- β 1 level and efficacy of α -tocopherol in patients with non-alcoholic steatohepatitis: A pilot study. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 15: 1667-1672.
- Havel PJ (2002). Control of energy homeostasis and insulin action by adipocyte hormones: Leptin, acylation stimulating protein, and adiponectin. *Current Opinion in Lipidology* 13: 51-59.
- He Y, MacLeod KM (2002). Modulation of noradrenaline-induced vasoconstriction in isolated perfused mesenteric arterial beds from obese Zucker rats in the presence and absence of insulin. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 80: 171-179.
- Hernan-Daza C (2002). La obesidad: un desorden metabólico de alto riesgo para la salud. *Colombia Médica* 33: 72-80.
- Hernández-Ledesma B, Ramos M, Recio I, Amigo L (2006). Effect of β -lactoglobulin hydrolysis with thermolysin under denaturing temperatures on the release of bioactive peptides. *Journal of Chromatography A* 1116: 31-37.
- Himms-Hagen J, Harper M (1999). Biochemical aspects of the uncoupling proteins: View from the chair. *International Journal of Obesity* 23: S30-S32.
- Himsworth HP (1936). Diabetes mellitus: its differentiation into insulin-sensitive and insulin-insensitive types. *Lancet* 1: 127-134.

- Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor- α : Direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259: 87-91.
- Hotamisligil G S, Spiegelman BM (1994). Tumor necrosis factor α : A key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes* 43: 1271-1278.
- Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM (1996). IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. *Science* 271: 665-66.
- Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, Iwahashi H, Kuriyama H, Ouchi N, Maeda K, Nishida M, Kihara S, Sakai N, Nakajima T, Hasegawa K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Hanafusa T, Matsuzawa Y (2000). Plasma concentration of a novel adipose specific protein adiponectin in type 2 diabetic patients. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 20: 1595-1599.
- Howard A, Udenigwe CC (2013). Mechanisms and prospects of food protein hydrolysates and peptide-induced hypolipidaemia. *Food and Function* 4: 40-51.
- Huang W, Majumder K, Wu J (2010). Oxygen radical absorbance capacity of peptides from egg white protein ovotransferrin and their interaction with phytochemicals. *Food Chemistry* 123: 635-641.
- Hufnagel B, Dworak M, Soufi M, Mester Z, Zhu Y, Schaefer JR, Klumpp S, Kriegelstein J (2005). Unsaturated fatty acids isolated from human lipoproteins activate protein phosphatase type 2C β and induce apoptosis in endothelial cells. *Atherosclerosis* 180: 245-254.
- Huting J (1993). Predictive value of mitral and aortic valve sclerosis for survival in end-stage renal disease on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Nephron* 64: 63-68.

I

Ibelgaufts H. Dictionary of cytokines. Ed 5^a. New York, NY: *Editorial VCH*. 1995; 777.

Ibrahim HR, Thomas U, Pellegrini A (2001). A helix-loop-helix peptide at the upper lip of the active site cleft of lysozyme confers potent antimicrobial activity with membrane permeabilization action. *Journal of Biological Chemistry* 276: 43767-43774.

J

James RW, Leviev I, Ruiz J, Passa P, Froguel P, Garin MB (2000). Promoter polymorphism T(-107)C of the paraoxonase PON1 gene is a risk factor for coronary heart disease in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 49: 1390-1393.

- James WPT, Caterson ID, Coutinho W, Finer N, Van Gaal LF, Maggioni AP, Torp-Pedersen C, Sharma AM, Shepherd GM, Rode RA, Renz CL (2010). Effect of sibutramine on cardiovascular outcomes in overweight and obese subjects. *New England Journal of Medicine* 363: 905-917.
- Johnson PR, Zucker LM, Cruce JA, Hirsch J (1971). Cellularity of adipose depots in the genetically obese zucker rat. *Journal of Lipid Research* 12: 706-714.
- Jubbin J, Rajesh I (2012). Behavioral therapy for management of obesity. *Endocrinology and Metabolism* 16: 28–32.
- Jung WK, Nam KS, Shaidi F, Kim SK (2001). Purification and characterization of antioxidative peptides from protein hydrolysate of lecithin-free egg. *JAACS* 78: 651-656.

K

- Kagawa K, Matsutaka H, Fukuhama C, Watanabe Y, Fujino H (1996). Globin digest, acidic protease hydrolysate, inhibits dietary hypertriglyceridemia and val-val-tyr-pro, one of its constituents, possesses most superior effect. *Life Sciences* 58: 1745-1755.
- Kaiser T, Heise T, Nosek L, Eckers U, Sawicki PT (2006). Influence of nebivolol and enalapril on metabolic parameters and arterial stiffness in hypertensive type 2 diabetic patients. *Journal of Hypertension* 24: 1397-1403.
- Kahn R, Buse J, Ferrannini E, Stern M (2005). The metabolic syndrome: time for a critical appraisal. *Diabetes Care* 28: 2289-2304.
- Kakuma T, Lee Y, Higa M, Wang Z-, Pan W, Shimomura I, Unger RH (2000). Leptin, troglitazone, and the expression of sterol regulatory element binding proteins in liver and pancreatic islets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 8536-8541.
- Kamencic H, Lyon A, Paterson PG, Juurlink BHJ (2000). Monochlorobimane Fluorimetric Method to Measure Tissue Glutathione. *Analytical Biochemistry* 286: 35-37.
- Kaplan PW, Jung RT (1984). The effect of acute hypercalcaemia on arginine induced growth hormone release in diabetic man. *Hormone and Metabolic Research* 16: 123-126.
- Kaplan NM (1989). The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. *Archives of Internal Medicine* 149: 1514-1520.
- Kasike BL, Cleary MP, O'Donnell MP, Keane WF (1985). Effects of genetic obesity on renal structure and function in the zucker rat. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 106: 598-604.

- Kasiske BL, O'Donnell MP, Keane WF (1992). The zucker rat model of obesity, insulin resistance, hyperlipidemia, and renal injury. *Hypertension* 19: I110-I115.
- Katakam PVG, Tulbert CD, Snipes JA, Erdös B, Miller AW, Busija DW (2005). Impaired insulin-induced vasodilation in small coronary arteries of zucker obese rats is mediated by reactive oxygen species. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 288: H854-H860.
- Katzeff HL, Selgrad C (1993). Impaired peripheral thyroidhormone metabolism in genetic obesity. *Endocrinology* 132 :989-995.
- Kim D, Kowalchick JE, Edmondson SD, Mastracchio A, Xu J, Eiermann GJ, Leiting B, Wu JK, Pryor KD, Patel RA, He H, Lyons KA, Thornberry NA, Weber AE (2007). Triazolopiperazine-amides as dipeptidyl peptidase IV inhibitors: Close analogs of JANUVIA™ (sitagliptin phosphate). *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 17: 3373-3377.
- Kirpichnikov D, Sowers JR (2001). Diabetes mellitus and diabetes-associated vascular disease. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 12: 225-230.
- Klein EG, Lytle LA, Chen V (2008). Social ecological predictors of the transition to overweight in youth: Results from the teens eating for energy and nutrition at schools (TEENS) study. *Journal of the American Dietetic Association* 108: 1163-1169.
- Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, Nathan DM (2002). Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *New England Journal of Medicine* 346: 393-403.
- Kobatake T, Matsuzawa Y, Tokunaga K, Fujioka S, Kawamoto T, Keno Y, Inui Y, Odaka H, Matsuo T, Tarui S (1989). Metabolic improvements associated with a reduction of abdominal visceral fat caused by a new α -glucosidase inhibitor, AO-128, in zucker fatty rats. *International Journal of Obesity* 13: 147-154.
- Kohen-Avramoglu R, Theriault A, Adeli K (2003). Emergence of the metabolic syndrome in childhood: an epidemiological overview and mechanistic link to dyslipidemia. *Clinical Biochemistry* 36: 413-420.
- Konturek S, Cześniakiewicz-Guzik M (2004). Brain gut axis and food intake control - theoretical and practical considerations. *Pediatrics Wspolczesna* 6: 351-359.
- Korhonen H, Pihlanto-Leppälä A (2002). Formation of bioactive peptides from milk proteins through fermentation by dairy starters. *ACS Symposium Series* 816: 173-186.
- Korhonen H (2009). Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *Journal of Functional Foods* 1: 177-187.
- Kurtz TW, Morris RC, Pershadsingh HA (1989). The zucker fatty rat as a genetic model of obesity and hypertension. *Hypertension* 13: 896-901.

Kylin E (1923). Studien über das Hypertonie-Hyperglykämie-Hyperurikämiesyndrom. *Zentralblatt für innere Medizin Leipzig* 81: 105-127.

L

Labuzek K, Kozłowski M, Szkudłapski D, Sikorska P, Kozłowska M, Okopien B (2013). Incretin-based therapies in the treatment of type 2 diabetes. More than meets the eye? *European Journal of Internal Medicine* 24: 207-212.

Lacroix IME, Li-Chan ECY (2012). Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity of dairy protein hydrolysates. *International Dairy Journal* 25: 97-102.

Lam DD, Zhou L, Vegge A, Xiu PY, Christensen BT, Osundiji MA . . . Heisler LK (2009). Distribution and neurochemical characterization of neurons within the nucleus of the solitary tract responsive to serotonin agonist-induced hypophagia. *Behavioural Brain Research* 196: 139-143.

Langendorff O (1898). Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen - III. abhandlung. vorübergehende unregelmässigkeiten des herzschlages und ihre ausgleichung. *Archiv für die gesammte Physiologie des Menschen und der Thiere* 70: 473-86.

Lash JM, Sherman WM, Hamlin RL (1989). Capillary basement membrane thickness and capillary density in sedentary and trained obese Zucker rats. *Diabetes* 38: 854-860.

Last Advice medicine users: www.mhra.gov.uk 2011

Lavaud S, Michel O, Sassy-Prigent C, Heudes D, Bazin R, Bariéty J, Chevalier J, Bélaïr M-, Mandet C (1996). Early influx of glomerular macrophages precedes glomerulosclerosis in the obese Zucker rat model. *Journal of the American Society of Nephrology* 7: 2604-2615.

Lavaud S, Poirier B, Mandet C, Bélaïr M-, Irinopoulou T, Heudes D, Bazin R, Bariéty J, Myara I, Chevalier J (2001). Inflammation is probably not a prerequisite for renal interstitial fibrosis in normoglycemic obese rats. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 280: F683-F694.

Lavine JE (2000). Vitamin E treatment of nonalcoholic steatohepatitis in children: A pilot study. *Journal of Pediatrics* 136: 734-738.

Le Marquer-Domagala F, Finet M (1997). Roles of NO-synthase and cyclooxygenase in sex- and pregnancy-dependent arterial and venous pressures in the rat. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 30: 205-213.

Lee SD, Tzang BS, Kuo WW, Lin YM, Yang AL, Chen SH, Tsai FJ, Wu FL, Lu MC, Huang CY (2007). Cardiac fas receptor-dependent apoptotic pathway in obese Zucker rats. *Obesity* 15: 2407-2415.

- Lépiciér P, Bouchard J, Lagneux C, Lamontagne D (2003). Endocannabinoids protect the rat isolated heart against ischaemia. *British Journal of Pharmacology* 139: 805-15.
- Li H, Aluko RE (2010). Identification and inhibitory properties of multifunctional peptides from pea protein hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 11471-11476.
- Levin BL, Stoddard-Apter S, Sullivan AC (1984). Central activation and peripheral function of sympatho-adrenal and cardiovascular systems in the zucker rat. *Physiology and Behavior* 32: 295-299.
- Li H, Aluko RF (2010). Identification and Inhibitory Properties of Multifunctional Peptides from Pea Protein Hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58: 11471-11476.
- Liaset B, Madsen L, Hao Q, Criales G, Mellgren G, Marschall H, Kristiansen K (2009). Fish protein hydrolysate elevates plasma bile acids and reduces visceral adipose tissue mass in rats. *Biochimica Et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1791: 254-262.
- LIBRO BLANCO, Estrategia europea sobre problemas de salud relacionados con la alimentación, el sobrepeso y la obesidad: <http://www.naos.aesan.mssi.gob.es/naos/ficheros/investigacion/publicacion8libroblanco.pdf>
- Lida Y, Masuda T (1996). Strength of translation initiation signal sequence of mRNA as studied by quantification method: Effect of nucleotide substitutions upon translation efficiency in rat preproinsulin mRNA. *Nucleic Acids Research* 24: 3313-3316.
- Liese AD, Hense HW, Doring A (2001). Microalbuminuria, central adiposity and hypertension in the non-diabetic urban population of the MONICA Augsburg Survey 1994/95. *Journal of Human Hypertension* 15: 799-804.
- Lizardi-Cervera J, Motola-Kuba D, Guevara-González L (2004). Obesity and its association with cryptogenic cirrhosis and hepatocarcinoma. *Gaceta Médica De México*, 140: S77-S83.
- López-Fandiño R, Otte J, van Camp J (2006). Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity. *International Dairy Journal* 16: 1277-12793.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.

M

- Maggio CA, Greenwood MRC (1982). Adipose tissue lipoprotein lipase (LPL) and triglyceride uptake in zucker rats. *Physiology and Behavior* 29: 1147-1152.

- Mancia G, Dell'Oro R, Quarti-Trevano F, Scopelliti F, Grassi G (2006). Angiotensin-sympathetic system interactions in cardiovascular and metabolic disease. *Journal of Hypertension* 24: S51-S56.
- Mancia G (2007). Blood pressure and glucose control in patients with diabetes. *American Journal of Hypertension* 20: S3-S8.
- Manso M A, Miguel M, Even J, Hernández R, Aleixandre A, López-Fandiño R (2008). Effect of the long-term intake of an egg white hydrolysate on the oxidative status and blood lipid profile of spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry* 109: 361-367.
- Marcuello C, Calle-Pascual AL, Fuentes M, Runkle I, Rubio MA, Montañez C, Rojo-Martinez G, Soriguer F, Bordiu E, Goday A, Bosch-Comas A, Carmena R, Casamitjana R, Castaño L, Castell C, Catala M, Delgado E, Franch J, Gaztambide S, Girbes J, Gomis R, Urrutia I, Lopez-Alba A, Vazquez JA, Vendrell J (2013). Prevalence of the metabolic syndrome in Spain using regional cutoff points for waist circumference: The di@bet.es study. *Acta Diabetológica* 1-9.
- Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, Kihara S, Nishizawa H, Kishida K, Nagaretani H, Matsuda M, Komuro R, Ouchi N, Kuriyama H, Hotta K, Akamura T, Shimomura I, Matsuzawa Y (2001). PPAR gamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin an adipose derived protein. *Diabetes* 50: 2094-2099.
- Maes W, Van Camp J, Vermeirssen V, Hemeryck M, Ketelslegers JM, Schrezenmeir, Van Oostveldt P, Huyghebaert A (2004). Influence of the lactokinin ala-leu-pro-met-his-ile-arg (ALPMHIR) on the release of endothelin-1 by endothelial cells. *Regulatory Peptides* 118: 105-109.
- Mahle CD, Tejwani GA, Hanissian SH, Girten B, Dersbach A, Merola AG (1986). The effect of long term aerobic exercise on weight gain, food and water intake, heart rate and blood pressure in Zucker rats. *Federation proceedings* 45: 616.
- Malik J, Melenovsky V, Wichterle D, Heast T, Simek J, Ceska R, Hradec J (2001). Both fenofibrate and atorvastatin improve vascular reactivity in combined hyperlipemia. *Cardiovascular Research* 52: 290-298.
- Manso MA, Miguel M, Even J, Hernández R, Aleixandre A, López-Fandiño R. (2008) Effect of the long-term intake of an egg white hydrolysate on the oxidative status and blood lipid profile of spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry* 109: 361-367.
- Mantzoros CS (1999). The role of leptin in human obesity and disease: A review of current evidence. *Annals of Internal Medicine* 130: 671-680.
- Martinez EG (2010). Body composition: its importance in clinical practice and some relatively simple techniques for evaluation. *Salud Uninorte* 26: 98-116.

- Martínez de Moretin BE, Rodríguez MC, Martínez JA (2003). Síndrome metabólico, Resistencia a la insulina y metabolismo tisular. *Endocrinología y Nutrición* 50: 326.
- Martínez-Maqueda D, Miralles B, Recio I, Hernández-Ledesma B (2012). Antihypertensive peptides from food proteins: a review. *Food and Function* 3: 350-361.
- Masterton RG (2010). Antibiotic heterogeneity. *International Journal of Antimicrobial Agents* 36: S15-S18.
- Matsubara M, Maruoka S, Katayose S (2002). Inverse relationship between plasma adiponectin and leptin concentrations in normal weight and obese women. *European Journal of Endocrinology* 147: 173-180.
- Matsuzawa Y (2006). The metabolic syndrome and adipocytokines. *FEBS Letters* 580: 2917-2921.
- McBride P (2008). Triglycerides and risk for coronary artery disease. *Current Atherosclerosis Reports* 10: 386-390.
- McKeown NM, Meigs JB, Liu S, Saltzman E, Wilson PW, Jacques PF (2004). Carbohydrate nutrition, insulin resistance, and the prevalence of the metabolic syndrome in the Framingham Offspring Cohort. *Diabetes Care* 27: 538-546.
- Meiattini F, Prencipe L, Bardelli F, Giannini G, Tarli P (1978). The 4-hydroxybenzoate/4-aminophenazone chromogenic system used in the enzymic determination of serum cholesterol. *Clinical Chemistry* 24:2 161-165.
- Meisel H (1998). Overview on milk protein-derived peptides. *International Dairy Journal* 8: 363-373.
- Meisel H (2004). Multifunctional peptides encrypted in milk proteins. *BioFactors* 21: 55-61.
- Michel O, Heudes D, Lamarre I, Masurier C, Lavau M, Bariety J, Chevalier J, Belair M, Mandet C (1997). Reduction of insulin and triglycerides delays glomerulosclerosis in obese zucker rats. *Kidney International* 52: 1532-1542.
- Miglio F, Rovati LC, Santoro A, Setnikar I (2000). Efficacy and safety of oral betaine glucuronate in non-alcoholic steatohepatitis: A double-blind, randomized, parallel-group, placebo-controlled prospective clinical study. *Arzneimittel-Forschung/Drug Research*, 50: 722-727.
- Miguel M, Recio I, Gómez-Ruiz JA, Ramos M, López-Fandiño R (2004). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *Journal of Food Protection*, 67: 1914-1920.
- Miguel M, López-Fandiño R, Ramos M, Alexandre A (2005). Short-term effect of egg-white hydrolysate products on the arterial blood pressure of hypertensive rats. *British Journal of Nutrition* 94: 731-737.

- Miguel M, López-Fandiño R, Ramos M, Aleixandre A (2006). Long-term intake of egg white hydrolysate attenuates the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Life Sciences* 78: 2960-2966.
- Miguel M, Alvarez Y, López-Fandiño R, Alonso MJ, Salaices M (2007a). Vasodilator effects of peptides derived from egg white proteins. *Regulatory Peptides* 140: 131-135.
- Miguel M, Manso M, Aleixandre A, Alonso MJ, Salaices M, López-Fandiño R (2007b). Vascular effects, angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity, and antihypertensive properties of peptides derived from egg White. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 10615-10621.
- Miguel M, Gómez-Ruiz JA, Recio I, Aleixandre A (2010). Changes in arterial blood pressure after single oral administration of milk-casein-derived peptides in spontaneously hypertensive rats. *Molecular Nutrition & Food Research* 54: 1422-1427.
- Mine Y, Kovacs-Nolan J (2006). New insights in biologically active proteins and peptides derived from hen egg. *World's Poultry Science Journal* 62: 87-95+168+173+178+183-184+189.
- Minokoshi Y, Kim Y, Peroni OD, Fryer LGD, Müller C, Carling D, Kahn BB (2002). Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* 415: 339-343.
- Möller NP, Scholz-Ahrens KE, Roos N, Schrezenmeir J (2008). Bioactive peptides and proteins from foods: Indication for health effects. *European Journal of Nutrition* 47: 171-182.
- Montague CT, O'Rahilly S (2000). The perils of portliness: causes and consequences of visceral adiposity. *Diabetes* 49: 883-888.
- Moral-Sanz J, Menendez C, Moreno L, Moreno E, Cogolludo A, Perez-Vizcaino F (2011). Pulmonary arterial dysfunction in insulin resistant obese Zucker rats. *Respiratory Research* 51.
- Morifuji M, Koga J, Kawanaka K, Higuchi M (2009). Branched-chain amino acid-containing dipeptides, identified from whey protein hydrolysates, stimulate glucose uptake rate in L6 myotubes and isolated skeletal muscles. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 55: 81-86.
- Mulero Cánovas J, Zafrilla Rentero P, Martínez-Cachá Martínez A, Leal Hernández M, Abellán Alemán J (2011). Bioactive peptides. *Clinica de Investigación en Arteriosclerosis* 23: 219-227.
- Muller S, Cleary MP (1988). Glucose metabolism in isolated adipocytes from ad libitum- and restricted-fed lean and obese Zucker rats at two different ages. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 187: 398-407.

- Mulvany MJ, Halpern W (1977). Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circulation Research* 41: 19-26.
- Mulvany MJ (1994). Mechanical and other factors involved in vascular injury related to hypertension. *Blood Pressure, Supplement* 3:11-17.
- Muñoz Calvo MT (2007). Metabolic syndrome. *Pediatrics Integral* 11: 615-622.
- Murphy KG, Dhillon WS, Bloom SR (2006). Gut peptides in the regulation of food intake and energy homeostasis. *Endocrine Reviews* 27: 719-727.
- Musso G, Gambino R, De Michieli F, Cassader M, Rizzetto M, Durazzo, Fagá E, Silli B, Pagano G (2003). Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 37: 909-916.

N

- Nagaoka S, Futamura Y, Miwa K, Awano T, Yamauchi K, Kanamaru Y, Tadashi K, Kuwata T (2001). Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk β -lactoglobulin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 281: 11-17.
- Nagaoka S, Nakamura YA, Shibata H, Kanamaru Y (2010). Soystatin (VAWWMY), a novel bile acid-binding peptide, decreased micellar solubility and inhibited cholesterol absorption in rats. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 74: 1738-1741.
- Naito HK, David JA (1984). Laboratory considerations: Determination of cholesterol, triglyceride, phospholipid, and other lipids in blood and tissues. *Laboratory and Research Methods in Biology and Medicine* 10: 1-76.
- Nakamura T, Mizutani J, Ohki K, Yamada K, Yamamoto N, Takeshi M, Takazawa K (2011). Casein hydrolysate containing val-pro-pro and ile-pro-pro improves central blood pressure and arterial stiffness in hypertensive subjects: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Atherosclerosis* 219: 298-303.
- Neuschwander-Tetri BA, Brint EM, Wehmeier KR, Oliver D, Bacon BR (2003). Improved non-alcoholic steatohepatitis after 48 weeks of treatment with the PPAR-gamma ligand rosiglitazone. *Hepatology* 38: 1008-1017.
- Nielsen KC, Owman C, Sporrang B (1971). Ultrastructure of the autonomic innervation apparatus in the main pial arteries of rats and cats. *Brain Research* 27: 25-32.
- Nishimatsu H, Suzuki E, Satonaka H, Takeda R, Omata M, Fujita T, Nagai R, Kitamura T, Hirata Y (2005). Endothelial dysfunction and hypercontractility of vascular myocytes are ameliorated by fluvastatin in obese Zucker rats. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 288: H1770-H1776.

- Nongonierma AB, FitzGerald RJ (2013). Dipeptidyl peptidase IV inhibitory and antioxidative properties of milk protein-derived dipeptides and hydrolysates. *Peptides* 39:157-163.
- Nongonierma AB, FitzGerald RJ (2013). Dipeptidyl peptidase IV inhibitory properties of a whey protein hydrolysate: influence of fractionation, stability to simulated gastrointestinal digestion and food-drug interaction. *International Dairy Journal* 32:33-39.
- Noto A, Zahradka P, Yurkova N, Xie X, Nitschmann E, Ogborn M, Taylor CG (2006). Conjugated linoleic acid reduces hepatic steatosis, improves liver function, and favorably modifies lipid metabolism in obese insulin-resistant rats. *Lipids* 41: 179-188.

O

- Oana F, Takeda H, Hayakawa K, Matsuzawa A, Akahane S, Isaji M, Akahane M (2005). Physiological difference between obese (fa/fa) Zucker rats and lean Zucker rats concerning adiponectin. *Metabolism: Clinical and Experimental* 54: 995-1001.
- Obrasova IG, Van Huysen C, Fathallah L ... (2002). An aldose reductase inhibitor reverses early diabetes-induced changes in peripheral nerve function, metabolism, and antioxidative defense. *FASEB Journal* 16: 123-125.
- O'Donnell MP, Kasiske BL, Clearly MP, Keane WF (1985). Effects of genetic obesity on renal structure and function in the Zucker rat, II: micropuncture studies. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 106: 605-610.
- Old LJ (1985). Tumor necrosis factor (TNF). *Science* 230: 630-632.
- Oltman CL, Richou LL, Davidson EP, Coppey LJ, Lund DD, Yorek MA (2006). Progression of coronary and mesenteric vascular dysfunction in Zucker obese and Zucker diabetic fatty rats. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 291: H1780-H1787.
- Oltman CL, Davidson EP, Coppey LJ, Kleinschmidt TL, Lund DD, Yorek MA (2008). Attenuation of vascular/neural dysfunction in Zucker rats treated with enalapril or rosuvastatin. *Obesity* 16: 82-89.
- OMS 2004: ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD 57ª ASAMBLEA MUNDIAL DE LA SALUD A57/9 Punto 12.6 del orden del día provisional 17 de abril de 2004 Estrategia mundial sobre régimen alimentario, actividad física y salud WHA55.23
- OMS expert consultation (2004). Appropriate body-mass index for Asian populations and its implications for policy and intervention strategies. *The Lancet* 157-163.
- Ondetti MA, Rubin B, Cushman DW (1977). Design of specific inhibitors of angiotensin converting enzyme: New class of orally active antihypertensive agents. *Science* 196: 441-444.

- Otani L, Ninomiya T, Murakami M, Osajima K, Kato H, Murakami T (2009). Sardine peptide with angiotensin i-converting enzyme inhibitory activity improves glucose tolerance in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 73: 2203-2209.
- Ou BX, Hampsch-Woodill M, Prior RL (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 4619-4626.
- Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Nishida M, Matsuyama A, Okamoto Y, Ishigami M, Kuriyama H, Kishida K, Nishizawa H, Hotta K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y (2001). Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation* 103: 1057–1063.
- Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y, Walsh K (2003). Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease. *Current Opinion in Lipidology* 14: 561-566.

P

- Pajvani UB, Scherer PE (2003). Adiponectin: systemic contributor to insulin sensitivity. *Current Diabetes Reports* 3 :207-213.
- Palou A, Serra F, Bonet ML, Picó C (2000). Obesity: Molecular bases of a multifactorial problem. *European Journal of Nutrition* 39: 127-144.
- Perrault L P, Nickner C, Desjardins N, Dumont É, Thai P, Carrier M (2001). Improved preservation of coronary endothelial function with celsior compared with blood and crystalloid solutions in heart transplantation. *Journal of Heart and Lung Transplantation* 20: 549-558.
- Peterson GL (1979). Review of the folin phenol protein quantitation method of lowry, rosebrough, farr and randall. *Analytical Biochemistry* 100: 201-220.
- Phillips MS, Liu QY, Hammond HA, Dugan V, Hey PJ, Caskey CT, Hess JF (1996). Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. *Nature Genetic* 13:18-19.
- Phillips SA, Sylvester FA, Frisbee JC (2005). Oxidant stress and constrictor reactivity impair cerebral artery dilation in obese zucker rats. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 288: R522-R530.
- Pi-Sunyer FX, Aronne LJ, Heshmati HM, Devin J, Rosenstock J (2006). Effect of rimonabant, a cannabinoid-1 receptor blocker, on weight and cardiometabolic risk factors in overweight

- or obese patients - RIO-north america: A randomized controlled trial. *Journal of the American Medical Association* 295: 761-775.
- Picchi A, Gao X, Belmadani S, Potter BJ, Focardi M, Chilian WM (2006). Tumor necrosis factor- α induces endothelial dysfunction in the prediabetic metabolic syndrome. *Circulation Research* 99: 69-77.
- Picó C, Sánchez J, Oliver P, Palou A (2002). Leptin production by the stomach is up-regulated in obese (fa/fa) Zucker rats. *Obesity Research* 10: 932-938.
- Pieter BJW (2006). Protein hydrolysate enriched in peptides inhibiting DPP-IV and their use. *WO 2006/068480 200*.
- Pihlanto-Leppälä A (2000). Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: Opioid and ACE-inhibitory peptides. *Trends in Food Science and Technology* 11: 347-356.
- Pikavance LC, Tadayyon M, Widdowson PS, Buckingham RE, Wilding JPH (1999). Therapeutic index for rosiglitazone in dietary obese rats: separation of efficacy and haemodilution. *British Journal of Pharmacology* 128: 1570-1576.
- Pilz S, Scharnagl H, Tiran B ... (2006) Free fatty acids are independently associated with all cause and cardiovascular mortality in subjects with coronary artery disease. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 91: 2542-2547.
- Pittas AG, Greenberg AS (2002). Thiazolidinediones in the treatment of diabetes. *Expert Opin Pharmacother* 3:529-540.
- Poirier B, Lannaud-Bournoville M, Conti M, Bazin R, Michel O, Bariéty J, Chevalier J, Myara I (2000). Oxidative stress occurs in absence of hyperglycaemia and inflammation in the onset of kidney lesions in normotensive obese rats. *Nephrology Dialysis Transplantation* 15: 467-476.
- Poirier B, Michel O, Bazin R, Bariéty J, Chevalier J, Myara I (2001). Conjugated dienes: A critical trait of lipoprotein oxidizability in renal fibrosis. *Nephrology Dialysis Transplantation* 16: 1598-1606.
- Poirier P, Giles TD, Bray GA, Hong Y, Stern JS, Pi-Sunyer FX, Eckel RH (2006). Obesity and cardiovascular disease: Pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: an update of the 1997 American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease from the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. *Circulation* 113: 898-918.
- Porez G, Prawitt J, Gross B, Staels B (2012). Bile acid receptors as targets for the treatment of dyslipidemia and cardiovascular disease. *Journal of Lipid Research* 53: 1723-1737.
- Poynten AM, Gan SK, Kriketos AD, Campbell LV, Chisholm DJ (2005). Circulating fatty acids, non-high density lipoprotein cholesterol, and insulin-infused fat oxidation acutely influence

whole body insulin sensitivity in non-diabetic men. *Clinical Endocrinology & Metabolism* 90: 1035-1040.

Pravenec M, Kurtz TW (2007). Molecular genetics of experimental hypertension and the metabolic syndrome: From gene pathways to new therapies. *Hypertension* 49: 941-952.

Promrat K, Lutchman G, Uwaifo GI, Freedman RJ, Soza A, Heller Doo E, Ghany M, Premkumar A, Park Y, Liang TJ, Yanovski JA, Kleiner DE, Hoofnagle JH (2004). A pilot study of pioglitazone treatment for nonalcoholic bsteatohepatitis. *Hepatology* 39: 188-196.

Q

Quiñones M, Sánchez D, Muguerza B, Moulay L, Laghi S, Miguel M, Aleixandre A (2010). Long-term intake of CoccoanOX attenuates the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry* 122: 1013-1019.

Quirós A, Contreras MD, Ramos M, Amigo L, Recio I (2009). Stability to gastrointestinal enzymes and structure-activity relationship of beta-casein-peptides with antihypertensive properties. *Peptides* 30: 1848-1853.

R

Rader DJ (2007). Effect of insulin resistance, dyslipidemia, and intra-abdominal adiposity on the development of cardiovascular disease and diabetes mellitus. *American Journal of Medicine* 120: S12-S18.

Raimundo M, Lopes JA (2011). Metabolic syndrome, chronic kidney disease, and cardiovascular disease: a dynamic and life-threatening triad. *Cardiology research and practice* 747861.

Raksakulthai R, Haard NF (2003). Exopeptidases and their application to reduce bitterness in food: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 43: 401-405.

Randall MD, Gardiner SM, Bennett T (1997). Enhanced cardiac preconditioning in the isolated heart of the transgenic ((mREN-2)27) hypertensive rat. *Cardiovascular Research* 33: 400-409.

Rashid S, Uffelman KD, Lewis GF (2002). The mechanism of HDL lowering in hypertriglyceridemic, insulin-resistant states. *Journal of Diabetes Complications* 16: 24-28.

Ratliff J, Leite JO, de Ogburn R, Puglisi MJ, VanHeest J, Fernandez ML (2010). Consuming eggs for breakfast influences plasma glucose and ghrelin, while reducing energy intake during the next 24 hours in adult men. *Nutrition Research* 30: 96-103.

Reasner CA. Where thiazolinediones will fit (2002). *Diabetes Metab Res Rev Suppl* 82:530-535.

Reaven GM (1988). Role of insulin resistance in human disease. *Diabete*, 37: 1595-1607.

- Reglamento (CE) Nº 1924/2006: REGLAMENTO (CE) No1924/2006 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 20 de diciembre de 2006 relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos. <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:404:0009:0025:ES:PDF>
- Reisen E, Abel R, Modan M, Silverberg DS, Eliahou HE, Modan B (1978). Effect of weight loss without salt restriction on the reduction of blood pressure in overweight hypertensive patients. *New England Journal of Medicine* 298: 1-6.
- Richards RJ, Porter JR, Inserra F, Ferder LF, Stella I, Reisin E, Svec F (2001). Effects of dehydroepiandrosterone and quinapril on nephropathy in obese Zucker rats. *Kidney International* 59: 37-43.
- Rivera L, Morón R, Zarzuelo A, Galisteo M (2009). Long-term resveratrol administration reduces metabolic disturbances and lowers blood pressure in obese Zucker rats. *Biochemical Pharmacology* 77: 1053-1063.
- Roberfroid M, Gibson GR, Hoyles L, McCartney AL, Rastall R, Rowland, Wolvers D, Watzl B, Szajewska H, Stahl B, Guarner F, Respondek F, Whelan K, Coxam V, Davicco MJ, Leotoing L, Wittrant Y, Delzenne NM, Cani PD, Neyrinck AM, Meheust A (2010). Prebiotic effects: Metabolic and health benefits. *British Journal of Nutrition* 104: S1-S63.
- Robinson AC, Burke J, Robinson S (1998). The effects of metformin on glycemic control and serum lipids in Insulin-Treated NIDDM Patients with Sub optimal Metabolic Control. *Diabetes Care* 21: 701-705.
- Rocchini AP, Moorehead C, Wentz E, Deremer S (1987). Obesity-induced hypertension in the dog. *Hypertension* 9: III,64-III-68.
- Rocchini AP, Moorehead CP, DeRemer S, Bondie D (1989). Pathogenesis of weight-related changes in blood pressure in dogs. *Hypertension* 13: 922-928.
- Rodriguez-Martinez MA, Ruiz-Torres A (1992). Homeostasis between lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in healthy human aging. *Mechanisms of Ageing and Development* 66: 213-222.
- Roeschlau P, Bernt E, Gruber W (1974). Enzymatic determination of total cholesterol in serum. *Zeitschrift Fur Klinische Chemie Und Klinische Biochemie* 12: 226.
- Romanko OP, Stepp DW (2005). Reduced constrictor reactivity balances impaired vasodilation in the mesenteric circulation of the obese Zucker rat. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 289: H2097-H2102.
- Romero AL, West KL, Zern T, Fernandez ML (2002). The seeds from plantago ovata lower plasma lipids by altering hepatic and bile acid metabolism in guinea pigs. *Journal of Nutrition* 132: 1194-1198.

- Ronti T, Lupattelli G, Mannarino E (2006). The endocrine function of adipose tissue: An update. *Clinical Endocrinology* 64: 355-365.
- Rossoni LV, Salaices M, Marín J, Vassallo DV, Alonso MJ (2002). Alterations in phenylephrine-induced contractions and the vascular expression of Na^+K^+ -ATPase in ouabain-induced hypertension. *British Journal of Pharmacology* 135: 771-781.
- Rutherford-Markwick KJ, Moughan PJ (2005). Bioactive peptides derived from food. *Journal of AOAC International* 88: 955-966.

S

- Sacks FM, Lichtenstein A, Van Horn L, Harris W, Kris-Etherton P, Winston M (2006). Soy protein, isoflavones, and cardiovascular health: An american heart association science advisory for professionals from the nutrition committee. *Circulation* 113: 1034-1044.
- Saito T, Nakamura T, Kitazawa H, Kawai Y, Itoh T (2000) Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese. *Journal of Dairy Science* 83: 1434-1440.
- Salehi M, Aulinger BA, D'Alessio DA (2008). Targeting β -cell mass in type 2 diabetes: Promise and limitations of new drugs based on incretins. *Endocrine Review*, 29: 367-379.
- Samaranayaka AGP, Li-Chan ECY (2011). Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of Functional Foods* 3: 229-254.
- Sampey BP, Vanhoose AM, Winfield HM, Freerman AJ, Muehlbauer MJ, Fueger PT, Newgard CB, Makowski L (2011). Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: Comparison to high-fat diet. *Obesity* 19: 1109-1117.
- Sánchez D (2008). Estudio experimental del efecto de la administración de dietas ricas en fibra sobre diferentes variables que aparecen alteradas en el síndrome metabólico. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Sánchez D, Quiñones M, Moulay L, Mugerza B, Miguel M, Aleixandre A (2011). Soluble fiber-enriched diets improve inflammation and oxidative stress biomarkers in Zucker fatty rats. *Pharmacological Research* 64: 31-35.
- Sanyal AJ, Contos MJ, Sterling RK, Luketic VA, Shiffman ML, Stravitz RT, Mills AS (2003). Nonalcoholic fatty liver disease in patients with hepatitis C is associated with features of the metabolic syndrome. *American Journal of Gastroenterology* 98: 2064-2071.
- Sanz Y, Santacruz A, Dalmau J (2009). Influence of the intestinal microbiota on obesity and on metabolic disorders. *Acta Pediátrica Española* 67: 437-442.

- Saravanan R, Shanmugam A (2010). Preventive effect of low molecular weight glycosaminoglycan from *amussium pleuronectus* (linne) on oxidative injury and cellular abnormalities in isoproterenol-induced cardiotoxicity in wistar rats. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 162: 43-51.
- Schnitzler M, Fisch P (2012). A role for microchimerism in obesity and evolution? *Medical Hypotheses* 78: 528-532.
- Scholle JM, Baker WL, Talati R, Coleman CI (2009). The effect of adding plant sterols or stanols to statin therapy in hypercholesterolemic patients: Systematic review and meta-analysis. *Journal of the American College of Nutrition* 28: 517-524.
- Schonfeld G, Pflieger B (1971). Overproduction of very low-density lipoproteins by livers of genetically obese rats. *American Journal of Physiology* 220: 1178-1181.
- Scruggs P, Filipeanu CM, Yang J, Chang JK, Dun NJ. (2004) Interaction of ovokinin (2-7) with vascular bradykinin 2 receptors. *Regul Peptides* 120:85-91.
- Segura-Campos M, Chel-Guerrero L, Betancur-Ancona D (2010). Effect of digestion on bioavailability of peptides with biological activity. *Revista Chilena De Nutrición* 37: 386-391.
- Sentandreu MA, Toldra F (2006). A fluorescence-based protocol for quantifying angiotensin-converting enzyme activity. *Nature protocols* 1: 2423-2427.
- Shahidi F, Zhong Y (2008). Bioactive peptides. *Journal of AOAC International* 91: 914-931.
- Seppo L, Jauhiainen T, Poussa T, Korpela R (2003). A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *American Journal of Clinical Nutrition* 77: 326-330.
- Serpillon S, Floyd BC, Gupte RS, George S, Kozicky M, Neito V, Recchia F, Stanley W, Wolin MS, Gupte SA (2009). Superoxide production by NAD(P)H oxidase and mitochondria is increased in genetically obese and hyperglycemic rat heart and aorta before the development of cardiac dysfunction. The role of glucose-6-phosphate dehydrogenase-derived NADPH. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 297: H153-H162.
- Schaefer JR, Maisch B, Klumpp S, Kriegelstein J (2005). Why does atherosclerosis occur where it occurs? *Atherosclerosis* 180: 417-418.
- Shankar SS, Steinberg HO (2005). Obesity and endothelial dysfunction. *Seminars in Vascular Medicine* 5: 56-64.
- Shimizu M, Son DO (2007). Food-derived peptides and intestinal functions. *Current Pharmaceutical Design* 13: 885-895.
- Shinozaki K, Nishio Y, Ayajiki K, Yoshida Y, Masada M, Kashiwagi A, Okamura T (2007). Pitavastatin restores vascular dysfunction in insulin-resistant state by inhibiting NAD(P)H

- oxidase activity and uncoupled endothelial nitric oxide synthase-dependent superoxide production. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 49: 122-130.
- Siddiqui AH, Hussain T (2007). Enhanced AT1 receptor-mediated vasocontractile response to ANG II in endothelium-denuded aorta of obese Zucker rats. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 292: H1722-H1727.
- Sierra-Honigsmann MR, Nath AK, Murakami C, García-Cardena G, Papapetropoulos A, Sessa WC, Madge LA, Schechner JS, Schwabb MB, Polverini PJ, Flores-Riveros, JR (1998). Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science* 281: 1683-1686.
- Silva SV, Pihlanto A, Malcata FX (2006). Bioactive peptides in ovine and caprine cheeselike systems prepared with proteases from *Cynara cardunculus*. *Journal of Dairy Science* 89: 3336-3344.
- Silveira ST, Martínez-Maqueda D, Recio I, Hernández-Ledesma B (2013). Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptides generated by tryptic hydrolysis of a whey protein concentrate rich in β -lactoglobulin. *Food Chemistry* 141: 1072-1077.
- Singla P, Bardoloi A, Parkash AA (2010). Metabolic effects of obesity: A review. *World Journal of Diabetes* 1: 76-88.
- Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C, Hauner H (2007). Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 92: 1023-1033.
- Solyom BC, Bourassa MG, Campeau L, Sniderman A, Marcil M, Lespérance J, Lévesque S, Varga S (2004). Effect of increasing metabolic syndrome score on atherosclerotic risk profile and coronary artery disease angiographic severity. *American Journal of Cardiology* 93: 159-164.
- Steinberg HO, Chaker H, Leaming R, Johnson A, Brechtel G, Baron AD (1996). Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation* 97: 2601-2610.
- Stepp DW, Boesen EI, Sullivan JC, Mintz JD, Hair CD, Pollock DM (2007). Obesity augments vasoconstrictor reactivity to angiotensin II in the renal circulation of the Zucker rat. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 293: H2537-H2542.
- Stefan N, Vozarova B, Funahashi T, Matsuzawa Y, Weyer C, Lindsay RS, Youngren JF, Havel PJ, Pratley RE, Bogardus C, Tataranni PA (2002). Plasma adiponectin concentration is associated with skeletal muscle insulin receptor tyrosine phosphorylation and low plasma concentration precedes a decrease in whole-body insulin sensitivity in humans. *Diabetes* 51: 1884-1888.

- Stern J, Johnson PR, Greenwood MR, Zucker LM, Hirsch J (1972). Insulin resistance and pancreatic insulin release in the genetically obese zucker rat. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 139: 66-69.
- Stern MP, Williams K, González-Villalpando C, Hunt KJ, Haffner SM (2004). Does the metabolic syndrome improve identification of individuals at risk of type 2 diabetes and/or cardiovascular disease? *Diabetes Care* 27: 2676-2681.
- Stich V, Berlan M (2004). Physiological regulation of NEFA availability: lipolysis pathway. *Proceedings of the Nutrition Society* 63: 369-374
- Subramanian R, MacLeod KM (2003). Age-dependent changes in blood pressure and arterial reactivity in obese zucker rats. *European Journal of Pharmacology* 477: 143-152.
- Sugino H, Nitoda T, Juneja LR (1997). General chemical composition of hen eggs. In: *Hen Eggs, their basic and applied science*; Yamamoto T, Juneja LR, Hatta H, Kim M, Eds: CRC Press, Inc: New York, New York pp. 13-24.
- Summerbell CD, Waters E, Edmund, LD, Kelly S, Brown T, Campbell KJ. (2005) Interventions for preventing obesity in children. The Cochrane database of systematic reviews 3: CD001871
- Swales JD (1995). Salt and blood pressure revisited. *Journal of Human Hypertension* 9: 517-521.
- Sweeting HN (2007). Measurement and definitions of obesity in childhood and adolescence: A field guide for the uninitiated. *Nutrition Journal* 6.

T

- Takaya K, Ogawa Y, Isse N, Okazaki T, Satoh N, Masuzaki H, . . . Nakao K (1996). Molecular cloning of rat leptin receptor isoform complementary DNAs-identification of a missense mutation in zucker fatty (fa/fa) rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 225: 75-83.
- Takeo S, Kamiyama T, Kaizuka Y, Ohya Y, Miyake K (1995). Influence of sematilide on ischemia/reperfusion injury to perfused rat hearts. *Pharmacometrics* 50: 135-41.
- Temel RE, Tang W, Ma Y, Rudel LL, Willingham MC, Ioannou YA, Yu L (2007). Hepatic niemann-pick C1-like 1 regulates biliary cholesterol concentration and is a target of ezetimibe. *Journal of Clinical Investigation* 117: 1968-1978.
- Temussi PA (2012). The good taste of peptides. *Journal of Peptide Science* 18: 73-82.
- Tilg H, Moschen AR (2006). Adipocytokines: Mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nature Reviews Immunology* 6: 772-783.

- Tofovic SP, Jackson EK (2003). Rat models of the metabolic syndrome. *Methods in Molecular Medicine* 86: 29-46.
- Tracey KJ. Tumor necrosis factor-alpha. En: Thomson A. *The cytokine handbook*, ed 2, San Diego C.A: *Academic Press* 1994; 289-300.
- Trinder P (1969). Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *Journal of Clinical Pathology* 22: 158-161.
- Tucker B, Fabbian F, Giles M, Thuraisingham RC, Raine AEG, Baker LRI (1997). Left ventricular hypertrophy and ambulatory blood pressure monitoring in chronic renal failure. *Nephrology Dialysis Transplantation* 12: 724-728.
- Tulipano G, Sibilia V, Caroli AM, Cocchi D (2011). Whey proteins as source of dipeptidyl dipeptidase IV (dipeptidyl peptidase-4) inhibitors. *Peptides* 32: 835-838.
- Tuomilehto J (2001). Vascular complications in type 2 diabetes: Current perspectives. *Practical Diabetes International* 18: S19-S24.
- Tuomilehto J, Lindström J, Hyyrynen J, Korpela R, Karhunen M, Mikkola L, Jauhiainen T, Seppo L, Nissinen A (2004). Effect of ingesting sour milk fermented using lactobacillus helveticus bacteria producing tripeptides on blood pressure in subjects with mild hypertension. *Journal of Human Hypertension* 18: 795-802.
- Turkenkopf IJ, Olsen JL, Moray L, Greenwood MRC, Johnson PR (1980). Hepatic lipogenesis in the preobese Zucker rat. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 164: 530-533.
- Turner NC, White P (1996). Effects of streptozotocin-induced diabetes on vascular reactivity in genetically hyperinsulinaemic obese Zucker rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 27: 884-890.
- Summerbell CD, Waters E, Edmunds LD, Kelly S, Brown T, Campbell KJ (2005). Interventions for preventing obesity in children. *Cochrane Database of Systematic Reviews (Online)* (3).
- Turpeinen A M, Ehlers PI, Kivimäki AS, Järvenpää S, Filler I, Wiegert E . . . Wagner F (2011). Ile-pro-pro and val-pro-pro tripeptide-containing milk product has acute blood pressure lowering effects in mildly hypertensive subjects. *Clinical and Experimental Hypertension* 33: 388-396.

U

- Ueno H, Kanellakis P, Agrotis A, Bobik A (2000). Blood flow regulates the development of vascular hypertrophy, smooth muscle cell proliferation, and endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *Hypertension*, 36: 89-96.

Unger T, Gohlke P (1990). Tissue renin-angiotensin systems in the heart and vasculature: Possible involvement in the cardiovascular actions of converting enzyme inhibitors. *American Journal of Cardiology* 65:31-101.

V

Vague J (1947). La differenciation sexuelle facteur determinant des forme de l'obesité. *La Presse Médicale* 30: 339-340.

Van De Laar FA, Lucassen PLBJ, Akkermans RP, Van De Lisdonk EH, De Grauw WJC (2006). Alpha-glucosidase inhibitors for people with impaired glucose tolerance or impaired fasting blood glucose. *Cochrane Database of Systematic Reviews* (4).

Van der Plancken I, Van Remoortere M, Van Loey A, Hendrickx ME (2004). Trypsin inhibition activity of heat-denatured ovomucoid: A kinetic study. *Biotechnology Progress* 20: 82-86.

Van Gaal LF, Rissanen A M, Scheen AJ, Ziegler O, Rössner S (2005). Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-europe study. *Lancet* 365: 1389-1397.

Vander Wal JS, Marth JM, Khosla P, Jen KC, Dhurandhar NV (2005). Short-term effect of eggs on satiety in overweight and obese subjects. *Journal of the American College of Nutrition* 24: 510-515.

Vasselli JR, Cleary MP, Jen KLC, Greenwood MRC (1980). Development of food motivated behavior in free feeding and food restricted Zucker fatty (*fa/fa*) rats. *Physiology & Behaviour* 25: 565-573.

Vegh A, Szekeres L, Parratt J (1992). Preconditioning of the ischaemic myocardium; involvement of the L-arginine nitric oxide pathway. *British Journal of Pharmacology* 107: 648-52.

Vera G, López-Miranda V, Herradón E, Martín MI, Abalo R (2012). Characterization of cannabinoid-induced relief of neuropathic pain in rat models of type 1 and type 2 diabetes. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 102: 335-343.

Vermeirssen V, Van Camp J, Decroos K, Van Wijmelbeke L, Verstraete W (2003). The impact of fermentation and in vitro digestion on the formation of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity from pea and whey protein. *Journal of Dairy Science* 86: 429-438.

Villalba N, Martínez P, Briones AM, Sánchez A, Salaíces M, García-Sacristán A, Hernández M, Benedito S, Prieto D (2009). Differential structural and functional changes in penile and coronary arteries from obese zucker rats. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 297: H696-H707.

Vilsbøll T, Krarup T, Deacon CF, Madsbad S, Holst JJ (2001). Reduced postprandial concentrations of intact biologically active glucagon-like peptide 1 in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 50: 609-613.

W

Wagner CE, Jurutka PW, Marshall PA, Groy TL, Van Der Vaart A, Ziller J, Furmick JK, Graeber ME, Matro E, Miguel BV, Tran IT, Kwon J, Tedeschi JN, Moosavi S, Danishyar A, Philp JS, Khamees RO, Jackson JN, Grupe DK, Badshah SL, Hart JW (2009). Modeling, synthesis and biological evaluation of potential retinoid X receptor (RXR) selective agonists: Novel analogues of 4-[1-(3,5,5,8,8-pentamethyl-5,6,7,8-tetrahydro-2-naphthyl)ethynyl]benzoic acid (bexarotene). *Journal of Medicinal Chemistry* 52: 5950-5966.

Waine C (2005). The metabolic syndrome: The whole is more than the sum of its parts. *Journal of Men's Health and Gender* 2: 170-178.

Wang W, Gonzalez De Mejia E (2005). A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 4: 63-78.

Wang M, Grayburn P, Chen S, Ravazzola M, Orci L, Unger RH (2008). Adipogenic capacity and the susceptibility to type 2 diabetes and metabolic syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 6139-6144.

Wang Z, Ma J, Si D (2010). Optimal cut-off values and population means of waist circumference in different populations. *Nutrition Research Reviews* 23: 191-199.

Wang ZX, Nakayama T (2010). Inflammation, a Link between Obesity and Cardiovascular Disease. *Mediators of Inflammation* 535918.

Wang Y, Landheer S, van Gilst WH, van Amerongen A, Hammes H, Henning RH. . . Buikema H (2012). Attenuation of renovascular damage in Zucker diabetic fatty rat by NWT-03, an egg protein hydrolysate with ACE- and DPP4-inhibitory activity. *PLoS ONE* 7(10).

Wassink AMJ, Olijhoek JK, Visseren FLJ (2007). The metabolic syndrome: Metabolic changes with vascular consequences. *European Journal of Clinical Investigation* 37: 8-17.

Weickert MO, Pfeiffer AFH (2008). Metabolic effects of dietary fiber consumption and prevention of diabetes. *Journal of Nutrition* 138: 439-442.

Westerterp-Plantenga MS, Nieuwenhuizen A, Tomé D, Soenen S, Westerterp KR (2009). Dietary protein, weight loss, and weight maintenance. *Annual Review of Nutrition* 29: 21-41.

- Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, Tataranni PA (2001). Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: Close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86: 1930-1935.
- Wickler SJ, Horwitz BA, Stern JS (1982). Regional blood flow in genetically obese rats during nonshivering thermogenesis. *International Journal of Obesity* 6: 481-490.
- Wiggers GA, Peçanha FM, Briones AM, Pérez-Girón JV, Miguel M, Vassallo DV, Cachofeiro V, Alonso MJ, Salaices M (2008). Low mercury concentrations cause oxidative stress and endothelial dysfunction in conductance and resistance arteries. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 295: H1033-H1043.
- Wilkinson IB, Cockcroft JR (1998). Cholesterol, endothelial function and cardiovascular disease. *Current Opinion in Lipidology* 9: 237-242.
- Witztum JL, Schonfeld G (1979). Lipoproteins in the plasma and hepatic perfusates of the Zucker fatty rat. *Diabetes* 28: 509–516.
- Wu J, Ding X. (2001) Hypotensive and physiological effect of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from soy protein on spontaneously hypertensive rats. *J Agric Food Chem* 49:501-506
- Wu X, Mäkynen H, Kähönen M, Arvola P, Pörsti I (1996). Mesenteric arterial function in vitro in three models of experimental hypertension. *Journal of Hypertension* 14: 365-372.

X

- Xavier FE, Salaices M, Márquez-Rodas I, Alonso MJ, Rossoni LV, Vassallo DV, Balfagón G (2004). Neurogenic nitric oxide release increase in mesenteric arteries from ouabain hypertensive rats. *Journal of Hypertension* 22: 949-957.

Y

- Yamada Y, Iwasaki M, Usui H, Ohinata K, Marczak ED, Lipkowski AW, Yoshikawa M (2010). Rapakinin, an anti-hypertensive peptide derived from rapeseed protein, dilates mesenteric artery of spontaneously hypertensive rats via the prostaglandin IP receptor followed by CCK1 receptor. *Peptides* 31: 909-914.
- Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Froguel P, Kadowaki T (2001). The fat-derived

- hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipotrophy and obesity. *Nature Medicine* 7: 941-946.
- Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Imai Y, Shimozawa N, Hioki K (2003). Globular adiponectin Protected ob/ob mice from diabetes and ApoE-deficient mice from atherosclerosis. *The Journal of Biological Chemistry* 278:2461-2468.
- Yoneda M, Hasegawa T, Nakamura K, Tamano M, Kono T, Terano A (2004). Vitamin E therapy in patients with NASH [1]. *Hepatology* 39: 568.
- Yoshie-Stark Y, Wasche A (2004). *In vitro* binding of bile acids by lupin protein isolates and their hydrolysates. *Food Chemistry* 88: 179-184.
- Young RA, Frink R, Longcope C (1982). Serum testosterone and gonadotropins in the genetically obese male Zucker rat. *Endocrinology* 111 :977-981.
- Yu Z, Yin Y, Zhao W, Wang F, Yu Y, Liu B, Liu J, Chen F (2011). Characterization of ACE-inhibitory peptide associated with antioxidant and anticoagulation properties. *Journal of Food Science* 76: C1149-C1155.
- Yu Z, Yin Y, Zhao W, Yu Y, Liu B, Liu J, Chen F (2011). Novel peptides derived from egg white protein inhibiting alpha-glucosidase. *Food Chemistry* 129: 1376-1382.
- Yu Z, Yin Y, Zhao W, Liu J, Chen F (2012). Anti-diabetic activity peptides from albumin against α -glucosidase and α -amylase. *Food Chemistry* 135: 2078-2085.
- Yuen VG, Pederson RA, Dai S, Orvig C, McNeill JH (1996). Effects of low and high dose administration of bis(maltolato)oxovanadium(IV) on fa/fa zucker rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 74: 1001-1009.

Z

- Zavaroni I, Bonora E, Pagliara M, Dall'Aglio E, Luchetti L, Buonanno G, Bonati PA, Bergonzani M, Gnudi L, Passeri M (1989). Risk factors for coronary artery disease in healthy persons with hypersulinemia and normal glucose tolerance. *New England Journal of Medicine* 320: 702-706.
- Zemel MB, Sowers JR, Shehin S, Walsh MF, Levy J (1990). Impaired calcium metabolism associated with hypertension in Zucker obese rats. *Metabolism* 39: 704-708.
- Zemel MB, Peuler JD, Sowers JR, Simpson L (1992). Hypertension in insulin-resistant zucker obese rats is independent of sympathetic neural support. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 262: E368-E371.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372: 425-432.

- Zhong F, Zhang X, Ma J, Shoemaker CF (2007). Fractionation and identification of a novel hypocholesterolemic peptide derived from soy protein alcalase hydrolysates. *Food Research International* 40: 756-762.
- Zhu C, Li G, Peng H, Zhang F, Chen Y, Li Y (2010). Treatment with marine collagen peptides modulates glucose and lipid metabolism in chinese patients with type 2 diabetes mellitus. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism* 35: 797-804.
- Ziegler O, Quilliot D (2000). Drug therapy of obesity in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes and Metabolism* 26:34-41.
- Zimmet P, Buyku EJ (1999). Etiology of the metabolic syndrome: potential role of insuline resistance, leptin resistance and other players. *Annals of the New York Academy of Sciences* 892:25-44.
- Zucker LM, Zucker TF (1961). Fatty, a new mutation in the rat. *Journal of Heredity* 52:275-278.
- Zucker TF, Zucker LM (1962). Hereditary obesity in the rat associated with high serum fat and cholesterol. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 110: 165-171.
- Zucker TF, Zucker LM (1963). Fat accretion and growth in the rat. *Journal of Nutrition* 80: 6-19.
- Zucker LM (1965). Hereditary obesity in the rat associated with hyperlipemia. *Annals of the New York Academy of Sciences* 131: 447-458.
- Zucker LM, Zucker TF (1967). Fatty, a new mutation in the rat. *Journal of Heredity* 32: 275-278.
- Zucker LM, Antoniadis HN (1972). Insulin and obesity in the Zucker genetically obese rat "fatty." *Endocrinology* 90: 1320-1330.